

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dušan D. Radojević

**UTICAJ SASTAVA MIKROBIOTE CREVA
NA IMUNOMODULATORNA SVOJSTVA
I IMUNOTERAPIJSKI POTENCIJAL
DENDRITSKIH ĆELIJA I SUPRESORSKIH
ĆELIJA MIJELOIDNOG POREKLA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dušan D. Radojević

**INFLUENCE OF INTESTINAL MICROBIOTA
COMPOSITION ON IMMUNOMODULATORY
PROPERTIES AND IMMUNOTHERAPEUTIC
POTENTIAL OF DENDRITIC CELLS AND
MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

dr Jelena Đokić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo

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

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Sergej Tomić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-Institut za primenu
nuklearne energije

dr Milica Markelić, docent
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Branko Jovčić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je realizovan u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu-Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Univerziteta u Beogradu-Instituta za primenu nuklearne energije u okviru PROMIS projekta Nano-MDSC-Thera (ev. br. 6062673, rukovodilac dr Sergej Tomić) koji je finansiran od strane Fonda za nauku Republike Srbije i ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 451-03-9/2021-14/200019, 451-03-9/2021-14/200042, 451-03-68/2022-14/200019 i 451-03-68/20 22-14/200042).

Na ovom putu podršku mi je pružilo dosta prijatelja i kolega koji su učinili da putovanje bude lakše. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Mentorki dr Jeleni Đokić, na posvećenosti, neiscrpnim idejama, strpljenju, razumevanju, temeljnom podučavanju i neizmernoj podršci tokom izrade eksperimentalnog i teorijskog dela ove disertacije. Jelena, hvala ti na prijateljstvu. Uloženi trud se uz dosta muke, ali još više smeha, na kraju isplatio.

Mentorki prof. dr Biljani Božić Nedeljković, na uvođenju u svet imunologije tokom osnovnih i master studija, na ažurnosti i pomoći prilikom spremanja dokumentacije za veća, kao i dragocenim sugestijama tokom izrade ove disertacije.

Dr Sergeju Tomiću, rukovodiocu projekta u okviru kojeg su realizovani ciljevi ove teze i članu Komisije, na dugogodišnjoj prijateljskoj saradnji, stručnoj pomoći, nesebičnoj podršci i pomoći pri izradi publikacija i disertacije. Zahvalan sam mu i na temeljnoj kritičkoj oceni teze.

Doc. dr Milici Markelić, na prijatnom vremenu provedenom na Fakultetu tokom izvođenja vežbi i prijateljskim razgovorima u autobusu na putu za Petnicu. Posebno joj zahvaljujem na podršci tokom doktorskih studija, pažljivom čitanju teksta doktorske disertacije i korisnim sugestijama koje su unapredile kvalitet teze.

Prof. dr Branku Jovčiću zahvaljujem na prihvatanju da bude član Komisije ove doktorske disertacije, izdvojenom vremenu, efikasnosti, detaljnim i stručnim korekcijama koje su doprinele finalnom izgledu teze.

Prof. dr Aleksandri Korać, na savetima i konstruktivnim razgovorima tokom školovanja i razmišljanja o daljem karijernom putu, prilici da budem „sa druge“ strane katedre i predavanjima iz ćelijske biologije koja su za mene bila svetla tačka prve godine na Biološkom fakultetu.

Prof. dr Maji Čakić Milošević, na pravovremenom obaveštavanju i brzim odgovorima na sve moje nedoumice u vezi sa obavezama i procedurama na Fakultetu.

Dr Nataši Golić na prilici da kao stipendista započnem svoj naučno-istraživački rad u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, gde sam upoznao sjajne ljude i prijatelje za ceo život. Dragim kolegama Amarelici, Milanu, Ivani, Jeleni, Goranu, Kaći, Maji, Mici, Nemanji S., Nemanji M., Goksiju, Jovanki, Danki, Dušanki, Nikoli, Dušanu, Mini, Lazi, Nidži, Jovani, Bisketu i Hris na pomoći, savetima, čašćenjima i veseloj atmosferi u laboratoriji. Mišku zahvaljujem na motivaciji u kritičnim trenucima. Kaji sam zahvalan što nije odustala od mene iako sam teška osoba. Emili, sapatnici u ovom akademskom podvigu, hvala na mentalnoj podršci i odličnom ukusu za hranu i piće. Bojziju, Kris, Ceci i Milki, hvala na svakom zajedničkom trenutku. Budućim doktorima Stefanu, Đolu, Makici, Marini i Dejani hvala na prijateljstvu, smehu i konstantnoj podršci.

Kolegicama sa Instituta za primenu nuklearne energije, Naci i Alisi, zahvalan sam na uvek dobroj i radnoj atmosferi tokom izrade eksperimenata u Zemunu, kao i na podučavanju u radu sa životinjskim modelom. Posebno se zahvaljujem Marini, na entuzijazmu i ogromnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije, njena energija i posvećenost eksperimentalnom radu zaslužuju svako divljenje.

Mojim savetnicama za životna pitanja Jovani, Mariji i Bojani zahvaljujem od srca na, do sada, uspešnoj navigaciji kroz život. Jovana, nadam se da sam konačno opravdao nadimak.

Želim da izrazim zahvalnost Marku, Bojanu, Mirjani, Marti, Lazaru, Vuji, Paji, Miši, Sofiji, Dragani, Danici, Vesni, Milošu, Aleksi, Dimitriju, Nenadu i Darku na divnim uspomenama koje su nastale na ovom putu, podršci i razumevanju za povremeni nedostatak slobodnog vremena za druženje. Jovani, Aleksi i Filpu hvala na podršci iz dijaspore i iskrenom prijateljstvu. Srećan sam i ponosan što vas imam u svom životu.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, jer su verovali u mene, pružili mi безусловnu podršku i vetar u leđa tokom čitavog školovanja, čime su svaki moj uspeh činili kompletnim. Ovu disertaciju posvećujem sestri i roditeljima.

Dušan Radojević

„Sve bolesti počinju u crevima...“

Hipokrat, (460-357. g. p. n. e)

Uticaj sastava mikrobiote creva na imunomodulatorna svojstva i imunoterapijski potencijal dendritskih ćelija i supresorskih ćelija mijeloidnog porekla

SAŽETAK

Transfer mijeloidnih ćelija imunogenih ili supresivnih svojstava, ima veliki potencijal u lečenju malignih tumora ali i autoimunskih bolesti. Međutim, nije do kraja ispitana veza funkcijskog potencijala mijeloidnih ćelija i sastava mikrobiote creva, kao jednog od ključnih regulatora imunskog sistema. U ovoj tezi je po prvi put ispitivana veza između sastava mikrobiote creva i funkcijskog potencijala mijeloidnih ćelija, i to humanih dendritskih ćelija (DC) i supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (MDSC) *in vitro*, kao i potencijal MDSC pacova da suprimiraju autoimunski proces u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE). Rezultati su pokazali da DC dobijene od zdravih donora koji su imali veći diverzitet mikrobiote creva i veću zastupljenost bakterija koje proizvode masne kiseline kratkog lanca (SCFA) poseduju slabiji imunogeni potencijal u odnosu na DC poreklom iz donora koji su imali manji diverzitet mikrobiote i veću zastupljenost rodova *Bifidobacterium* i *Collinsella*. U modelu humanih MDSC je pokazano da poliamini mikrobiote potenciraju imunosupresivna svojstva MDSC posredstvom intestinalnih epitelnih ćelija. Takođe, transfer MDSC aktiviranih prostaglandinom E2 (MDSC-PGE2) u životinje sa indukovanim EAE, ublažava simptome EAE nakon migracije u limfni sistem creva. Fenomen ublažavanja simptoma EAE nakon transfera MDSC-PGE2 je bio povezan sa smanjenom infiltracijom proinflamatornih i povećanom infiltracijom regulatornih ćelija u CNS i slezinu, očuvanjem integriteta intestinalne barijere, diverziteta mikrobiote creva i povećanjem zastupljenosti bakterija koje ispoljavaju imunoregulatorne osobine, poliamina i SCFA u fecesu. Ovi rezultati ukazuju na blisku povezanost mikrobiote creva i imunogenosti/supresivnosti mijeloidnih ćelija, što može biti iskorišćeno u razvoju novih efikasnijih terapija za maligne tumore i autoimunske bolesti.

Ključne reči: dendritske ćelije, antitumorska terapija, supresorske ćelije mijeloidnog porekla, autoimunske bolesti, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, mikrobiota creva, poliamini, masne kiseline kratkog lanca

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva; Imunobiologija

Influence of intestinal microbiota composition on immunomodulatory properties and immunotherapeutic potential of dendritic cells and myeloid derived suppressor cells

ABSTRACT

The transfer of myeloid cells with immunogenic or suppressive properties holds great potential for the treatment of malignant tumors or autoimmune diseases, respectively. However, the relationship between the functional potential of myeloid cells and the composition of the gut microbiota, one of the most important regulators of the immune system, has not yet been elucidated. In this thesis, we investigated for the first time the relationship between the gut microbiota composition and the functional potential of myeloid cells, in human dendritic cell (DC) and myeloid derived suppressor cells (MDSC) differentiated *in vitro*, and the potential of rat MDSCs to suppress the autoimmune response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model *in vivo*. The results showed that DCs from healthy donors with higher gut microbiota diversity and higher abundance of short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacteria have lower immunogenic potential, in contrast to DCs from donors with lower gut microbiota diversity and higher abundance of *Bifidobacterium* and *Collinsella* genera. In the human MDSC model, polyamines produced by the microbiota were shown to enhance the immunosuppressive properties of MDSCs by intestinal epithelial cells. Also, transfer of animal MDSCs activated with prostaglandin E2 (MDSC-PGE2) into animals with induced EAE alleviates EAE symptoms after migration to the intestinal lymphatic system. The phenomenon of alleviation of EAE symptoms after MDSC-PGE2 transfer was associated with decreased infiltration of pro-inflammatory and increased infiltration of regulatory cells in the CNS and spleen, maintenance of intestinal barrier integrity, diversity of the intestinal microbiota, and an increase in the abundance of immunoregulatory bacteria, polyamines, and SCFA in the feces. These results suggest a strong association between the gut microbiota and the immunogenicity/suppressiveness of myeloid cells that can be exploited in the development of new, more effective therapies for malignancies and autoimmune diseases.

Key words: dendritic cells, antitumor therapy, myeloid derived suppressor cells, autoimmune diseases, experimental autoimmune encephalomyelitis, gut microbiota, polyamines, short-chain fatty acids

Scientific filed: Biology

Scientific subfield: Cell and Tissue Biology; Immunobiology

LISTA SKRAĆENICA

- ALR** - receptori koji su slični receptorima odsutnim kod melanoma, engl. *Absent In Melanoma(AIM)-Like Receptors*
- ANCOM** - engl. *Analysis of Composition of Microbiomes*
- APC** - antigen prezentujuće ćelije, engl. *Antigen Presenting Cells*
- ARG-1** - arginaza 1
- BATF3** - engl. *Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*
- BCR** - B-ćelijski receptor, engl. *B-Cell Receptor*
- BH** - engl. *Benjamini-Hochberg*
- BSA** - goveđi serum albumin, engl. *Bovine Serum Albumin*
- cAMP** - ciklični adenzin-monofosfat, engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate*
- CAR-T** - T ćelije sa himernim antigenskim receptorom, engl. *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cells*
- CCR** - hemokinski receptor, engl. *C-C chemokine receptor*
- CD** - klaster diferencijacije, engl. *Cluster of Differentiation*
- cDC** - konvencionalne dendritske ćelije, engl. *Classical Dendritic Cells*
- cDNK** - komplementarna DNK, engl. *Complementary DNK*
- CFA** - kompletni Frojndov adjuvans, engl. *Complete Freund's Adjuvant*
- CLR** - lektinski receptori C-tipa, engl. *C-type Lectin Receptors*
- CLR** - engl. *Centered Log-Ratio*
- CNS** - centralni nervni sistem
- ConA** - konkanavalin A, engl. *Concanavalin A*
- COX-2** - ciklooksigenaza 2, engl. *Cyclooxygenase-2*
- CPI** - blokatori kontrolnih tačaka, engl. *Check Point Inhibitors*
- CSFE** - Karboksifluorescein sukcinimidil estar, engl. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- CTLA-4** - citotoksični T-limfocitni antigen 4, engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
- CXCL** - engl. *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*
- CXCR** - engl. *Chemokine (C-X-C motif) Receptor*
- Cy** - cijanin, engl. *Cyanine*
- DA** - engl. *Dark Agouti*
- DAMP** - molekularni obrasci oštećenja, engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*
- DC** - dendritske ćelije, engl. *Dendritic Cells*
- DMEM** - engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DT1** - dijabetes tip 1
- EAE** - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
- EGR** - engl. *Early Growth Response*
- ELISA** - enzimski imunosorbentni test, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- eMDSC** - supresorske ćelije mijeloidnog porekla rane faze, engl. *Early Stage Myeloid Derived Suppressor Cells*
- ENA** - Evropska arhiva nukleotidnih sekvenci, engl. *European Nucleotide Archive*
- ENS** - enterički nervni sistem

Fab - antigen-vezujući domen, engl. *Fragment antigen binding*

FBS - fetalni goveđeg serum, engl. *Fetal Bovine Serum*

Fc - kristalizujući fragment, engl. *Fragment crystalline*

FCS - fetalni serum teleta, engl. *Fetal Calf Serum*

FcεRI - visoko-afinitetni IgE-receptor, engl. *High Affinity Receptor for Immunoglobulin E*

FDR - korekcija višestrukih poređenja, engl. *False discovery rate*

FFA - receptori za slobodne masne kiseline, engl. *Free Fatty Acid Receptors*

FITC - fluorescein izocijanat, engl. *Fluorescein isothiocyanate*

Foxp3 - engl. *Forkhead Box P3*

GALT - limfno tkivo pridruženo crevima, engl. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GAPDH - Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza, engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GATA3 - engl. *GATA Binding Protein 3*

GCN2 - engl. *General Control Nonderepressible 2 Kinase*

G-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita, engl. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GF - bez mikroorganizama, engl. *Germ Free*

GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga, engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GPCR - receptori kuplovani sa G proteinom, engl. *G Protein-Coupled Receptor*

GRAS - lista generalno prihvaćenih kao sigurni, engl. *Generally Recognized As Safe*

HIF-1α - faktor kojeg indukuje hipoksija alfa, engl. *Hypoxia-Inducible Factor-1 a*

HLA - humani leukocitni antigen, engl. *Human Leucocyte Antigen*

HMGB1 - protein visoke pokretljivosti iz grupe 1, engl. *High-Mobility Group Box 1 protein*

HPLC - hromatografija pod visokim pritiskom, engl. *High Pressure Liquid Chromatography*

HSP - proteini toplotnog šoka, engl. *Heat shock proteins*

IDO - indoleamin 2,3-dezoksigenaza, engl. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

IEL - intraepitelni limfociti

IFN - interferon

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

ILC - urođene limfoidne ćelije, engl. *Innate Lymphoid Cells*

ILT - receptor koji se odlikuje po domenu sličnom imunoglobulinima, engl. *Immunoglobulin Like Transcript receptor*

imDC - nezrele dendritske ćelije, engl. *Immature Dendritic Cells*

iNOS - inducibilna azot oksid sintaza, engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*

IRAK - kinaza povezana sa receptorom za interleukin-1, engl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

IRF4 - regulatorni faktor interferona, engl. *Interferon Regulatory Factor 4*

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

iTreg - indukovani regulatorni T limfociti, engl. *induced regulatory T cells*

Jak - Janus kinaza, engl. *Janus kinase*

LEfSe - linearna diskriminaciona analiza koja uračunava veličinu efekta, engl. *Linear discriminant analysis Effect Size*

LPS - lipopolisaharid

MALT - limfna tkiva povezana sa mukozom, engl. *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MAMP - molekularni obrasci mikroorganizama, engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns*

MAPK - mitogenom-aktivirana proteinska kinaza, engl. *Mitogen-activated protein kinase*

MBP - bazni protein mijelina, engl. *Myelin Basic Protein*

MCP-1 - protein hemotakse monocita tip 1, engl. *Monocyte Chemotactic Protein-1*

M-CSF - faktor stimulacije kolonija makrofaga, engl. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

mDC - zrele dendritske ćelije, engl. *Mature Dendritic Cells*

MDSC - supresorske ćelije mijeloidnog porekla, engl. *Myeloid Derived Suppressor Cells*

MFI - srednja vrednost intenziteta fluorescence, engl. *Mean Fluorescence Intensity*

MGB - osa mikrobiota-crevo-mozak, engl. *Microbiota-Gut-Brain axis*

MHC - glavni kompleks tkivne histokompatibilnosti, engl. *Major Histocompatibility Complex*

M-MDSC - mononuklearne supresorske ćelije mijeloidnog porekla, engl. *mononuclear Myeloid Derived Suppressor Cells*

moDC - monocitne dendritske ćelije

MOG - mijelin oligodendrocitni glikoprotein

MS - multipla skleroza

MyD88 - protein primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije, engl. *Myeloid differentiation primary response 88*

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

Na-EDTA - natrijum etilendiamintetrasirćetna kiselina, engl. *Sodium ethylenediaminetetraacetate*

NF-κB - nukleusni faktor κB, engl. *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells*

NGS - sekvenciranje sledeće generacije, engl. *Next Generation Sequencing*

NK - urođenoubilačke ćelije, engl. *Natural Killer cells*

NKT limfociti - urođenoubilačke T-ćelije, engl. *Natural Killer T cell*

NLR - receptori slični nukleotid-vezujućem proteinu koji sadrži oligomerizacioni domen, engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing protein (NOD)-Like Receptors*

NO - azot oksid, engl. *Nitric Oxide*

Nrf2 - engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

nTreg - prirodni regulatorni T limfociti, engl. *natural regulatory T cells*

OTU - operaciona taksonomska jedinica, engl. *Operational Taxonomic Unit*

PAMP - molekularni obrasci patogena, engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBMC - mononuklearne ćelije periferne krvi, engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS - fosfatni pufer sa dodatkom soli, engl. *Phosphate Buffered Saline*

PCoA - engl. *Principal Coordinates Analysis*

PCR - polimerazna lančana reakcija, engl. *Polymerase Chain Reaction*

pDC - plazmocitoidne dendritske ćelije, engl. *Plasmacytoid Dendritic Cells*

PD-L1 - ligand proteina programirane ćelijske smrti, engl. *Programmed cell Death Ligand 1*

PE - fikoeritrin, engl. *Phytoerythrin*

PerCP - peridinin-hlorofil protein, engl. *Peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5*

PGE2 - Prostaglandin E2

PI - propidijum jodid, engl. *Propidium Iodide*

PLP - proteolipidni protein

PMN-MDSC - polimorfonuklearne supresorske ćelije mijeloidnog porekla, engl. *polymorphonuclear Myeloid Derived Suppressor Cells*

PPMS - primarno progresivna multipla skleroza

PRR - receptori za prepoznavanje obrazaca, engl. *Pattern Recognition Receptors*

QIIME2 - engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*

RA - reumatoidni artritis

rg - rekombinantni glodarski

RLR - receptori slični genu 1 koji indukuje retinoična kiselina, engl. *Retinoic acid-Inducible Gene-(RIG)-I-Like Receptors*

RNK - ribonukleinska kiselina

ROR γ t - engl. *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Gamma t*

ROS - reaktivne vrste kiseonika, engl. *Reactive Oxygen Species*

rpm - broj obrtaja u minuti, engl. *Revolutions Per Minute of rotor*

RPMI - engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*

RRMS - relapsno-remitentna multipla skleroza

RT-PCR - reakcije polimerizacije lanaca u realnom vremenu, engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

S1PR - sfingozin-1-fosfatni receptor, engl. *Sphingosine-1-phosphate receptor*

SAD - Sjedinjene Američke Države

SCFA - masne kiseline kratkog lanca, engl. *Short Chain Fatty Acids*

SFB - segmentisane filamentozne bakterije

SIRP α - signalni regulatorni protein alfa, engl. *Signal Regulatory Protein alpha*

SPF - bez specifičnih patogena, engl. *Specific Pathogen Free*

SPMS - sekundarno progresivna multipla skleroza

STAT - prevodnik signala i aktivator transkripcije, engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T-bet - engl. *T Box Expressed in T cells*

TCA - Krevsov ciklus, engl. *Tricarboxylic Acid Cycle*

TCR - T-ćelijski receptor, engl. *T-Cell Antigen Receptor*

TGF- β - transformišući faktor rasta-beta, engl. *Transforming Growth Factor- β*

Th - pomoćnički T limfociti, engl. *T helper cells*

TIR - Toll-interleukin-1 receptor, engl. *Toll/IL-1R*

TLR - receptori slični Toll-u, engl. *Toll-Like Receptors*

TNF- α - faktor nekroze tumora, engl. *Tumour Necrosis Factor*

tolDC - tolerogene dendritske ćelije, engl. *Tolerogenic Dendritic Cells*

Treg - regulatorni T limfociti, engl. *Regulatory T cells*

tRNK - transkripciona ribonukleinska kiselina

TSLP - limfopoetin strome timusa, engl. *Thymic Stromal Lymphopoietin*

UV - ultraljubičasto, engl. *ultraviolet*

VEGF - vaskularni endotelni faktora rasta, engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*

ZBTB46 - engl. *Zinc Finger And BTB Domain Containing 46*

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Osnovne funkcije imunskog sistema	1
1.1.1. Komponente urođenog imunskog sistema	1
1.1.1.1. Dendritske ćelije	3
1.1.1.2. Supresorske ćelije mijeloidnog porekla.....	5
1.1.2. Komponente stečenog imunskog sistema	9
1.2. Bolesti povezane sa poremećajem imunskog odgovora	13
1.2.1. Tumori.....	13
1.2.2. Autoimunske bolesti	17
1.2.2.1. Multipla skleroza.....	18
1.2.2.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis.....	20
1.3. Mikrobiota - osnovne karakteristike i pojmovi	22
1.3.1. Mikrobiota creva.....	23
1.3.2. Povezanost sastava i funkcije mikrobiote creva sa imunološkim bolestima.....	28
1.3.2.1. Mikrobiota creva i tumori	28
1.3.2.2. Mikrobiota creva u autoimunskim bolestima	29
1.3.3. Povezanost sastava i funkcije mikrobiote creva sa imunološkim terapijama	30
2. CILJEVI RADA	33
3. MATERIJAL I METODE.....	34
3.1. <i>In vitro</i> diferencijacija monocita periferne krvi u zrele DC.....	34
3.1.1. Sakupljanje uzoraka	34
3.1.2. Izolacija mononuklearne frakcije periferne krvi	34
3.1.3. Diferencijacija nezrelih DC iz monocita periferne krvi.....	35
3.1.4. Stimulacija sazrevanja nezrelih DC.....	35
3.1.5. Fenotipska i funkcijska karakterizacija nezrelih i zrelih DC	35
3.1.6. Potencijal DC za indukciju Th ćelijskog profila	36
3.2. Eksperimentalne životinje	36
3.3. <i>In vitro</i> diferencijacija imunosupresivnih MDSC iz progenitora kostne srži	36
3.3.1. Izolacija ćelija iz kostne srži DA pacova.....	36
3.3.2. Diferencijacija MDSC iz prekursora kostne srži.....	37
3.3.3. Diferencijacija makrofaga i DC iz prekursora kostne srži	37
3.3.4. Morfološka karakterizacija MDSC, makrofaga i DC	37

3.3.5. Funkcijska karakterizacija MDSC.....	38
3.3.5.1. Ispitivanje supresivne funkcije MDSC	38
3.3.5.1.1. Izolacija splenocita.....	38
3.3.5.1.2. Test supresije proliferacije splenocita	38
3.3.5.2. Merenje produkcije NO.....	38
3.4. Efekat MDSC na tok bolesti i imunski odgovor u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	39
3.4.1. Životinjski model multiple skleroze - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis pacova	39
3.4.2. Izazivanje eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod DA pacova, MDSC tretman i praćenje toka bolesti.....	39
3.4.3. Fenotipska karakterizacija ćelija.....	40
3.4.4. Merenje produkcije citokina.....	41
3.4.5. Mikroskopska analiza ćelijskog infiltrata u piku bolesti.....	41
3.4.6. Test praćenja kretanja MDSC.....	42
3.5. Dizajn <i>in vitro</i> eksperimenta u modelu intestinalne barijere.....	43
3.5.1. Uzgajanje i diferencijacija Caco-2, humane intestinalne ćelijske linije.....	43
3.5.2. Model intestinalne barijere i dizajn eksperimenta	43
3.5.3. Fenotipska karakterizacija humanih MDSC	44
3.5.4. ELISA test	44
3.6. Izolovanje ukupne RNK iz ćelija i tkiva	44
3.7. Reverzna transkripcija (RT) i polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qPCR)	45
3.8. Izolovanje ukupne DNK iz fecesa	46
3.9. Sekvenciranje dela gena za 16S ribozomsku RNK primenom metode sekvenciranja nove generacije	47
3.10. Obrada podataka dobijenih metodom sekvenciranja nove generacije	48
3.10.1. Obrada i statistička analiza metagenomskih podataka fecesa zdravih donora.....	48
3.10.2. Obrada i statistička analiza metagenomskih podataka dobijenih iz fecesa DA pacova.....	49
3.11. Dostupnost podataka	50
3.12. Kvantifikacija odabranih metabolita bakterija	50
3.12.1. Određivanje koncentracije masnih kiselina kratkog lanca u fecesu zdravih donora i fecesu DA pacova	50
3.12.2. Određivanje koncentracije poliamina u fecesu DA pacova.....	52
3.13. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze u fekalnom materijalu DA pacova	52
3.14. Statistička obrada podataka	52
4. REZULTATI.....	54

4.1. POVEZANOST OSOBINA MIKROBIOTE CREVA SA IMUNOGENIM KAPACITETOM HUMANIH DENDRITSKIH ČELIJA MONOCITNOG POREKLA.....	54
4.1.1. Analiza varijabilnosti ekspresije fenotipskih i funkcijskih markera nezrelih i zrelih DC između zdravih donora	54
4.1.2. Analiza varijabilnosti u produkciji citokina od strane nezrelih i zrelih DC.....	56
4.1.3. Korelacija ekspresije fenotipskih markera i produkcije citokina od strane na imDC i mDC.....	57
4.1.4. Povezanost sastava mikrobiote creva donora i kapaciteta njihovih monocita da se diferenciraju u imDC i odgovore na stimulus	58
4.1.5. Ispitivanje asocijacije zastupljenosti bakterija mikrobiote creava i kapaciteta monocita da se diferenciraju u imDC i odgovore na stimulus	60
4.1.6. Ispitivanje povezanosti nivoa masnih kiselina kratkog lanca produkovanih od strane mikrobiote creva i varijabilnosti diferenciranih DC između zdravih donora	61
4.2. UTICAJ MIKROBIOTE CREVA NA SUPRESIVNI KAPACITET I IMUNOTERAPIJSKI POTENCIJAL MDSC	63
4.2.1. Fenotipska i funkcijska analiza <i>in vitro</i> dobijenih MDSC	63
4.2.2. Ispitivanje imunosupresivnog potencijala MDSC na simptome EAE	66
4.2.3. Karakterizacija potencijalnih mehanizama u osnovi imunoterapijskog efekta MDSC <i>in vivo</i>	67
4.2.4. Analiza migracije MDSC nakon intraperitonealne primene u modelu EAE kod DA pacova	72
4.2.5. Uticaj MDSC na integritet intestinalne barijere u modelu EAE kod DA pacova	73
4.2.6. Povezanost sastava mikrobiote creva i efekata MDSC u modelu EAE kod DA pacova	73
4.2.7. Povezanost zastupljenosti bakterija mikrobiote creva i efekata MDSC u EAE	76
4.2.8. Predikciona analiza metaboličke aktivnosti mikrobiote creva i kvantifikacija odabranih metabolita	78
4.2.9. Modelovanje interakcije humanih MDSC i metabolita mikrobiote <i>in vitro</i>	80
5. DISKUSIJA.....	83
5.1. POVEZANOST SASTAVA I FUNKCIJE MIKROBIOTE CREVA SA POTENCIJALOM MONOCITA PERIFERNE KRVI ZDRAVIH DONORA DA SE <i>in vitro</i> DIFERENCIRAJU U IMUNOGENE DC	83
5.2. POVEZANOST SASTAVA I FUNKCIJE MIKROBIOTE CREVA SA FENOTIPOM, SUPRESIVNIM KAPACITETOM I IMUNOTERAPIJSKIM POTENCIJALOM <i>in vitro</i> DIFERENCIRANIH MDSC	88
6. ZAKLJUČCI.....	94
7. LITERATURA	96

1. UVOD

1.1. Osnovne funkcije imunskog sistema

Imunski sistem čine organi, limfna tkiva, ćelije i molekuli koji prepoznajući antigene strane organizmu, kao što su oni poreklom od mikroorganizama (bakterije, toksini, virusi i gljive), ili izmenjene sopstvene antigene (npr. neoantigeni tumorskih ćelija), pružaju zaštitu organizmu od uticaja iz spoljašnje i unutrašnje sredine. Mehanizmi koji posreduju u imunskom odgovoru omogućavaju razlikovanje sopstvenih i stranih molekula, doprinose uklanjanju patogenih mikroorganizama i obnavljanju oštećenog tkiva. Međutim ukoliko imunski sistem ne pruži adekvatan odgovor javljaju se bolesti povezane sa imunodeficijencijama i razvojem tumora, kao i one povezane sa alergijskim i autoimunskim bolestima [1].

Organi i tkiva koji izgrađuju imunski sistem mogu biti primarni i sekundarni. Kostna srž i timus predstavljaju primarne limfne organe, dok u sekundarne limfne organe spadaju limfni čvorovi, slezina, kao i limfna tkiva povezana sa mukozom (engl. *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT). Sve ćelije imunskog sistema nastaju u kostnoj srži od hematopoetskih prekursora. Pojedine ćelije imunskog sistema (B limfociti i mijeloidne ćelije) tu i završavaju svoju diferencijaciju, dok se diferencijacija nekih imunskih ćelija završava u drugim limfnim organima i tkivima. Od matičnih ćelija prvo nastaju ćelije progenitori, zajednički limfoidni progenitor koji ima potencijal da se diferencira u sve tipove limfocita, kao što su T i B limfociti i urođenoubilačke ćelije (engl. *Natural Killer*, NK) i zajednički mijeloidni progenitor koji će dati ćelije mijeloidne loze, megakariocite, eritrocite, granulocite, mastocite, monocite, makrofage i dendritske ćelije (engl. *Dendritic Cells*, DC). Ipak, ova podela nije striktna. Na primer, većina DC nastaje od mijeloidnih prekursora, dok plazmocitoidne DC nastaju od limfoidnog progenitora. Nakon nastanka, prekursori T limfocita migriraju u timus gde sazrevaju u naivne T limfocite, dok u sekundarnim limfnim organima i tkivima, nakon susreta sa antigenom, dolazi do njihove specifične aktivacije i diferencijacije u efektorske i memorijske limfocite [2-6]. Kako imunski sistem predstavlja mrežu mnogobrojnih komponenti, molekula i ćelija koje učestvuju u imunskom odgovoru, postoji nekoliko linija odbrane protiv stranih antigena koji mogu da indukuju specifični imunski odgovor [7].

1.1.1. Komponente urođenog imunskog sistema

Epitelne površine kože, gastrointestinalnog (GI) i respiratornog trakta zajedno sa antimikrobnim peptidima (katelicidinima, defenzinima i histatinima) predstavljaju prvu prepreku sa kojom se susreću antigeni. Antimikrobni peptidi, kao potentni endogeni antibiotici, mogu da ostvaruju direktni antimikrobni efekat sa širokim spektrom delovanja, ali i da utiču na produkciju citokina, deobu epitelnih ćelija i zarastanje rana [8].

Mehaničke barijere zajedno sa neutrofilima, monocitima, makrofagama, DC, NK ćelijama, mastocitima, proteinima plazme i sistema komplementa, čine komponente urođenog imunskog sistema [1]. Navedene ćelije i molekule odlikuje sposobnost prepoznavanja konzerviranih struktura koje su: zajedničke za klase mikroorganizama, predstavljaju produkte metabolizma mikroorganizama ili svojim nosiocima omogućavaju preživljavanje i infektivnost. Prepoznavanje ovih struktura i brzu aktivaciju imunskog odgovora od strane ćelija urođenog imunskog sistema omogućavaju receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRR). PRR mogu biti eksprimirani na površini ćelija, u njihovoj citoplazmi ili u okviru endozoma. PRR predstavljaju receptore kodirane funkcionalnim genima koji se nasleđuju i podeljeni su u nekoliko klasa: receptore slične Toll-u (engl. *Toll-Like Receptor*, TLR), receptore slične nukleotid-vezujućem proteinu koji sadrži oligomerizacioni domen (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing protein (NOD)-Like Receptors*, NLR), receptore slične genu 1 koji indukuje retinoična kiselina (engl. *Retinoic acid-Inducible Gene-(RIG)-I-Like Receptors*, RLR), lektinske receptore C-tipa (engl. *C-type Lectin Receptors*, CLR) i klasu receptora koji su slični receptorima odsutnim kod melanoma (engl. *Absent In Melanoma(AIM)-Like Receptors*, ALR) [9-11]. Različiti PRR prepoznaju različite obrasce poreklom od mikroorganizama, koji se označavaju kao molekulski obrasci mikroorganizama ili patogena (engl. *Microbe-/Pathogen-Associated Molecular Patterns*, MAMP/PAMP). TLR su najbolje izučena klasa PRR čija aktivacija dovodi do odbrane organizma od infekcija [12]. Postoji nekoliko tipova TLR kod ljudi, među kojima se nekoliko njih nalazi na ćelijskoj membrani: TLR1 prepoznaje obrasce poreklom od Gram-pozitivnih bakterija; TLR2 se aktivira u kontaktu sa lipoproteinima i peptidoglikanima; TLR4 omogućava prepoznavanje lipoteihoične kiseline i lipopolisaharida (LPS) Gram-negativnih bakterija; TLR5 se aktivira prepoznavanjem flagelina Gram-negativnih bakterija; TLR6 je uključen u prepoznavanje različitih obrazaca Gram-pozitivnih bakterija, a TLR11 prepoznaje profilin vrste *Toxoplasma gondii*. Pored TLR eksprimiranih na površini ćelija, postoje i receptori koji se nalaze unutar ćelije i prepoznaju dvolančanu ribonukleinsku kiselinu (RNK) poreklom od virusa (TLR3) ili nukleinske kiseline virusa i bakterija (TLR7, TLR8, TLR9). Pored navedenih TLR, kod ljudi postoje i TLR8 i TLR10, međutim njihova funkcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena [12-16]. Nakon prepoznavanja, obrasci dovode do pokretanja unutarćelijske signalne kaskade posredstvom konzerviranog domena Toll-interleukin(IL)-1 receptora (engl. *Toll/IL-1R*, TIR), njegovog adapterskog proteina - proteina primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*, MyD88) i kinaze povezane sa receptorom za IL-1 (engl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase*, IRAK). Nakon uspostavljanja ovog kompleksa sa unutrašnje strane membrane, fosforilacija IRAK dovodi do aktivacije signalnih puteva posredovanih nukleusnim faktorom (NF)-kB (engl. *Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) i mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) čime se reguliše ekspresija gena uključenih u imunski odgovor [17].

Osim PAMP, imunski sistem mogu aktivirati i molekuli poreklom od oštećenih ćelija, molekulski obrasci koji su produkti oštećenja (engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP), kao što su proteini toplotnog šoka, mokraćna kiselina i protein visoke pokretljivosti iz grupe 1 (engl. *High-Mobility Group Box 1 protein*, HMGB1) [10,18]. Proteini toplotnog šoka (engl. *Heat shock proteins*, HSP) pored uloge u pravilnom savijanju polipeptidnih lanaca u stanju homeostaze, imaju važnu ulogu u odgovoru na stres (UV zračenje, infekcija, inflamacija) - aktiviraju brojne imunske ćelije ako se nalaze na ćelijskoj

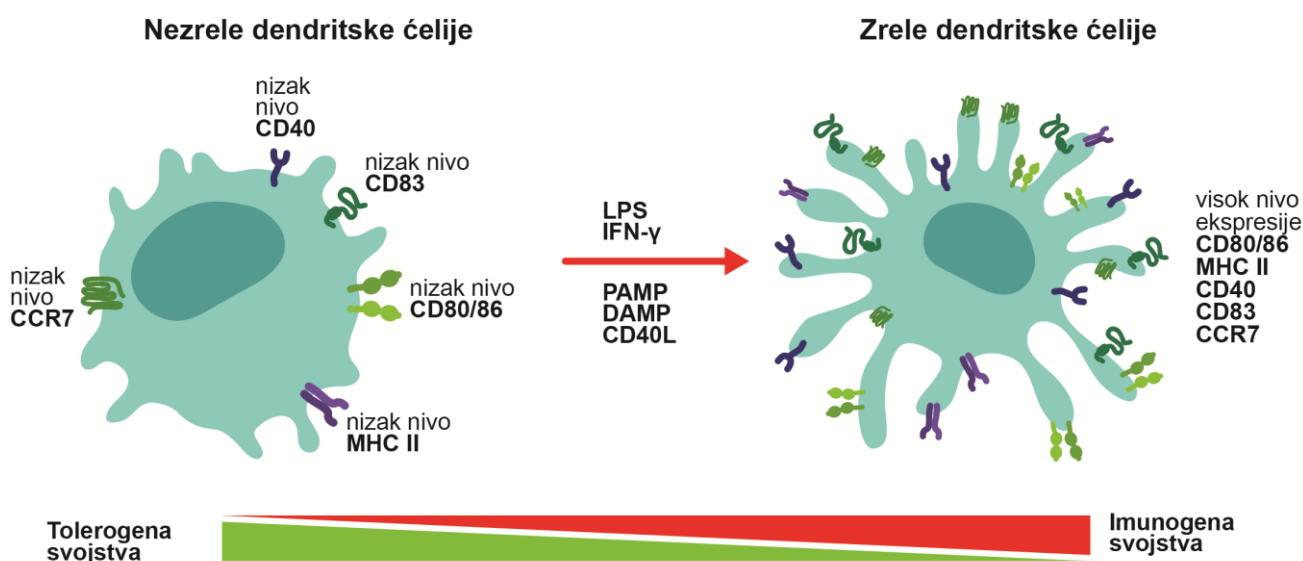
membrani ćelija pod stresom, a kao vanćelijski solubilni molekuli imaju značajnu ulogu u stimulaciji imunskog odgovora posredstvom TLR2 i TLR4 [17].

Iako se za urođeni imunski sistem smatra da nema klasičnu imunološku memoriju, za razliku od adaptivnog imunskog sistema, novija istraživanja pokazuju da ćelije urođene imunosti i njihovi progenitori podležu značajnim epigenetičkim promenama nakon inicijalne aktivacije tako da stiču kompetentnost da adekvatno odgovore na iste antigene pri ponovnom izlaganju, pri čemu je odgovor često većeg intenziteta i brzine u odnosu na odgovor pri inicijalnom kontaktu [19]. Osim toga, ovakve epigenetičke promene se mogu i nasleđivati kroz par generacija [20], što čini urođenu imunost izuzetno značajnom u očuvanju jedinke i same vrste.

Za održavanje homeostaze imunskog sistema i uspešnu odbranu organizma neophodno je udruženo delovanje komponenti urođene i adaptivne imunosti, s obzirom da mehanizmi urođene imunosti omogućavaju pokretanje adekvatnog adaptivnog imunskog odgovora i njegovu regulaciju [21].

1.1.1.1. Dendritske ćelije

DC obuhvataju heterogenu grupu najpotentnijih antigen prezentujućih ćelija (engl. *Antigen Presenting Cells*, APC) koje, kako je prethodno spomenuto, tokom imunске homeostaze nastaju od pluripotentnih hematopoetskih matičnih ćelija kostne srži mijeloidnog i limfoidnog porekla [2,22]. Ove ćelije predstavljaju vezu između urođene i stečene imunosti, zato što jedine omogućavaju efikasnu aktivaciju naivnih T limfocita, B limfocita i održavanje imunološke tolerancije (tj. nereaktivnosti). Odlikuje ih sposobnost preuzimanja i obrade antigena koji se zatim prezentuje naivnim CD8⁺ (engl. *Cluster of Differentiation*, CD), odnosno CD4⁺ T limfocitima u drenirajućim limfnim organima u sklopu glavnog kompleksa tkivne histokompatibilnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) klase I i klase II [23]. Fagocitoza u DC ne predstavlja mehanizam za uklanjanje patogena, već pre svega mehanizam uzorkovanja materijala čiji će antigeni nakon obrade biti prezentovani u kompleksu sa MHC molekulima na površini ćelije [24].



Slika 1. Fenotipske karakteristike nezrelih i zrelih humanih dendritskih ćelija.

DC mogu biti nezrele (engl. *Immature DC*, imDC) i zrele (engl. *Mature DC*, mDC), pri čemu postoje razlike u njihovom fenotipskom i funkcijskom profilu (Slika 1). U uslovima imunske homeostaze imDC imaju visok kapacitet za internalizaciju antigena iz okruženja i poseduju nizak nivo ekspresije MHC klase II i kostimulatornih molekula (CD80 i CD86) na ćelijskoj membrani. U odsustvu stimulacije, aktivacioni marker CD83 se nalazi unutar imDC, dok se nakon stimulacije pomoću PAMP, citokina ili DAMP eksprimira na ćelijskoj membrani i predstavlja jedan od važnih funkcijskih markera [25,26]. Nakon prepoznavanja i preuzimanja antigena, DC prolaze kroz ireverzibilni proces diferencijacije tj. sazrevanja. Tokom sazrevanja smanjuje im se kapacitet za preuzimanje antigena, a povećava se nivo ekspresije površinskih molekula kao što su kostimulatorni molekuli (CD80 i CD86), molekul aktivacije CD83 i molekuli koji su važni za funkciju mDC (CD40, MHC II i CCR7) [27,28]. CD40 predstavlja važan transmembranski receptor za koji se vezuje CD40L T limfocita, te posreduje u regulaciji aktivacije T ćelija. Takođe, DC tokom sazrevanja ekspimiraju više CD80, CD86 i MHC II [29], kao i hemokinski receptor, CCR7, koji im omogućava migraciju do drenirajućeg limfnog čvora uz gradijent hemokina, CCL19 i CCL21, koje proizvode stromalne ćelije limfnih čvorova. DC zatim migriraju u limfne čvorove koji dreniraju mesto inflamacije i u kojima se odvija kontakt sa naivnim antigen-specifičnim T limfocitima [30]. Sazrevanjem DC stiču sposobnost da pokrenu adaptivni imunski odgovor na antigen koji su prepoznali uključujući patogene, odgovor na strano tkivo, izmenjene sopstvene antigene (neoantigene) i alergene [27,28].

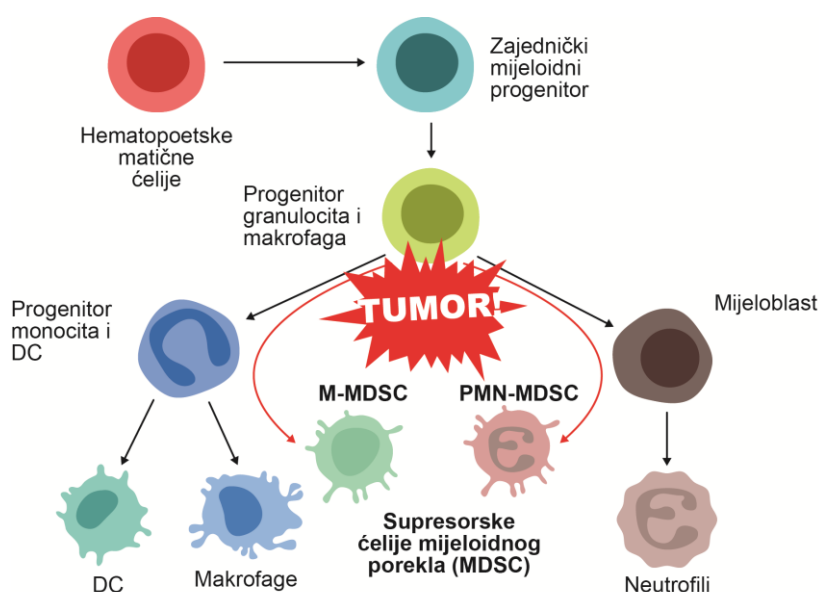
Kod ljudi se DC mogu svrstati u nekoliko podtipova u zavisnosti od toga od kojih ćelija vode poreklo, koje markere ekspimiraju i koju funkciju imaju. Tako se na osnovu porekla DC mogu razvrstati na plazmocitoidne DC (pDC) i konvencionalne DC (engl. *Classical DC*, cDC) koje se diferenciraju od prekursora kostne srži i na inflamatorne DC koje nastaju diferencijacijom od monocita (moDC) tokom inflamatornih stanja. Od limfoidnih prekursora nastaju pDC, koje pre svega prepoznaju antigene poreklom od virusa ali i bakterijskih ćelija [31], i to jednolančane RNK pomoću TLR7, i nemetilovana CpG ostrvca DNK (nemetilovani oligonukleotidi bogati citozinom i guaninom) pomoću TLR9. Ovi antigeni pokreću signalnu kaskadu koja dovodi do aktivacije NF- κ B što omogućava produkciju interferona (IFN) tip I od strane pDC [32]. Pored IFN tipa I, pDC proizvode i IL-12, faktor nekroze tumora (engl. *Tumour Necrosis Factor*, TNF)- α i hemokine [33]. Iako mogu da održavaju toleranciju na sopstvene antigene, pDC imaju važnu ulogu i u razvoju autoimunskih bolesti [34]. Dok u tumorskom tkivu pDC indukuju programiranu ćelijsku smrt izmenjenih ćelija, tumorsko okruženje može da iskoristi njihov tolerogeni potencijal, čime tumor može da izbegne imunski nadzor [32]. Za razliku od pDC, cDC imaju mijeloidno poreklo, a predstavljaju ključne APC koje aktiviraju naivne T limfocite i indukuju njihovu diferencijaciju u efektorske T ćelije. Mogu biti rezidentne u limfnim organima i tkivima (slezina, limfni čvorovi i Pejerove ploče) gde provode ceo svoj životni ciklus kao nezrele u stanju imunske homeostaze ili migratorne cDC koje dobijaju fenotip zrelih ćelija u perifernim tkivima [35,36]. Migratorne cDC se nalaze u svim tkivima kod sisara kao ćelije stražari, u koži kao Langerhansove ćelije ispod suprabazalnog sloja epidermisa [37], u respiratornom i GI traktu neposredno ispod epitela [38,39] i u skladu sa tim, ispoljavaju specifične funkcije. Inflamatorne moDC su povezane sa inflamatornim stanjima koja ih indukuju, gde pokreću imunski odgovor prezentacijom antigena CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitima ili neposredno preko rezidentnih DC koje od njih preuzimaju antigene [40]. Prilikom diferencijacije monocita u moDC, prvi korak predstavlja migracija monocita na mesto inflamacije posredstvom CCR2 [41]. Putem PRR, moDC prepoznaju i preuzimaju antigene iz mikrookruženja, čime dolazi do njihovog sazrevanja i obrade unetih antigena,

a zatim migriraju do drenirajućih limfnih čvorova gde će se pokrenuti antigen-specifičan T ćelijski odgovor [42]. S obzirom da su moDC najbolje proučene, jer je najbolje razvijen sistem za njihovo dobijanje *in vitro*, dobro je poznato da je za njihovu diferencijaciju potrebno prisustvo faktora stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) i IL-4 [43]. Kod ljudi se mogu okarakterisati pomoću markera koje eksprimiraju (+) ili ne eksprimiraju (-), kao što su: HLA-DR (engl. *Human Leucocyte Antigen*), CD11b, CD11c, CD1a (+ ili -), CD14 (-), CD206 (+ ili -), visoko-afinitetni IgE-receptor (FcεRI), CD172a (engl. *Signal Regulatory Protein alpha*, SIRPα), CD64 i CCR2 [28,44].

Osim pokretanja stečenog imunskog odgovora, posebna populacija DC može indukovati toleranciju na antigene te se nazivaju tolerogene DC (tolDC). TolDC imaju sposobnost da spreče razvoj inflamatornih T limfocita, a istovremeno indukuju razvoj regulatornih i anergičnih T limfocita pomoću različitih mehanizama. Često antigene prezentuju bez ekspresije kostimulatornih molekula, a eksprimiraju visok nivo ko-inhibitornih molekula, čime daju signal naivnim T limfocitima da postanu anergični ili da se diferenciraju u indukovane regulatorne T limfocite [45]. TolDC su izuzetno heterogene i obuhvataju kako imDC, tako i DC sa nižim stepenom zrelosti, tzv. poluzrele DC (engl. *semi-mature DC*) [46,47]. O mehanizmima kojima tolDC indukuju toleranciju, biće više reči kasnije u uvodu.

1.1.1.2. Supresorske ćelije mijeloidnog porekla

Nasuprot DC čija je osnovna uloga u indukciji aktivacije ili tolerancije adaptivnog imunskog sistema, osnovna uloga supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (engl. *Myeloid Derived Suppressor Cell*, MDSC) je isključivo supresija imunskog odgovora. MDSC predstavljaju grupu nezrelih ćelija mijeloidnog porekla heterogene morfologije i funkcije, koje su tokom homeostaze u organizmu prisutne u niskom broju u cirkulaciji, a broj im se značajno povećava tokom različitih patoloških stanja: hronične inflamacije, autoimunskih bolesti i tumora (Slika 2).



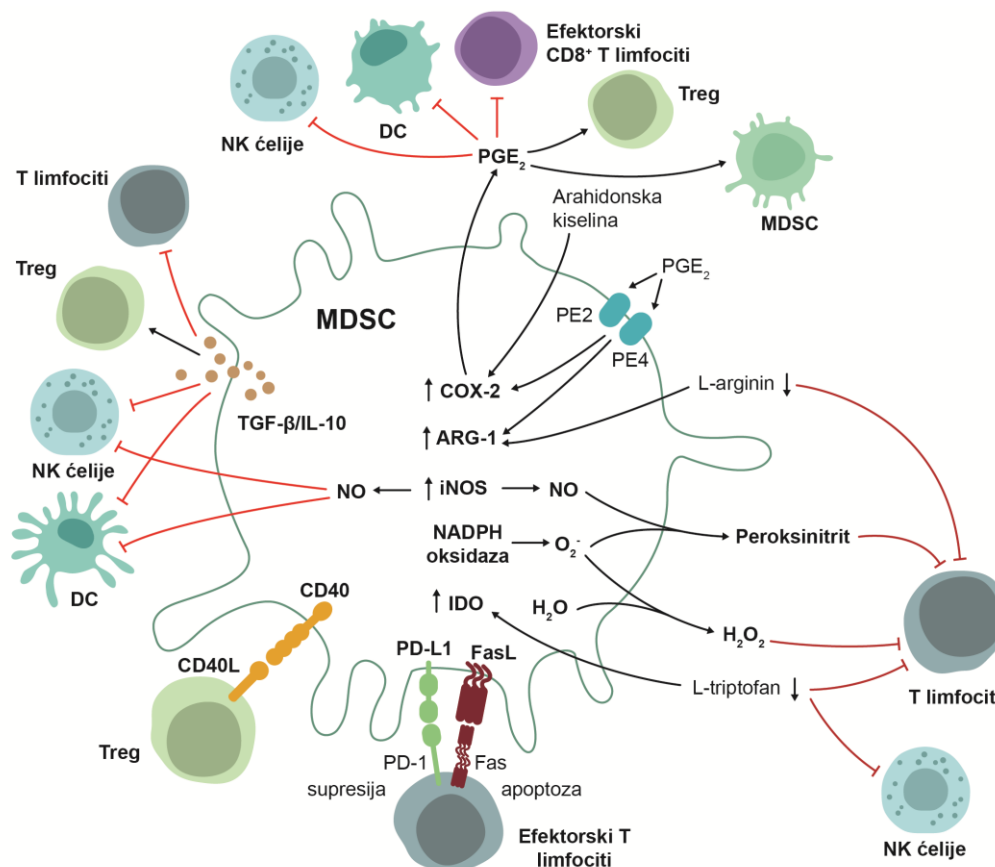
Slika 2. Diferencijacija supresorskih ćelija mijeloidnog porekla.

Na osnovu morfoloških osobina i fenotipa, MDSC kod ljudi možemo podeliti u tri osnovne grupe: MDSC poreklom od monocita, koje su označene kao mononuklearne (M-MDSC) i karakteriše ih fenotip Lin (CD3, CD19, CD56)-CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD15-HLA-DR⁻; MDSC koje su slične granulocitima, tzv. polimorfonuklearne (PMN-MDSC) koje odlikuje fenotip Lin-CD11b⁺CD33⁺CD14⁻CD15⁺; dok treću grupu čine MDSC rane faze (engl. *early stage MDSC*, eMDSC) koje odlikuje viši stepen nezrelosti, fenotipa Lin-CD11b⁺CD33⁺CD14⁻CD15⁻ [48-50]. MDSC su povezane sa razvojem tumora, njegovim širenjem i supresijom imunskog odgovora indukovanom primenom terapije, zbog čega su označene kao jedan od glavnih uzročnika izostanka pozitivnih efekata antitumorskih terapija [51,52]. Akumulacija i ekspanzija MDSC u različitim tumorskim tkivima omogućena je brojnim faktorima među kojima su GM-CSF, faktor stimulacije kolonija makrofaga (engl. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF) i granulocita (G-CSF), IL-6, IL-10, vaskularni endotelni faktora rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), IL-1 β , prostaglandin (PG)E2 i dr. [53,54]. Delovanjem većine ovih solubilnih faktora pokreće se Jak (engl. *Janus kinase*)/prevodnik signala i aktivator transkripcije (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*, STAT)-3 signalna kaskada unutar mijeloidnih ćelija, gde kontinuirana stimulacija STAT3 dovodi do sprečavanja sazrevanja mijeloidnih ćelija i uspostavljanja imunosupresivnog okruženja u okviru kojeg tumorske ćelije mogu nesmetano da se dele. Stoga je signalni put u kojem učestvuju Jak i STAT3 prepoznat kao ključni faktor koji doprinosi imunosupresiji posredovanoj mijeloidnim ćelijama i trenutno su u povoju potencijalne terapijske strategije koje ciljaju Jak/STAT3 [55,56].

Imunosupresivni mehanizmi MDSC ogledaju se u produkciji IL-10, transformišućeg faktora rasta-beta (engl. *Transforming Growth Factor- β* , TGF- β), reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), azot oksida (NO), visokim nivoima ekspresije arginaze 1 (ARG-1) i dr. Ovim mehanizmima MDSC direktno suprimiraju imunski odgovor T limfocita, DC i NK, ili indukuju povećanje broja regulatornih T limfocita (Treg), koje zatim nezavisno inhibiraju imunski odgovor (Slika 3) [57]. NO je unutarćelijski i međućelijski signalni molekul, sekundarni glasnik, koji nastaje kao produkt L-arginina u reakciji koju katalizuje enzim azot oksid sintaza. NO u organizmu može da reaguje sa DNK i proteinima i ostvaruje brojne uloge u inflamatornim procesima, angiogenezi i diferencijaciji ćelija [58]. Produkcija NO od strane iNOS (engl. *inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS) inhibira Jak/STAT1 signalni put u DC, s obzirom da NO favorizuje nitraciju STAT1 proteina, naspram fosforilacije koja aktivira ovaj put. Na ovaj način NO inhibira prezentaciju antigena T limfocitima [59]. NO koji proizvode MDSC može da ostvaruje i direktne efekte na T limfocite utičući na njihovu funkciju i migraciju. Poznato je da peroksinitrit koji nastaje u reakciji NO i superoksida ($\cdot O_2^-$) dovodi do modifikacije T-ćelijskog receptora (engl. *T-Cell antigen Receptor*, TCR) i CD8 kompleksa na CD8⁺ T limfocitima, čime smanjuje kapacitet T limfocita da prepoznaju antigen u sklopu MHC I molekula. Nitracija hemokina CCL2 onemogućava signalizaciju koja je neophodna da bi efektni CD8⁺ T limfociti migrirali na mesto inflamacije [60,61]. U studiji na mišjim MDSC, zaključeno je da M-MDSC ekspresiraju visok nivo iNOS i STAT1 čime se favorizuje produkcija NO dok se kod PMN-MDSC povećava ekspresija STAT3 i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze što dovodi do produkcije veće količine ROS. Generalno, ROS imaju važnu ulogu u odgovoru makrofaga na bakterijske infekcije, a njihov nivo se naročito povećava nakon stimulacije TLR1, TLR2 i TLR4. U produkciji unutarćelijskih ROS učestvuju mitohondrije i NADPH oksidaza, kao i endoplazmin retikulum i peroksizomi. Tumorsko mikrokruženje je bogato ROS tako da održava MDSC u stanju nepotpune diferencijacije, što znači da se sprečava njihova krajnja

diferencijacija u makrofage i DC. Stoga se može zaključiti da su ROS jedan od glavnih regulatora funkcije MDSC u tumoru. Njihovo prisustvo pokreće ekspresiju transkripcionih faktora Nrf2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) i faktora kojeg indukuje hipoksija (engl. *Hypoxia-Inducible Factor-1*, HIF-1) α , koji povećava supresivne funkcije MDSC i njihovo održavanje u tumorskom tkivu. Dodatno, produkcija ROS od strane MDSC može zajedno sa NO da dovede do inaktivacije tumor-specifičnih CD8⁺ T limfocita [62]. Vodonik peroksid koji proizvode MDSC utiče na ekspresiju CD3 ζ koji je neophodan za formiranje biološki aktivnog CD3 receptora, čime se ograničava funkcija T limfocita [63]. Pored važne uloge iNOS i NADPH oksidaze u supresivnim ulogama MDSC, važnu ulogu u modulaciji imunskog sistema ima enzim ARG-1. Kod glodara, MDSC unose L-arginin iz neposrednog okruženja, koji zatim ARG-1 unutar ćelije razgrađuje, dok se kod ljudi ovaj enzim uglavnom oslobađa iz MDSC u cirkulaciju. Enzim ARG-1 hidrolizuje L-arginin do L-ornitina i uree, čime se smanjuje zastupljenost L-arginina u vanćelijskoj sredini i dolazi do gladovanja T limfocita koji u tim uslovima ne mogu pravilno da se aktiviraju i dele [64,65]. Važnost L-arginina za pravilnu funkciju T limfocita dokazana je eksperimentima u kojima su se T limfociti poreklom od ljudi i glodara, koji su aktivirani u okruženju bez L-arginina, odlikovali smanjenom ekspresijom CD3 ζ lanca i neaktivnošću Jak3 i signalne kaskade NF- κ B. Dodatno, ovi uslovi gajenja su doveli do izostanka deobe T limfocita i nemogućnosti proizvodnje citokina IFN- γ . Aktivnost ARG-1 u MDSC je podstaknuta produkcijom PGE2, što dovodi do redukcije nivoa L-arginina u tumorskom mikrookruženju i aktivacije kinaze GCN2 (engl. *General Control Nonderepressible 2*) u T limfocitima. Ova kinaza svoje negativne efekte na TCR ostvaruje modifikacijom CD3 ζ lanca i na ćelijski ciklus posredstvom modifikacija ciklina D3 i ciklin-zavisne kinaze 4 [65]. Iako PGE2 koji se proizvodi u tumorskom mikrookruženju aktivira MDSC putem receptora EP2 i EP4 i omogućava akumulaciju MDSC i njihove imunosupresivne funkcije, same MDSC predstavljaju najveće proizvođače PGE2 u humanim tumorima. U proizvodnji PGE2 aktivno učestvuje enzim ciklooksigenaza 2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) koja kao prekursorski molekul koristi arahidonsku kiselinu [66,67]. PGE2 poreklom iz tumorskog tkiva dovodi do povećane ekspresije COX-2 u MDSC, čime se podstiče dalja proizvodnja PGE2 i omogućava pozitivna povratna sprega koja dovodi do stabilizacije funkcija MDSC [68]. MDSC sintezom PGE2 deluju na inhibiciju sazrevanja DC, smanjenje ekspresije kostimulatornih molekula na ćelijskoj membrani DC i produkciju IL-12, što sve usmerava odgovor od pomoćničkih T ćelija (engl. *T helper cell*, Th)1 ka Th2 ćelijskom profilu. Osim toga, PGE2 indukuje nastanak tolDC koje se odlukuju povećanom ekspresijom enzima indoleamin 2,3-dezoksigenaze (IDO) i produkcijom IL-10. TolDC dalje indukuju diferencijaciju CD4⁺ T limfocita u Treg. PGE2 ostvaruje i direktan uticaj na CD8⁺ T limfocite smanjivanjem njihovog kapaciteta za prepoznavanje tumorskih antigena [69]. Za aktivaciju humanih MDSC i Treg u tumorskom tkivu važnu ulogu ima upravo IDO. Njenom aktivnošću triptofan se prevodi u kinureninskom putu do kinurenina, kinureinske i kvinolne kiseline [70]. Time IDO smanjuje vanćelijsku koncentraciju triptofana koji je neophodan za proliferaciju i aktivaciju T limfocita. Takođe, kinurenin ima direkto delovanje na supresiju imunskog odgovora. Kinureninski put predstavlja glavni put katabolizma triptofana i obezbeđuje imunskim ćelijama energiju u vidu finalnog produkta ovog puta, nikotinamid adenin dinukleotida. Zbog toga se ovaj put smatra važnim regulatorom funkcija imunskog sistema [71]. Takođe, poznato je da kinurenin kao prvi produkt koji nastaje u razgradnji triptofana može poslužiti kao endogeni ligand za aril-hidrokarbonski receptor, čija aktivacija pokreće diferencijaciju CD4⁺Foxp3⁺ Treg (engl. *Forkhead Box P3*) i smanjuje imunogenost DC [72,73]. MDSC zahvaljujući visokoj stopi

metabolizma mogu da preuzimaju aminokiseline arginin i triptofan, čime CD8⁺ T limfocitima i NK ćelijama onemogućavaju preživljavanje [74]. Osim toga, pokazano je da u mišem modelu multiple skleroze (MS), eksperimentalnom autoimunskom encefalomyelitisu (EAE), MDSC dovode do inhibicije migracije, deobe i produkcije citokina od strane B limfocita u centralnom nervnom sistemu (CNS) [75]. Pored navedenih imunosupresivnih mehanizama, MDSC verovatno ostvaruju svoje supresivne funkcije i aktivnošću površinskih receptora ILT3 i ILT4 (engl. *Immunoglobulin Like Transcript receptor*). Ekspresija ILT3 i ILT4 je povezana sa tolerogenim funkcijama DC, kod kojih ovi molekuli dovode do funkcijske inaktivacije CD4⁺ T limfocita. Shodno tome, pretpostavljeno je da i MDSC ekspimiraju ILT3 i ILT4, pošto je pokazano da MDSC koje se nakupljaju u placenti tokom trudnoće, posredstvom ILT4 omogućavaju toleranciju majke na fetus [76]. Za inhibitorski receptor ILT3 je pokazano u literaturi da održava mijeloidne ćelije u nezrelom stadijumu, čime podstiče njihov supresivni kapacitet [77]. De Goeje i saradnici su 2015. godine po prvi put pokazali da se ILT3 ekspimirira u humanim MDSC i da pacijenti kod kojih je ustanovljena veća zastupljenost MDSC koje ekspimiraju visok nivo ILT3, imaju kraće vreme preživljavanja u odnosu na pacijente sa nižom ekspresijom ILT3 [78]. Kada se sve navedeno uzme u obzir, a posebno jaka imunosupresivna funkcija MDSC u tumorskom tkivu, može se pretpostaviti da ove ćelije mogu biti korisne u stanjima koja su povezana sa prenaplašenim imunskim odgovorom, kao što su autoimunske bolesti.



Slika 3. Imunosupresivni mehanizmi supresorskih ćelija mijeloidnog porekla.

Humane MDSC na svojoj površini ekspimiraju CD33 koji ukazuje na mijeloidno poreklo ovih ćelija [79]. Površinski marker monocita, CD14 klasifikuje MDSC kao M-MDSC, dok je za PMN-MDSC karakteristično prisustvo CD15 [80]. Iako su donekle

poznati markeri humanih MDSC, ni pacovske ni humane MDSC se ne mogu okarakterisati jedinstvenim markerom, već je neophodno ispitati kombinaciju većeg broja fenotipskih i funkcijskih karakteristika. Za MDSC pacova je karakteristično da eksprimiraju površinski marker granulocitnih ćelija/neutrofila HIS48 [81] i RP-1 [82]. Takođe u literaturi se navodi i da MDSC glodara eksprimiraju CD11b i CD11c markere makrofaga i DC [83]. MDSC pacova eksprimiraju i marker CD172a (SIRP α) koji se nalazi kod mononuklearne populacije ćelija sa fagocitnim funkcijama kao što su DC i makrofage [84]. Pored fenotipskih markera, MDSC proizvode citokin TGF- β i eksprimiraju enzime ARG-1, iNOS i COX-2 [85,86]. Kako ne postoje jedinstveni markeri koji bi okarakterisali MDSC, za potrebe detaljne analize MDSC populacija neophodno je dokazati njihovu supresivnu funkciju.

1.1.2. Komponente stečenog imunskog sistema

T i B limfociti predstavljaju glavne komponente stečenog imunskog sistema, koji za razliku od urođenog, počiva na mehanizmima koji omogućavaju antigen-specifičan odgovor koji je usmeren na pojedinačne komponente stranog agensa. Takođe, stečeni imunski sistem poseduje i svojstvo memorije, pa svaki naredni susret sa istim antigenom, indukuje snažniji i brži imunski odgovor. Specifičnost odgovora omogućavaju receptori koji se nalaze na membrani ovih limfocita, a koji nastaju tokom sazrevanja ćelija rekombinacijom genskih segmenata koji kodiraju varijabilne domene limfocitnih receptora [1]. Receptori su proteinski kompleksi izgrađeni od varijabilnih i očuvanih domena koji su udruženi sa drugim proteinima čija je funkcija pokretanje unutarćelijskih aktivacionih signala. Kod B limfocita, receptorski kompleks BCR (engl. *B-Cell Receptor*) se sastoji od šest polipeptidnih lanaca, od kojih po dva identična laka i teška lanca formiraju imunoglobulinski (Ig) receptor/antitelo, a po jedan Ig α i Ig β predstavljaju pridružene transmembranske proteine. Za razliku od lakog Ig lanca koji ima po jedan varijabilan i jedan očuvani domen, teški lanci imaju jedan varijabilni i tri očuvana domena. Imunoglobulini imaju dva regiona, antigen-vezujući fragment (engl. *Fragment antigen binding*, Fab) koji obuhvata ceo laki lanac i prva dva domena teškog lanca (1 varijabilni i 1 konstantni) koji interaguje sa epitopima, specifičnim delovima antigena i kristalizujući fragment (engl. *Fragment crystalline*, Fc) koji obuhvata preostala dva očuvana domena oba teška lanca i omogućava brojne funkcije antitelima. Krajnje diferencirani B limfociti, plazma ćelije, mogu da oslobađaju Ig receptor, u obliku sekretovanog produkta, koji se tada označava kao antitelo [1,6,87]. Antitela se vezuju za mikroorganizme čime sprečavaju njihovo vezivanje za receptor (neutralizacija) ili olakšavaju njihovo fagocitovanje od strane makrofaga ili neutrofila. Takođe, IgG oblaže transformisane ćelije tumora ili ćelije zaražene virusom, koja aktiviraju NK ćelije u procesu poznatom pod nazivom citotoksičnost zavisna od antitela. IgE klasa antitela se vezuje za antigene parazita, ali i alergene, pa preko svog Fc fragmenta aktivira mastocite i bazofile koji oslobađaju brojne proinflamatorne medijatore [88]. Mukozna tkiva su bogata IgA antitelima, koja omogućavaju zaštitu epitelnih barijera od prodora patogena [89].

Konvencionalni T limfociti poseduju TCR izgrađen iz dva lanca, α i β , koji ima po jedan varijabilni i očuvani domen. Zajedno sa pridruženim nepromenljivim lancima CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , gradi neaktivni TCR receptorski kompleks. Kada se CD3 kompleks upotpuni CD3 ζ lancem, onda specifično prepoznavanje antigena pokreće aktivacionu signalnu

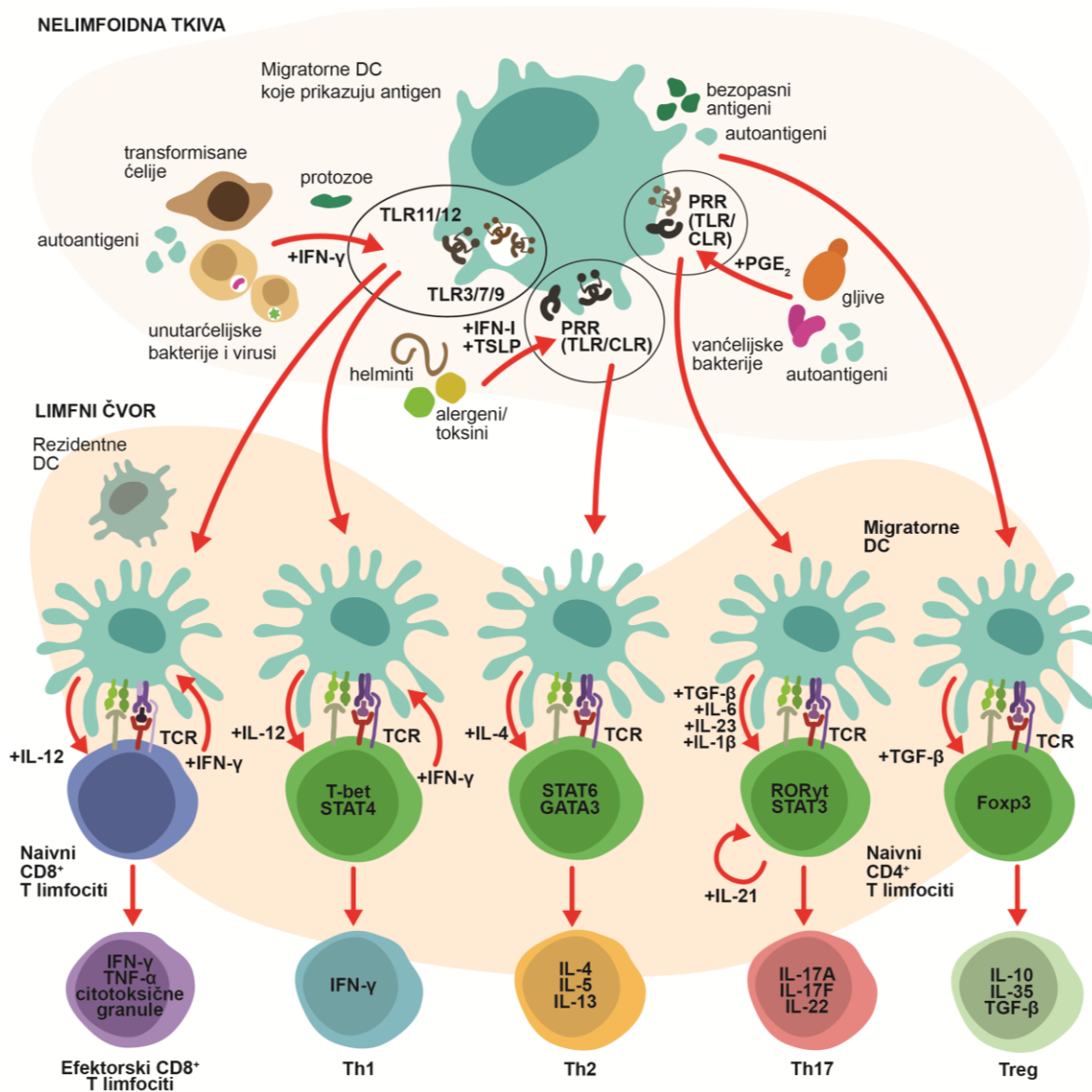
kaskadu unutar T limfocita [90]. Pokretanju signalne kaskade u T limfocitima prethodi prepoznavanje antigena koji se nalazi u kompleksu sa MHC molekulima.

Na površini T limfocita nalaze se i koreceptorski molekuli CD4 i CD8, koji prepoznaju delove MHC klase II odnosno klase I i pokreću dodatne aktivacione signale u T limfocitima [6,91]. T limfociti koji na svojoj površini eksprimiraju CD8 koreceptor označavaju se kao citotoksični T limfociti ili CD8⁺ T limfociti, a njihova glavna funkcija je pokretanje ćelijske smrti u zaraženim ili izmenjenim tumorskim ćelijama. Sa druge strane, T limfociti koji na svojoj površini imaju CD4 koreceptor, nazivaju se pomoćničkim T ćelijama (Th ćelije) koje posredstvom citokina regulišu kompletan imunski odgovor. U odnosu na funkciju koju imaju i citokine koje proizvode, efektorski CD4⁺ T limfociti mogu biti Th1, Th2, Th17 i Treg [92].

MHC klase I molekuli se nalaze na površini svih ćelija sa jedrom i vrše prezentaciju antigena CD8⁺ T limfocitima. MHC klase II molekuli se nalaze na površini APC, kao što su DC, B limfociti i makrofage i pokreću imunski odgovor posredovan CD4⁺ T limfocitima [93]. Ova dva tipa molekula se razlikuju prema poreklu antigena koji prezentuju T limfocitima. Proteinski antigeni poreklom od unutarćelijskih ili fagocitovanih patogena se isecaju do peptida u proteazomima nakon ubikvitinacije u citoplazmi, zatim ulaze u endoplazmatski retikulum gde se spajaju sa MHC I molekulima i transportuju do ćelijske membrane. MHC klase II molekuli prezentuju proteinske antigene koji nastaju u endozomskim vezikulama nakon fagocitoze [94]. Postoje i drugi tipovi limfocita koji mogu odgovoriti na antigene koji nisu proteinske prirode, kao što su lipidni (NKT limfociti, engl. *Natural Killer T cell*) [95] i antigeni stresa ($\gamma\delta$ T limfociti) [96]. Ovi limfociti označavaju se, zajedno sa NK ćelijama, limfocitima urođene imunosti [97].

Kako je prethodno spomenuto, migratorne DC preuzimaju materijal iz svog okruženja i primaju signale od lokalnih ćelija, kao što su epitelne, stromalne i druge imunske ćelije, čime se pokreće proces njihovog sazrevanja i migriranja ka drenirajućim limfnim čvorovima. Za razliku od toga, makrofage se prvenstveno nalaze u perifernim tkivima i slezini, na osnovu čega se može zaključiti da one najverovatnije nisu neophodne za inicijaciju diferencijacije T limfocita, već su odgovorne za prezentovanje antigena efektorskim CD4⁺ T limfocita na periferiji i aktivaciju memorijskih ćelija. Kako imunizacija miševa kojima nedostaju B limfociti dovodi do deobe CD4⁺ T limfocita specifičnih za antigen, pretpostavlja se i da B limfociti nisu ključne ćelije koje aktiviraju naivne CD4⁺ T limfocite, iako je njihov doprinos aktivaciji potvrđen [98]. Stoga DC, kao ćelije koje se nalaze u limfnim čvorovima i eksprimiraju MHC II molekule, predstavljaju glavne pokretače stečenog imunskog odgovora posredovanog CD4⁺ T limfocitima (Slika 4). Nakon prepoznavanja PAMP, izmene u ekspresiji hemokinskih receptora i integrina na DC, koje su pokrenute signalima koje proizvode lokalne ćelije, omogućavaju migraciju DC do lokalnih limfnih čvorova gde će T limfociti putem TCR prepoznati antigen u kompleksu sa MHC II molekulom na DC [99–101]. Imunski odgovor se kod naivnih CD4⁺ T limfocita pokreće specifičnim prepoznavanjem TCR i MHC II molekula sa antigenom i kostimulacijom posredstvom CD80 (B7.1) i CD86 (B7.2) molekula na DC koji se vezuju za CD28 na T limfocitima [102]. Pored navedena dva tipa aktivacionih signala, treći tip signala u komunikaciju između DC i naivnih CD4⁺ T limfocita predstavljaju citokini koji obezbeđuju polarizaciju imunskog odgovora. DC aktivirane preko TLR3, TLR9 i TLR11 u kontaktu sa virusima, bakterijama i sopstvenim antigenima ili preko receptora za IFN- γ , proizvode IL-12 i CXCL9/CXCL10 (engl. *Chemokine (C-X-C motif) ligand/receptor CXCL/R*) koji preko CXCR3 privlače T limfocite. DC produkcijom IL-12 podstiču naivne

CD4⁺ T limfocite da povećavaju ekspresiju transkripcionih faktora T-bet (engl. *T Box Expressed in T cells*) i STAT4 i proizvode proinflamatorni citokin IFN- γ , a koji dodatno stimuliše DC da proizvode IL-12 i usmerava diferencijaciju naivnih CD4⁺ ka Th1 ćelijama. T-bet takođe suprimira razvoj naivnih CD4⁺ T limfocita u smeru Th2 i Th17 ćelija sprečavanjem transkripcionih faktora GATA3 (engl. *GATA Binding Protein 3*) i ROR γ t (engl. *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Gamma t*) da se vežu za promotore citokinskih gena koje regulišu. Th1 ćelije na virusne infekcije odgovaraju produkcijom citokina IFN- γ , TNF, IL-2 i IL-12 [103]. Citokin IL-12 podstiče i NK ćelije da proizvode IFN- γ , tako da i NK ćelije učestvuju u uklanjanju uzročnika unutarćelijskih infekcija i izmenjenih ćelija domaćina. IL-12 mogu proizvoditi i makrofage aktivirane klasičnim putem (M1 makrofage). M1 makrofage se aktiviraju u kontaktu sa bakterijskim obrascima kao što su



Slika 4. Aktivacija i diferencijacija T limfocita.

LPS i komponente koje ulaze u sastav spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija, delovanjem GM-CSF ili IFN- γ , imaju ulogu u fagocitozi bakterija. M1 makrofage zajedno sa NK i Th1 ćelijama doprinose uklanjanju uzročnika unutarćelijskih infekcija [104–109].

IFN- γ , pored aktivacije M1 makrofaga, stimuliše i produkciju IgG antitela od strane B limfocita koji obavijaju mikroorganizme i olakšavaju njihovu fagocitozu [1].

DC koje su prepoznale obrasce poreklom od parazita i alergena, uz dodatnu stimulaciju preko IFN tipa I pokrenuće drugačiji imunski odgovor. Ovako stimulisane DC proizvode više IL-4 i indukuju ekspresiju transkripcionog faktora STAT6 i GATA3 u naivnim CD4⁺ T limfocitima, a istovremeno isključuju program diferencijacije u Th1 [110,111]. U ovom procesu nastaju Th2 ćelije koje učestvuju u zaštiti organizma od parazita i omogućavaju reparaciju tkiva, dok mogu da učestvuju i u alergijskim reakcijama [112]. Th2 ćelije proizvode IL-4, IL-5 i IL-13 kojima mogu stimulisati ćelije creva da proizvode mukus i pojačaju peristaltiku u cilju ekspulzije crevnog parazita. Th2 ćelije deluju i na makrofage da se aktiviraju alternativnim putem (M2 makrofage) i stiču ulogu u reparaciji oštećenog tkiva. Citokin IL-5 kojeg proizvode Th2 ćelije posreduje u aktivaciji eozinofila, dok IL-4 utiče na produkciju IgE od strane B limfocita koji vezivanjem za antigene mogu da aktiviraju mastocite i olakšavaju uklanjanje parazita [1].

Kada DC na periferiji prepoznaju obrasce poreklom od vanćelijskih bakterija i gljiva, migriraju u limfne čvorove gde će produkcijom proinflamatornih citokina IL-6, IL-1 β , IL-23 i TGF- β pokrenuti diferencijaciju Th17 ćelija. Citokini TGF- β i IL-6 započinju diferencijaciju i aktiviraju transkripcione faktore ROR γ t i STAT3, IL-21 podstiče deobu ovih ćelija, a IL-23 produkovan od strane DC održava njihovu usmerenost ka Th17 ćelijskom profilu. Krajnje diferencirane Th17 ćelije proizvode IL-17A, IL-17F i IL-21 kojima odgovaraju na infekcije vanćelijskim patogenima [113,114]. Pored ova dva citokina, Th17 ćelije proizvode i IL-22 koji u mukoznim tkivima utiče na produkciju antimikrobnih peptida i podstiče odgovor protiv patogena [115,116]. Pored zaštitne uloge, Th1 i Th17 ćelije mogu imati ulogu u nastanku autoimunskih bolesti, a slično se pokazalo i u različitim životinjskim modelima bolesti [117].

Pored navedenih ćelijskih podtipova, postoje i Treg koje čine 5-10 % populacije svih perifernih CD4⁺ T limfocita kod miševa i ljudi [118]. Treg nastaju u timusu tokom diferencijacije (engl. *natural Treg*, nTreg) i migriraju na periferiju gde će ostvariti svoje funkcije. Sa druge strane, do danas su opisane i populacije indukovanih Treg (engl. *induced Treg*, iTreg), koje nastaju van timusa ili se konvertuju od drugih tipova efektorskih T ćelija. Za oba tipa Treg je karakteristično prisustvo markera CD4, CD25 (α lanac IL-2 receptora) i većina eksprimira transkripcioni faktor Foxp3 koji je odgovoran za supresivne funkcije ovih ćelija [119]. nTreg učestvuju u regulaciji imunskog odgovora, čime održavaju toleranciju na sopstvene antigene i sprečavaju razvoj autoimunskih bolesti [118]. U toku diferencijacije u timusu, nTreg nastaju kao ćelije koje prepoznaju sopstvene antigene, ali niskim afinitetom, te ne umiru negativnom selekcijom kao ostali autoreaktivni T limfociti, već stiču tolerogena svojstva koja im omogućavaju održavanje periferne tolerancije. Za razliku od nTreg, iTreg nastaju od naivnih ili efektornih T limfocita, kao što su CD4⁺Foxp3⁻ nTreg koje aktiviraju tolDC i M2 makrofage na periferiji [118,120]. Nalaze se u crevima tokom imunske homeostaze, tokom hroničnih inflamacija ili u tumoru kada se aktiviraju posredstvom signala iz tumorskog mikrookruženja [121-123]. iTreg takođe nastaju i u odgovoru na komensalne mikroorganizme u crevima i antigene poreklom od hrane [124]. Generalno, Treg mogu da suprimiraju funkcije CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, B limfocita, NK ćelija, DC i monocita. Zbog uloge u zaštiti tumorskih ćelija od antitumorskog odgovora, Treg su predmet velikog broja istraživanja. Svoju supresivnu funkciju Treg ostvaruju posredstvom različitih mehanizama. Mogu direktno da suprimiraju proliferaciju T limfocita, a znatno češće deluju pomoću imunosupresivnih

citokina (IL-10, IL-35, TGF- β). Indirektno mogu da utiču na inhibiciju aktivnosti T limfocita smanjenjem aktivnosti APC [125].

Naivni CD8⁺ T limfociti pomoću TCR prepoznaju antigen koji je eksprimiran u kompleksu sa MHC I molekulom na APC u sekundarnim limfnim organima. APC obezbeđuju dodatne stimulse pomoću kostimulatornih molekula i citokina, čime se CD8⁺ T limfociti diferenciraju u antigen-specifične efektorske ćelije. Na osnovu citokina koje proizvode, do danas je opisano nekoliko podtipova CD8⁺ T limfocita među kojim su Tc1, Tc2, Tc17 i regulatorni CD8⁺ T limfociti, a po sličnosti sa ekvivalentnim populacijama CD4⁺ T limfocita. Poznata su tri osnovna mehanizma kojima aktivirani CD8⁺ T limfociti, pogotovo Tc1, uklanjaju ćelije inficirane virusima i unutarćelijskim bakterijama, kao i transformisane ćelije. Efektorski Tc1 limfociti mogu da produkuju proinflamatorne citokine IFN- γ i TNF- α , oslobađaju citotoksične granule slično NK ćelijama i eksprimiraju ligand za Fas receptor (FasL) koji indukuje apoptozu ciljnih ćelija. Kod CD8⁺ T limfocita i NK ćelija u okviru citotoksičnih granula, koje se oslobađaju u imunološku sinapsu između efektorskih i ciljnih ćelija, nalaze se perforini koji prave membranske komplekse u vidu pora na ciljnoj ćeliji i granzimi koji ulaze kroz novonastale pore i pokreću njenu apoptozu [126,127]. Međutim, kako su tumorski antigeni često skloni izmenama, oni zajedno sa signalima iz mikrookruženja tumora mogu dovesti do anergije, odnosno funkcionalne inaktivacije CD8⁺ T limfocita i preživljavanja tumorskih ćelija [128].

Nakon uklanjanja antigena, deo aktiviranih/efektorskih T limfocita ulazi u apoptozu, a manji deo se zadržava kao memorijske ćelije sa sposobnošću reaktivacije prilikom ponovnog susreta sa antigenom za koji su specifične [129].

1.2. Bolesti povezane sa poremećajem imunskog odgovora

Kako bi se osigurala specifična odbrana organizma od infekcije i stranih antigena, stimulatorni signali omogućavaju proliferaciju antigen-specifičnih T limfocita, produkciju citokina i diferencijaciju T limfocita u odgovarajuće efektorske ćelije. Imunski odgovor koji se razvija je brz i efikasan. Nakon uklanjanja pretnje, uključuju se inhibicioni signali koji omogućavaju ograničavanje i završetak pokrenutog imunskog odgovora na način da ne dođe do prekomernog oštećenja sopstvenog tkiva i hronične inflamacije. Ovi regulatorni mehanizmi između ostalog uključuju i smanjenje ekspresije receptorskih i koreceptorskih molekula, indukciju anergije, inhibiciju proliferacije i apoptozu aktiviranih ćelija [130]. Prekomerni i neadekvatno regulisani imunski odgovor, kao i hronična inflamacija, mogu uzrokovati različita stanja povezana sa poremećajem imunskog odgovora, kao što su hronične inflamatorne bolesti, autoimunske bolesti i tumori [131].

1.2.1. Tumori

Različiti mehanizmi kontrolišu procese ćelijske deobe i programirane ćelijske smrti i na taj način održavaju homeostazu u organizmu. Narušavanjem ove ravnoteže dolazi do povećanja ukupnog broja ćelija i razvoja tumorskog tkiva. Razvoj tumora mogu uzrokovati genetičke mutacije koje su nastale spontano, delovanjem mutagenih faktora biološkog (virusi, bakterije i gljive), hemijskog (dimetilnitrozamin, duvanski dim) i fizičkog (ultraljubičasto i jonizujuće zračenje) porekla ili mogu biti nasleđene. Promene genetičkog materijala koje mehanizmi reparacije DNK ne uklone, akumuliraju se i potenciraju tumorsku transformaciju ćelija [132-134]. Transformacija ćelija može voditi ka

nastanku tumora koji je benigne ili maligne prirode. Maligni tumori (kanceri) se klasifikuju kao karcinomi (epitelnog porekla), sarkomi (mezodermalnog porekla), limfomi i leukemije i oni imaju sposobnost širenja kroz organizam putem krvnih i limfnih sudova [135,136].

U tkivu kancera prisutna je heterogena mreža interakcija malignih ćelija, fibroblasta, vanćelijskog matriksa, krvnih i limfnih sudova, različitih molekula, kao i imunskih ćelija koje mogu da utiču na progresiju tumora ili da uspore njegov rast. Tumorsko mikrookruženje omogućava malignim ćelijama da izbegnu imunski odgovor, da prežive i proširuju se kroz organizam (metastaziraju) čineći kancer sistemskom bolešću [137]. Imunski sistem poseduje sposobnost da izmenjene ćelije prepozna i ukloni posredstvom CD8⁺ T limfocita ili NK ćelija. NK ćelije mogu biti aktivirane putem njihovih aktivacionih receptora kada prepoznaju ćelije koje imaju nizak nivo ili odsustvo ekspresije MHC klase I molekula na površini što nije karakteristično za ćelije zdravog tkiva, a predstavlja mehanizam kojim ćelije kancera pokušavaju da izbegnu prepoznavanje od strane T limfocita [138,139]. U kanceru su prisutni i CD4⁺ T limfociti, pre svega Th1 ćelije koje su dovedene u vezu sa povoljnim kliničkim ishodom kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom [140]. Produkcijom IFN- γ , Th1 ćelije stimulišu odgovor CD8⁺ T limfocita, dovode do aktivacije M1 makrofaga i aktiviraju DC i B limfocite. Pored IFN- γ i interferoni po tipu 1 mogu da inhibiraju ćelije koje malignim ćelijama omogućavaju izbegavanje imunskog nadzora. Tako IFN- α i IFN- β indukuju apoptozu Treg i inhibiraju funkcije MDSC [141,142]. Međutim, ćelije kancera mutiranjem antigena mogu da izbegnu imunski odgovor, imaju sposobnost regrutovanja Treg, produkuju TGF- β ili aktiviraju inhibitorne receptore na T limfocitima, bilo direktno eksprimiranjem liganda proteina programirane ćelijske smrti (engl. *Programmed cell Death Ligand 1*, PD-L1) ili indirektno putem APC aktivirajući citotoksični T-limfocitni antigen 4 (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, CTLA-4) [1]. Takođe, visoka ekspresija STAT3 omogućava ćelijama kancera da izbegnu imunski odgovor, s obzirom da ovaj transkripcioni regulator dovodi do produkcije molekula koji će inhibirati aktiviranje imunskog sistema. Kod neizmenjenih ćelija STAT3 učestvuje u deobi i diferencijaciji ćelija, a kod transformisanih ćelija dugotrajna aktivacija dovodi do povećane produkcije IL-6, TGF- β i VEGF [143,144]. Generalno, antitumorski odgovor može se podeliti na tri faze: fazu eliminacije, fazu ravnotežnog stanja i fazu izbegavanja imunskog odgovora. U prvoj fazi, antitumorski odgovor je uspešan u uklanjanju transformisanih ćelija i može zaustaviti njihov dalji rast. U narednoj fazi, ukoliko se formira tumor, imunski sistem pokušava da inhibira rast ali ne uspeva da ukloni sve maligne ćelije, pa su kancer i imunski odgovor u ravnoteži. Ukoliko imunski sistem bude inhibiran ili kancer razvije mehanizme inhibicije imunskog odgovora, nastupa treća faza, tj. kompletno izbegavanje imunskog odgovora i uspostavljanje dominacije kancera [145].

Imunosupresivno okruženje koje se formira oko malignih ćelija predstavlja poteškoću za primenu antitumorskih imunskih terapija [146]. Stoga je razumevanje interakcija koje se dešavaju između ćelija kancera i ćelija imunskog sistema u takvom okruženju od velike važnosti za razvoj novih terapijskih strategija.

U tumorskoj mikrosredini često vlada hipoksija jer usled ubrzanog rasta prokrvljenost tumorskog tkiva nije adekvatna. U takvom okruženju se akumuliraju krajni produkti metabolizma malignih ćelija, imunosupresivni molekuli, kao što su ciklični adenzin-monofosfat (engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP), adenzin, laktat i enzimIDO [147]. Hipoksija dovodi do migracije iTreg u tkivo kancera, pri čemu prisustvo

cAMP podstiče supresivne funkcije Treg, a posledično Treg omogućavaju angiogenezu i preživljavanje malignih ćelija [148–151]. Ćelije kancera se adaptiraju na hipoksične uslove pomoću HIF-1 α koji menja njihov metabolizam iz aerobnog u anaerobni, zbog čega se dodatno zakišeljava sredina usled intenzivirane glikolize [152]. Kako je prethodno napomenuto, u tumorskom mikrokruženju postoji veliki broj ćelija koje doprinose razvoju i širenju tumorskog tkiva usled produkcije različitih faktora i signalnih molekula. Tako fibroblasti koji se menjaju pod uticajem TGF- β , proizvode vimentin i dezmin čime se omogućava rast tumora, zajedno sa modifikacijama u vanćelijskom matriksu. Maligne ćelije mogu da proizvode VEGF čime se podstiče uspostavljanje kompleksne mreže krvnih sudova koja će omogućiti bolji dotok nutrijenata u tkivo kancera. M-CSF i protein hemotakse monocita tip 1 (engl. *Monocyte Chemotactic Protein-1*, MCP-1) koje proizvode maligne ćelije dovode do migracije makrofaga u tumorsko tkivo, kao i do njihove diferencijacije u M2 tip. VEGF i IL-1 β koje proizvode makrofage posreduju takođe u vaskularizaciji tumorskog tkiva. U tumorskom mikrokruženju su pristuni i GM-CSF, G-CSF, kao i citokini, IFN- γ , IL-4, IL-6, TNF- α koji deluju na nezrele mijeloidne prekursore kostne srži i slezine da se akumuliraju u tkivu kancera i diferenciraju u DC, makrofage i granulocite, ali koji dovode i do diferencijacije prekursorskih ćelija u MDSC i pokreću njihove supresivne mehanizme [153–156]. U tumoru, pDC imaju dvojaku funkciju s obzirom da je pokazano da ćelije koje na svojoj površini ekspimiraju marker CD9 predstavljaju imunosupresivne pDC koje indukuju Treg i povezane su sa lošijom prognozom bolesti. Sa druge strane, CD81⁺ pDC proizvode IFN- α i aktiviraju CD8⁺ T limfocite [43,157,158] što koreliše sa dobrim anti-tumorskim odgovorom. Za antitumorski odgovor su važne cDC, s obzirom da vrše unakrsnu prezentaciju antigena tumora u sklopu MHC I i dodatno proizvode IL-12, čime se aktiviraju tumor-specifični CD8⁺ T limfociti [159]. Mikrokruženje tumora posredstvom CCL2 kojeg proizvode maligne ćelije privlači monocite od koji će nastati makrofage i moDC u tkivu kancera [160,161]. Navedeni mehanizmi kojima maligne ćelije interaguju sa domaćinom omogućavaju njihovo preživljavanje i širenje u organizmu.

Postojeći protokoli u terapiji kancera zasnovani na radijaciji i primeni hemoterapeutika omogućavaju inhibiciju rasta malignih ćelija, sprečavaju deobu i dovode do uništavanja ćelija kancera. Iako ispoljavaju značajne terapijske efekte, usled brzog razvoja tumorskog tkiva kod nekih pacijenata može da se razvije rezistencija malignih ćelija na primenu ova dva tipa tumorskih terapija [162]. Pored toga, ovakvi terapijski pristupi nemaju selektivno dejstvo, pa pored ćelija kancera pogađaju i druge zdrave ćelije kao što su proliferišuće matične i imunske ćelije koje se brzo dele. Ove terapije imaju mnogo neželjenih efekata i čine pacijente izuzetno podložnim infekcijama. Zbog toga su razvijeni imunoterapijski pristupi koji regrutuju imunske ćelije i molekule za borbu protiv malignih ćelija. Imunoterapija tumora podrazumeva korišćenje citokina, adoptivni transfer ćelija i vakcinaciju što dovodi do potpune remisije i izlečenja kod jednog broja pacijenata. Identifikacijom kontrolnih tačaka imunskog sistema razvijena je antitumorska terapija koja se zasniva na primeni blokatora kontrolnih tačaka (engl. *Check Point Inhibitors*, CPI), čija se efektivnost ispituje u kliničkim istraživanjima [163]. Odgovor pacijenata sa solidnim tumorima na CPI terapiju je u proseku za 15 do 30 % bolji nego odgovor na standardne terapije, što predstavlja značajan progres u lečenju kancera. Još bolja efikasnost je utvrđena kod pacijenata sa melanomom gde dostiže 45-60 % [164]. Do sada najviše ispitivane terapije na bazi adoptivnog transfera ćelija uključuju tretman pacijenata *ex vivo* aktiviranim antigen-specifičnim T limfocitima, CAR-T ćelijama i NK ćelijama. Iako efikasan, za ove tipove terapija je potrebno upotrebiti veliki broj ćelija da bi se postigao

povoljan klinički efekat. Dodatno, ćelijska imunoterapija može dovesti do prejakog imunskog odgovora, a u najgorem slučaju i do citokinske oluje [165,166]. Zbog toga su u pvoju terapije zasnovane na APC, posebno DC, koje imaju sposobnost da indukuju diferencijaciju i proliferaciju antigen specifičnih T limfocita sa odgovarajućim Th profilom i efektorskim funkcijama, posebno memorijske T limfocite koje bi mogle da štite pacijenta od ponovne pojave istog kancera. Međutim, DC čine manje od 1 % svih leukocita u perifernoj krvi [167] i stoga *ex vivo* izolovane DC ne predstavljaju dobar izvor za ćelijsku terapiju.

Sallusto i Lanzavecchia su 1994. godine prvi pokazali da DC mogu nastati od monocita, kada se monociti gaje *in vitro* u prisustvu GM-CSF i IL-4 [168]. Njihovo otkriće je omogućilo brojne studije koje su proučavale diferencijaciju i sazrevanje DC. U uslovima imunske homeostaze u organizmu ne dolazi do diferencijacije monocita u DC, već rezidentne i migratorne DC nastaju od prekursora iz kostne srži. Zahvaljujući studijama koje su pre svega rađene na miševima, pokazano je da DC *in vivo* zaista mogu da nastanu od Ly6C⁺ monocita u različitim inflamatornim stanjima [36,169]. U tumorskom tkivu, moDC nastaju od monocita koji eksprimiraju CCR2 i regulatorni faktor interferona (engl. *Interferon Regulatory Factor 4*, IRF4), BATF3 (engl. *Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*) i ZBTB46 (engl. *Zinc Finger And BTB Domain Containing 46*) nalik cDC. Slično makrofagama, moDC eksprimiraju EGR1 i EGR2 (engl. *Early Growth Response*), ali kod moDC izostaje ekspresija MAFB [170]. Kod ljudi moDC odlikuje visok nivo ekspresije HLA-DR, CD11b, CD11c, CD1a, CD1b, CD1c, CD141, CD206 i FcεRI. Ekspresija CD14 markera na njihovoj ćelijskoj membrani je okarakterisana kao umerena, dok CD16 nije prisutan uopšte [170]. MoDC su identifikovane u biološkim uzorcima različitih tumora i autoimunskih bolesti, a njihova funkcija u tumoru je najviše proučavana. One su važne za prepoznavanje transformisanih ćelija, preuzimaju antigene iz tumorskog mikrookruženja, sazrevaju i prenose antigene do drenirajućih limfnih čvorova, aktiviraju naivne T limfocite i pokreću tumor-specifični T ćelijski odgovor [42]. Tokom diferencijacije u moDC nastaju ćelije koje imaju potencijal da prezentuju tumorske antigene ili da vrše unakrsnu prezentaciju antigena. Iako kod mišjih tumora cDC predstavljaju glavni izvor IL-12 i moDC mogu da ga proizvode čime utiču na aktivaciju CD8⁺ T limfocita i usmeravanje CD4⁺ T limfocita ka Th1 fenotipu [171].

Prednost korišćenja protokola za *in vitro* diferencijaciju DC od monocita periferne krvi se pre svega ogleda u tome što na ovaj način može da se dobije dovoljan broj ćelija koji je neophodan za primenu u terapiji tumora. Pored prinosa ćelija, prednost je i to što uzorkovanje periferne krvi ne zahteva specijalnu pripremu pojedinca i rutinski se obavlja u laboratorijama opremljenim sistemima za ćelijsku terapiju. Krajem XX veka istraživači počinju da više pažnje posvećuju istraživanju mogućnosti primene DC vakcina u terapiji tumora. Prvi rezultati dobijeni na životinjama pokazali su da DC poreklom iz slezine, koje su prethodno aktivirane tumorskim antigenima, mogu da indukuju antitumorsku zaštitu [172]. Studije sa DC vakcinama pokazale su da one mogu da indukuju tumor-specifične T limfocite, pogotovo efektorske Th1 i Tc1 ćelije koje su najznačajnije za anti-tumorski odgovor. Kako je već napomenuto, DC mogu da se diferenciraju *in vitro* iz različitih ćelija u posebnim uslovima. CD34⁺ hematopoetske matične ćelije u prisustvu GM-CSF i TNF-α daju DC, dok monociti periferne krvi kod ljudi mogu da se diferenciraju u DC u prisustvu GM-CSF i IL-4. Takođe, ćelije kostne srži kod miševa predstavljaju pogodan izvor prekursorskih ćelija koje mogu da se diferenciraju u DC. IL-4 ostvaruje svoju ulogu u diferencijaciji DC poreklom od monocita tako što zajedno sa GM-CSF inhibira razvoj

monocita ka makrofagima [173]. Kada su *in vitro* izložene TLR agonistima kao što je LPS, i/ili proinflamatornim citokinima, kao što je IFN- γ , pokreće se ireverzibilan proces njihovog sazrevanja. LPS posredstvom TLR4 na površini imDC dovodi do pokretanja NF- κ B i MAPK signalne kaskade i krajnje diferencijacije u zrele imunogene DC [174]. Prilikom *in vitro* diferencijacije moguće je u kontrolisanim uslovima dobiti dovoljan broj ćelija za primenu u antitumorskoj terapiji [175]. Međutim, nekoliko kliničkih studija je pokazalo da postoje pacijenti koji slabije odgovaraju na terapiju DC vakcinama, dok kod pojedinih pacijenata izostaje odgovor u potpunosti. To se delimično može pripisati nedovoljnoj stimulaciji DC prilikom sazrevanja, smanjenoj sposobnosti da migriraju i nedovoljnoj produkciji citokina [176].

Monociti koji iz perifere krvi migriraju u tumorsko tkivo mogu da se diferenciraju u MDSC, u prisustvu GM-CSF i IL-6, pri čemu nastaju ćelije koje su potentni inhibitori antitumorskog odgovora. MDSC koje imaju fenotip sličan monocitima u tumoru su zastupljenije od onih MDSC koje nalikuju polimorfonuklearnim ćelijama. Od MDSC u tumorskom mikookruženju zahvaljujući nedostatku kiseonika, mogu nastati tumorske makrofage posredstvom HIF-1 α , dok je za diferencijaciju monocita u tumorske makrofage neohodna stimulacija sa citokinima IL-4, IL-10 i IL-13 [177-179]. U tumorskom mikookruženju u najvećem broju nalaze se nezrele mijeloidne ćelije, MDSC kojima okruženje karakteristično za tumorsko tkivo onemogućava da se terminalno diferenciraju i utiče na fenotip ovih ćelija. Mehanizmi njihovog migriranja u tumorsko mikookruženje zasnivaju se na brojnim hemokininima koje proizvode maligne ćelije, a za koje MDSC ekspresiraju receptore. Tako prepoznavanje hemokina i receptora, na primer CCL2/CCR2, CCL15/CCR1, CCL9/CCR1 omogućava njihovu akumulaciju u kanceru [180]. MDSC sprečavaju uklanjanje transformisanih ćelija suprimiranjem obe komponente imunskog odgovora, i urođenog i stečenog [181]. Jedan od mehanizama supresije je smanjenje dostupnosti arginina dejstvom arginaze-1 (ARG-1) čija se ekspresija povećava u MDSC koje potom usvajaju velike količine ove esencijalne aminokiseline neophodne za aktivaciju CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, kao i NK ćelija [53,182].

1.2.2. Autoimunske bolesti

Globalno, broj pacijenata obolelih od autoimunskih bolesti je u stalnom porastu tako da sada već obuhvataju 5-10 % svetske populacije i zastupljenije su kod žena [183,184]. Imunski sistem je tokom evolucije razvio nekoliko mehanizama koji omogućavaju imunološku toleranciju, odnosno izbegavanje pokretanja ili inhibiranje pokrenutog odgovora na antigene. Tokom razvoja T i B limfocita, mehanizmi centralne tolerancije sprečavaju dalji razvoj ćelija koje imaju visok afinitet za prepoznavanje sopstvenih antigena u timusu (T limfociti) i kostnoj srži (B limfociti). Ukoliko T i B limfociti koji sa niskim afinitetom prepoznaju sopstvene antigene, izbegnu negativnu selekciju u centralnim limfnim organima i dospeju na periferiju, često takve ćelije stiču tolerogena svojstva ili bivaju regulisana na periferiji mehanizmima periferne tolerancije. TolDC su glavne ćelije koje omogućavaju mehanizme periferne tolerancije, suprimiraju ovakve ćelije direktno ili posredstvom Treg [1,185,186]. Ukoliko autoreaktivni limfociti izbegnu i mehanizme periferne tolerancije, mogu da se diferenciraju u efektorske ćelije koje će dovesti do odgovora na antigene sopstvenih tkiva što dovodi do razvoja autoimunskih bolesti.

Razvoj autoimunskih bolesti često je uslovljen kombinacijom genetičke predispozicije pojedinca i brojnih sredinskih faktora koji pokreću patološki imunski odgovor [187]. Retke su autoimunske bolesti koje nastaju mutacijom u jednom genu (monogenske), dok češće nastaju interakcijom većeg broja gena (poligeneske) koji remete funkcije pojedinačnih organa ili zahvataju veći broj organa [188,189]. Od sredinskih faktora najčešće se u vezu sa razvojem autoimunskih bolesti dovode: infekcije, hormoni, ishrana, upotreba lekova i duvanskih proizvoda. Međutim, danas se sve češće razvijaju autoimunske bolesti i težina simptoma povezuje i sa sastavom mikrobioloških zajednica različitih regiona tela kao i prisustvom/odsustvom pojedinačnih bakterija [190].

Najčešće autoimunske bolesti kod ljudi su MS, reumatoidni artritis (RA), dijabetes tip 1 (DT1) i sistemski eritemski lupus [191]. Poznato je da u autoimunskim bolestima B limfociti proizvode autoantitela koja su specifična za sopstvene strukturne proteine, enzime i proteine koji su u neposrednom kontaktu sa RNK. U preglednom članku koji su priredili Burbelo i saradnici [192] obuhvaćeno je 52 autoantigena koji se najčešće koriste prilikom seroloških testiranja u različitim autoimunskim bolestima. Međutim, nije poznato za sve autoimunske bolesti koja to autoantitela mogu da posluže kao biomarkeri bolesti, kao ni koji su to autoantigeni pokrenuli odgovor. Ukoliko je pokrenut imunski odgovor na sopstveno tkivo ili ograničenu grupu ćelija, onda autoantigeni mogu biti lokalizovani, kao što je to u slučaju DT1, gde je odgovor usmeren ka insulinu koji proizvode β -ćelije pankreasa. Kod drugih autoimunskih bolesti ipak poreklo i vrsta autoantigena nisu do kraja razjašnjeni [192]. Tako se kod MS još uvek ne zna koji autoantigen pokreće patološki imunski odgovor, ali je poznato da kod životinja simptome nalik MS izaziva primena mijelin oligodendrocitnog glikoproteina (MOG) u modelu EAE [193].

Mehanizmi nastanka autoimunskih bolesti su sada već dosta razjašnjeni zahvaljujući eksperimentalnim životinjskim modelima autoimunskih bolesti koji su razvijani tokom godina. Korišćenjem inbrednih sojeva glodara omogućeno je određivanje suspektnih genskih lokusa koji su relevantni za patofiziološko stanje, utvrđivanje komponenti imunskog sistema koje doprinose razvoju bolesti i specifičnih signalnih puteva. Takođe, ovi modeli omogućavaju i razvoj novih imunoterapijskih pristupa za lečenje autoimunskih bolesti [194]. Jedan od takvih modela je i EAE, razvijen za potrebe proučavanja mehanizama razvoja MS *in vivo*. EAE je moguće indukovati kod svih kičmenjaka, a miševi, pacovi i primati su najčešće korišćene vrste za proučavanje inflamacije u CNS-u [195]. Terapije autoimunskih bolesti zasnovane su na primeni lekova koji smanjuju inflamaciju i bol, kao što su kortikosteroidi i drugi imunosupresivni lekovi [196], međutim najveći problem sa ovim terapijskim pristupima je njihov nespecifičan imunosupresivni efekat zbog čega ovi pacijenti postaju podložni infekcijama protiv kojih ne mogu da se izbore. Zbog ovoga je važno razviti terapije koje će suprimirati odgovor samo imunskih komponenti aktiviranih protiv sopstvenog antigena.

1.2.2.1. Multipla skleroza

Noviji podaci pokazuju da od MS boluje preko 2,8 miliona ljudi širom sveta, među kojima najviše ima osoba uzrasta između 20 i 50 godina, od kojih je u proseku oko 71 % žena u zavisnosti od regiona koji se proučava [183,197]. U Srbiji oko 9000 ljudi ima ustanovljenu dijagnozu MS prema procenama Društva multiple skleroze Srbije iz 2020. godine [198].

Iako uzroci nastanka MS nisu u potpunosti razjašnjeni, jasno je da rizik od nastanka bolesti zavisi od udruženog delovanja sredinskih faktora i genetičke predispozicije [199]. Nastanak MS povezan je sa polimorfizmima u nekoliko gena, od kojih polimorfizmi u genima za MHC klasu I i II, a koji se kod ljudi nazivaju još i HLA, svoje nosioce u najvećoj meri predisponiraju za razvoj MS [199]. U literaturi su poznate promene u HLA-DRB1 genu koji pripada MHC klasi II molekula, kao što je alelska varijanta HLA-DRB1*15:01 koja je prva opisana i koja je povezana sa trostruko većim rizikom od razvoja MS. Među polimorfizmima u HLA-DRB1 genu, pored genetičke predispozicije za nastanak bolesti, postoje i oni koji svojim nosiocima omogućavaju otpornost na bolest, kao što su HLA-DRB1*14 i DRB1*07 [199,200]. Dodatno, faktori rizika su infekcija Epštajn-Barovim virusom, korišćenje cigareta, adolescentska gojaznost i deficijencija vitamina D [199]. Pored svega navedenog, ključne događaje u nastanku MS predstavljaju aktivacija mijeloidnih ćelija koje narušavaju tolerogene mehanizme i poremećaj u sastavu mikrobioloških zajednica koje naseljavaju mukozne površine [201,202]. S obzirom da ne postoji jedan dijagnostički test za MS, za postavljanje dijagnoze MS-a neophodna je kombinacija kliničkih i dijagnostičkih podataka dobijenih iz kliničkih opservacija, upotrebom magnetne rezonancije i laboratorijskih ispitivanja potencijalnih biomarkera MS-a u cerebrospinalnoj tečnosti [203].

MS predstavlja hroničnu inflamatornu bolest CNS-a u čijoj je osnovi demijelinizacija aksona koju prati fizička, senzorna i neurološka disfunkcija. Tok bolesti može da se razlikuje, pa se bolest javlja u fazama pri čemu se smenjuju faze stabilnosti (remisija) i pogoršanja (relaps). Ovakav tok bolesti se klasifikuje kao relapsno-remitentna MS (RRMS) i procenjuje se da je zastupljena kod 85 % pacijenata. Oko 80 % pacijenata sa RRMS, razvija sekundarnu progresivnu formu MS (SPMS) u kojoj bolest utiče na pokretljivost. Ukoliko bolest ima progresivan tok od samog početka, onda se klasifikuje kao primarno progresivna MS (PPMS) [204–206].

Tokom razvoja CNS-a i kasnije tokom života, mijeloidne ćelije održavaju homeostazu u CNS-u. U parenhimskom tkivu nalaze se ćelije mikroglije, tj. specijalizovane makrofage CNS-a, koje mogu da detektuju PAMP i DAMP, uklanjaju ostatke ćelija fagocitozom i učestvuju u remodelovanju sinapsi [207]. Ipak u MS-u, ćelije mikroglije i aktivirane makrofage čine najzastupljenije inflamatorne ćelije plaka. Generalno, aktivirane mijeloidne APC mogu imati dvojaku ulogu, mogu biti neuroprotektivne, ali i učestvovati u razvoju MS u zavisnosti od aktivacionog signala. Aktivirane ćelije mikroglije započinju inflamaciju u CNS-u koja pokreće migraciju neutrofila i T limfocita [208–210]. Danas je poznato da pored ćelija mikroglije razvoju bolesti doprinose i B limfociti, T limfociti i NK ćelije.

Iako mehanizmi nastanka bolesti uključuju i CD4⁺ i CD8⁺ T limfocite, istraživanja su uglavnom više posvećena proučavanju mehanizmima u kojima posreduju efektorski CD4⁺ T limfociti (Th1 i Th17 ćelije). U normalnim uslovima, ćelije sa periferije ne mogu da prođu krvno-moždanu barijeru i ne mogu da dođu do CNS-a [211]. Međutim, ukoliko nastanu promene u propustljivosti krvno-moždane barijere, autoreaktivni CD4⁺ T limfociti koji nastaju u perifernim tkivima prolaze kroz ovu barijeru i ponovo se aktiviraju delovanjem tkivnih APC. Njihovom reaktivacijom i produkcijom proinflamatornih citokina u CNS, obrazuju se inflamatorne lezije u beloj i sivoj masi mozga i kičmene moždine [204]. U inflamatornim lezijama nalaze se i CD8⁺ T limfociti, a u manjem broju mogu se naći i B limfociti i plazma ćelije [212].

Zbog svoje supresivne funkcije, tolDC bi mogle da se koriste za terapiju autoimunskih bolesti. Trenutno su u toku kliničke studije koje ispituju sigurnost i efikasnost ovakve terapije. Studija terapije MS bazirane na tolDC se nalazi u prvoj fazi, a prijavljeno je da pacijenti dobro podnose terapiju bez pogoršanja bolesti [213]. MDSC su pronađene u perifernoj krvi kod pacijenata koji boluju od MS, gde je uočeno da je zastupljenost M-MDSC skoro 10 puta veća od zastupljenosti PMN-MDSC, dok generalno MDSC ostvaruju veći supresivni efekat u remitentnoj fazi i omogućavaju oporavak [214]. Kako se za lečenje MS primenjuju terapije za modifikovanje bolesti pokazano je da MDSC ostvaruju pozitivan efekat na primenu fingolimoda, antagonista za sfingozin-1-fosfatni receptor (engl. *Sphingosine-1-phosphate receptor*, S1PR), i povećavaju njegovu terapijsku efikasnost [215]. S obzirom da terapija za modifikovanje bolesti može dovesti do modulacije ili supresije imunskog odgovora i da to može imati za posledicu povećan rizik od infekcija neophodno je raditi na razvijanju novih terapijskih procedura za lečenje MS [216].

1.2.2.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

EAE predstavlja životinjski model MS. Ovaj model ima dobro definisane patološke mehanizme i prepoznatljive simptome što omogućava proučavanje efekta terapije na tok bolesti, kao i razotkrivanje mehanizama koji posreduju u terapijskom efektu. Zahvaljujući rezultatima koji su dobijeni u modelu EAE, danas je u upotrebi nekoliko terapeutika za lečenje pacijenata koji boluju od MS, kao što su glatiramer-acetat koji podstiče funkcije Treg, fingolimod koji sprečava limfocite da se infiltriraju u CNS, i natalizumab koji sprečava nakupljanje monocita i limfocita u CNS-u [217].

EAE je u osnovi inflamatorna bolest CNS, po patološkim mehanizmima i kliničkoj slici podseća na MS. Za indukciju bolesti kod osetljivih inbrednih sojeva životinja primenjuju se homogenizovana cela tkiva CNS-a ili specifični antigeni CNS-a kao što su MOG, proteolipidni protein (PLP) i bazni protein mijelina (engl. *Myelin Basic Protein*, MBP) u emulziji koja pored antigena sadrži i kompletni Frojndov adjuvans (engl. *Complete Freund's Adjuvant*, CFA). Frojndov adjuvans predstavlja emulziju antigena u mineralnom ulju i označava se kao CFA ako su u emulziju dodate inaktivirane mikobakterije ili toksin *Bordetella pertusis*. Toksin uzročnika pertusisa ima ulogu u podsticanju aktivnosti APC, pojačava aktivnost proinflamatornih T limfocita i podstiče njihov prolazak kroz krvno-moždanu barijeru. CFA omogućava sazrevanje APC i eksprimiranje kostimulatornih molekula na njihovoj površini, kao i produkciju IL-12 i IL-23 [217]. Bolest može biti indukovana i pasivnim transferom autoreaktivnih T limfocita iz prethodno imunizovanih životinja [195,205,218,219]. Visok stepen reproducibilnosti i verovatnoće indukcije bolesti predstavljaju prednost korišćenja ovog modela. Prema većini protokola, prvi klinički simptomi bolesti počinju da budu vidljivi između 5 i 16 dana nakon indukcije bolesti, u zavisnosti od životinja na kojima se model primenjuje [220]. Klinički simptomi variraju u zavisnosti od načina indukcije bolesti, a uglavnom je zastupljena paraliza koja započinje od repa, preko zadnjih do prednjih ekstremiteta i u retkim slučajevima dolazi do smrti [221].

Bolest odlikuje inflamatorni infiltrat u CNS-u, bogat aktiviranim ćelijama mikroglije, makrofagama i limfocitima, kao i demijelinizacija aksona [220]. U infiltratima su pronađeni CD4⁺ T limfociti specifični za antigene mijelinskog omotača koji imaju važnu ulogu u pokretanju inflamacije u CNS-u i razvoju bolesti. Iako se dugo smatralo da su

prvenstveno Th1 ćelije odgovorne za razvoj EAE, kada je ustanovljeno da citokin IL-23 doprinosi inflamaciji u CNS-u, tada su i Th17 ćelije počele intenzivno da se proučavaju u kontekstu neuroinflamacije [222]. Tome u prilog idu rezultati studije koja je pokazala da miševi koji imaju mutaciju u genu koji kodira za subjedinicu IL-12p35, receptor za IL-12 ili receptor za IFN- γ i dalje razvijaju EAE [223–225]. Citokin IL-12 (IL-12p70) je izgrađen iz dve subjedinice, p40 i p35 koje grade biološki aktivnu formu, dok IL-23 izgrađuju subjedinice p40 i p19. Eksperimenti na miševima su pokazali da je za razvoj EAE neophodna subjedinica p40 koja je zajednička za citokine IL-12 i IL-23 [226]. Th1 ćelije koje nastaju pod uticajem IL-12 i delovanjem transkripcionog faktora Tbet, proizvode IFN- γ koji ima višestruke efekte na razvoj EAE, a neki od efekata su slabljenje krvno-moždane barijere, produkcija hemokina od strane astrocita, regrutovanje mijeloidnih ćelija i povećanje ekspresije MHC I i MHC II molekula [227–229]. Zanimljivo je da je zapažen suprotan efekat koji ostvaruje IFN- γ na mozak i kičmenu moždinu, s obzirom da kod iste životinje može da ima zaštitnu ulogu u tkivu mozga dok uzrokuje inflamaciju u kičmenoj moždini [230]. Th17 ćelije proizvode citokin IL-17 i za razliku od IFN- γ mogu izazvati inflamaciju u mozgu. Neki od mehanizama koji posreduju u neuroinflamaciji su slabljenje krvno-moždane barijere, produkcija hemokina od strane tkivno rezidentnih ćelija u CNS-u i migracija neutrofila posredstvom CXCL2 hemokina [230,231]. Ukoliko se naivni CD4⁺ T limfociti diferenciraju samo u prisustvu IL-6 i TGF- β , na taj način nastaju Th17 ćelije koje proizvode IL-17 ali nemaju patogeni potencijal za koji je neophodan IL-23 [232]. Aktivacija efektorskih Th1 i Th17 ćelija putem GM-CSF je specifična za životinjski model, a generalno se smatra da je ovaj molekul vrlo važan za razvoj EAE, s obzirom da miševi koji imaju neaktivan GM-CSF receptor ne mogu da razviju bolest [233]. Produkcija TNF- α od strane Th1 i Th17 ćelija dovodi do progresu EAE, putem demijelinizacije aksona CNS-a [234]. Drugi limfociti, kao što su NK ćelije i $\gamma\delta$ T ćelije mogu imati i regulatornu ulogu u EAE [235]. Regulatorna uloga NK ćelija se ogleda u direktnom citotoksičnom efektu na patogene autoreaktivne T limfocite specifične za antigene mijelina [236], a $\gamma\delta$ T ćelije pored produkcije citokina, IL-2, IL-10 i TNF- α , pokreću apoptozu patogenih konvencionalnih T limfocita posredstvom Fas/FasL interakcije [237,238]. Još jedan tip limfocita ima važnu ulogu u razvoju autoimunskih bolesti, ali pre svega u sprečavanju da do bolesti dođe, a to su Treg. Pokazano je da postoji smanjen broj ovih ćelija i da je njihova funkcija narušena kod pacijenata sa MS [205]. Pored limfocita i mijeloidne ćelije, kao što su DC i M1 makrofage imaju ulogu u progresu EAE. Njihova sposobnost prezentacije antigena potiče od mijelina i produkcija citokina IL-6, IL-1 β i TNF- α dovodi do aktivacije CD4⁺ T limfocita [239]. Sa druge strane za M2 makrofage je karakterističan anti-inflamatorni efekat pošto supresijom signalnog puta NF- κ B utiču na usporavanje razvoja bolesti i sprečavaju oštećenje motornih neurona [240]. Takođe, tolDC imaju regulatornu ulogu u EAE koju ostvaruju indukcijom Treg [241].

MDSC su pronađene i u perifernim imunskim organima i u CNS-u kod životinja sa EAE, a pokazano je da svoju imunosupresivnu funkciju ostvaruju funkcionalnom inaktivacijom autoreaktivnih T limfocita, njihovom apoptozom i remijelinizacijom aksona [242]. U krvi pacijenata sa MS, postoji povećana zastupljenost populacije CD15⁺CD33⁺HLA-DR^{low}CD14⁻ MDSC (PMN-MDSC) koje *in vitro* inhibiraju proliferaciju autologih T limfocita. Za miše PMN-MDSC je pokazano da ostvaruju supresivne efekte na EAE posredstvom PD-1/PD-L1 interakcije sa T limfocitima [243]. Zahvaljujući svojoj supresivnoj funkciji, MDSC bi mogle biti od velike pomoći u terapiji MS [244]. Za razliku od PMN-MDSC, uloga M-MDSC u MS-u i EAE-u nije najjasnija. Cantoni i saradnici su pokazali da pacijenti sa RRMS u perifernoj krvi imaju M-MDSC sa smanjenom

ekspresijom STAT3 i ARG-1 u odnosu na M-MDSC zdravih ljudi, što je povezano sa njihovim slabijim supresivnim kapacitetom. Sa druge strane Iacobaeus i saradnici su pokazali da kod pacijenata sa RRMS postoji povećana zastupljenost M-MDSC tokom relapsa u poređenju sa fazom remisije i SPMS pacijentima. Ove M-MDSC odlikuje stabilan imunosupresivni potencijal koji opada sa napredovanjem bolesti [245,246].

Do sada su kao ćelijske terapije za autoimunske bolesti koje uključuju MDSC korišćene MDSC izolovane iz tkiva obolele životinje. Nekoliko studija je ispitivalo primenu *ex vivo* dobijenih MDSC u lečenju EAE. U jednoj studiji MDSC izolovane iz slezine EAE miševa mogu da smanje simptome bolesti i smanjuju zastupljenost Th17 ćelija [243]. Drugo istraživanje je, nasuprot tome, pokazalo da primena MDSC iz slezine EAE miševa ne dovodi do smanjenja simptoma EAE i čak uzrokuje povećanje udela Th17 ćelija [247]. Pored toga prijavljen je izostanak efekata MDSC koje su *in vitro* diferencirane od prekursora kostne srži na slabljenje simptoma u DT1 [248]. Dobijeni različiti terapijski efekti mogu da budu posledica heterogenosti MDSC koje se primenjuju i nedovoljno razvijenih protokola za njihovu *in vitro* diferencijaciju. U tom smislu, skoro je pokazano da dodavanje PGE2 uz GM-CSF i IL-6 prilikom *in vitro* diferencijacije humanih monocita u MDSC pojačava njihove supresivne funkcije [249]. Međutim, još uvek nije ispitano da li ovako diferencirane MDSC mogu da spreče razvoj EAE.

1.3. Mikrobiota - osnovne karakteristike i pojmovi

Zahvaljujući tehnološkom iskoraku krajem XX veka, naučnici su, koristeći visokopropusnu tehnologiju sekvenciranja, počeli da otkrivaju dinamične i raznovrsne mikrobiološke zajednice koje naseljavaju vrlo različite ekosisteme u kojima ostvaruju brojne funkcije. Sekvenciranje ciljanih marker gena, ukupnih genoma kao i ukupne informacione RNK (iRNK) iz uzoraka omogućilo je naučnicima da dobiju uvid u sastav i funkciju zajednice od interesa, bez prethodne kultivacije u medijumu klasičnim mikrobiološkim metodama [250]. Pomoću navedenih metoda sekvenciranja sledeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS) okarakterisana je struktura mikrobioloških zajednica koje žive u epipelagičnoj i mezopelagičnoj zoni okeana [251], kao i u usnoj duplji, nosu, GI i urogenitalnom traktu i na koži zdravih ljudi [252].

Mikrobiološka zajednica koju čine brojne bakterije, virusi, arhee, gljive i protozoe, koje naseljavaju zajedničku životnu sredinu, označava se kao mikrobiota. Mikroorganizmi koji čine mikrobiotu često mogu biti korisni i potencijalno štetni za domaćina ili sredinu koju naseljavaju, ipak u najvećem broju žive u simbiozi sa domaćinom dok manji broj može izazvati bolesti. Pojam mikrobiom obuhvata pored samih mikroorganizama i njihove genome, produkte metabolizma kao i okruženje koje nastanjuju [253]. Dodatno, produkti koji nastaju tokom metabolizma mikroorganizama mogu se preciznije označiti kao metabolom [254].

Svi višecelijski organizmi, kao što su životinje i biljke, kolonizovani su velikim brojem mikroorganizama koji su u interakciji sa svojim domaćinom, što se odražava na fiziološki status kako mikroorganizama tako i domaćina [255].

Sastav mikrobiote je tokom homeostaze u organizmu u stanju eubioze, odnosno postoji balans između zastupljenosti mikroorganizama, tako kod ljudi u crevima postoji dominacija korisnih vrsta razdela Firmicutes i Bacteroidetes naspram vrsta iz razdela Proteobacteria [256]. Ukoliko dođe do narušavanja odnosa unutar mikrobiote, bilo da se

smanjuje raznovrsnost ili povećava broj potencijalno patogenih vrsta, nastupa stanje disbioze. Disbioza može biti rezultat genetičke predispozicije domaćina, delovanja antibiotika, načina ishrane, životnog stila i stresa, a najčešće je rezultat udruženog delovanja većeg broja faktora [257].

Za utvrđivanje brojnosti i raznovrsnosti mikrobiote koja nastanjuje jednu sredinu koriste se indeksi alfa diverziteta, dok je za utvrđivanje sličnosti odnosno razlike između dve zajednice potrebno koristiti indekse beta diverziteta. Ovi pojmovi su preuzeti iz ekoloških disciplina i danas su široko u upotrebi prilikom analize mikrobiote u metagenomskim studijama [258].

Zahvaljujući životinjskim modelima bolesti, pre svega mišjim i pacovskim, moguće je ispitati da li postoji asocijacija između razvoja neke bolesti i sastava mikrobiote [259]. Upotreba laboratorijskih životinja bez mikroorganizama (engl. *Germ Free*, GF), životinja bez specifičnih patogena (engl. *Specific Pathogen Free*, SPF) i životinja sa dizajniranim sastavom mikrobiote (gnotobiotičke životinje) u biomedicinskim istraživanjima doprinela je boljem razumevanju interakcija između mikroorganizama i domaćina. Takođe, vrlo je značajna i upotreba beskičmenjačkih modela voćne mušice (*Drosophila melanogaster*) i valjkastih crva (*Caenorhabditis elegans*) u otkrivanju uticaja koji imaju pojedinačne bakterije na fiziološki status i ponašanje domaćina [260,261]. Mnoge studije, kako na životinjskim modelima tako i na ljudima, povezale su disbiozu mikrobiote sa bolestima u čijoj je osnovi poremećaj imunskog odgovora. Međutim, vrlo često nije jasno da li je disbioza posledica ili uzrok bolesti. Proučavanje disbioze mikrobiote creva je od velikog interesa među istraživačima širom sveta, s obzirom da mikrobiota creva ima funkciju u varenju i apsorpciji hrane, kao i da creva predstavljaju važan endokrini i imunomodulatorni organ i da postoji veza enteričkog nervnog sistema (ENS) preko vagusa sa CNS-om [262]. Tako je pokazana korelacija između poremećaja sastava i funkcije mikrobiote creva i razvoja alergija na hranu [263], autoimunskih bolesti [264–266] i tumora [267,268].

1.3.1. Mikrobiota creva

Kod ljudi, mikrobiota creva predstavlja najkompleksniju i najbrojniju zajednicu mikroorganizama u odnosu na druge kolonizovane delove tela, unutar koje su bakterije prisutne u najvećem procentu [269,270]. Kolonizacija creva bakterijama započinje neposredno po rođenju, a način rođenja je jedan od važnih faktora koji utiče na proces razvoja mikrobiote creva. Tako, ukoliko je dete rođeno carskim rezom, a ne prirodnim putem, ono će umesto tipičnim vaginalnim rodovima biti kolonizovano vrstama rodova *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*, bakterijama koje su karakteristične za kožu majke [271]. Danas je takođe poznato da se sastav mikrobiote novorođenčeta može razlikovati i na osnovu načina izvođenja carskog reza, ukoliko je on bio planiran ili prinudan kako bi se spasio život majke i deteta [272]. Pored direktne kolonizacije bakterijama, majka putem dojenja prenosi sekretovane IgA, laktoferin, slobodne oligosaharide i kompleksne lipide čime doprinosi razvoju mikrobiote creva i imunskog sistema novorođenčeta [273]. Stoga je period neposredno nakon rođenja vrlo važan za pravilan razvoj imunskog sistema i uspostavljanje stabilne mikrobiote creva. Za razliku od odraslih ljudi, kod novorođenčadi su najzastupljenije fakultativno anaerobne vrste iz razdela Proteobacteria i Actinobacteria, dok već nakon nepune tri godine u njihovom digestivnom traktu sastav mikrobiote počinje da izgleda kao kod odraslih ljudi [278,279]. Tokom života sastav mikrobiote creva se značajno razlikuje između ljudi, a kada se

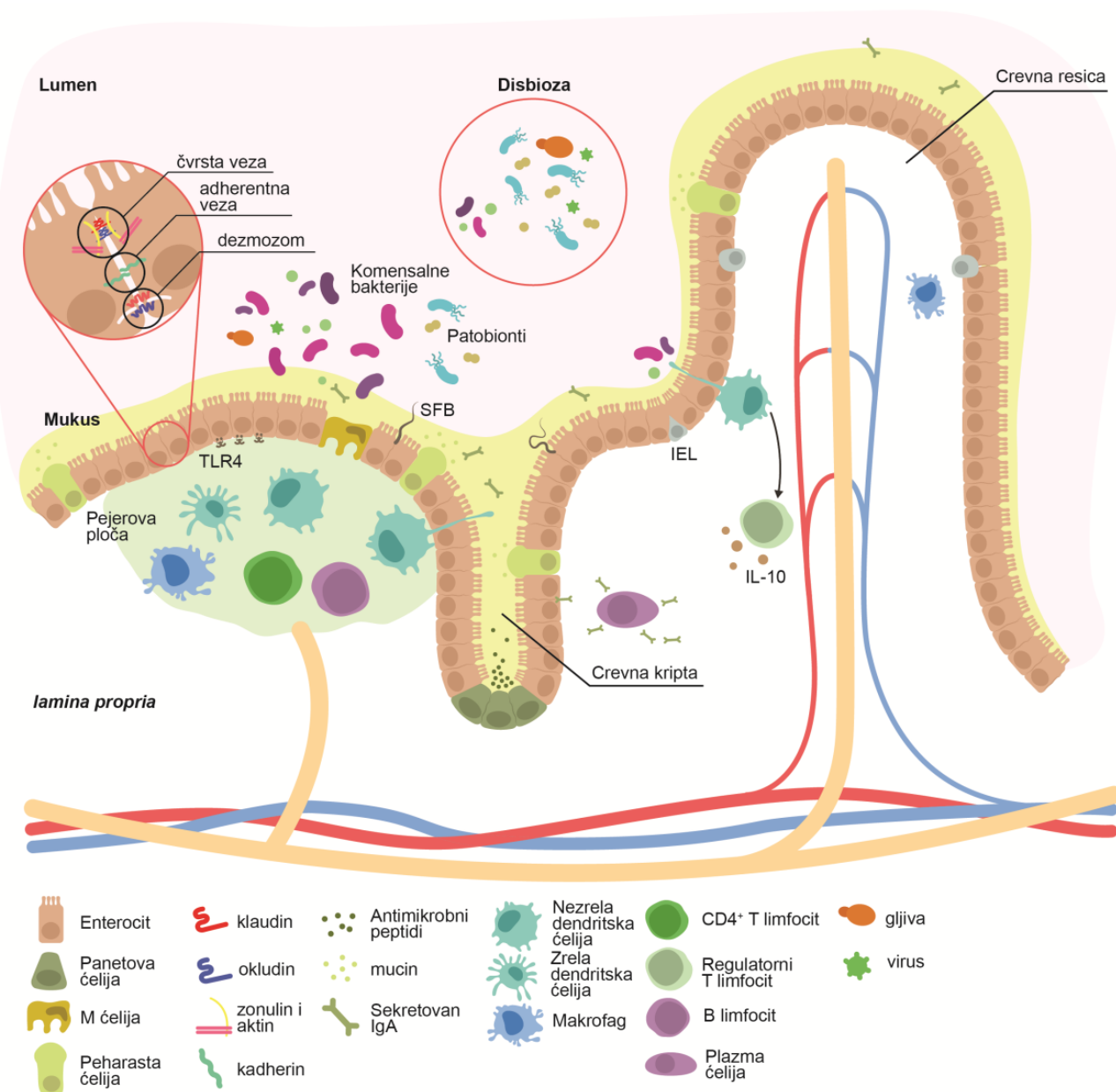
posmatra individualno, prisutne su manje varijacije u sastavu mikrobiote creva kod zdrave osobe tokom njenog životnog veka, što ukazuje na stabilnost sastava mikrobiota zdravih odraslih osoba [274].

Kolonizacija bakterijama i komunikacija sa mukoznim imunskim sistemom domaćina u najranijem periodu života predstavljaju važne faktore za otpornost na različite bolesti kasnije tokom zrelog doba. Mikrobiota ima važnu ulogu u razvoju, pokretanju, usmeravanju i pravilnom funkcionisanju imunskog sistema sisara, dok sa druge strane, imunski sistem ima važnu ulogu u formiranju i održavanju eubioze mikrobiote creva [275]. Komunikacija između mikroorganizama i domaćina pre svega se zasniva na prepoznavanju MAMP i PAMP od strane PRR na intestinalnim epitelnim i imunskim ćelijama koji mogu da prepoznaju patogene protiv kojih će se pokrenuti imunski odgovor ili da suprimiraju inflamatorni odgovor i pokrenu imunološku toleranciju na komensalne mikroorganizme, čime se održava simbioza sa mikrobiotom u crevima [276] (detaljnije opisano u **Poglavlju 1.1. Osnovne funkcije imunskog sistema**).

Postoji nekoliko mehanizama kojima domaćin održava eubiozu mikrobiote creva (Slika 5). Jedan od mehanizama podrazumeva postojanje barijere koju grade epitelne ćelije kao najzastupljenije ćelije epitela creva, čime se razdvaja vezivno tkivo od lumena creva. Sa bazolateralne strane, između susednih epitelnih ćelija creva uspostavlja se nekoliko tipova međućelijskih veza kao što su okluzivne (čvrste) veze, adherens veze i dezmozomi u čijoj izgradnji učestvuje nekoliko strukturnih proteina. Međućelijske veze su odgovorne za održavanje integriteta barijere u crevima. Među njima, okluzivne veze izgrađuju integralni membranski proteini kladini i okludini, kojima se u proteinskom kompleksu pridružuje zonulin 1, čija je uloga u povezivanju kladina i okludina sa aktinskim citoskeletnim elementima [277]. U okviru ove strukture, kladin ima glavnu ulogu u održavanju barijere i omogućavanju selektivne paracelularne propustljivosti. Porodica kladina kod ljudi obuhvata nekoliko članova među kojima kladin 5 zajedno sa kladinima 1, 3, 4, 8, 11, 14 i 19 učestvuje u održavanju integriteta barijere, dok kladini 2 i 10 omogućavaju propustljivost [278]. Tako recimo ukoliko je izmeren nizak nivo kladina 5 i 8 u epitelnim ćelijama creva kod ljudi, to može da ukaže na povećanu propustljivost intestinalne barijere [279,280], a kada veze oslabe, komensali i patogeni mogu nesmetano da prodru u tkivo. Kod kolona pacova za održavanje integriteta intestinalne barijere zaduženi su kladini 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 i 12, među kojima su najviše zastupljeni kladini 1, 3, 4, 5 i 8. Za duodenum kod pacova je karakteristična ekspresija kladina 12, dok su u jejunumu ekspimirani kladini 3, 5 i 12. Kladini 2, 7 i 12 omogućavaju paracelularni transport molekula iz lumena creva, a na jačinu međućelijskih veza utiče ekspresija kladina 1, 3, 4, 5 i 8 [281]. Pored izgradnje intestinalne barijere, različiti tipovi epitelnih ćelija creva imaju i još neke važne uloge, kao što su produkcija antimikrobnih proteina od strane Panetovih ćelija [282] i produkcija citokina IL-8 koji učestvuje u aktivaciji imunskog sistema [283].

Pored navedenih funkcija, epitelne ćelije proizvode zajedno sa DC i imunosupresivni citokin TGF- β koji omogućava homeostazu imunskih ćelija creva i diferencijaciju Treg, a u njegovoj regulaciji važnu ulogu ima mikrobiota. Poznata je uloga različitih produkata bakterija u produkciji TGF- β od strane epitelnih ćelija creva i DC, kao što su masne kiseline kratkog lanca (engl. *Short Chain Fatty Acid*, SCFA) i adenzin trifosfat [284]. Epitelne ćelije takođe proizvode protein limfopoetin strome timusa (engl. *Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP) koji ostvaruje anti-inflamatorno dejstvo, podsticanjem tolerogenih funkcija DC i M2 makrofaga [285]. Sa apikalne strane epitelne ćelije creva pokrivene su

slojem sluzi koji predstavlja glikokaliks izgrađen od mucina koji same epitelne ćelije proizvode [285]. Mukus se odlikuje regionalnom raznolikošću. Tako je za želudac karakteristično prisustvo dva sloja mukusa, unutrašnjeg i spoljašnjeg, koji štite tkivo od delovanja kiseline i enzima u lumenu. Tanko crevo ima jedan sloj izgrađen samo od mucina 2, što omogućava prolazak hranljivih supstanci i lekova kroz epitel iz lumena creva i odlikuje ga manja zastupljenost bakterija u odnosu na debelo crevo. S obzirom da je broj komensalnih bakterija veći u debelom crevu, u ovom regionu creva je prisutan mukus koji grade dva sloja, unutrašnji gušći sloj koji sprečava prodor bakterija dublje u tkivo i spoljašnji rastresitiji sloj, u kojem se mogu naći bakterije [286–288]. Mukus ima antimikrobnu ulogu, prvenstveno kao fizička barijera, a komponente koje ga izgrađuju mogu imati toksičan efekat za mnoge bakterije [289]. Dodatno, mikrobiota koja naseljava površinu mukusa omogućava kompetitivnu ekskluziju patogena i pruža zaštitu domaćinu od potencijalnih infekcija [290].



Slika 5. Mukozna imunost

Tokom zajedničke evolucije domaćina i mikrobiote creva, posebna lokalizacija različitih PRR na epitelnim ćelijama creva nastala je kao dodatni mehanizam održavanja homeostaze između domaćina i komensalnih bakterija u crevima. Tako je TLR4 na ćelijama epitela creva lokalizovan bazolateralno što omogućava prepoznavanje članova mikrobiote ili patogena tek nakon prolaska kroz sve zaštitne barijere i kada dođe do narušavanja intestinalne barijere, pa postoji opasnost od prelaska bakterija iz lumena creva dublje u podepitelno tkivo [291]. Međutim, pokazano je da epitelne ćelije creva ekspimiraju TLR9 i na bazalnoj i na apikalnoj strani, pri čemu samo aktivacija receptora na bazalnoj strani dovodi do produkcije proinflamatornih citokina putem NF- κ B signalne kaskade, a vezivanje liganda za apikalni receptor dovodi do inaktivacije bazalnog [292]. Takođe, epitelne ćelije pri stimulaciji komensalnim bakterijama putem TLR4 receptora mogu da produkuju i IL-10 koji održava integritet intestinalne barijere [293]. U određenim delovima epitela nalaze se i specijalizovane ćelije, M ćelije (engl. *Microfold cells*), koje preuzimaju antigene [294] fagocitozom i endocitozom iz lumena creva i prezentuju ih intraepitelnim limfocitima (IEL) u okviru limfnog tkiva pridruženog crevima (engl. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT). Još jedan mehanizam tolerancije domaćina na komensale obuhvata aktivnost efektorskih ćelija imunskog sistema koje su difuzno raspoređene duž epitela i *lamina propria*. Tako recimo, DC provlače svoje nastavke između epitelnih ćelija i uzorkuju lumen creva u potrazi za antigenima koje će prezentovati limfocitima u okviru *lamina propria* [295]. S obzirom da se nalaze u nezrelom stanju, bakterijski produkti mogu da stimulišu njihovo sazrevanje. Pored DC, i makrofage učestvuju u održavanju homeostaze u crevnoj mukozi, uklanjanjem patogena i obnavljanjem epitelne barijere [296]. Pokazano je da imunske ćelije odlikuje inter-individualna varijabilnost, s obzirom da imaju potencijal da različito odgovore na stimulaciju uz pomoć MAMP poreklom od mikrobiote creva [297]. Pored DC u epitelnom tkivu nalaze se i IEL koji uklanjaju oštećene i inficirane epitelne ćelije bez migracije van tkiva. Najveći broj IEL ekspimiraju na površini TCR, a pored receptora imaju i CD8 α homodimer, CCR9 i integrin CD103. Među ovim ćelijama razlikuju se indukovane IEL, koje su zapravo konvencionalni antigen-specifični T limfociti, koji nakon aktivacije dolaze u creva privučeni inflamacijom; i prirodne IEL koje se u nezrelom stanju nalaze u crevima. Ukoliko IEL ne ekspimiraju TCR receptor, klasifikuju se kao urođene limfoidne ćelije (engl. *Innate Lymphoid Cells*, ILC) [298]. ILC su tip rezidentnih limfocita i mogu se podeliti u tri grupe, ILC1, ILC2 i ILC3. ILC1 u odgovoru na tumor i patogene produkuju IFN- γ , GM-CSF, kao i citotoksične molekule perforin i granzim. Zajedno sa Th1 ćelijama angažovane su u borbi protiv unutarćelijskih patogena [299]. ILC2 ćelije doprinose oporavku tkiva od oštećenja i uklanjanju parazita [300], a ILC3 nalikuju Th17 ćelijama, s obzirom da proizvode citokine IL-17 i IL-22. Kako su ILC u kontaktu sa okolnim ćelijama, tako IL-22 koji produkuju ILC3 održava homeostazu mukoze podsticanjem deobe epitelnih ćelija i produkcije mucina [301]. Makrofage i druge rezidentne mijeloidne ćelije produkcijom IL-1 β u odgovoru na PAMP i MAMP podstiču ILC3 na produkciju GM-CSF, IL-17 i IL-22 [302,303]. Broj IEL može biti regulisan i metabolitima mikrobiote, na šta su ukazali rezultati studije na miševima koji nisu imali komensalnu bakteriju *Lactobacillus reuteri*, koja metabolše triptofan do derivata indol-3-sirćetne kiseline. Kod ovakvih miševa je ustanovljena značajno manja zastupljenost IEL, a njihov broj se povećao nakon primene ishrane bogate triptofanom i uz suplementaciju ovom bakterijom [304].

Zid creva je celom dužinom inervisan mrežom neurona koji čine ENS [305] i koji je u komunikaciji sa CNS-om preko nerva vagusa, iako svoje funkcije obavlja nezavisno od njega [306]. Zajedno sa glijalnim ćelijama, ENS omogućava peristaltiku creva i održava

epitelnu barijeru [307]. Na funkcije ENS mogu da utiču različiti metaboliti koje proizvode mikrobiota creva. Bakterije metabolišu triptofan do indoksil sulfata, tirozin do p-Kresola i histidin do derivata imidazol propionata, a nastali derivati imaju ulogu u modulaciji funkcije CNS-a [308]. Osim derivata aminokiselina, i drugi metaboliti poreklom od bakterija mogu da utiču na ENS. Pokazano je da se TLR3, TLR4 i TLR7 eksprimiraju u ENS-u. Ova višesmerna komunikacija koja postoji između mikrobiote, creva i CNS čini osu mikrobiota-crevo-mozak (engl. *Microbiota-Gut-Brain axis*, MGB) [309,310]. Veliki broj rezultata koji ukazuju na postojanje MGB ose proistekao je iz eksperimenata na GF miševima kod kojih odsustvo mikrobiote utiče na neurotransmisiju u CNS-u [311]. Brojne su i druge funkcije koje mikrobiota creva ostvaruje u organizmu domaćina, kao što su: održavanje integriteta intestinalne barijere [312], varenje kompleksnih ugljenih hidrata, antimikrobna zaštita [313], metabolisanje lekova [314] i sinteza različitih metabolita kojima komuniciraju sa ćelijama domaćina. Kao produkti metabolizma bakterija nastaju brojni molekuli koji mogu biti pronađeni u urinu, fecesu, serumu i cerebrospinalnoj tečnosti [315,316]. Bakterije mogu da sintetišu različite egzogene vitamine kao što su vitamin K i vitamini iz B grupe koji su rastvorljivi u vodi [317]. Pored vitamina, bakterije razgradnjom biljnih vlakana proizvode SCFA [318], a od prekursorskih aminokiselina mogu da sintetišu važne metabolite kao što su poliamini [319]. Pored toga, od primarnih žučnih soli, dekonjugacijom proizvode sekundarne žučne soli kao što su dezoksiholna i litholinska kiselina [320]. Među navedenim metabolitima najviše su proučavani efekti koje na fiziološki status domaćina ostvaruju SCFA [318,321]. Tri glavne SCFA u crevima su sirćetna, buterna i propionska kiselina i prvenstveno služe kao izvor energije za epitelne ćelije kolona, a višak buterne i propionske kiseline putem cirkulacije ishranjuje i hepatocite. Pored toga, SCFA imaju ulogu u sprečavanju inflamacije, održavanju integriteta epitela i krvno-moždane barijere gde utiču na povećanu produkciju okludina i kladina 5 kako je pokazano na GF miševima [322,323]. SCFA prepoznaje grupa receptora kuplovanih sa G proteinom (engl. *G Protein-Coupled Receptor*, GPCR) koji su nazvani receptorima za slobodne masne kiseline (engl. *Free Fatty Acid*), FFA2 (GPR43) i FFA3 (GPR41). Receptori za SCFA su rasprostranjeni među nervnim ćelijama, leukocitima i adipocitima [324]. Jedan od mehanizama kojim SCFA ostvaruju funkciju jeste epigenetička modifikacija do koje dovode inhibicijom histon deacetilaze [320]. Među bakterijama u crevima kod ljudi, buternu kiselinu u najvećoj meri proizvode vrste iz porodice *Ruminococcaceae* i *Lachnospiraceae*, sirćetnu kiselinu vrste roda *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* i vrsta *Akkermansia muciniphila*, dok propionsku kiselinu proizvode vrste roda *Veillonella* i *Bacteroides* [325–327].

Pojedini predstavnici mikrobiote creva mogu da proizvode poliamine. Kod ljudi poliamini nastaju od prekursorskih aminokiselina ornitina i metionina, pri čemu od ornitina nastaje putrescin dejstvom ornitin dekarboksilaze, dok od metionina i putrescina nastaje spermidin čijom obradom nastaje spermin. Iako je poznato da su za nastanak poliamina neophodne prekursorske aminokiseline, mehanizmi nastanka poliamina kod bakterija nisu dovoljno pojašnjeni. Bakterije pored spermidina i putrescina, imaju mogućnost da u lumen proizvode i kadaverin, norspermidin i homospermidin. Poliamini imaju funkciju u održavanju strukture hromatina i zaštiti DNK od oštećenja [319,328,329]. Takođe, putrescin koji proizvode bakterije u lumenu creva održava deobu kolonocita i mukoznu homeostazu [330]. Vrste iz rodova *Fusobacterium* i *Bacteroides* predstavljaju primere producenata poliamina među bakterijama [331].

Disbiozu creva mogu da prouzrokuju različiti agensi iz spoljašnje sredine, ishrana i infekcije patogenim mikroorganizmima. Ova promena u sastavu mikrobiote creva povezana je sa promenama u imunskom sistemu domaćina, može dovesti do razvoja autoimunskih bolesti, metaboličkih sindroma i alergija. Stoga mikrobiota, odnosno izmene njenog sastava i funkcije, predstavljaju izvor potencijalnih terapijskih pristupa za povećanje efikasnosti terapija tumora i terapije infekcija izazvanih mikroorganizmima koji su razvili otpornost na antibiotike [275].

1.3.2. Povezanost sastava i funkcije mikrobiote creva sa imunološkim bolestima

Kako su članovi mikrobiote i njihovi produkti u neprestanoj komunikaciji sa domaćinom, čime ostvaruju svoje pozitivne efekte na njegov fiziološki status, ne čudi što su pojedini predstavnici ili izmene u sastavu mikrobiote povezani i sa razvojem bolesti koje nastaju usled neadekvatnog imunskog odgovora. Imunski sistem ima funkciju u održavanju ravnoteže između pokretanja odgovora na patogene i održavanja tolerancije na antigene sopstvenog tkiva i komensale, čime omogućava homeostazu u organizmu, dok disbioza mikrobiote može pokrenuti ili doprineti razvoju bolesti povezanih sa disfunkcijom imunskog sistema.

1.3.2.1. Mikrobiota creva i tumori

Danas je poznato da različiti mikroorganizmi mogu imati ulogu u razvoju tumora kod ljudi, pri čemu disbioza mikrobiote creva prouzrokovana genetičkom predispozicijom, infekcijama i stilom života može podsticati razvoj tumora [332]. Za određeni broj komensalnih bakterija, tačnije patobionata, pokazano je da direktno učestvuju u razvoju tumora. Patobionti su stalno prisutni članovi mikrobiote koji se u crevima zdravih ljudi nalaze u manjem broju i oportunistički su patogeni [333]. Oportunističkim patogenima se smatraju oni komensalni mikroorganizmi koji u stanju homeostaze nisu infektivni, ali kada je imunski sistem oslabljen mogu da uspostave infekcije [334]. Tako inflamacija koju u crevima uzrokuje infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* može pokrenuti razvoj tumora želuca [335]. Kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom povećana je zastupljenost komensalnih bakterija roda *Fusobacterium*, iako uloga ovog roda u nastanku tumora još uvek nije dovoljno razjašnjena [268]. Pojedini članovi mikrobiote pronađeni su i u tumorskim tkivima korišćenjem NGS, pre svega kod kolorektalnog kancera, kancera pluća i prostate [336–338]. S obzirom da u tumorskom mikrookruženju vlada hipoksija, bakterije kao što su vrste roda *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* i *Bacillus* u takvim uslovima mogu nesmetano da se razmnožavaju [339–341].

Od kako je krajem XIX veka primećeno da infekcija patogenim bakterijama dovodi do regresije tumora, naučnici pokušavaju da razviju nove terapijske pristupe u lečenju tumora koji su zasnovani na bakterijama ili njihovim produktima [342]. Kako su obligatne ili fakultativno anaerobne bakterije sposobne da se infiltriraju u tumorsko tkivo, one mogu da inhibiraju rast tumora produkcijom različitih toksina i podsticanjem aktivnosti imunskog sistema domaćina [343]. S obzirom da su pacijenti sa tumorom već imunokompromitovani, iz bezbedonosnih razloga i zbog pojave neželjenih dejstava, sa živih bakterija se prešlo na primenu atenuisanih sojeva i sojeva koji su modifikovani genetičkim inženjerstvom. Međutim, primena bakterijskih produkata pokazala se kao sigurnije i efikasnije rešenje. Tako vakcina koja sadrži LPS ostvaruje antitumorski efekat aktivacijom imunskog odgovora u tumoru. Takođe je pokazano da enzim azurin poreklom od

Pseudomonas aeruginosa može da gradi stabilan kompleks sa p53 u tumorskim ćelijama i pokrene apoptozu tumorskih ćelija [342,344]. Još nekoliko faktora prisutnih kod *Pseudomonas aeruginosa*, kao što su egzotoksin A, ramnolipidi i ciklodipeptidaza koji mu omogućavaju virulentnost, imaju dokazani citotoksični efekat na tumorske ćelije [345].

1.3.2.2. Mikrobiota creva u autoimunskim bolestima

Disbioza mikrobiote creva je jedan od ključnih faktora koji dovodi do prekida tolerancije i razvoja autoimunskih bolesti [346]. Mehanizmi koji omogućavaju odgovor autoreaktivnih limfocita se međusobno ne isključuju i mogu dovesti do sistemskih ili organ-specifičnih autoimunskih bolesti. Imunološka tolerancija može biti narušena molekularnom mimikrijom, kada različiti antigeni dele iste imunogene epitope, pa tako sličnost između peptidnih antigena bakterija i autoantigena čoveka može da pokrene diferencijaciju autoreaktivnih T i B limfocita [347]. Ovaj obrazac je uočen na modelu dijabetesa kod miševa gde antigen *Fusobacteria* ima sličnosti sa specifičnim antigenom β ćelija pankreasnih ostrvca i aktivira autoreaktivne CD8⁺ T limfocite [348]. Kod autoimunskog uveitisa je pokazano da antigeni komensalnih bakterija mogu da stimulišu autoreaktivne TCR i vode ka razvoju bolesti [349]. Još jedna autoimunska bolest u kojoj ulogu može imati molekularna mimikrija jeste sistemski lupus eritematosus. Autoantitela za Ro60 protein koji se vezuje za RNK, i uređuje njenu konformaciju, uzrokuju nastanak bolesti, a među komensalnim bakterijama postoje Ro60 ortolozi [350] koji bi mogli da pokrenu odgovor T limfocita prema sopstvenom Ro60 proteinu. Širenje epitopa predstavlja još jedan mehanizam indukcije autoimunosti, koji može da se zasniva i na mehanizmima molekularne mimikrije. Predstavlja pokretanje imunskog odgovora na epitope koji su nešto drugačiji od dominantnog epitopa, a započinju ga antigeni komensalnih bakterija. Jednom pokrenut odgovor pokreće oštećenje tkiva, pri čemu se oslobađaju autoantigeni koji se prezentuju istovremeno sa bakterijskim i to pokreće autoreaktivnost na veći broj autoantigena [351]. Zanimljivo je da citrulinacija proteina, izmena arginina u citrulin, omogućava odgovor na originalni antigen, njegovu izmenjenu formu i sve druge tako promenjene proteine. Pored navedenih mehanizama, pokazano je i da produženo izlaganje TLR obrascima poreklom od bakterija može dovesti do neprekidnog produkovanja proinflamatornih molekula koji počinju da oštećuju tkivo [352]. Do razvoja autoimunskih bolesti može doći i prilikom fenomena koji se označava kao „aktivacija od strane posmatrača“ (engl. *bystander activation*) za koji je karakteristično da prilikom infekcije bakterije stimulišu APC da proizvode kostimulatorne molekule i citokine dok prezentuju sopstvene antigene na ćelijskoj membrani, čime se omogućava pokretanje odgovora usmerenog ka autoantigenima [190].

S obzirom da mikrobiota creva i njeni metaboliti održavaju integritet intestinalne barijere i učestvuju u uspostavljanju homeostaze imunskog sistema, ne čudi što je disbioza creva dovedena u vezu sa mnogim autoimunskim bolestima. Tako, promene u sastavu mikrobiote mogu da dodatno stimulišu aktivan urođeni i stečeni imunski odgovor. Kod pacijenata koji boluju od MS utvrđeno je da postoje promene u sastavu mikrobiote creva u odnosu na zdrave osobe [202,353]. Saznanja o ulozi mikrobiote u razvoju i progresiji MS uglavnom su dobijena iz istraživanja na modelu EAE. Pokazano je da se kod GF miševa razvija lakši oblik bolesti usled nedostatka mikrobiote i da kada se creva ovih miševa kolonizuju segmentisanim filamentoznim bakterijama (SFB), dolazi do pogoršanja bolesti koje je posredovano ekspanzijom Th17 ćelija i njihovom migracijom u CNS [354]. Neke

bakterije mogu da stimulišu aktivaciju imunosupresivnih ćelija, Treg i tolDC, kao što su *Bacteroides fragilis* posredstvom polisaharida A i vrsta *Prevotella histicola* čija primena može da spreči razvoj EAE kod miševa [355,356]. Ovi rezultati i mnogi drugi ukazuju da bi uspostavljanje ravnoteže između članova mikrobiote i primena određenih bakterija ili njihovih produkata kao suplemenata, moglo da bude novi terapijski pristup za lečenje autoimunskih bolesti. Tome u prilog idu i rezultati dobijeni na modelu EAE u miševa, gde su simptomi EAE bili značajno redukovani nakon terapijske primene *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [357,358]. Ove bakterije su kao poznati probiotici odavno uvršćeni na listu generalno prihvaćenih kao sigurni (engl. *Generally Recognized As Safe*, GRAS). Probiotici se prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji definišu kao „živi mikroorganizmi koji kada se primene u dovoljnoj količini ostvaruju pozitivne efekte na zdravlje domaćina” [359]. Primena bakterije *Bifidobacterium animalis* kod miševa, dovela je do kasnije pojave simptoma EAE nakon indukcije bolesti u poređenju sa netretiranim životinjama, pri čemu je uočen i manji gubitak na težini tokom razvoja EAE [357]. U nekoliko kliničkih studija su primenjeni probiotički sojevi kod MS pacijenata. U jednoj studiji je primenjena kombinacija vrsta rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* kao suplementacija kod grupe pacijenata sa RRMS koji su bili na terapiji glatiramer-acetatom i efekti su upoređeni sa grupom pacijenata bez terapije glatiramer-acetatom. Rezultati su pokazali da je suplementacija probioticima sprečila infiltraciju CD14^{high}CD16^{low} monocita u CNS [360]. Takođe, pokazano je da *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus reuteri* dovode do smanjenja inflamacije u CNS, i inhibiraju Th1 i Th17 ćelije da proizvode citokine [361]. Potraga za probioticima nove generacije, bakterijama koje prethodno nisu primenjivane kao probiotici, zahteva vreme za ispitivanje njihove efikasnosti i sigurnosti, kao i prilagođavanje uslova za njihovo masovno gajenje za potrebe farmaceutske industrije [362].

1.3.3. Povezanost sastava i funkcije mikrobiote creva sa imunološkim terapijama

Prve publikacije koje dovode u vezu mikrobiotu creva i odgovor na antitumorsku terapiju CPI pojavile su se krajem 2015. godine [363,364]. Sivan i saradnici su pokazali da dolazi do poboljšanja terapijskog efekta anti-PD-L1 terapije kada se primene vrste roda *Bifidobacterium* u mišjem modelu B16.SIY melanoma i da je ovo povezano sa boljim sazrevanjem DC i aktivacijom CD8⁺ T limfocita [363]. Paralelno sa ovom studijom, pokazano je da odgovor na antitumorsku terapiju antitelima koja se vezuju za CTLA-4 može biti inhibiran posredstvom antibiotika, dok primena *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides thetaiotaomicron* kod životinja tretiranih antibioticima može da poboljša efikasnost ove terapije [364]. U narednim studijama je potvrđen sličan fenomen, tj. da mikrobiota creva ima značajnu ulogu u odgovoru domaćina na antitumorsku terapiju. Tako je kod pacijenata sa melanomom odgovor na anti-PD-1 terapiju bio značajno povezan sa raznovrsnošću sastava mikrobiote creva [365], a tretman antibioticima je smanjio efikasnost anti-PD-1 terapije [366]. Jedna od terapijskih procedura izmene mikrobiote je fekalna transplantacija. Fekalna transplantacija podrazumeva prenošenje fekalnog materijala zdravih donora u GI trakt pacijenata koji primaju ovaj vid terapije. Dodatno, fekalna transplantacija mikrobiote pacijenata koji imaju efikasan odgovor na anti-PD-1 terapiju omogućava responsivnost na anti-PD-1 terapiju u transplantiranim humanizovanim miševima koji su prethodno bili tretirani antibioticima ili GF miševima. Međutim, fekalna transplantacija pacijenata koji nisu efikasno odgovorili na terapiju, nije

dala rezultate kod istih miševa [366]. Nekoliko studija je potvrdilo sličan fenomen koji se tiče veze terapije anti-PD-1 antitelima i mikrobiote creva [367–369].

Pored varijabilnosti u odgovoru pacijenata na CPI terapiju, postoji i varijabilnost u odgovoru pacijenata sa tumorima na primenu T ćelija sa himernim antigenskim receptorom (engl. *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cells*, CAR-T). CAR-T terapija se zasniva na izolacija autologih T limfocita i modifikaciji njihovog receptora genetičkim inženjerstvom, kao i sledstvenim umnožavanjem u cilju dobijanja adekvatnog prinosa antigen-specifičnih CAR-T ćelija za terapiju. Pored vremena neophodnog za dobijanje ćelija, kod pacijenata sa hematološkim malignitetima, u oko 80 % slučajeva primena CAR-T terapije ima neželjene sporedne efekte kao što su pojačani odgovor imunskog sistema na infekciju i terapiju ili neurotoksičnost. Zbog svega navedenog postoji potreba da se ustanovi na koji način može da se prilagodi efikasnost CAR-T terapije. Na primer, postoje studije koje ukazuju na postojanje veze između sastava bakterija u crevima i razlika u odgovora pacijenata na CAR-T terapiju [370], dok druge studije ukazuju da nema dovoljno rezultata koji bi na to nedvosmisleno ukazali [371]. Smith i saradnici su pokazali na osnovu linearne diskriminacione analize koja uračunava veličinu efekta (engl. *Linear discriminant analysis Effect Size*, LEfSe) da postoje razlike u sastavu mikrobiote creva pacijenata koji su primili CAR-T terapiju za lečenje solidnih i hematoloških tumora, a koji su grupisani na pacijente koji daju kompletan i nekompletan odgovor na terapiju. Kod pacijenata koji su imali kompletan odgovor na terapiju primećeno je povećanje zastupljenosti porodica *Oscillospiraceae*, *Ruminococcaceae* i *Lachnospiraceae*. Povećana zastupljenost porodice *Peptostreptococcaceae* je bila jedna od karakteristika pacijenata koji nisu imali potpun odgovor na terapiju. Rezultati dve nedavne studije su pokazali da upotreba antibiotika i modulacija sastava mikrobiote creva mogu da poboljšaju rezultate primene CAR-T terapije [370,372–375].

Dok je povezanost mikrobiote creva sa tumorskim imunoterapijama više puta pokazana, literaturni podaci koji bi povezali efikasnost terapije autoimunskih bolesti i diverziteta mikrobiote creva i njihovih produkata nedostaju. Nekoliko studija se fokusiralo na uticaj stila života, ishrane i mikrobiote creva u nastanku i razvoju MS, sa ciljem da utvrde na koji način bi promena ishrane mogla da doprinese poboljšanju kvaliteta života kod ovih pacijenata [376,377]. Pokazano je da je nizak nivo neaktivne forme vitamina D, 25-hidroksivitamina D₃, kod gojaznih ljudi povezan sa rizikom od nastanka MS, kao i da nedostatak vitamina D predstavlja faktor rizika od nastanka ove bolesti [378]. Pored antioksidativnog efekta, vitamin D verovatno ima ulogu u inhibiciji produkcije IFN- γ kao i u održavanju integriteta intestinalne barijere i sastava mikrobiote creva. U kliničkoj studiji pod akronimom SOLAR u periodu od 2011. do 2016. godine ispitivan je efekat oralne primene visokih doza vitamina D kod pacijenata sa RRMS koji koriste terapiju IFN- β -1a. Rezultati su pokazali da korišćenje vitamina D ipak nije poboljšalo terapijske efekte IFN- β -1a iako je terapija sprečila nastanak novih lezija [202,379]. Takođe, u mišjem modelu EAE je pokazano da ishrana u zapadnom stilu (engl. *western diet*) koja je bogata mastima i prostim šećerima dovodi do promene u sastavu mikrobiote creva i pogoršanja bolesti [380]. Druga studija je pokazala je da periodično gladovanje (engl. *intermittent fasting*) dovodi do promena u sastavu mikrobiote creva, gde je primećeno povećanje zastupljenosti porodica *Lactobacillaceae*, *Bacteroidaceae* i *Prevotellaceae*, kao i smanjenje T limfocita koji proizvode IL-17, kako kod MS pacijenata tako i u modelu EAE [381]. Pored navedenih rezultata, postoje i kliničke studije koje su ispitivale efekat fekalne transplantacije kod pacijenata koji boluju od MS. S obzirom da su ove studije započete u prethodnih nekoliko

godina, rezultati se mogu očekivati u narednim godinama. Jedna studija, pod akronimom MS-BIOME započeta 2018. godine sa rokom završetka početkom 2023., ima za cilj procenu bezbednosti primene fekalne transplantacije kod pacijenata sa RRMS. Dodatna istraživanja su neophodna kako bi se sagledala celokupna slika primene fekalne transplantacije i korekcija u ishrani za lečenje MS [202]. Međutim, zanimljiva diskusija je pokrenuta 2020. godine u časopisu *Nature* na temu na koji način bi mikrobiota creva mogla da doprinese u lečenju autoimunskih bolesti. Zaključeno je da je neosporiv potencijal primene bakterija za lečenje ovih bolesti i da bi se u lečenju MS mogla primeniti dijeta koja će favorizovati promenu od proinflamatornih ka anti-inflamatornim bakterijama, dok će generalno nova saznanja možda omogućiti razvoj kombinacije probiotika i prebiotika koji će se primenjivati u terapijske svrhe [382].

Imunoterapijske procedure zasnovane na autologim ćelijama imaju veliki potencijal za primenu u terapiji tumora i autoimunskih bolesti [383,384]. Ćelije neophodne za ovaj terapijski pristup mogu se dobiti i *in vitro*, izolacijom prekursora iz krvi pacijenata koje se dalje diferenciraju u željene ćelije. Među imunostimulatornim mijeloidnim ćelijama, imunogene DC imaju veliki potencijal da pokrenu tumor-specifični odgovor kod slabo imunogenih tumora. Sa druge strane, imunoregulatorne mijeloidne ćelije, kao što su MDSC, imaju veliki potencijal da suprimiraju imunski odgovor i budu iskorišćene u terapijske svrhe u autoimunskim bolestima [385]. S obzirom da mikrobiota ima važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora, efikasnost terapije mijeloidnim ćelijama, kao što su DC i MDSC, bi takođe mogla biti povezana sa sastavom mikrobiote creva i zastupljenošću njihovih metabolita, što je bila i glavna naučna hipoteza ove doktorske disertacije.

2. CILJEVI RADA

U literaturi je poznato da mijeloidne ćelije, pre svega DC i MDSC, imaju veliki potencijal za primenu u imunoterapijskim procedurama, naročito u lečenju tumora i autoimunskih oboljenja. Međutim, između različitih donora njihove fenotipske i funkcijske karakteristike mogu da variraju, što može dovesti do razlika u efikasnosti terapijskih procedura koje podrazumevaju primenu ovih ćelija. S obzirom da postoji jako blizak odnos između imunskog sistema domaćina i sastava mikrobiote creva, osnovna hipoteza istraživanja je bila da su varijabilnost u fenotipskim i funkcijskim karakteristikama mijeloidnih ćelija, kao i njihova efikasnost u modulaciji bolesti, blisko povezane sa sastavom mikrobiote creva. Mogući uzroci fenotipske i funkcijske varijabilnosti mijeloidnih ćelija su metaboliti koje produkuje mikrobiota creva.

Kako do sada nije poznato koji metaboliti i koji članovi ovih zajednica u crevima najviše utiču na fenotipske i funkcijske osobine DC i MDSC, postavljeni su sledeći ciljevi ovog istraživanja:

1. Ispitati povezanost sastava mikrobiote creva i njihovih metabolita sa potencijalom monocita periferne krvi zdravih donora da se diferenciraju *in vitro* u imunogene DC sa osobinama koje ukazuju na njihov potencijal za indukciju antitumorskog odgovora

- a) Ispitati varijabilnost u potencijalu monocita periferne krvi različitih ispitanika da se *in vitro* diferenciraju u nezrele i zrele DC;
- b) Identifikovati bakterije mikrobiote creva i njihove metabolite koji su povezani sa kapacitetom monocita da se diferenciraju u nezrele DC, kao i kapacitetom nezrelih DC da odgovore na stimulaciju LPS/IFN- γ .

2. Ispitati povezanost sastava mikrobiote creva i njihovih metabolita sa fenotipom i supresivnim kapacitetom MDSC dobijenih *in vitro*, kao i sa terapijskim potencijalom ovih ćelija u modelu EAE

- a) Ispitati efekat PGE2 na *in vitro* diferencijaciju pacovskih MDSC analizom fenotipskih i funkcijskih karakteristika;
- b) Ispitati efekat primene MDSC dobijenih *in vitro* na kliničku sliku EAE i potencijalne mehanizme delovanja MDSC;
- c) Ispitati efekat tretmana MDSC na integritet epitelne barijere creva i sastav mikrobiote creva DA pacova u modelu EAE;
- d) Ispitati uticaj epitelnih ćelija creva i odabranih metabolita bakterija na diferencijaciju monocita periferne krvi ljudi u imunosupresivne MDSC *in vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. *In vitro* diferencijacija monocita periferne krvi u zrele DC

3.1.1. Sakupljanje uzoraka

Uzorci periferne krvi i fekalnog materijala sakupljeni su od šest muških i osam ženskih zdravih donora (n=14) koji su ispunjavali sve neophodne kriterijume definisane pre započinjanja studije: da u vreme davanja uzoraka nisu imali bolesti povezane sa poremećajem imunskog sistema, da nisu korisnici duvanskih proizvoda, da u prethodnih šest meseci nisu koristili antibiotike ili suplementaciju probioticima i da nisu imali operaciju slepog creva. Ovi isključujući kriterijumi su identifikovani kao važni za praćenje ispitivanih fenomena, pošto mogu značajno uticati na sastav mikrobiote creva i modulaciju imunskog odgovora. Prosek godina donora u trenutku davanja uzoraka bio je 33, pri čemu je najmlađi donor imao 21, a najstariji 46 godina. Svi donori su potpisali dobrovoljni pristanak za učešće u studiji, pri čemu su u dokumentu detaljno upoznati sa ciljevima studije, a u skladu sa odlukom Etičke komisije Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu (INEP-UB) broj 02-765/2 i Helsinškom deklaracijom. Uzorci krvi i fecesa su uzeti u toku istog dana od svakog pojedinačnog donora, kako bi se omogućila relevantna analiza asocijacije mikrobiote i imunoloških parametara. Neposredno nakon sakupljanja uzoraka, fekalni materijal je adekvatno obeležen i spakovan u zamrzivač za duboko zamrzavanje na -80 °C. Uzorci periferne krvi su po uzimanju odmah korišćeni za diferencijaciju monocita u DC u laboratoriji. Reproducibilnost protokola za diferenciranje DC, promene u ekspresiji fenotipskih markera i funkcijskih molekula, kao i preciznost metode za praćenje ovih promena (imunocitohemijsko obeležavanje i merenje fluorescence protočnim citofluorimetrom) su praćeni kod tri donora, koji su uzorke periferne krvi dali tri puta tokom tri nedelje.

3.1.2. Izolacija mononuklearne frakcije periferne krvi

Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) izolovane su iz leukocitno-trombocitnog sloja cele krvi (engl. *buffy coats*). Ovaj sloj se nakon centrifugiranja izdvaja između eritrocita sa donje strane i sloja plazme neposredno iznad. Kako bi se izolovale samo PBMC, iz ove ćelijske suspenzije koja se sastoji od svih ćelijskih elemenata krvi sem eritrocita, korišćen je gustinski gradijent za razdvajanje Lymphoprep sa gustinom 1,077 g/mL (PAA Laboratories, Linc, Austrija) uz centrifugiranje. Prvi korak podrazumevao je površinsko nanošenje ćelijske suspenzije na gradijent u epruveti, pri čemu se uočavaju dve faze, a zatim se nakon centrifugiranja tokom 20 minuta na 2200 rpm (engl. *Revolutions Per Minute of rotor*) pojavljuje i sloj

mononuklearnih ćelija između gradijenta i gornje faze. Isprane ćelije su čuvane u potpunom medijumu za kultivaciju.

Kako bi se iz dobijene PBMC frakcije izolovali monociti korišćen je Monocytes isolation kit II (Milteny Biotec, Bergiš Gladbah, Nemačka). Nekoliko koraka koje proizvođač preporučuje je prethodilo izolaciji monocita. Pre svega prebrojane su ćelije PBMC frakcije, kako bi se naspram željenog broja ćelija za dalje eksperimente preračunalo koju zapreminu antitela je neophodno koristiti za izolaciju monocita. Nakon toga su ćelije inkubirane sa smešom biotinom konjugovanih antitela (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a) u preporučenoj koncentraciji tokom 10 minuta. Ova antitela su bila specifična za ćelije koje nisu monociti. Sledeća inkubacija u trajanju od 15 minuta, omogućila je da se za biotin vežu anti-biotin antitela koja su bila konjugovana sa magnetnim kuglicama. Magnetna izolacija monocita dovodi do razdvajanja monocita od ostatka ćelija koje se zadržavaju na magnetu, dok se neobeleženi monociti sakupljaju u medijumu za gajenje ćelija. Čistoća prečišćene frakcije bila je veća od 90 %.

Dodatno, za potrebe ispitivanja potencijala DC za indukciju Th ćelijskog profila, korišćenjem komercijalnog CD4⁺ T cell isolation kita (Milteny Biotec, koji uključuje smešu CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, $\gamma\delta$ TCR i CD235a antitela) negativno su sortirani alogeni CD4⁺ T limfociti iz PBMC drugih donora.

3.1.3. Diferencijacija nezrelih DC iz monocita periferne krvi

Kako bi se dobile imDC, monocitna frakcija je gajena u potpunom CellGenix GMP (engl. *Good manufacturing practice*) DC medijumu sa dodatkom 100 ng/mL humanog rekombinantnog GM-CSF (Leucomax) i 20 ng/mL humanog rekombinantnog IL-4 (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, Sjedinjene Američke Države (SAD)). Ćelije su gajene tokom četiri dana u inkubatoru na 37 °C pri atmosferi zasićenoj sa 5 % ugljen-dioksida (CO₂), u ukupnom broju od 3 × 10⁵/mL u ploči sa 24 bunarčića (Nunc, Roskild, Danska).

3.1.4. Stimulacija sazrevanja nezrelih DC

Nakon četiri dana kultivacije, deo kultura imDC od svakog donora je stimulisan sa 200 ng/mL LPS poreklom od *Escherichia coli* 0,111:B4 (Sigma Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) i 20 ng/mL IFN- γ (R&D Systems) tokom narednih 16 sati, kako bi se podstaklo njihovo sazrevanje u mDC. Ćelije su sakupljene petog dana i korišćene za dalje analize funkcije i fenotipa.

3.1.5. Fenotipska i funkcijska karakterizacija nezrelih i zrelih DC

Fenotipska analiza ćelija dobijenih protokolom za diferencijaciju i ćelija dobijenih nakon izlaganja aktivacionim signalima urađena je na Partec Cube 6 (Sysmex Partec GmbH, Nemačka) i BS LSR II (Beckton Dickinson, San Hoze, Kalifornija, SAD) protočnom citometru. Ćelije su obeležene primarnim antitelima konjugovanim sa fluorohromom koja su rastvorena u fosfatnom puferom sa dodatkom soli (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) i 0,1 % NaN₃ i 0,5 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS). Za potrebe fenotipske karakterizacije korišćena su antitela (klon): anti-CD14-FITC (TUK4), anti-CD83 biotin (HB15) (Milteny Biotec), anti-CD1a-PerCP/Cy5.5 (HI149), anti-CD83-FITC (HB15), anti-ILT3-PEcy7 (ZM4.1), anti-HLA-DR-Alofikocijanin-Cy7 (L243), anti-CD86-PerCP/

Cy5.5 (BU63) i anti-CD40-Alofikocijanin (Biolegend, San Dijego, Kalifornija, SAD), anti-CD86-PE (IT2.2), anti-ILT3-PE (ZM4.1) (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), anti-HLA-DR-PerCP (L243) (R&D Systems) (FITC - fluorescein izocijanat, PerCP - peridinin-hlorofil protein, Cy - cijanin, PE - fikoeritrin). Neposredno pred svaku analizu je vršena kompenzacija preklapanja signala korišćenjem uzoraka koji su obeleženi jednim antitelom. Nespecifična fluorescencija je određena pomoću kontrole i njihovih izotipskih antitela (engl. *Fluorescence Minus One control*, FMO). U svakom uzorku analiza je urađena na minimum 5000 ćelija.

Nivo zastupljenosti citokina koje proizvode imDC i mDC, kao što su IL-12p70, IL-1 β , TNF- β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8 i IL-22 određivan je u supernatantima pomoću LEGENDPlex sistema (Biolegend), a prema uputstvu proizvođača. Kod 12 od 14 donora je nivo zastupljenosti IL-1 β bio ispod praga detekcije, dok je kod svih 14 donora nivo TNF- β bio takođe ispod praga detekcije. Zbog toga su IL-1 β i TNF- β isključeni iz daljih analiza.

Rezultati fenotipske analize su prikazani kao brožane vrednosti procenata ćelija koje ekspresiraju testirani antigen ili kombinaciju antigena (%) ili kao srednja vrednost intenziteta ekspresije testiranog antigena (engl. *Mean Fluorescence Intensity*, MFI). Nivo promene (% i MFI) ekspresije antigena (fenotipski markeri i funkcijski molekuli) nakon stimulacije DC izračunat je deljenjem vrednosti dobijenih za mDC sa vrednostima kod imDC.

3.1.6. Potencijal DC za indukciju Th ćelijskog profila

DC su gajene u kokulturi sa CD4⁺ T limfocitima u cilju ispitivanja potencijala DC za indukciju diferencijacije Th profila u mikrotitar pločama sa „U“ dnom. Odnos ćelija u kokulturi je bio 1:10 (Broj DC, 1×10^4 : broj CD4⁺ T limfocita 1×10^5). Kultivacija je trajala pet dana u inkubatoru na 37 °C, sa zasićenjem atmosfere od 5 % CO₂. U poslednjih šest sati gajenja DC i CD4⁺ T limfocita, u kokulture je dodat PMA (20 ng/mL, Sigma Aldrich) i CaI jonofor (500 μ g/mL, Sigma Aldrich). Nakon toga su sakupljeni supernatanti kultura i analizirana je produkcija citokina pomoću sistema fluorescentnih kuglica (Th-13 plex, Legendplex, Biolegend).

3.2. Eksperimentalne životinje

Dark Agouti (DA) pacovi koji su korišćeni u ovoj studiji odgajani su u vivarijumu INEP-UB u skladu sa prethodno razvijenim protokolima u kontrolisanim uslovima, sa nesmetanim pristupom vodi i peletiranoj hrani. Sve eksperimentalne procedure su bile u skladu sa odobrenjem Etičke komisije INEP-UB i preporukama Evropske direktive o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe (Direktiva 2010/63/eu) i odobrene su od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (Odluka br. 323-07-11160/2019-05/1).

3.3. *In vitro* diferencijacija imunosupresivnih MDSC iz progenitora kostne srži

3.3.1. Izolacija ćelija iz kostne srži DA pacova

DA pacovi su eutanazirani korišćenjem anestetika ksilazina i ketamina kao što je to prethodno opisano [386]. Nakon toga su uklonjeni koža i mišići, iščašen kuk i dislocirani

femur i tibija. Kostni su isprane u HCl, pa u etanolu u Petri šolji, a zatim u sterilnom PBS-u. Isečeni su krajevi sa obe strane kostiju, kako bi se sa jedne strane iglom u kojoj se nalazi RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*) medijum (Sigma Aldrich) istisnule ćelije kostne srži u Petri šolju. Nakon sakupljanja materijala kostne srži, savijenom sterilnom iglom prvo debljom pa onda tanjom, razbijani su ćelijski klasteri kako bi se dobila ćelijska suspenzija koja je profiltrirana kroz filter veličine pora 30 μm , zatim centrifugirana 10 minuta na 1600 rpm. Ćelijski talog nakon cetrifugiranja tretiran je četiri minuta puferom za liziranje ćelija koji predstavlja 0,8 % amonijum hlorid (NH_4Cl) koji ima pH 7,3, nakon čega je suspenzija centrifugirana i isprana. Posle ovog tretmana ćelije su resuspendovane u kompletnom RPMI medijumu (RPMI medijum koji sadrži 10 % FCS (fetalni serum teleta, engl. *Fetal Calf Serum*) (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) u koji su dodati antibiotici (penicilin, streptomycin, gentamicin; svaki 1 %) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Hesens, Nemačka)). Broj vijabilnih ćelija je određen nakon bojenja tripan plavim prebrojavanjem u hemocitometru uz pomoć svetlosnog mikroskopa.

3.3.2. Diferencijacija MDSC iz prekursora kostne srži

Za potrebe diferencijacije MDSC iz prekursora kostne srži ćelije su gajene u kompletnom RPMI medijumu (20×10^6 ćelija u T-75 flasku (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) sa 12 mL medijuma) u prisustvu koktela za diferencijaciju koji čine rekombinantni glodarski (rg) rgFLT-3 (20 ng/mL, Perpotech, Roki Hil, Nju Džerzi, SAD), rgGM-CSF (20 ng/mL, R&D System) i 40 ng/mL rgIL-6, a prema kombinaciji ranije korišćenih protokola [387–389]. Jedan T-75 flask je sadržao navedeni koktel za diferencijaciju (FLT-3/GM-CSF/IL-6) (ove ćelije su onačene kao kontrolne MDSC, MDSC-K), dok je u drugi dodat i 1 $\mu\text{g/mL}$ PGE2 [249] (ove ćelije su označene kao MDSC-PGE2), a oba flaska sa ćelijama su tokom naredna četiri dana čuvana u inkubatoru na 37 °C pri zasićenosti atmosfere sa 5 % CO_2 . Kulturama ćelija je dodato 3 mL odgovarajućeg svežeg RPMI medijuma za diferencijaciju drugog dana kultivacije. Nakon diferencijacije ćelije su sakupljene u PBS sa 0,02 % natrijum etilendiamintetrasirćetne kiseline (Na-EDTA) i centrifugirane na 1600 rpm tokom 15 minuta. MDSC su prečišćene korišćenjem Pancol gustinskog gradijenta (1,077 g/mol, PAN Biotech, Ajdenbah, Nemačka) u okviru prstena koji dominantno čine ćelije niske gustine, karakteristične za MDSC [390].

3.3.3. Diferencijacija makrofaga i DC iz prekursora kostne srži

Protokol za diferencijaciju makrofaga/DC iz prekursorskih ćelija kostne srži podrazumeva gajenje ćelija u kompletnom RPMI medijumu u prisustvu 20 ng/mL rgGM-CSF i 20 ng/mL rgFLT-3 tokom šest dana [391,392]. Nakon diferencijacije, ćelije su izolovane na gradijentu na isti način kao MDSC.

3.3.4. Morfološka karakterizacija MDSC, makrofaga i DC

Nakon diferencijacije iz ćelija kostne srži MDSC, makrofage i DC su pripremljene kao citospin preparati, 1×10^4 ćelija u 20 μL PBS je nanošeno na pločice koje su obložene poli-L-lizinom i centrifugirane u Rotafix 32 centrifugi (Andreas Hettich GmbH & Co., Tutlingen, Nemačka). Preparati su osušeni na vazduhu i obojeni korišćenjem May-Grunwald Giemsa boje (Sigma Aldrich). Nakon bojenja preparati su posmatrani na svetlosnom mikroskopu.

3.3.5. Funkcijska karakterizacija MDSC

3.3.5.1. Ispitivanje supresivne funkcije MDSC

3.3.5.1.1. Izolacija splenocita

Splenociti (leukociti slezine) su izolovani iz slezine eutanaziranih zdravih DA pacova. Kapsula je otvorena na vrhu kako bi sadržaj lakše bio istisnut pritiskanjem sterilnom iglom. Nakon inicijalnog oslobađanja ćelija, klasteri ćelija su razbijeni korišćenjem šprica sa 20 G iglom. Sakupljeni materijal oslobođen iz slezine je profiltriran kroz 30 µm filter i ispran sa RPMI medijumom koji je sadržao 2 % FCS. Nakon centrifugiranja talog je resuspendovan u RPMI sa 2 % FCS i ćelije su stavljene na Pancol gustinski gradijent i centrifugirane na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta na 4000 rpm. Isprane ćelije na dnu tube su tretirane sa puferom za liziranje u periodu od tri minuta, a nakon toga su isprane dva puta. Za određivanje broja ćelija korišćena je boja tripan plavo.

3.3.5.1.2. Test supresije proliferacije splenocita

MDSC dobijene od prekursora iz kostne srži su gajene zajedno sa splenocitima koji su prethodno aktivirani konkanavalinom A (engl. *Concanavalin A*, ConA). Prvobitno su splenociti obeleženi FarRed-om (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD) prema uputstvima proizvođača, a zatim su stimulisani 0,5 µg/mL ConA (Sigma Aldrich). MDSC i aktivirani splenociti (3×10^5) su kokultivisani u odnosima 1:5 (6×10^4 MDSC), 1:10 (3×10^4 MDSC), 1:20 ($1,5 \times 10^4$ MDSC) i 1:40 ($0,75 \times 10^4$ MDSC). Ovako zasejane kokulture su gajene tokom četiri dana na 37 °C, pri atmosferi zasićenoj sa 5 % CO₂ i 90 % vlažnosti. Kao kontrola su korišćene kulture splenocita obeležени FarRed-om i tretiranih ConA bez MDSC, kao i tehničke kontrole splenociti koji su tretirani ConA bez obeležavanja i splenociti koji nisu tretirani ConA, a obeleženi su FarRed-om. Nakon četiri dana gajenja u kokulturi ćelije su sakupljene i obeležene rastvorom 5 µg/mL propidijum jodida (engl. *Propidium Iodide*, PI) koji boji jedra nekrotičnih ćelija i ćelija u kasnoj apoptozi. Obeležene ćelije su analizirane na protočnom citometru (BD LSR II, BD Biosciences). Proliferacija ćelija je posmatrana analizom FarRed razblaženja, nakon što su odstranjeni dubleti i mrtve ćelije (pozitivne na PI).

3.3.5.2. Merenje produkcije NO

Potencijal MDSC za produkciju NO analiziran je u supernatantima sakupljenim nakon četiri dana kultivacije korišćenjem Griess reagensa (Abcam, Kembridž, Velika Britanija) koji se koristi za detekciju nitritnih jona koji nastaju kao produkti razgradnje NO, a prema uputstvima proizvođača. ApSORbanca je očitana na talasnoj dužini 540 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (BioTek EL800, Agilent Scientific Instruments, Kalifornija, SAD). Koncentracija NO je određena pomoću standardne krive.

3.4. Efekat MDSC na tok bolesti i imunski odgovor u modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

3.4.1. Životinjski model multiple skleroze - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis pacova

Kapacitet MDSC da smanje inflamaciju *in vivo* proučavan je u modelu EAE kao što je prethodno opisano [393]. Ukratko, ženke DA pacova starosti osam nedelja, sa težinama u rasponu od 138 do 166 g, nasumično su podeljene u tri eksperimentalne grupe koje su sačinjene od po 10 životinja ujednačene težine. Eksperiment je ponovljen četiri puta, od čega je tokom dva eksperimenta praćen ceo tok bolesti, a tokom druga dva eksperimenta životinje su žrtvovane u piku bolesti (Dan 15) kako bi se ispitali mehanizmi.

Simptomi bolesti se boduju na osnovu lestvice: 0 - bez kliničkih simptoma, 1 - mlitav rep, 2 - periferna paraliza (pareza) zadnjih esktremiteta, 3 - paraliza zadnjih ekspremiteta, praćena inkontinencijom, 4 - fatalna progresija bolesti i/ili smrt. Ukoliko se primete simptomi koji su slabijeg intenziteta, onda se dodeljuju prelazni bodovi (0,5; 1,5; 2,5).

3.4.2. Izazivanje eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod DA pacova, MDSC tretman i praćenje toka bolesti

Životinje su anestetizirane mešavinom ketamina i ksilazina i nakon toga im je injektirano 50 μ L emulzije koja sadrži ukupni homogenat kičmene moždine rastvoren u PBS-u u jednakim odnosima, CFA i 4 mg/mL *Mycobacterium tuberculosis* (Difco/BD Diagnostics, Sparks, Merilend, SAD) u predelu stopala zadnje desne šape. Jedan dan nakon imunizacije, jedna grupa životinja je dobila tretman sa 2×10^6 MDSC-K dobijenih iz prekursora kostne srži, po pacovu. Druga grupa je tretirana istim brojem MDSC-PGE2. MDSC ($2 \times 10^6/200 \mu$ L) su bile aplikovane intraperitonealno. Nakon osam dana od imunizacije, životinje su svakodnevno praćene, uz merenje težina, kako bi se uočili simptomi bolesti. Nekoliko parametara je proučavano kako bi se odredila težina bolesti, kao što su incidenca bolesti, početak pojavljivanja prvih simptoma bolesti, trajanje bolesti, maksimalni klinički skor i kumulativni indeks bolesti (zbir dnevnih srednjih vrednosti za klinički skor u jednoj grupi podeljen sa ukupnim brojem dana). Životinje su posmatrane tokom 27 dana od imunizacije.

Neposredno pred indukciju EAE (Dan 0) i u piku bolesti (Dan 15), sakupljen je fekalni materijal od svih životinja i ostavljen u zamrzivaču za duboko zamrzavanje na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. U piku bolesti, životinje su anestetizirane i urađena je perfuzija organa kroz desnu komoru srca fiziološkim rastvorom tokom pet minuta, nakon čega su žrtvovane i sakupljeni su organi. Dodatno, tri zdrave životinje, kojima nije izazvana bolest i nisu dobijale tretman sa MDSC, a slične starosti i težine kao životinje iz eksperimentalnih grupa, žrtvovane su kako bi se sakupili uzorci creva. Skupljeni su uzorci ileuma neposredno uz cekum i skladišteni na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, a uzorci slezine i kičmene moždine su odmah korišćeni za karakterizaciju ćelijskih infiltrata na protočnom citometru. Deo uzoraka kičmene moždine je pripremljen za imunohistohemijsku analizu, a uzorci ileuma su pripremljeni u Trizolu za analizu ekspresije gena za funkcijske molekule korišćenjem reakcije polimerizacije lanaca u realnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain*

Reaction RT-PCR ili *Quantitative PCR*, qPCR). Deo splenocita je korišćen za kultivaciju u cilju analize produkcije citokina na sistemskom nivou. Čelijski infiltrat slezine izolovan je kao u potpoglavlju 3.3.5.1.1. **Izolacija splenocita.** Čelijske suspenzije kičmene moždine su pripremljene prema prethodno opisanom protokolu u Radović *i sar*, 2015 [394]. Ukratko, prikupljene kičmene moždine su prvo usitnjene na ledu i tretirane kolagenazom (0,5 mg/mL, Gibco) i dezoksiribonukleazom (40 IU/mL, Sigma Aldrich) tokom 30 minuta na 37 °C. Nakon ispiranja, ćelije su razdvojene na Percoll gradijentu gustine u centrifugi na 4000 rpm tokom 20 minuta.

3.4.3. Fenotipska karakterizacija ćelija

MDSC, kao i čelijske suspenzije dobijene iz slezine i kičmene moždine sakupljenih u piku bolesti (Dan 15), su obojene specifičnim setom antitela i okarakterisane na BD LSR II protočnom citometru (BD Biosciences). Rezultati su analizirani uz pomoć FlowJoVX (BD Biosciences) i FCS Express 7 (Denovo software).

Ćelije su prvo isprane jednom u PBS-u koji je sadržao 0,01 % natrijum azida (Sigma Aldrich), a onda inkubirane tokom 15 minuta sa 2 % rastvorom normalnog seruma pacova u PBS-u (eBioscience, Frankfurt na Majni, Nemačka) u cilju blokade Fc receptora na mijeloidnim ćelijama. Obeležavanje je urađeno monoklonskim antitelima koja su konjugovana sa fluorohromima. Za površinsko bojenje ćelije su inkubirane sa antitelima razblaženim u PBS-u sa dodatkom 0,01 % NaN₃ u odgovarajućim koncentracijama, kako je priloženo u Tabeli 1. Inkubacija je trajala 30 minuta na 4 °C.

Unutarćelijsko bojenje usledilo je nakon površinskog obeležavanja pomoću kita za fiksaciju i permeabilizaciju (Flow Cytometry Fixation and Permeabilization Buffer Kit I, R&D Systems). Obeležavanje IFN- γ , IL-10, IL-17 i Foxp3 u T ćelijama koje se nalaze u infiltratima iz slezine i kičmene moždine usledilo je nakon aktivacije ćelija sa PMA (20 ng/mL), jonomicinom (500 ng/mL) i monenzinom (2 μ M) (Sigma Aldrich). Preko 5000 ćelija je korišćeno za svaku analizu, postavljanjem graničnika tako da se izbegnu mrtve ćelije. FSV620 (BD Bioscience) boja za vijabilnost ćelija je korišćena kako bi se iz dalje analize otklonile mrtve ćelije (nisko na skali FSC/SSC). Preklapanje signala između kanala je kompenzovano na početku analize, korišćenjem pojedinačno obeleženih ćelija, a nespecifična fluorescencija je određena korišćenjem odgovarajućih izotipskih negativnih kontrola.

Tabela 1. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju MDSC pacova i čelijskih infiltrata kičmene moždine i slezine.

Naziv antitela/agensa i fluorohrom	Razblaženje	Proizvođač
PerCP/Cy5.5 streptavidin	1:200	BioLegend
PE/Cy7 streptavidin	1:200	BioLegend
IgG negativna kontrola (Alofikocijanin)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
IgG1 negativna kontrola (Alexa Fluor 488; PE)	1:10	BioRad
IgG1 negativna kontrola (Alexa Fluor 647)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
IgG1 negativna kontrola (biotin)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific

IgG2 negativna kontrola (FITC)	1:50	Thermo Fisher Scientific
IgG2 negativna kontrola (Alofikocijanin)	1:50	BioLegend
IgM negativna kontrola (FITC)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Anti-pacovsko CD68 (Alexa Fluor 647)	1:10	BioRad
Anti-pacovsko CD4 (biotin)	1:10	BioRad
Anti-pacovsko MHC II (R-PE)	1:10	BioRad
Anti-pacovsko CD172a/SIRP- α (biotin)	1:10	BioRad
Anti-pacovsko CD3 (Alexa Fluor 647)	1:10	BioRad
Anti-mišje/pacovsko IL-17A (FITC)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Anti-pacovsko HIS-48 (FITC)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Anti-pacovsko CD161 (biotin)	1:50	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Anti-pacovsko CD25 (FITC)	1:100	BD Pharmingen
Anti-pacovsko CD103 (biotin)	1:50	BD Pharmingen
Anti-pacovsko IL-10 (PE)	1:20	BD Pharmingen
Anti-pacovsko RP-1 (Alexa Fluor 647)	1:50	BD Pharmingen
Anti-pacovsko CD86 (biotin)	1:50	BD Pharmingen
Anti-mišje/pacovsko/humano Foxp3 (Alofikocijanin)	1:20	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific
Anti-pacovsko IFN- γ (FITC)	1:20	BioLegend
Anti-mišje/pacovsko CD11b (Alofikocijanin)	1:50	BioLegend
Anti-pacovsko CD86 (FITC)	1:50	BioLegend
Anti-pacovsko CD45 (PE)	1:50	BioLegend
Anti-mišje/pacovsko CD11b (biotin)	1:50	BioLegend
Anti-pacovsko CD80 (PE)	1:50	BioLegend

3.4.4. Merenje produkcije citokina

U cilju ispitivanja uticaja MDSC na sistemski imunski odgovor životinja u piku EAE, deo splenocita je kultivisan u mikrotitar ploči (Sarstedt) sa 24 bunarčića (100 μ L suspenzije sa 2×10^6 splenocita po bunarčiću). Stimulacija ćelija je izvršena dodavanjem 2,5 μ g/mL ConA (Sigma Aldrich) tokom 24 sata. Čist supernatant, bez ćelijskih ostataka, korišćen je za ELISA test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) za određivanje produkcije IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-17, IL-10 i IFN- γ prema uputstvima navedenim u specifikaciji proizvoda (R&D Systems). Standardna kriva je korišćena za određivanje koncentracija ispitivanih citokina u uzorcima.

3.4.5. Mikroskopska analiza ćelijskog infiltrata u piku bolesti

Kičmena moždina je izolovana iz eutanaziranih DA pacova u piku bolesti (Dan 15). Kako bi se utvrdila količina ćelijskog infiltrata u kičmenoj moždini, lumbalni delovi kičmenih moždina su fiksirani u 4 % paraformaldehidu tokom dve nedelje. Iz tkiva je voda uklonjena kroz seriju rastvora 70 %, 96 %, 96 % i 100 % etanola, a zatim je izvršen korak prosvetljivanja u ksilolu rastuće koncentracije (33 % u etanolu, 66 %, 100 % i 100 %)

kako bi se uklonio i alkohol. Tkivo je nakon toga kalupljeno u parafin pomoću uređaja Tissue Embedding Center EC 350 (Especialidades Médicas, Myr, Španija). Na mikrotomu su napravljene presece debljine 5-7 μm . Dalji koraci u pripremi mikroskopskih preparata tkiva uključivali su uklanjanje parafina iz preseka uz pomoć ksilola i rehidraciju tkiva kroz seriju alkohola, od većih ka manjim koncentracijama (100 %, 96 % i 70 % etanol). Zatim je usledilo bojenje hematoksilinom i eozinom (Sigma Aldrich), montiranje pokrovnog stakalca kanada balzomom i posmatranje pod svetlosnim mikroskopom.

Za potrebe imunofluorescentne analize, na rehidratirane parafinske preseke je dodat BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*) sat vremena kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela, a zatim su presece inkubirani sa mišjim anti-pacovskim CD45 antitelom (OX22, Biolegend, 5 μg /preseku) i poliklonskim zečijim anti-pacovskim MBP antitelom (Novus Biologicals, 5 μg /preseku) na 4 °C tokom noći. Nakon prekonoćne inkubacije, preparati su isprani u PBS-u i inkubirani sa sekundarnim antitelima anti-mišjim IgG-Alexa 546 i anti-zečijim IgG-Alexa 488 (oba po 2 μg po preseku, Thermo Fisher Scientific) tokom tri sata. Nakon toga je usledilo ispiranje u PBS i bojenje preseka DAPI (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (1 μg po preseku) i fiksacija medijumom za montiranje preparata (Bio-Optica, Milano, Italija). Preparati su posmatrani na epi-fluorescentnom mikroskopu (Axiovert A1, Carl Zeiss, Hajdelberg, Nemačka) uz upotrebu sledećih filtera: UV za DAPI (UV-2B, ex:330-380 nm, DM 400, BA 435), zeleni filter za detekciju MBP (engl. *Maltose-Binding Protein*) (B-2A, ex:450-490 nm, DM 505, BA 520) i crveni filter za detekciju CD45 (G-2, ex:510-560 nm, DM 575, BA 590). Uz pomoć monohromatske kamere su dobijene zasebne slike za svaki filter koje su naknadno preklopljene korišćenjem ImageJ softvera (National Institutes of Health, Betezda, Merilend, SAD).

3.4.6. Test praćenja kretanja MDSC

Za potrebe praćenja kretanja MDSC u organizmu nakon primene u životinjama, korišćene su MDSC ćelije diferencirane u prisustvi PGE2 koje su nakon razdvajanja na gradijentu gustine obojene fluorescentnom bojom CFSE (0,5 μM , Thermo Fisher Scientific) (engl. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) prema uputstvima proizvođača. DA pacovi su podeljene u dve grupe od po devet životinja, pri čemu je životinjama u jednoj grupi izazvan EAE, dok je druga grupa bila kontrolna. Dan nakon imunizacije, obe grupe životinja su istovremeno tretirane intraperitonealno pomoću MDSC-PGE2. Nakon trećeg, sedmog i desetog dana životinje su eutanizirane i sakupljeni su organi za analizu kretanja MDSC-PGE2 obeleženih sa CFSE na protočnom citometru. Preponski, pazušni i mezenterični limfni čvorovi, kao i Pejerove ploče su usitnjeni na čeličnim mrežicama i profiltrirani na filteru sa porama veličine 30 μm . Nakon toga je usledilo ispiranje ćelija u RPMI medijumu koji je sadržao 2 % FCS. Splenociti i ćelijski infiltrat kičmene moždine izolovani su prema protokolu koji je opisan u Radovic *i sar.*, 2015 [394], uz digestiju pomoću 0,5 mg/mL kolagenaze (Gibco) i 40 IU/mL dezoksiribonukleaze (Sigma Aldrich) i razdvajanje na gradijentu gustine sa Percoll reagensom (centrifugiranje na 4000 rpm tokom 20 minuta).

Nakon izolacije ćelije su isprane u PBS i obeležene bojom za diskriminaciju između vijabilnih i mrtvih ćelija, FVS620 (BD Bioscience), prema uputstvima proizvođača. Ćelije su pripremljene za analizu na protočnom citometru dodatnim bojenjem CD45:PE i CD11b:biotin-streptavidin PE/Cy7 što je omogućilo detekciju MDSC-PGE2 obeleženih CFSE u okviru CD45⁺CD11b⁺ ćelijske populacije.

3.5. Dizajn *in vitro* eksperimenta u modelu intestinalne barijere

3.5.1. Uzgajanje i diferencijacija Caco-2, humane intestinalne ćelijske linije

Caco-2 ćelije (ATCC HTB-37) su kultivisane u flaskovima površine 75 cm² (T-75 flask, Sarstedt) za uzgajanje adherentnih ćelija, u DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa višom koncentracijom glukoze 4500 mg/L (DMEM High Glucose, Gibco/Thermo Fisher Scientific), uz dodatak 20 % FBS, 1 % L-glutamina i 1 % smeše antibiotika penicilina i streptomicina (Gibco) (kompletni DMEM). Nakon što bi ćelije dostigle konfluentnost od 70 % flaska, ćelije su tretirane tripsinom (Torlak, Beograd, Srbija) koji sadrži 1mM EDTA i prebačene u nove flaskove. Za potrebe eksperimenta zasejano je 4×10^4 ćelija na inserte sa veličinom pora 0,4 μ m (Sarstedt) i ćelije su tako gajene tokom 18 dana kako bi se diferencirale u ćelije sa osobinama epitelnih ćelija creva, uz promenu medijuma svakog drugog dana. Ćelije su tokom ove kultivacije testirane na prisustvo mikoplazme u tri različita termina (1, 9. i 16. dana kulture).

3.5.2. Model intestinalne barijere i dizajn eksperimenta

Caco-2 ćelije imaju sposobnosti da se spontano dele i formiraju jednosloj nalik epitelu u kom ćelije kroz nekoliko nedelja zadobijaju karakteristike zrelih epitelnih ćelija creva, sa uspostavljenim čvrstim međućelijskim vezama na lateralnim stranama. Diferencirane ćelije se odlikuju polarizacijom, pa se tako razlikuje apikalna strana koja je u crevima okrenuta ka lumenu, formira se bazalna strana koja u crevima naleže na sloj *lamina propria*, a čvrste veze koje se uspostavljaju omogućavaju održavanje integriteta *in vitro*. Zbog toga je ova ćelijska linija pogodna za ispitivanje narušavanja ili očuvanja integriteta barijere u različitim eksperimentalnim uslovima [395,396].

Za potrebe eksperimenta, Caco-2 ćelije su diferencirane na insertima i nakon toga su raspoređene u mikrotitar ploče sa 24 bunarčića. Za određivanje netoksične koncentracije spermidina i putrescina, Caco-2 ćelije su prvo tretirane različitim koncentracijama ovih poliamina. Kako se koncentracija od 0,4 mM oba pomenuta poliamina pokazala netoksičnom za ćelije, diferencirane Caco-2 ćelije su tretirane spermidinom i putrescinom u navedenoj koncentraciji. U bunarčiće mikrotitar ploče prvo su dodati monociti izolovani iz periferne krvi zdravog donora (Izolacija monocita opisana je u sekciji **3.1.2. Izolacija mononuklearne frakcije periferne krvi**) u prisustvu GM-CSF (100 ng/mL) i humanog rekombinantnog IL-6 (40 ng/mL, R&D Systems), zatim su na bunarčiće postavljeni inserti sa diferenciranim Caco-2 sa dodatkom 500 μ L kompletnog DMEM i ćelije su ovako gajene u kokulturi tokom četiri dana [249]. Nakon završene diferencijacije humanih MDSC, sakupljeni su supernatanti iz inserta i iz bunarčića za potrebe ELISA testa. Caco-2 ćelije i MDSC su sakupljene u mikrotube i korišćene za izolaciju RNK, a deo MDSC za fenotipsku karakterizaciju na protočnom citometru. Kao eksperimentalne kontrole su korišćene MDSC bez tretmana poliaminima, tretirane spermidinom i putrescinom (0,05 mM spermidin i 0,05 mM putrescin), kao i kokulture Caco-2 ćelija i MDSC bez poliamina.

3.5.3. Fenotipska karakterizacija humanih MDSC

Ćelijske suspenzije koje su sadržale MDSC diferencirane od humanih monocita su obojene specifičnim setom antitela i okarakterisane na BD LSR II protočnom citometru (BD Biosciences). Rezultati su obrađeni uz pomoć FlowJoVX (BD Biosciences) i FCS Express 7 (Denovo software).

Ispitivane ćelije su jednom isprane u PBS-u koji je sadržao 0,01 % natrijum azida (Sigma Aldrich) i zatim inkubirane tokom 15 minuta sa FcR-blocking rastvorom (True-stain, Biolegend). Za obeležavanje površinskih molekula ćelije su inkubirane sa monoklonskim antitelima razblaženim u PBS-u sa dodatkom 0,01 % NaN₃ u odgovarajućim koncentracijama kako je prikazano u Tabeli 2. Inkubacija je trajala 30 minuta na 4 °C.

Za detekciju ekspresije ARG-1 unutar MDSC ćelija korišćen je kit za fiksaciju i permeabilizaciju (Flow Cytometry Fixation and Permeabilization Buffer Kit I, R&D Systems) i dodatno su obeležene mišjim anti-humanim ARG-1 antitelom. Za svaku analizu je korišćeno minimalno 5000 ćelija, postavljanjem graničnika tako da se izbegnu mrtve ćelije. FSV620 (BD Biosciences) boja za vijabilnost ćelija je korišćena kako bi se iz dalje analize otklonile mrtve ćelije. Preklapanje signala između kanala je kompenzovano na početku analize, korišćenjem pojedinačno obeleženih ćelija, a nespecifična fluorescencija je određena korišćenjem odgovarajućih negativnih kontrola.

Tabela 2. Antitela korišćena za fenotipsku karakterizaciju humanih MDSC.

Naziv antitela (Fluorohrom)	Razblaženje	Proizvođač
HLA-DR (Alofikocijanin-Cy7)	1:50	BioLegend
IgG2 negativna kontrola (Alofikocijanin-Cy7)	1:50	BioLegend
CD14 (FITC)	1:50	BioLegend
IL-10 (Alofikocijanin)	1:20	BioLegend
ILT3 (PE-Cy7)	1:50	BioLegend
IgG2 negativna kontrola (PE-Cy7)	1:50	BioLegend
ILT4 (Alofikocijanin)	1:50	BioLegend
IgG2 negativna kontrola (Alofikocijanin)	1:50	BioLegend
ARG-1 (PE-Cy7)	1:50	BioLegend
IDO-1 (Alofikocijanin)	1:20	R&D Systems

3.5.4. ELISA test

Quantikine ELISA kit (R&D Systems) je korišćen prema uputstvima proizvođača za određivanje koncentracije citokina TGF-β1 koji produkuju Caco-2 ćelije u insertima. Koncentracije citokina su preračunate na osnovu standardne krive.

3.6. Izolovanje ukupne RNK iz ćelija i tkiva

RNK iz uzoraka ileuma DA pacova je izolovana po proceduri za fenol/hloroform ekstrakciju prema opisanom protokolu [397]. Ukratko, uzorci su iz mikrotuba prebačeni u hladne avane u koje je prethodno sipan suvi led. Tkiva su homogenizovana na suvom

ledu pomoću tučka, nakon čega su uzorci resuspendovani u 500 µL denaturišućeg pufera (25 mM natrijum-citrat, 4 M guanidin tiocijanat, 0,1 M 2-merkaptoetanol, 0,5 % natrijumova so N-lauroilsarkozina), prebačeni u nove sterilne mikrotube i ostavljeni na ledu tokom 15 minuta, kako bi se polako otopili. Nakon toga je usledila ekstrakcija kiselim fenolom (pH 4) koji je dodat u istoj zapremini kao denaturišući pufer, a sukcesivno su dodati i 2M kiseli natrijum acetat u zapremini od 50 µL, i hloroform u zapremini od 100 µL po uzorku. Nakon laganog mešanja, uzorci su čuvani na ledu tokom 15 minuta. Posle centrifugiranja u hladnoj centrifugi (4 °C) na 13000 rpm tokom 20 minuta u mikro tubi se formiraju dve faze razdvojene beličastom interfazom. Pažljivo je preuzet samo gornji vodeni sloj u kome se nalazi RNK, i sa njim je ponovljen korak fenolske ekstrakcije kako bi se dobio što čistiji prinos RNK. Poslednji koraci podrazumevali su RNK precipitaciju hladnim izopropanolom tokom 30 minuta na -20 °C, centrifugiranje i ispiranjem uzoraka hladnim 75 % etanolom. Nakon što je pokupljen sav etanol posle centrifugiranja, talog se sušio na sobnoj temperaturi 15 minuta, nakon čega je resuspendovan u 35 µL sterilne vode bez nukleaza.

RNK iz *in vitro* diferenciranih MDSC DA pacova i *in vitro* diferenciranih humanih MDSC, izolovana je korišćenjem 500 µL TRIzol (Thermo Fisher Scientific), uz dodavanje 100 µL hloroforma (Sigma Aldrich/Merck). Nakon toga uzorci su centrifugirani na 12000 g tokom pet minuta u centrifugi na 4 °C. Gornja vodena faza je sakupljena iz svakog uzorka i prebačena u nove sterilne mikro tube i u svaki uzorak dodato je po 600 µL hladnog 70 % etanola. U narednim koracima su korišćene komponente kita za izolaciju RNA (Total RNA Purification Mini Spin Kit, Genaxxon Bioscience, Biberach, Nemačka) prema uputstvu za korišćenje kita u kombinaciji sa Trizolom, uz korekciju koraka sa tretmanom dezoksiribonukleazom koji je trajao 30 minuta. Koncentracije RNK u svim uzorcima merena je na spektrofotometru BioSpec-nano (Shimadzu, Tokio, Japan). Integritet izolovane RNK je proveren na 2 % agaroznom gelu, a odsustvo genomske DNK u uzorcima potvrđeno je polimeraznom lančanom reakcijom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) pomoću prajmera za umnožavanje *GAPDH* gena (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) za humane uzorke i *Actb* gena (za β-aktin) za pacovske uzorke. Nakon izolacije, svi uzorci sa izolovanom RNK su skladišteni u zamrzivaču za dubinsko zamrzavanje na -80 °C.

3.7. Reverzna transkripcija (RT) i polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qPCR)

Reverzna transkripcija je urađena korišćenjem komercijalnog kita (RevertAid RT Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific). Za sintezu komplementarne DNK (engl. *Complementary*, cDNK), kao matrica za RNK-zavisnu DNK polimerazu (enzim reverzna transkriptaza) korišćeno je 0,5 µg ukupne RNK izolovane iz dela ileuma DA pacova, 0,1 µg ukupne RNK izolovane iz MDSC DA pacova i 0,1 µg ukupne RNK izolovane iz humanih MDSC. Napravljena je prva smeša zapremine 13 µL koja je sadržala određenu koncentraciju RNK molekula, nasumične heksamere i sterilnu vodu bez nukleaza, koja je tokom pet minuta zagrevana na 65 °C kako bi se uklonile sekundarne strukture RNK i omogućila enzimska reakcija. U početnu smešu zatim je dodat reakcioni pufer, dNTP smeša, RiboLock inhibitor ribonukleaza i enzim RevertAid reverzna transkriptaza. Nakon njihovog dodavanja u odgovarajućoj koncentraciji, ukupna zapremina je bila 20 µL. Sinteza cDNK se odvijala u sledećim uslovima: 25 °C tokom 10 minuta, 42 °C tokom 60 minuta, 70 °C tokom 10 minuta. Korišćen je PCR za proveru

uspešnosti sinteze cDNK, sa odgovarajućim prajmerima za gene koji se konstitutivno eksprimiraju (engl. *housekeeping genes*) karakterističnim za vrstu i to *GAPDH* za humane uzorke i *Actb* za uzorke poreklom iz DA pacova.

Detekcija ekspresije ciljnih gena urađena je na aparatu za qPCR (7500 real-time PCR system, Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) pomoću FastGene 2X IC Green Universal ROX (Nippon Genetics, Tokio, Japan). Za svaki ispitivani gen je napravljena smeša zapremine 8 μ L po reakciji koja je sadržala: 5 μ L IC Green, 1 μ L Rox low, 1 μ L *Forward* i 1 μ L *Reverse* prajmera. Zatim je dodavana cDNK u zapremini od 2 μ L po reakciji po bunarčiću. Korišćen je program u kojem je inicijalna denaturacija podešena na 95 °C tokom 2 minuta, denaturacija na 95 °C tokom 5 sekundi, hibridizacija prajmera i elongacija na 60 °C tokom 30 sekundi. Svaki uzorak je testiran u tehničkom duplikatu ili triplikatu.

Normalizacija je urađena na osnovu ekspresije pacovskog *Actb* gena ili humanog *GAPDH* gena, a rezultati su prikazani kao relativna zastupljenost ciljnog gena korišćenjem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode. Nivo relativne ekspresije RNK za kludin i okludin u eksperimentalnim grupama izračunat je kao nivo njihove promene kod zdravih životinja (relativna ekspresija iRNK = 1). Prajmeri koji su korišćeni nalaze se u Tabeli 3.

Tabela 3. Lista prajmera koji su korišćeni za umnožavanje cDNK

Vrsta	Naziv proteina	Naziv gena	Sekvence prajmera (5'-3')
pacov	β -aktin	<i>Actb Forward</i> <i>Actb Reverse</i>	AGCCATGTACGTAGCCATCC CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
	Kludin 5	<i>Cldn5 Forward</i> <i>Cldn5 Reverse</i>	GAAC TACGTCTAAGGGCGGG ACCCAACCTAACTTGCCTCG
	Okludin	<i>Ocln Forward</i> <i>Ocln Reverse</i>	TCATGCCTTGGGGATTGAGC AGGACTTCCCAGAGTGCAGA
	Arginaza 1	<i>Arg1 Forward</i> <i>Arg1 Reverse</i>	CAAGCTGGGAATTGGCAAAG GGTCCAGTCCATCAACATCAAA
	Ciklooksigenaza 2	<i>Ptgs2 Forward</i> <i>Ptgs2 Reverse</i>	TCCAGTATCAGAACCGCATTGCCT AGCAAGTCCGTGTTCAAGGAGGAT
	Inducibilna azot oksid sintaza	<i>Nos2 Forward</i> <i>Nos2 Reverse</i>	GACCAGAACTGTCTCACCTG CGAACATCGAACGTCTCACA
čovjek	Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza	<i>GAPDH Forward</i> <i>GAPDH Reverse</i>	TCCACCACCCTGTTGCTGTA TGAACGGGAAGCTCACTGG
	Azot oksid sintaza 2	<i>NOS2 Forward</i> <i>NOS2 Reverse</i>	CAGCGGGATGACTTTCCAA AGGCAAGATTTGGACCTGCA
	Ciklooksigenaza 2	<i>PTGS2 Forward</i> <i>PTGS2 Reverse</i>	CCGGGTACAATCGCACTTAT GGCGCTCAGCCATACAG

3.8. Izolovanje ukupne DNK iz fecesa

Izolacija DNK iz fecesa dobrovoljnih davaoca je urađena istovremeno iz svih 14 uzoraka u sterilnim uslovima korišćenjem laminarne komore biobezbednosti nivo 2, kako bi se izbegla kontaminacija uzoraka mikroorganizmima iz sredine. DNK iz fecesa DA pacova izolovana je u istim uslovima. Neposredno pre izolacije DNK, izmerena je težina

fecesa na digitalnoj vagi i izolacija je urađena upotrebom komercijalnog kita za izolaciju DNK iz fekalnog materijala (ZR Fecal DNA MiniPrep, Zymo Research, Orindž, Kalifornija, SAD) prema uputstvima proizvođača. Za homogenizaciju uzoraka korišćen je Digital Disruptor Genie (Scientific Industries Inc., Bohemija, Nju Jork) tokom 30 minuta na 2400 rpm. Koncentracije DNK izolovane iz uzoraka zdravih donora, kao i DA pacova, određene su korišćenjem spektrofotometra BioSpec-nano (Shimadzu) i Qubit fluorometra (Thermo Fisher/Invitrogen) korišćenjem PicoGreen boje prema uputstvima navedenim u komercijalnom kitu. Svi uzorci su ostavljeni u zamrzivaču na -20 °C do uslužnog sekvenciranja DNK.

Deo izolovane DNK iz uzoraka fecesa DA pacova iskorišćen je za detekciju SFB pomoću qPCR. Detekcija ciljnih gena je urađena kako je prethodno opisano u potpoglavlju **3.7. Reverzna transkripcija (RT) i polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qPCR)**, a korišćeni su prajmeri „Bact 1369 Forward” 5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3' i odgovarajući „Prok 1492 Reverse” 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', zatim „SFB-specific 16S rRNA gene Forward” 5'-AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC-3' i „universal 16S rRNA gene Reverse” 5'- TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG-3'. Normalizacija je urađena na osnovu ekspresije dela gena bakterijske 16S rRNK, a rezultati su prikazani kao relativna zastupljenost ciljnih gena za detekciju SFB korišćenjem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode.

3.9. Sekvenciranje dela gena za 16S ribozomsku RNK primenom metode sekvenciranja nove generacije

Za sekvenciranje gena za 16S rRNK u uzorcima DNK iz fecesa dobrovoljaca i iz fecesa DA pacova izabrana je strategija sekvenciranja hipervarijabilnih V3-V4 regiona gena za 16S rRNK uz očitavanje uparenih krajeva, a broj ciklusa za svako očitavanje iznosio je 250 (engl. *paired end*, PE250).

DNK izolovana iz fecesa zdravih donora je sekvencirana na MiSeq platformi (Illumina) u FISABIO centru za sekvenciranje i bioinformatiku (Valensija, Španija) prema njihovim standardnim protokolima, a uslužno sekvenciranje je omogućeno preko platforme ScienceExchange.

Ukupna DNK izolovana iz fecesa DA pacova sekvencirana je na NovaSeq6000 platformi u Novogene (Peking, Narodna Republika Kina). Prema njihovom protokolu, za PCR reakciju korišćen je Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, Ipsvič, Masačusets, SAD) i set prajmera 341F (5-CCTAYGGGRBGCASCAG-3) and 806R (5-GGACTACNNGGGTA TCTAAT-3), a PCR produkti su proveravani na 2 % agaroznom gelu sa SYBR Green bojom. Amplikoni dužine oko 400 do 450 baznih parova su korišćeni u daljoj analizi. Ujednačeni odnosi PCR produkata su pomešani i prečišćeni Qiagen Gel Extraction kitom (Qiagen, Hilden, Nemačka). Za pripremu biblioteke korišćen je kit NEBNext Ultra DNA Library Prep za Illumina platformu, nakon čega su biblioteke kvantifikovane na Qubit fluorimetru (Thermo Fisher Scientific) i sekvencirane. Dobijene sekvence su dodeljene odgovarajućim uzorcima na osnovu njihovih jedinstvenih barkod sekvenci u procesu demultipleksiranja i dostavljene putem *Amazon Web Service* linka ka skladištu u „oblaku” (engl. *cloud*), odakle su preuzete za dalju obradu i analizu.

3.10. Obrada podataka dobijenih metodom sekvenciranja nove generacije

3.10.1. Obrada i statistička analiza metagenomskih podataka fecesa zdravih donora

Prvobitno je, korišćenjem prinseq-lite programa [398] sa zadatim podešavanjima: „min_length: 50, trim_qual_right: 30, trim_qual_type: mean, trim_qual_window: 20“, urađena kontrola kvaliteta demultipleksovanih neobrađenih sekvenci (engl. *raw reads*) i uklonjene su sekvence lošeg kvaliteta. *Forward* i *Reverse* sekvence visokog kvaliteta su spojene pomoću FLASH programa [399] sa unapred predodređenim parametrima programa. Bioinformatički softver QIIME2 v2020.2 (engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*, <https://qiime2.org>) [400] je korišćen za dalju analizu sekvenci. Prvobitno su spojene sekvence dodatno filtrirane na osnovu ocene kvaliteta (engl. *quality score*) putem dodatka „q-score-joined“ sa opštim parametrima [401]. Nakon toga sekvence su pomoću dodatka „deblur denoise-16S“ [402] uz izmenu parametra „p-trim-length 439“, očišćene od dvosmislenih baza (engl. *ambiguous base*) i himernih sekvenci, i napravljena su dve tabele koje su se koristile za dalju analizu, tabela sa reprezentativnim sekvencama i tabela sa zastupljenošću karakteristika (engl. *feature table*). Određivanje taksonomskih kategorija omogućeno je pravljjenjem klasifikatora koji je treniran naspram Greengenes 13_8 baze sa 99 % sličnosti u okviru operacione taksonomske jedinice (engl. *Operational Taxonomic Unit*, OTU). Uzorci su normalizovani u odnosu na uzorak sa najmanjim brojem sekvenci (4000) i korišćeni za analizu alfa i beta diverziteta. Medijana vrednosti ekspresije svakog pojedinačnog analiziranog markera je korišćena za razdvajanje donora na one čije imDC slabije odgovaraju na stimulus (neresponderi, ekspimiraju markere čije su vrednosti manje ili jednake vrednostima medijane (\leq medijana)) i one čije imDC bolje odgovaraju na stimulus (responderi, ekspimiraju vrednosti markera koji su veći od medijane ($>$ medijana)). Kvantitativna mera brojnosti i ujednačenosti sastava mikrobiote (Šenonov indeks) određena je između zdavih donora koji su bili razdvojeni u dve grupe (respondere i nerespondere) za svaki ispitani marker. Razlike u mikrobioti između ovih grupa (Bray-Curtis distanca) utvrđene su pomoću dodatka „beta-group-significance“ uz upotrebu „p-method anosim“ i 999 permutacija [403]. Dobijene statistički značajne razlike u beta diverzitetu između grupa predstavljene su pomoću EMPeror PCoA dijagrama rasipanja (engl. *Principal Coordinates Analysis*) [404,405]. Rezultati analize diverziteta prikazani su grafički kao dijagrami kutije (engl. *boxplot*) koji su napravljeni u RStudio v1.2.5042 pomoću paketa ggplot2, a Pairwise Wilcoxon rank-sum test sa Benjamini-Hochberg (BH) metodom za korekciju višestrukih poređenja (engl. *False discovery rate*, FDR) je korišćen za poređenje vrednosti Šenonovog indeksa između dve grupe donora. Analiza diferencijalne zastupljenosti taksona između dve grupe donora za sve analizirane markere, urađena je u QIIME2 softveru pomoću „p-compositional“ dodatka [406] i ANCOM dodatka „composition ancom“ (engl. *Analysis of Composition of Microbiomes*) na različitim taksonomskim nivoima (60 imunskih markera naspram 6 filuma, 32 porodice, 58 rodova i 63 vrste). Za poređenja koja su imala W koeficijent preko 1, statistička značajnost je potvrđena sa Pairwise Wilcoxon rank-sum testom sa BH FDR metodom i grafički prikazana kao dijagrami kutije u RStudio pomoću nekoliko paketa, qiime2R (<https://github.com/jbisanz/qiime2R>), phyloseq [407], microbiome (<https://github.com/microbiome/microbiome>), ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org/>) i stats (R core team). Kako bi se dodatno utvrdila povezanost između imunoloških markera i bakterijskih taksona upotrebljena je linearna regresija pomoću lm funkcije u R-u, pri čemu je model korigovan za pol i godine. U slučaju odstupanja raspodele reziduala od

Gausove raspodele korišćena je strategija za normalizaciju podataka koja je uključivala dodavanje minimalnih vrednosti (engl. *pseudocount*) kao što je 0,0001 i logaritamsku transformaciju podataka. Beta koeficijenti i FDR korigovane p vrednosti korišćeni su za pravljenje toplotne karte (engl. *heatmap*) u GraphPad softveru. Koncentracije SCFA (mM ukupnih SCFA, mM koncentracija i relativni doprinos sirćetne, buterne i propionske kiseline) poređene su između dve grupe donora za sve ispitivane markere pomoću Pairwise Wilcoxon rank-sum testa, a rezultati su grafički prikazani pomoću ggplot funkcije. R programski paketi Hmisc (<https://github.com/harrelfe/Hmisc>) i corrplot (<https://github.com/taiyun/corrplot>) su korišćeni za pravljenje matrice Spirmanove rang korelacije i vizuelizaciju.

3.10.2. Obrada i statistička analiza metagenomskih podataka dobijenih iz fecesa DA pacova

Neobrađene sekvence bez prajmera i barkodova su najpre analizirane QIIME2 v2020-8 [400] softverom kako bi se proverio kvalitet sekvenci. Nakon proučavanja interaktivnih dijagrama kutije koji predstavljaju rezultat „demux summarize“ dodatka i odabira parametara za dalju obradu sekvenci, primenjen je DADA2 protokol [408] sa sledećim parametrima: „-p-trunc-len-f 227“ i „-p-trunc-len-r 224“. Nakon otklanjanja sekvenci koje su imale dvosmislene baze i himerne sekvence, sekvence visokog kvaliteta su spojene i napravljena je tabela zastupljenosti sa 2971 karakteristika (engl. *features*) i odgovarajućim reprezentativnim sekvencama. Da bi se karakteristikama u tabeli dodelili taksoni korišćen je dodatak za pravljenje naivnog Bajesovog klasifikatora treniranog na sekvencama ekstrahovanih iz SILVA 132 baze podataka (kriterijum 99 % sličnosti) [409,410] i „classify-sklearn“ dodatka u QIIME2.

Podaci dobijeni obradom u QIIME2 su zajedno sa tabelom sa meta podacima prebaćeni u RStudio v1.4.1717 (RStudio Team) pomoću paketa qiime2R (<https://github.com/jbisanz/qiime2R>) i objedinjeni u phyloseq objekat [407]. Kako bi se omogućila reproducibilnost analize, korišćena je funkcija set.seed = 999, nakon čega je korišćena funkcija u okviru phyloseq paketa za preračunavanje indeksa alfa (Šenon i Simpson indeksi) i beta diverziteta (Unweighted UniFrac distanca) uz normalizaciju broja sekvenci na 21600. Statistička značajnost dobijenih razlika za indekse alfa i beta diverziteta između dve vremenske tačke (Dan 0 i Dan 15) za svaku od grupa (kontrolna EAE grupa, grupa tretirana sa MDSC-K, grupa tretirana sa MDSC-PGE2) određena je korišćenjem uparenog Welch Two Sample T testa. Za poređenja između neuparenih podataka (Dan 15 između grupa životinja) korišćen je neupareni Studentov T test. Unweighted UniFrac matrice distanci su iskorišćene za pravljenje PCoA grafika kako bi se bolje uočila razlika u mikrobioti između uzoraka. Statistička značajnost u sličnostima između dve grupe je utvrđena analizom sličnosti (ANOSIM) [411] uz pomoć vegan (<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>) paketa. Vrednost R bliža 1 ukazuje na razliku između grupa.

Kako bi se utvrdila diferencijalna zastupljenost taksona na nivou vrste, roda i porodice korišćen je QIIME2 protokol za analizu kompozicija mikrobioma (ANCOM) [406] pri čemu su taksoni sa W većim od 1, dodatno testirani Pairwise Wilcoxon testom ili uparenim T testom u R. Za otkrivanje taksonomskih biomarkera između grupa u piku bolesti korišćena je LEfSe analiza [412] preko Galaxy platforme, pri čemu su podešeni parametri: LDA skor 3,5, α vrednost za Kruskal-Wallis test $<0,05$ i „all-against-all“ strategija za višestruko poređenje.

Rezultati predikcione analize metaboličke funkcije mikrobiote u piku bolesti dobijeni su korišćenjem PICRUSt2 [413] protokola, uz predoređene parametre, a koji se zasniva na pretraživanju marker gena i MetaCyc [414] baze podataka sa metaboličkim putevima. Kako bi se utvrdili diskriminatorni predikcioni putevi između ove tri grupe u piku EAE, rezultat PICRUSt2 protokola su analizirani LEfSe analizom na Galaxy platformi i putevi koji su imali LDA skor veći od 2 su grafički prikazani.

Raspodela kontinuiranih varijabli kao što su relativne učestalosti taksona i ćelijskih populacija, nivoi ekspresije markera i koncentracije metabolita, testirana je Shapiro-Wilk testom normalnosti. p vrednost 0,05 ili niža je smatrana statistički značajnom ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Prilikom višestrukih poređenja BH FDR je primenjen kako bi se korigovale lažno pozitivne p vrednosti (dobijanje statistički značajne razlike među podacima samo kao posledica velikog broja poređenja). Svi grafički prikazi su napravljeni koristeći graphics (v4.1.0) (R core team) i ggplot2 (v3.3.5) pakete ukoliko nije drugačije naglašeno u tekstu.

3.11. Dostupnost podataka

Sekvence delova gena za 16S rRNA iz uzoraka fecesa zdravih donora dostupne su na sajtu Evropske arhive nukleotidnih sekvenci (engl. *European Nucleotide Archive*, ENA) <https://www.ebi.ac.uk/ena> pod pristupnim kodovima: PRJEB41873 i ERP125715, dok se na istom sajtu sekvencama dobijenim iz uzoraka fecesa DA pacova može pristupiti uz kodove: PRJEB52193 i ERP136892.

3.12. Kvantifikacija odabranih metabolita bakterija

Kvantifikacija metabolita za koje je prediktivnom analizom pokazano da postoji razlika između upoređivanih grupa (respondera i nerespondera u eksperimentima sa humanim DC odnosno između netretiranih i MDSC-tretiranih životinja u piku bolesti) urađena je korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) na UltiMate 3000 UHPLC sistemu (Thermo Fisher Scientific) koji je sastavljen iz LPG 3400 HPLC pumpe, DAD 300 detektora, WPS 3000TSL automatskog sistema za preuzimanje uzoraka, TCC 3000 SD sistema za kolonu, SRD postolja za rastvore i AFC frakcionog kolektora. Dobijeni podaci su obrađeni upotrebom softverskog paketa Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher Scientific).

3.12.1. Određivanje koncentracije masnih kiselina kratkog lanca u fecesu zdravih donora i fecesu DA pacova

Ekstrakcija i kvantifikacija SCFA iz uzoraka fekalnog materijala zdravih donora i DA pacova urađena je u vodenom rastvoru prema opisanim protokolima koje su priložili De Baere *i sar*, 2013 i Stanisavljević *i sar*, 2019 [415,416]. Standardi za kalibraciju su napravljeni u koncentracijama od 0,5 mM do 50 mM za sirćetnu, buternu i propionsku kiselinu, kao i sukcinu kiselinu koja je korišćena kao unutrašnji standard (sve hemikalije su kupljene od Sigma Aldrich). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Hypersil Gold kolona (150 × 4,6 mm) (Thermo Fisher Scientific) namenjena za molekule veličine 3 μm koja je bila zaštićena zaštitnom pretkolonom. Mobilna faza je napravljena od 20 mM natrijum dihidrogen fosfata (NaH₂PO₄, Serva, Hajdelberg, Nemačka) uz korekciju do pH 2,22 sa

fosfornom kiselinom (H_3PO_4) (Merck) i acetonitrila HPLC čistoće (Sigma Aldrich). Tokom hromatografskog razdvajanja temperatura u sistemu za kolonu je bila održavana na 30 °C. Podešavanja za HPLC-UV gradijent program su prikazana u Tabeli 4 i Tabeli 5. Uzorci su nanošeni na kolonu u zapremini od 10 μ L, a UV detektor je bio podešen na talasnu dužinu 210 nm.

Za kvantifikaciju sirćetne, buterne i propionske kiseline korišćeni su UV spektri i poređenja sa standardima. Sukcinska kiselina, kao unutrašnji standard, korišćena je za kompenzaciju razlika nastalih tokom pripreme uzorka. Sva merenja su rađena u triplicatu. Koncentracije su određene prema formuli:

$$\text{SCFA (sirćetna, buterna, propionska kiselina)} = (\text{organska kiselina u fekalnom uzorku} \times 6 \times 10^{-3}) \times 1000 \text{ mmol/kg} / (\text{sukcinska kiselina u fekalnom uzorku} \times \text{početna masa fecesa}).$$

Tabela 4. HPLC-UV gradijent program za kvantifikaciju SCFA iz fekalnog materijala zdravih donora (ACN - acetonitril).

Vreme (min)	Protok (mL/min)	NaH ₂ PO ₄ (%)	ACN (%)
-5	0,8	100	0
3,5	0,8	100	0
4	0,4	92,5	7,5
7,5	0,4	92,5	7,5
8	0,4	85	15
10,5	0,4	85	15
11	0,4	80	20
13	0,4	80	20
13,5	0,4	80	20
20	0,4	75	25
20,5	1,2	100	0
23,5	1,2	100	0
24	0,8	100	0
25	0,8	100	0

Tabela 5. HPLC-UV gradijent program za kvantifikaciju SCFA iz fekalnog materijala DA pacova (ACN - acetonitril).

Vreme (min)	Protok (mL/min)	NaH ₂ PO ₄ (%)	ACN (%)
3,5	0,8	100	0
4	0,4	92,5	7,5
7,5	0,4	92,5	7,5
8	0,4	85	15
10,5	0,4	85	15
11	0,4	80	20
13	0,4	80	20
13,5	0,4	75	25
20	0,4	75	25
20,5	1	100	0

3.12.2. Određivanje koncentracije poliamina u fecesu DA pacova

Uzorci fekalnog materijala DA pacova sakupljenih u piku bolesti i od zdravih pacova rastvoreni su 11 puta dodavanjem 10 mM PBS pH 7,38 sa 150 μ M 1,6-diaminoheksana (Sigma Aldrich) u zapremini 10 puta većoj od mase fecesa. Izolacija poliamina je podrazumevala mešanje na vorteks aparatu jedan minut, inkubiranje uzoraka na ledu tokom 20 minuta, centrifugiranje na 15000 g tokom 10 minuta i odvajanje supernatanta. Supernatanti su čuvani u zamrzivaču na -20 °C do analize na HPLC.

Poliamini u fekalnim ekstraktima su derivatizovani kako bi mogli da se detektuju pomoću UV detektora. Derivatizacija i kvantifikacija poliamina na HPLC je urađena prema protokolu opisanom u Redmond i Tseng 1979 [417]. Protokol je podrazumevao korišćenje 1,6-diaminoheksana (Sigma Aldrich) kao unutrašnjeg standarda i benzoil hlorida (Sigma Aldrich) za derivatizaciju. Hromatografsko razdvajanje urađeno je na koloni Luna C18(2) (250 \times 4,6 mm) koja je namenjena za molekule veličine do 5 μ m sa veličinom pore od 100 Å (Phenomenex, Toren, Kalifornija, SAD). Mobilnu fazu su činili metanol i voda u odnosu 58:42. Hromatografija je rađena pri izokratskim uslovima, prilikom kojih se sastav mobilne faze ne menja tokom HPLC analize, dok je temperatura u sistemu za kolonu tokom razdvajanja održavana na 27 °C. Uzorci su nanošeni na kolonu u zapremini od 20 μ L, a UV detektor je bio podešen na talasnu dužinu 227 nm.

Spoljašnja standardna kalibraciona kriva je korišćena za određivanje koncentracije putrescina i spermidina. Standardi za putrescin i spermidin su napravljeni u rasponu koncentracija od 2 μ M do 400 μ M.

3.13. Određivanje aktivnosti alkalne fosfataze u fekalnom materijalu DA pacova

Integritet intestinalne barijere može da se utvrdi i merenjem aktivnosti enzima alkalne fosfataze u fekalnom materijalu. Ovaj esej primenjen je na fecesima sakupljenim od DA pacova iz sve tri grupe, kontrolne EAE grupe, MDSC-K i MDSC-PGE2 grupe u piku bolesti kao i od zdravih DA pacova, prema protokolu koji je opisan u Ismael *i sar*, 2021 [418]. Izmereno je 35 mg od svakog uzorka i homogenizovano u 1750 μ L pufera za ekstrakciju koji je napravljen od 1 mM magnezijum hlorida ($MgCl_2$) i 10 mM Tris-HCL sa pH 8,0. Homogenizovani uzorci su centrifugirani na 10000 g tokom 20 minuta. Nakon centrifuge, sakupljeni su supernatanti koji su pomešani sa puferom za rastvaranje (1 mM $MgCl_2$ i 200 mM Tris, pH 10,4) u odnosu 1:1. Uzorci su zatim inkubirani na 37 °C u termobloku tokom 10 minuta. Kao supstrat je korišćen nitrofenilfosfat u finalnoj koncentraciji 5 mM. Posle dodavanja supstrata, uzorci su dodatno inkubirani još pet minuta u termobloku. Enzimska reakcija je zaustavljena stavljanjem uzoraka na led i dodavanjem hladnog 0,02 M NaOH. Apsorbanca je izmerena na talasnoj dužini 410 nm. Sadržaj proteina u fecesu određen je korišćenjem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) prema uputstvima proizvođača. Aktivnost alkalne fosfataze je izražena kao mU enzima/mg proteina.

3.14. Statistička obrada podataka

Ekspresija fenotipskih markera i produkcija citokina od strane imDC i mDC poređena je uparenim Wilcoxon signed-rank testom. Koeficijent varijabilnosti je korišćen kao mera varijabilnosti u produkciji svakog pojedinačnog markera između donora. Kako bi se

utvrdila povezanost između podataka dobijenih u analizi mikrobiote i DC svojstava, izračunata je medijana ekspresije za svaki analizirani molekul na imDC, mDC kao i za nivo promene ekspresije za svaki pojedinačni molekul. Ove analize su urađene korišćenjem softvera GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). Zdravi donori su podeljeni u dve grupe (\leq medijana i $>$ medijana, opisano u potpoglavlju **3.10.1. Obrada i statistička analiza metagenomskih podataka fecesa zdravih donora**). Razlike između donora koji su podeljeni u dve grupe na ovaj način analizirane su za svaki marker pomoću Wilcoxon Rank Sum testa sa opštim parametrima (paired=FALSE) u Rstudio v1.2.5042 (R Studio team).

Za poređenje ekspresije fentipskih markera i funkcionalnih molekula, nivoa relativne ekspresije iRNK i produkcije NO između MDSC-K i MDSC-PGE2 korišćen je Studentov T test. One-way ANOVA sa Tukey testom za višestruka poređenja je korišćena za analizu nivoa relativne ekspresije iRNK, aktivnosti alkalne fosfataze i učestalosti i broja ćelijskih populacija u tkivima od značaja i produkcije citokina u splenocitima u piku između sve tri grupe. Statistička značajnost u kliničkim skorovima između sve tri grupe u svakoj vremenskoj tački kada su simptomi zabeleženi, proverena je Two-way ANOVA testom sa Dunnett-ovim *post-hoc* testom. Parametri koji ukazuju na težinu bolesti su poređeni između kontrolne grupe koja je razvila EAE i dva tretmana, statistička značajnost je ispitana Studentovim T testom, i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Log-rank test je korišćen za poređenje pojedinačnih skorova EAE između grupa. Nivoi SCFA i poliamina su poređeni između grupa korišćenjem Kruskal-Wallis testa. Sve statističke analize su urađene u GraphPad Prism 9 softveru (GraphPad Software).

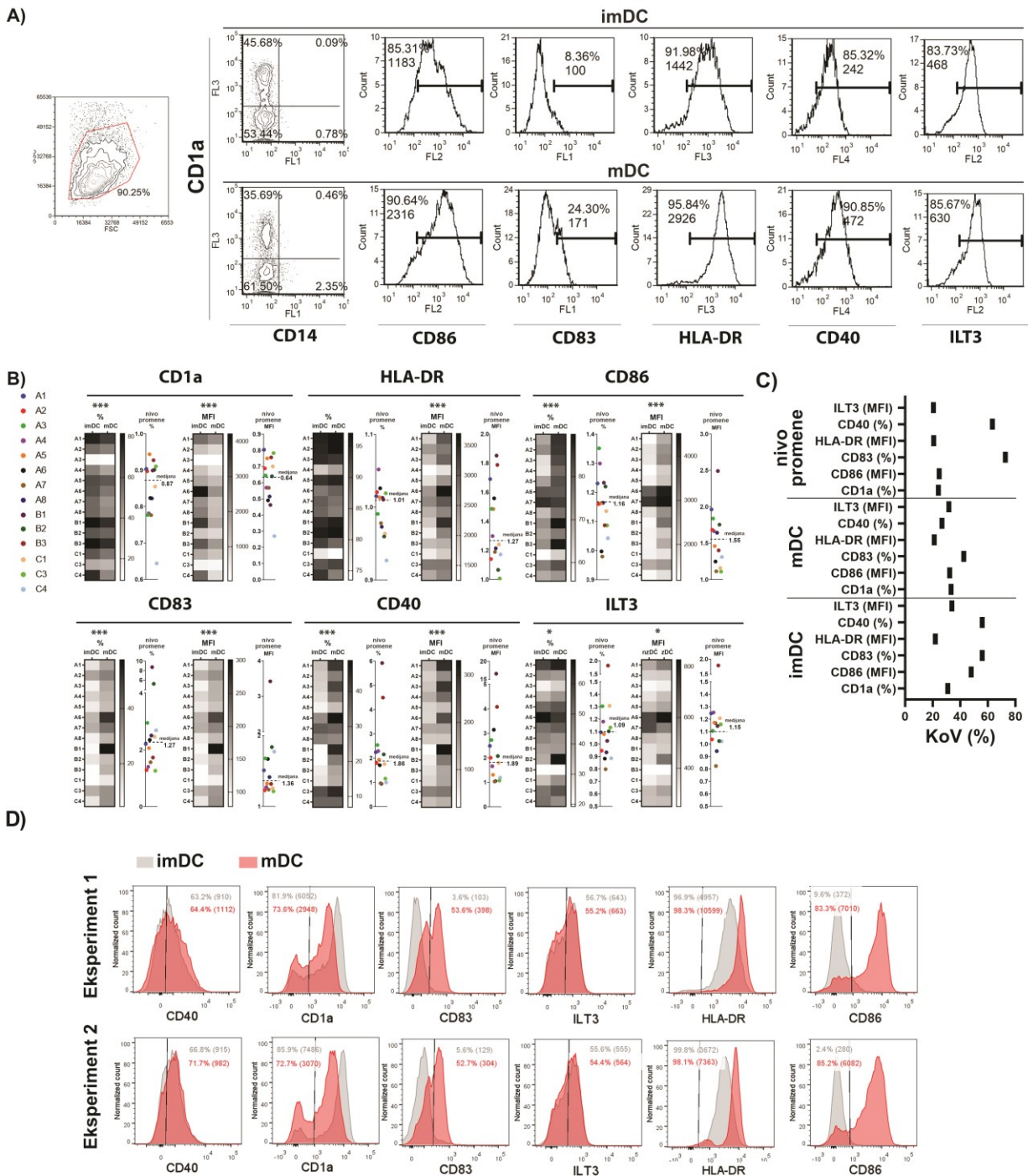
4. REZULTATI

4.1. POVEZANOST OSOBINA MIKROBIOTE CREVA SA IMUNOGENIM KAPACITETOM HUMANIH DENDRITSKIH ĆELIJA MONOCITNOG POREKLA

4.1.1. Analiza varijabilnosti ekspresije fenotipskih i funkcijskih markera nezrelih i zrelih DC između zdravih donora

Za potrebe analize razlika između zdravih donora u potencijalu monocita da se diferenciraju u DC, monociti su prečišćeni magnetnim sortiranjem i gajeni u CellGenix GMP DC medijumu u prisustvu GM-CSF i IL-4 tokom četiri dana. Prethodno je pokazano da se stimulacijom imDC kombinacijom LPS i IFN- γ , dobijaju vrlo imunogene mDC koje imaju sposobnost da pokrenu anti-tumorski Th1 odgovor [419,420]. U tom smislu je primenjen ovakav protokol i nakon 16h stimulacije je analiziran fenotip imDC i mDC (Slika 6). Rezultati su pokazali da se prilikom diferencijacije monocita u imDC smanjuje ekspresija CD14 markera karakterističnog za monocite i makrofage, a povećava ekspresiju CD1a markera [421]. Iako su monociti svih donora (n=14) snizili nivo ekspresije markera CD14 tokom diferencijacije u imDC (minimalna vrednost 0,6 % a maksimalna 3,7 % CD14⁺ ćelija), uočena je velika varijabilnost između donora u nivou povećanja ekspresije CD1a na imDC.

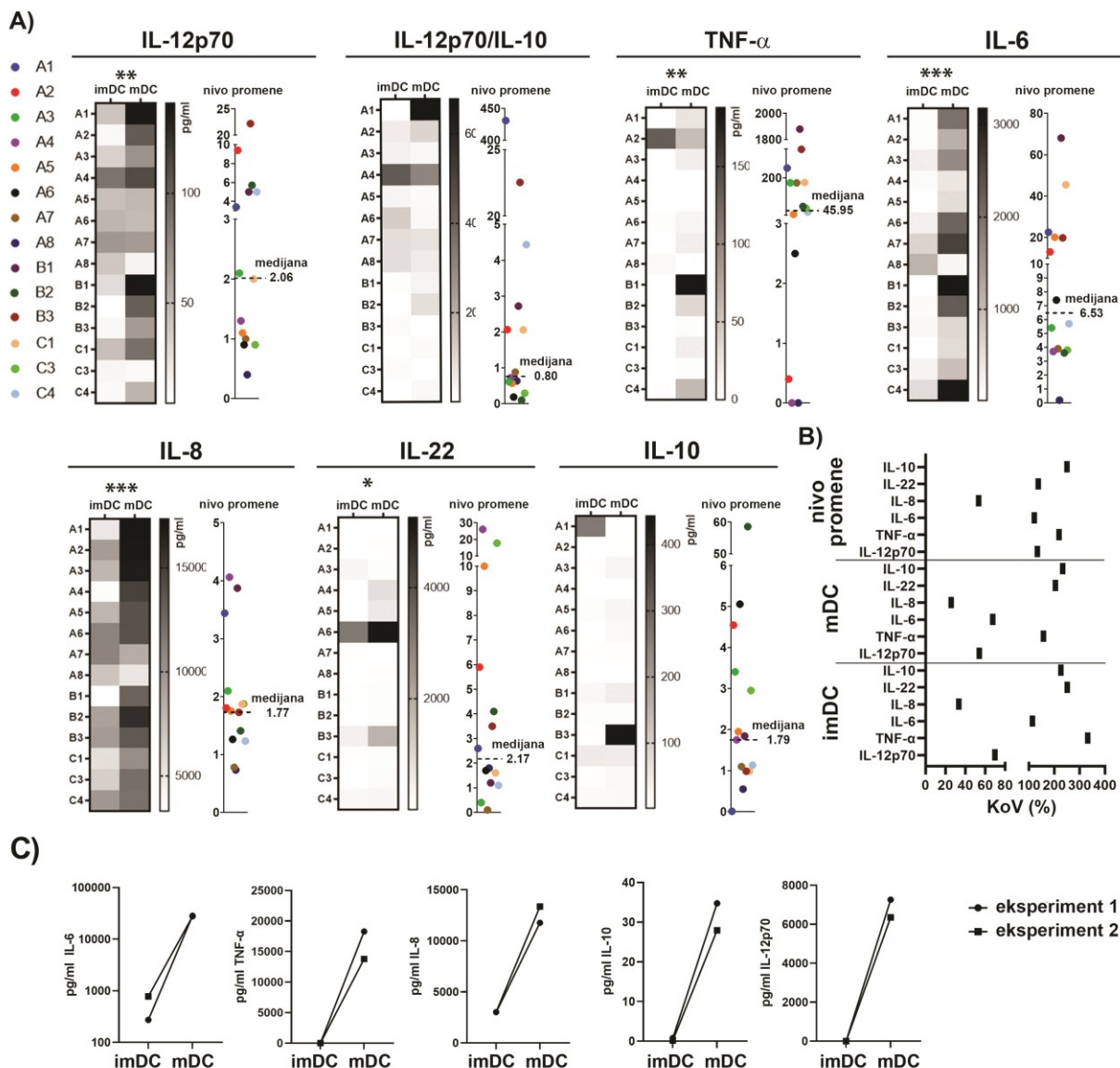
Osim toga, uočeno je da stimulacija LPS/IFN- γ povećava ekspresiju CD86, CD83, HLA-DR i CD40 ali da postoji varijabilnost između donora i u ekspresiji ovih molekula kako na imDC, tako i mDC (Slika 6B i C). Ovi molekuli su inače izuzetno važni za stabilnost mDC i adekvatnu aktivaciju T limfocita [422]. Ekspresija ILT3, molekula važnog za imunoregulatornu funkciju tolDC [423], takođe je varirala na imDC kod različitih donora. Varijacija u ekspresiji ILT3 je bila najizraženija nakon stimulacije kada je uočeno da je devet donora povećalo ekspresiju ovog molekula, dok je kod pet donora ekspresija ostala nepromenjena. Kako su uzorci donora (arbitratno obeleženi brojevima i slovima A, B, C) sakupljeni u dve vremenske tačke (uzorci od 8 donora označenih slovom A i brojevima sakupljeni su u jednom danu; uzorci od šest donora obeleženih slovima B i C i brojevima sakupljeni su sledećeg dana), nije pronađena razlika u nivoima ekspresije ispitivanih markera kada se na ovaj način podele donori u dve grupe prema vremenu uzorkovanja. Osim toga, analiza fenotipskih markera kod istih donora u tri vremenske tačke pokazala je da nema značajnih razlika u nivoima ekspresije na imDC, kao i prilikom odgovora na stimulus za sazrevanje (Slika 6D). Ovi rezultati ukazuju da varijacije između donora nisu bile posledica različitog vremena kultivisanja ćelija, već su svojstvene donora u datim eksperimentalnim uslovima.



Slika 6. Ekspresija fenotipskih markera i funkcijskih molekula na imDC i mDC nakon stimulacije LPS/IFN- γ . Nezrele DC su dobijene iz monocita u prisustvu GM-CSF i IL-4, a četvrtog dana su stimulisane kombinacijom LPS i IFN- γ tokom 16 sati. Čelije su sakupljene i obeležene za analizu na protočnom citofluorimetru. **A)** Dijagrami sa strategijom analize za detekciju specifične ekspresije ispitivanih molekula su prikazani za jednog donora. Iznad odgovarajućih histograma su navedeni procenti pozitivnih ćelija (%) i njihov srednji intenzitet fluoescencije (engl. *Mean Fluorescence Intensity*, MFI) za označeni molekul. **B)** Nivoi ekspresije markera na imDC i mDC su prikazani kao toplotne karte. Nivo promene za svaki marker preračunat je deljenjem dobijenih vrednosti za svaki molekul nakon stimulacije LPS/IFN- γ sa vrednostima ekspresije na imDC. Vrednosti za nivo promene prikazane su na tačkastom grafikonu za svakog donora različitom bojom. **C)** Grafički prikaz koeficijenta varijacije za ispitivane markere. **D)** Karakterizacija fenotipskih i funkcijskih molekula za jednog donora, od ukupno tri analizirana, u dve vremenske tačke, od ukupno tri analizirane, je prikazana na reprezentativnim histogramima. Statistička značajnost između nivoa ekspresije markera na imDC i mDC određena je uparenim Wilcoxon signed-rank testom. Statistički značajne relacije označene su zvezdicom (***) $p < 0,001$, * $p < 0,05$, a medijana je na tačkastom grafikonu (**B**) označena isprekidanom linijom. (imDC - nezrele DC, mDC - zrele DC, KoV - koeficijent varijacije).

4.1.2. Analiza varijabilnosti u produkciji citokina od strane nezrelih i zrelih DC

Za efikasnu imunoterapijsku primenu DC u borbi protiv tumora, neophodna je produkcija imunostimulativnih citokina koji pokreću antitumorski odgovor posredovan Th1 i Tc1 limfocitima [424]. Stoga je pored fenotipskih markera i kostimulatora, ispitano da li postoji varijacija između donora i u nivou produkcije citokina: IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-22 i IL-10 od strane imDC i nakon stimulacije LPS/IFN- γ (mDC) (Slika 7).



Slika 7. Citokinski profil imDC i mDC nakon stimulacije LPS/IFN- γ . Supernatanti kultura imDC i mDC svih donora su analizirani u cilju određivanja nivoa citokina pomoću obeleženih kuglica na protočnom citofluorimetru. **A)** Toplotne karte prikazuju nivo produkcije citokina kod imDC i mDC nakon stimulacije LPS/IFN- γ . Nivo promene za svaki citokin izračunat je deljenjem vrednosti produkcije citokina od strane mDC sa vrednostima kod imDC. Vrednosti za nivo promene prikazane su na tačkastom grafikonu za svakog donora različitom bojom. **B)** Varijabilnosti u produkciji citokina između DC različitih donora prikazane su kao koeficijent varijacije za ispitivane citokine. **C)** Reprerentativni grafikoni karakterizacije citokinskog profila za jednog donora od tri donora. Statistička značajnost između nivoa ekspresije markera na imDC i mDC određena je uparenim Wilcoxon signed-rank testom u statističkom softveru GraphPad Prism 9.0. Statistički značajne relacije označene su zvezdicom (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$), dok je medijana na tačkastom grafikonu (A) predstavljena isprekidanom linijom. (imDC - nezrele DC, mDC - zrele DC, KoV - koeficijent varijacije).

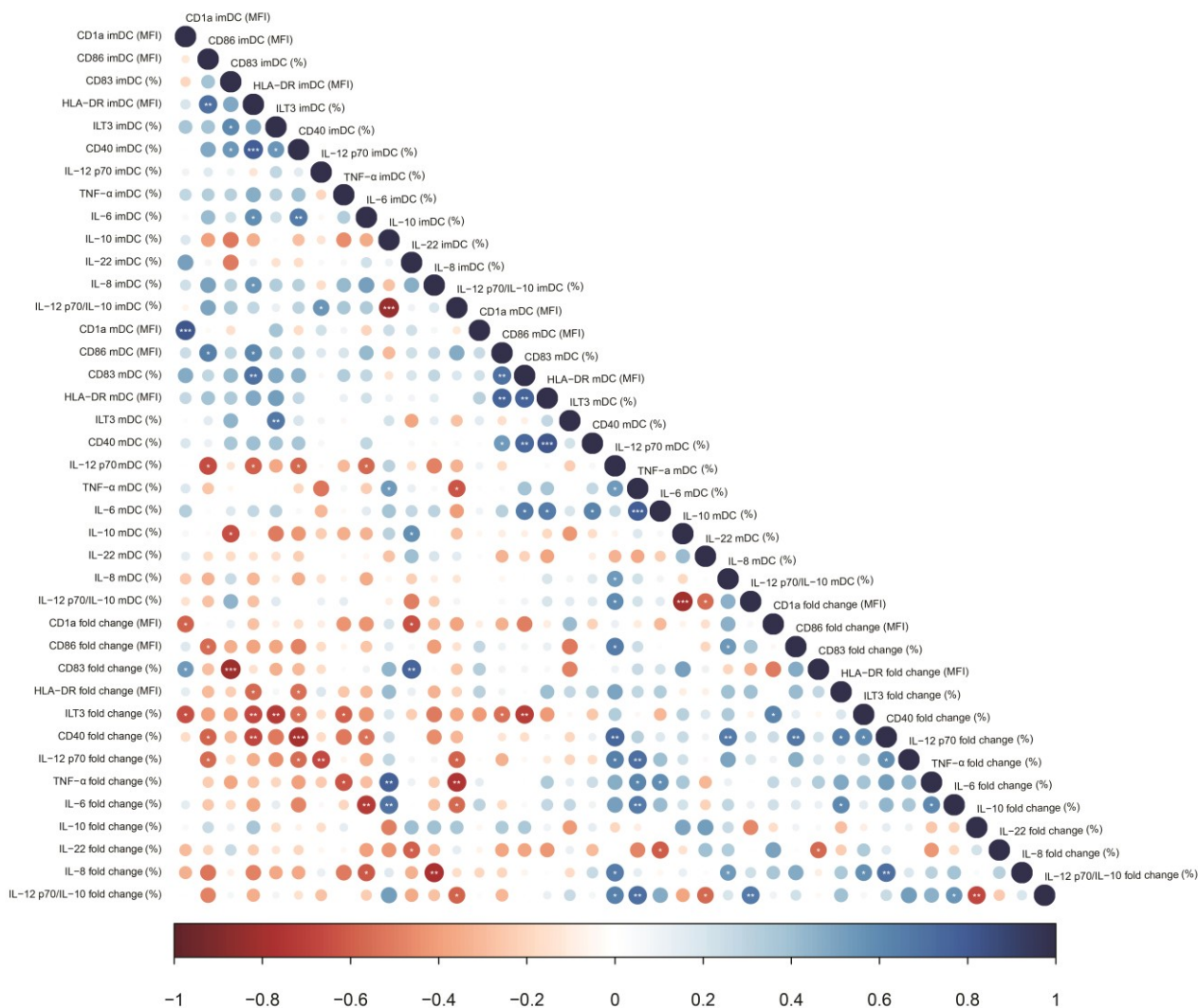
Rezultati su pokazali da u slučaju produkcije citokina postoji dosta izraženija varijabilnost između donora, u odnosu na ekspresiju fenotipskih markera (Slika 6B i Slika 7B). Takođe je uočeno da je kod većine donora povećana produkcija IL-6 nakon stimulacije imDC, dok je samo kod jednog donora došlo do smanjenja produkcije ovog citokina. U slučaju IL-8, nakon stimulacije povećana je njegova produkcija kod DC poreklom od 12 donora, dok je kod dva bila smanjena. Kada je u pitanju produkcija IL-12p70 od strane DC u odgovoru na stimulaciju (mDC), postojala je velika varijacija kod različitih donora - kod devet donora je bila povećana produkcija, kod četiri se nije promenio nivo produkcije, dok su DC jednog donora smanjile nivo produkcije ovog citokina u odgovoru na stimulus. mDC samo od tri donora nisu značajno povećale produkciju IL-22 nakon aktivacije. Imunosupresivni citokin IL-10 se nakon stimulacije LPS/IFN- γ pojačano proizvodovao kod mDC osam donora, mDC poreklom od četiri donora imale su neizmenjenu produkciju, a mDC dva donora su smanjile nivo produkcije ovog citokina. Za potrebe određivanja kapaciteta DC da pokrenu Th1 imunski odgovor, korišćen je odnos između produkcije IL-12p70 i IL-10. Na taj način je utvrđeno da DC poreklom od šest donora povećavaju ovaj odnos nakon stimulacije. Kao i za fenotipske markere, i ovde nije pronađena razlika u nivoima produkcije ispitivanih citokina kada se donori podele na dve grupe prema vremenskim tačkama u kojima su sakupljeni uzorci (podaci nisu prikazani). Analiza produkcije istih citokina kod donora u ponovljenim terminima analize je pokazala da postoje samo neznatne razlike u nivoima njihove produkcije od strane imDC i mDC (Slika 7C).

4.1.3. Korelacija ekspresije fenotipskih markera i produkcije citokina od strane na imDC i mDC

Povezanost između ekspresije posmatranih fenotipskih i funkcijskih molekula na imDC, mDC i stepena njihove promene, ispitivana je primenom korelacione analize (Slika 8). Rezultati su pokazali da je ekspresija CD1a na imDC pozitivno korelisala sa kapacitetom DC da povećaju ekspresiju CD83 nakon stimulacije, a negativno korelisala sa kapacitetom DC da povećaju ekspresiju ILT3 nakon izlaganja LPS/IFN- γ . Nivoi ekspresije kostimulatornih markera CD86 i CD80 na imDC su negativno korelisali sa nivoom promene ILT3. Uočeno je i da ekspresija CD40, HLA-DR, CD86 i CD83 pozitivno koreliše sa ekspresijom ILT3 na imDC. Sa druge strane, ekspresija CD40, HLA-DR, CD86 i CD83 na imDC je negativno korelisala sa kapacitetom imDC da nakon stimulacije dodatno povećaju nivo ekspresije ovih molekula.

Analiza je pokazala da postoji negativna korelacija između produkcije TNF- α , IL-6, IL-8, IL-22, IL-12p70, kao i odnosa produkcije IL-12p70/IL-10 od strane imDC sa kapacitetom DC da povećaju produkciju ovih citokina nakon stimulacije. Produkcija IL-12p70/IL-10 od strane imDC je negativno korelisala sa nivoom promene ovog odnosa nakon stimulacije DC.

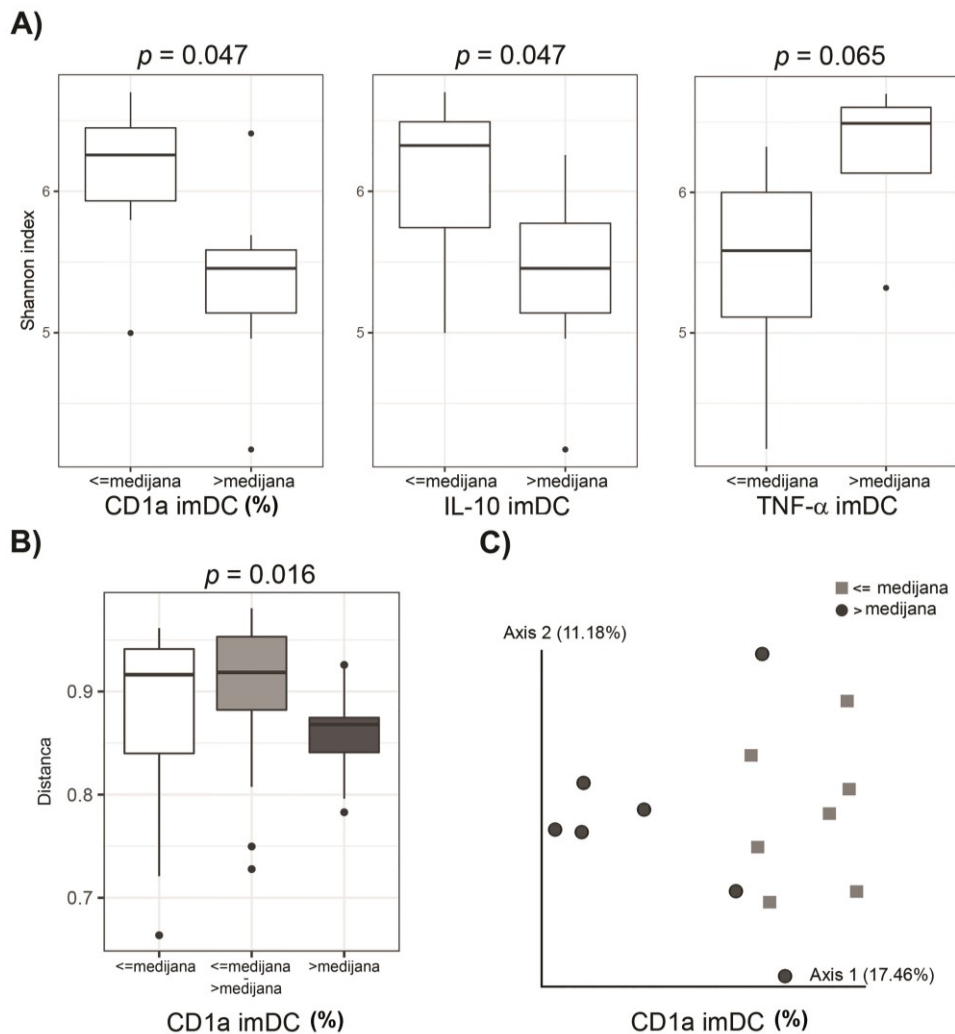
Kada su posmatrani zajedno markeri i citokini, uočeno je da ekspresija IL-6, CD40, CD86 i HLA-DR na imDC negativno koreliše sa produkcijom IL-12p70 od strane mDC, dok produkcija ovog citokina pozitivno koreliše sa ekspresijom CD40 i CD86 na mDC kao i sa produkcijom IL-8 i TNF- α na mDC. Kapacitet DC da povećaju produkciju citokina IL-6 i TNF- α u odgovoru na stimulaciju LPS/IFN- γ u pozitivnoj je korelaciji sa produkcijom IL-10 od strane imDC.



Slika 8. Spirmanova rang korelacija između fenotipskih markera i funkcijskih molekula imDC i mDC. Korelacija između ispitivanih molekula imDC i mDC, kao i njihovih nivoa promene, prikazana je grafički u formi korelograma. Plave tačke označavaju pozitivne korelacije, dok crvene tačke označavaju negativne korelacije između ispitivanih parametara. Veličina tačaka i intenzitet njihove obojenosti proporcionalne su Spirmanovom koeficijentu korelacije. Statistički značajne relacije označene su zvezdicom (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). (*fold change* = nivo promene).

4.1.4. Povezanost sastava mikrobiote creva donora i kapaciteta njihovih monocita da se diferenciraju u imDC i odgovore na stimulus

S obzirom da uzrok različitog imunskog odgovora na patogene može biti različit sastav mikrobiote creva [297,425–427], ispitana je povezanost osobina mikrobiote creva i potencijala monocita periferne krvi da se diferenciraju u imDC i odgovore na stimulaciju LPS/IFN- γ . Analiziran je sastav mikrobiote creva zdravih donora koji su podeljeni na osnovu ekspresije svakog ispitivanog molekula na imDC i mDC, i nivoa promene molekula nakon stimulacije u dve grupe (\leq medijana, $>$ medijana) (Slika 9A). Rezultati su pokazali da donori imDC koji eksprimiraju veći nivo CD1a ($>$ medijana) imaju značajno niži diverzitet mikrobiote creva u odnosu na donore imDC koje eksprimiraju niži nivo CD1a (\leq medijana). Dalje, donori koji su imali imDC sa nižim nivoom TNF- α kao i nižim nivoom produkcije IL-10 imali su i manje vrednosti alfa diverziteta, što ukazuje na manji diverzitet mikrobiote creva. Nije primećena statistički značajna asocijacija između alfa diverziteta mikrobiote creva i drugih ispitivanih molekula DC.

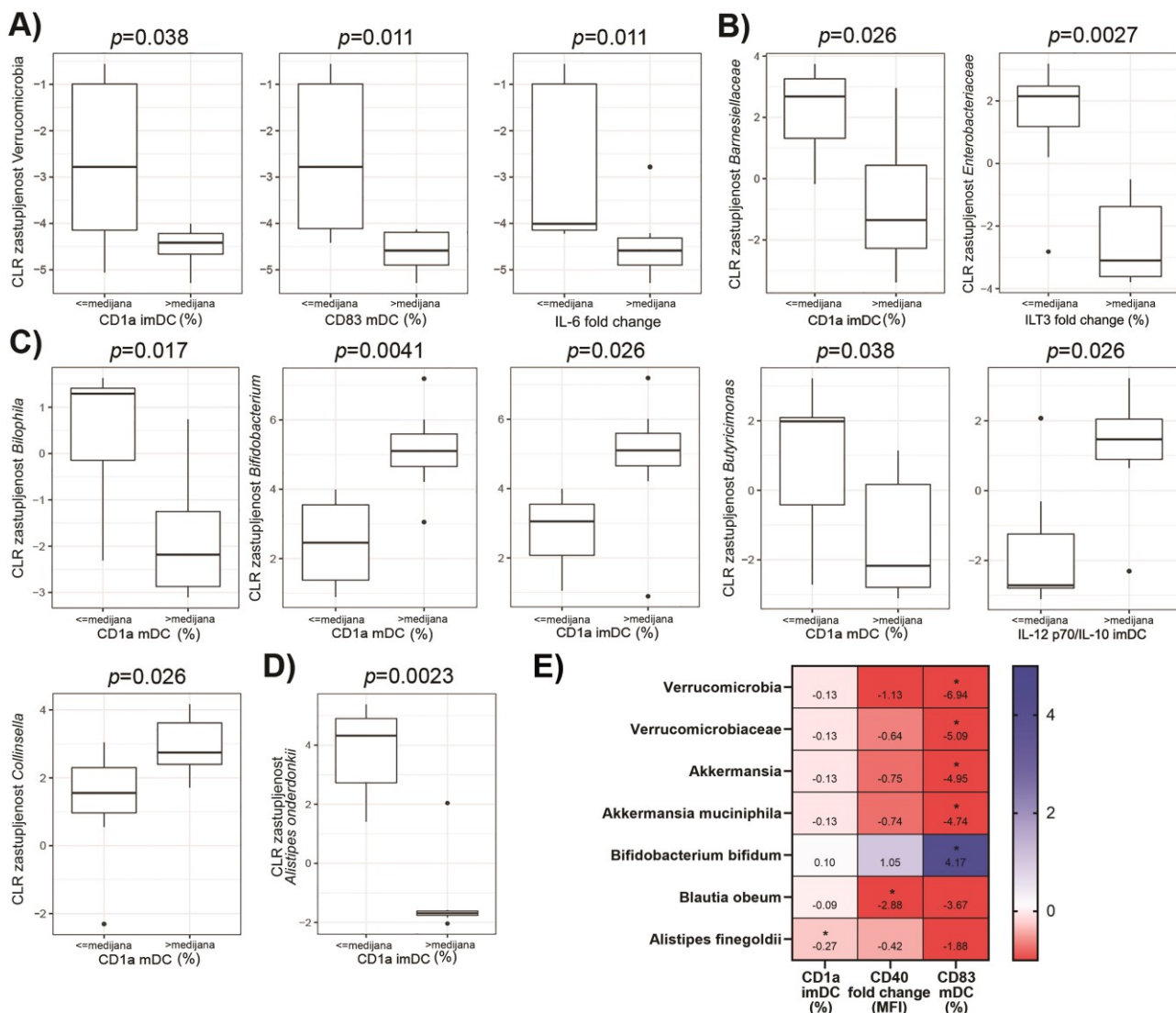


Slika 9. Analiza diverziteta mikrobiote creva zdravih donora u odnosu na fenotipska i funkcijska svojstva DC. Mikrobiota creva je analizirana na osnovu sekvenciranja dela gena za 16S rRNK iz uzoraka fecesa istog dana kada su izolovani monociti iz krvi 14 donora. Dijagrami kutije predstavljaju poređenja za **A)** Šenonov indeks diverziteta između donora koji su podeljeni u dve grupe (\leq medijana i $>$ medijana) na osnovu svakog od analiziranih fenotipskih markera i funkcijskih molekula imDC i mDC i **B)** Bray-Curtis matricu distanci između donora. Za poređenja indeksa beta diverziteta, zasnovanom na Bray-Curtis matrici distanci, između donora čije DC ekspiriraju ispitivane molekule ispod ili u nivou medijane (\leq medijana) (beli stubić), između donora čije DC ekspiriraju molekule ispod ili u nivou medijane (\leq medijana) i iznad nivoa medijane ($>$ medijana) (svetlo sivi stubić) i između donora čije DC ekspiriraju molekule iznad nivoa medijane ($>$ medijana) (tamno sivi stubić) statistička znalajnost je utvrđena korišćenjem ANOSIM testa sa 999 permutacija. **C)** PCoA dijagram rasipanja zasnovan na Bray-Curtis matrici distanci, između dve grupe donora. Prikazani su samo statistički značajni rezultati nakon BH FDR korekcije.

Dalje je ispitivano da li su donori čije imDC ekspiriraju različite nivoe ispitivanih fenotipskih i funkcijskih molekula ili različito odgovaraju na LPS/IFN- γ stimulus, slični na osnovu beta diverziteta kao mere različitosti sastava mikrobioloških zajednica između donora. Na osnovu dobijenih Bray-Curtis matrica diverziteta utvrđeno je da postoje značajne razlike u sastavu zajednica između donora koji na imDC ekspiriraju različite nivoe CD1a (Slika 9B i C). Unutar grupe donora čije imDC ekspiriraju niži nivo CD1a u odnosu na medijanu postoji veća razlika u sastavu zajednica nego u slučaju grupe donora čije imDC ekspiriraju viši nivo CD1a. Nije primećena statistički značajna asocijacija u beta diverzitetu kada su donori podeljeni u grupe na osnovu ekspresije i produkcije drugih ispitivanih molekula DC.

4.1.5. Ispitivanje asocijacije zastupljenosti bakterija mikrobiote creva i kapaciteta monocita da se diferenciraju u imDC i odgovore na stimulus

S obzirom da je pokazano da razlike u imunskom odgovoru između zdravih donora mogu biti u vezi sa sastavom mikrobiote creva, dalje je ispitana diferencijalna relativna zastupljenost bakterija na različitim taksonomskim nivoima: razdeo, porodica, rod i vrsta. Zastupljenosti taksona su upoređivane između dve grupe donora na osnovu vrednosti medijane za svaki ispitivani molekul DC (Slika 10). Ovom analizom pokazano je da donori koji na imDC i mDC eksprimiraju viši nivo CD1a (>medijana) imaju niže nivoe relativnih zastupljenosti razdela *Verrucomicrobia* (Slika 10A), porodice *Barnesiellaceae* (Slika 10B) i rodova *Bilophila* i *Butyricimonas* (Slika 10C).



Slika 10. Diferencijalna zastupljenost bakterija mikrobiote creva zdravih donora. Analiza diferencijalne zastupljenosti A) 6 razdela, B) 32 porodice, C) 58 roda i D) 63 vrste između donora koji su podeljeni u dve grupe (\leq medijana i $>$ medijana) na osnovu svakog od analiziranih fenotipskih markera i funkcijskih molekula imDC i mDC. Prikazani su samo statistički značajni rezultati nakon analize sa QIIME2 „p-comosition“ dodatkom za analizu sastava mikrobioma (ANCOM). Poređenja sa W koeficijentima > 1 su dodatno podvrgnuta Pairwise Wilcoxon rank-sum statističkom testu nakon čega je usledila BH FDR korekcija p vrednosti. E) Kako bi se utvrdila asocijacija između imunoloških parametara i bakterijskih taksona korišćena je R lm funkcija uz korekciju modela za pol i godine. Grafički prikaz rezultata linearne regresije (beta koeficijenta i FDR p vrednosti) napravljen je pomoću GraphPad Prism 9.0 softvera. (*fold change* = nivo promene).

Sa druge strane, u mikrobioti creva ovih donora povećana je relativna zastupljenost rodova *Bifidobacterium* i *Collinsella*, a smanjena zastupljenost vrste *Alistipes onderdonkii* (Slika 10D). Takođe, visoka ekspresija molekula CD83 na mDC, kao i veći kapacitet DC da na stimulus LPS/IFN- γ produkuju IL-6 su bili povezani sa nižom relativnom zastupljenošću razdela Verrucomicrobia (Slika 10A). Kod onih donora čije DC nisu promenile ili su smanjile nivo ekspresije ILT3 nakon stimulacije, primećena je povećana relativna zastupljenost porodice *Enterobacteriaceae* (Slika 10B). Kada su posmatrane samostalno IL-12p70, nije postojala značajna razlika između donora u zastupljenosti različitih taksona mikrobiote creva. Međutim, kada je u obzir uzet odnos između IL-12p70 i IL-10, uočene su značajne razlike u sastavu mikrobiote, pre svega u relativnoj zastupljenosti roda *Butyricimonas* iz porodice *Odoribacteriaceae*. Ovaj rod je bio relativno niže zastupljen kod donora čije imDC imaju odnos IL-12p70/IL-10 ispod medijalne vrednosti (Slika 10C).

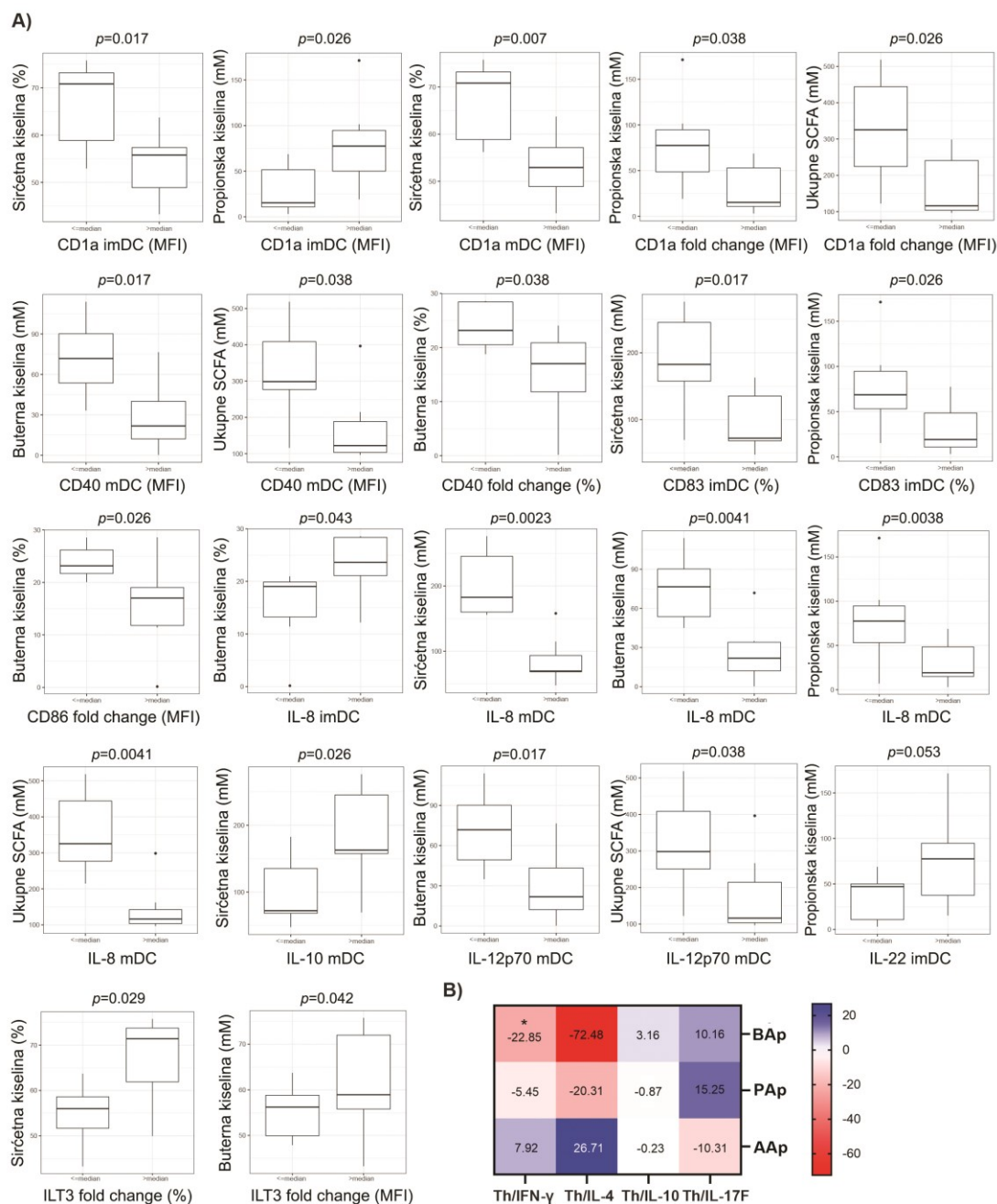
Dodatno je ispitana povezanost produkcije praćenih fenotipskih markera i funkcijskih molekula DC i relativne zastupljenosti taksona pomoću linearne regresije, koja je u najvećoj meri potvrdila prethodne nalaze. Rezultati su pokazali da je nivo ekspresije CD1a na imDC negativno povezan sa još jednim predstavnikom roda *Alistipes*, *Alistipes finegoldi* (Slika 10E). Takođe je i na ovaj način pokazano da postoji negativna asocijacija između relativne zastupljenosti razdela Verrucomicrobia, tačnije predstavnika porodice *Verrucomicrobiaceae* i vrste *Akkermansia muciniphila* sa nivoom ekspresije CD83 markera na mDC. Dodatno, ekspresija ovog markera je bila pozitivno asocirana sa prisustvom *Bifidobacterium bifidum* u mikrobioti creva donora. Uočeno je i da je nivo promene u ekspresiji CD40 nakon odgovora na stimulus LPS/IFN- γ , bio negativno povezan sa relativnom zastupljenošću vrste *Blautia obeum* (Slika 10E).

4.1.6. Ispitivanje povezanosti nivoa masnih kiselina kratkog lanca produkovanih od strane mikrobiote creva i varijabilnosti diferenciranih DC između zdravih donora

Rezultati su pokazali da bakterije kao što su rod *Butyricimonas* i vrsta *Alistipes onderdonkii*, poznati producenti SCFA [428], imaju povećanu relativnu zastupljenost kod donora čije DC imaju niži nivo ekspresije CD1a i slabije odgovaraju na stimulaciju LPS/IFN- γ . S obzirom da je imunomodulatorni efekat SCFA opisan u literaturi [429], u narednom delu istraživanja analizirana je koncentracija ovih molekula u fekalnom materijalu donora. Kod donora čije su imDC imale viši odnos IL-12p70/IL-10 i slabo ga povećavale nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ , bila je prisutna veća relativna zastupljenost roda *Butyricimonas*. Analiza koncentracija (mM) ukupnih SCFA u uzorku, sirćetne, propionske i buterne kiseline, kao i njihov procentualni doprinos (%) u ukupnim SCFA pokazala je da kada se donori podele u dve grupe na isti način kao u prethodnim analizama, veća koncentracija ukupnih ili pojedinačnih SCFA se detektuje kod donora čije DC eksprimiraju niži nivo CD1a, kao i funkcijskih molekula CD40, CD83, CD86, IL-8 i IL-12p70 (Slika 11A). Kako je uočena smanjena produkcija citokina IL-12p70, koji omogućava aktivaciju i pokretanje imunskog odgovora posredovanog Th1 ćelijama, kod donora sa većom koncentracijom SCFA u fecesu, dodatno je ispitana povezanost citokina koje produkuju T ćelije kokultivisane sa DC i koncentracije SCFA pravljenjem linearnog regresionog modela (Slika 11B). Uočena je statistički značajna negativna asocijacija između procentualnog udela buterne kiseline i kapaciteta DC da stimulišu Th profilisanje u smeru Th1 ćelija i produkcije IFN- γ . Takođe, rezultati su pokazali da kod donora sa višim

koncentracijama SCFA u fecesu, DC imaju veću ekspresiju imunosupresivnih molekula IL-10 i ILT3.

Rezultati ovog dela istraživanja doktorske disertacije pokazali su da postoji povezanost sastava i metaboličke aktivnosti mikrobiote creva i svojstava DC kao najpotentnijih imunogenih APC, pri čemu DC poreklom od donora sa nižim diverzitetom bakterija imaju veći imunogeni potencijal.



Slika 11. Zastupljenost SCFA u fecesu zdravih donora. Povezanost koncentracije fekalnih SCFA i varijabilnosti diferenciranih DC između donora. **A)** Statistički značajna poređenja za izmerene koncentracije sirčetne (AA), propionske (PA) i buterne kiseline (BA), kao i ukupne SCFA (mM) i njihove udele u ukupnim SCFA (%) između donora podeljenih u dve grupe na osnovu nivoa ekspresije imunoloških molekula. Statistički značajnim su smatrane p vrednosti manje od 0,05 nakon primene Pairwise Wilcoxon rank-sum testa. **B)** Asocijacija između produkcije citokina od strane Th ćelija i koncentracije izmerenih SCFA u fecesu utvrđena je sa lm funkcijom u R-u uz korekciju modela za pol i godine. Grafički prikaz rezultata linearne regresije (beta koeficijenti i FDR p vrednosti) napravljen je u GraphPad Prism 9.0 softveru. (p - procenat, *fold change* = nivo promene).

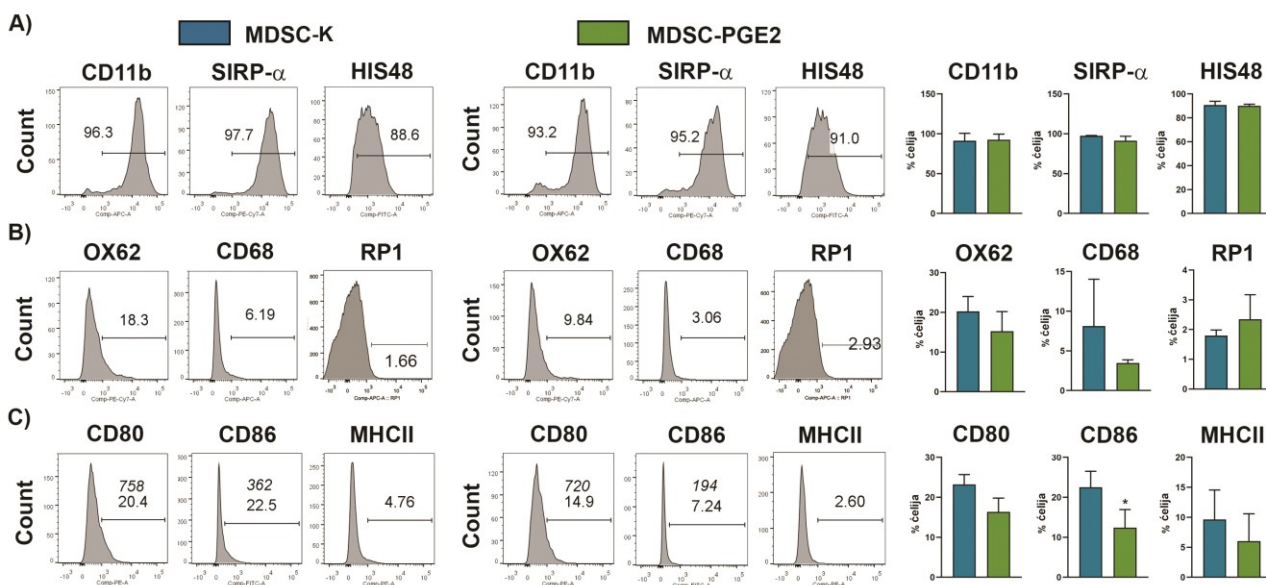
4.2. UTICAJ MIKROBIOTE CREVA NA SUPRESIVNI KAPACITET I IMUNOTERAPIJSKI POTENCIJAL MDSC

4.2.1. Fenotipska i funkcijska analiza *in vitro* dobijenih MDSC

U narednom delu disertacije ispitana je povezanost supresivnih svojstava mijeloidnih ćelija sa sastavom i funkcijom mikrobiote. Za potrebe ovih istraživanja odabran je model MDSC, kao ćelijske populacije koja ispoljava najpotentnija supresivna svojstva [430].

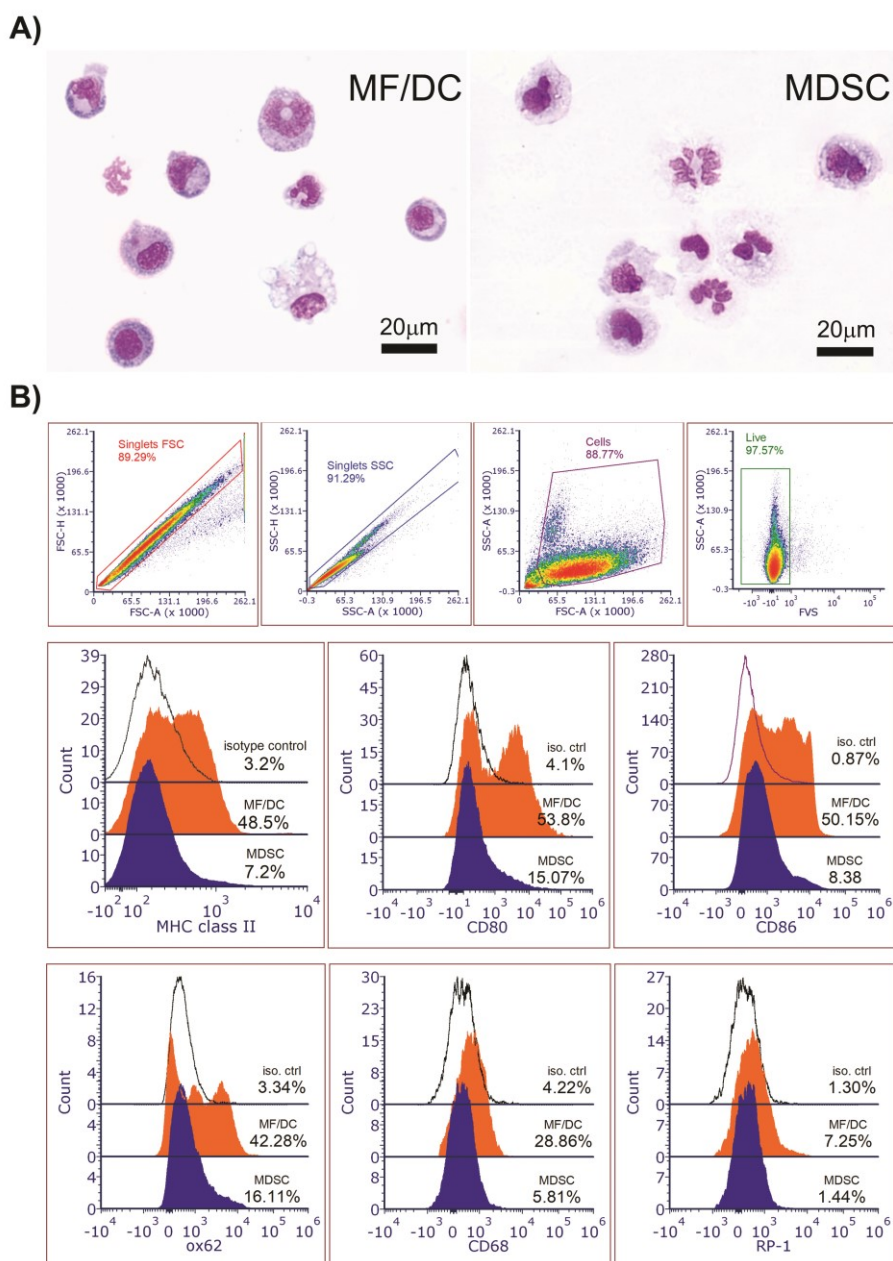
MDSC su dobijene diferencijacijom iz prekursora kostne srži. Prekursorske ćelije su gajene u prisustvu GM-CSF, FLT3 i IL-6 (MDSC-K) i u medijumu sa GM-CSF, FLT3, IL-6 i PGE2 (MDSC-PGE2) nakon čega su dobijene ćelije korišćene za fenotipsku analizu na protočnom citometru za prethodno opisane markere pacovskih MDSC [85,431,432].

Analiza površinskih molekula za koje je u ranijim radovima pokazano da su eksprimirani na MDSC (CD11b, SIRP- α i HIS48) je pokazala da su ovi molekuli visoko eksprimirani na ćelijama dobijenim *in vitro*, a da diferencijacija MDSC u prisustvu PGE2 nije značajno uticala na ekspresiju ovih markera (Slika 12A). Uočeno je da oko 20 % ćelija ekspresira OX62, marker pacovskih DC, a njegova ekspresija je bila manja kod MDSC-PGE2. Manje od 15 % ćelija je ekspresiralo CD68, receptor čistač (engl. *scavenger receptor*) [433], dok je kod manje od 3 % ćelija bio prisutan marker zrelih granulocita RP-1 [82] (Slika 12B). Kostimulativni molekuli CD80 i CD86 su bili eksprimirani kod oko 20 % ćelija, dok je ekspresija CD86 bila statistički značajno smanjena kod ćelija koje su diferencirane u prisustvu PGE2 (Slika 12C).



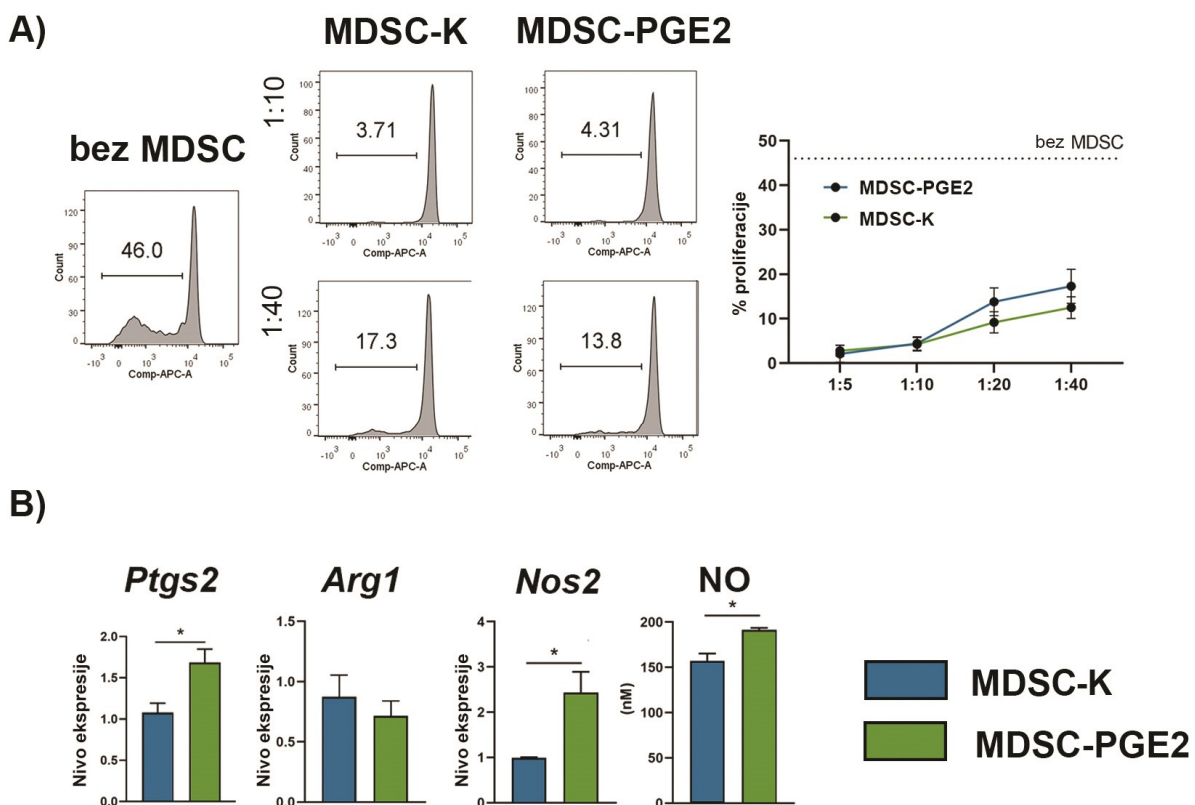
Slika 12. Fenotipska karakterizacija MDSC. MDSC diferencirane iz kostne srži DA pacova tokom četiri dana u prisustvu FLT-3, GM-CSF i IL-6 označene su plavom bojom kao MDSC-K, dok su ćelije gajene u prisustvu FLT-3, GM-CSF, IL-6 i PGE2 označene zelenom bojom kao MDSC-PGE2. Predstavljeni su reprezentativni dijagrami analize na protočnom citometru koji prikazuju ekspresiju markera u jednom eksperimentu, od četiri sa sličnim rezultatima. Sumirani rezultati ekspresije markera iz sva četiri eksperimenta su prikazani kao procenat pozitivnih ćelija \pm standardna devijacija (Studentov T test, * $p < 0,05$) i vizuelizovani kao dijagram sa stubićima. **A)** Marker karakteristični za MDSC kod pacova (CD11b, SIRP- α , HIS-48). **B)** Marker ostalih mijeloidnih ćelija (OX62, CD68, PR-1). **C)** Receptorski i kostimulativni molekuli (MHCII, CD86, CD80). Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za određeni fenotipski marker.

U cilju upoređivanja fenotipa MDSC dobijenih ovim protokolima, dodatno su diferencirane makrofage/DC iz prekursorskih ćelija kostne srži pacova, po ranije opisanim protokolima, a koji su uključivali FLT-3 i GM-CSF [391,392]. Nasuprot dobijenim MDSC, dobijene DC/makrofage su ekspimirale u velikoj meri CD68 i OX62. Takođe DC/makrofage u poređenju sa MDSC su ekspimirale značajno više nivoe MHC II, CD86 i CD80 (Slika 13B). Analizom ćelija na mikrografijama uočeno je da su ćelije diferencirane u smeru DC/makrofaga dominantno mononuklearne morfologije, dok se među ćelijama koje su diferenciranim u smeru MDSC mogu uočiti i mononuklearne i polimorfonuklearne ćelije (Slika 13A).



Slika 13. Analiza razlika u fenotipu između MDSC, makrofaga/DC. Makrofage/DC su diferencirane u prisustvu FLT-3 i GM-CSF, dok su MDSC diferencirane u prisustvu FLT-3, GM-CSF i IL-6 tokom četiri dana. **A)** Reprezentativne svetlosne mikrografije May-Grünwald Giemsa bojenja citospin preparata sa dobijenim ćelijama. **B)** Reprezentativni dijagrami sa strategijama formiranja graničnika koje su korišćene za analizu fenotipskih markera i na njima je prikazana izotipska kontrola obeležena sa belom bojom, narandžastom bojom su označene Makrofage/DC, a MDSC sa plavom bojom. Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za ispitivani fenotipski marker.

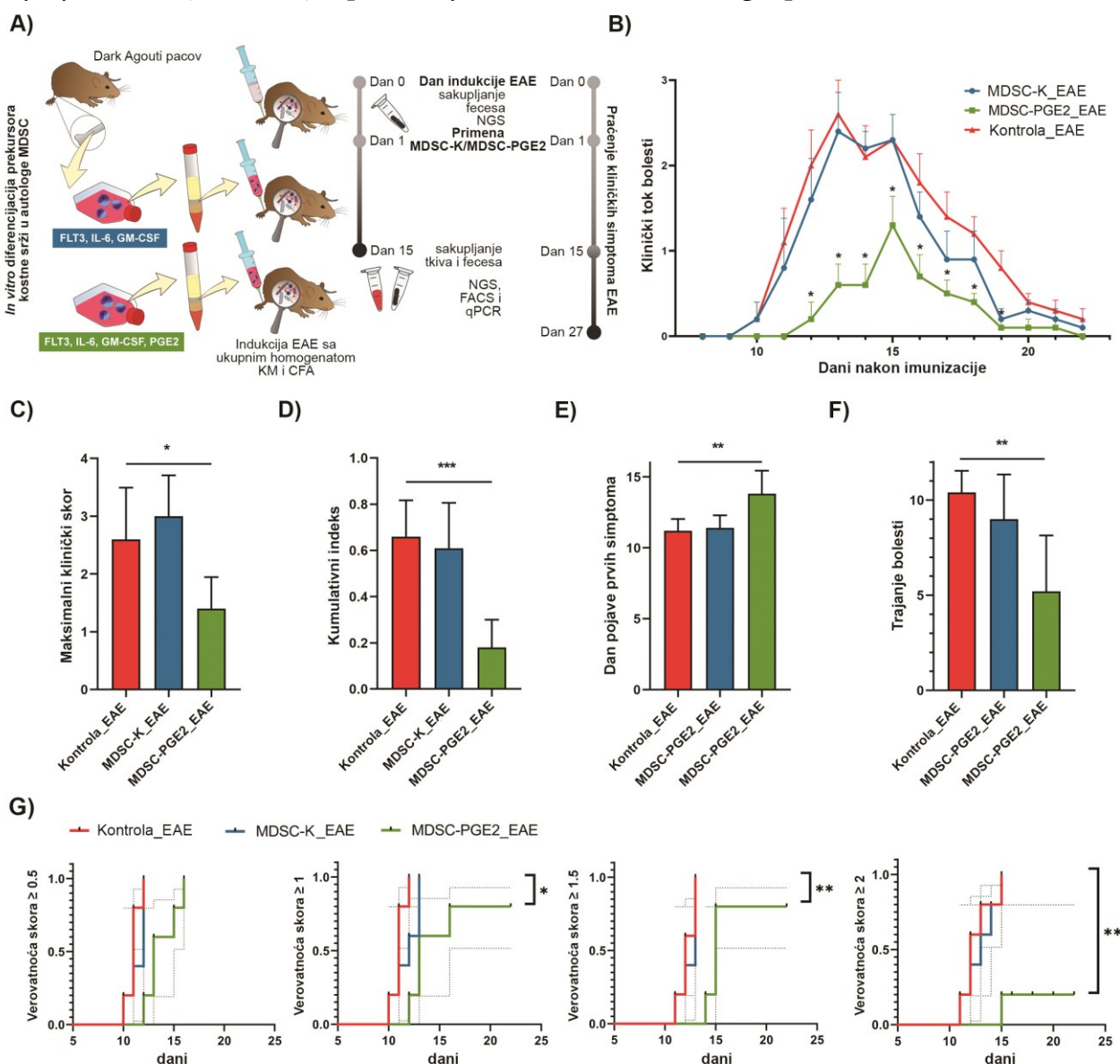
Kako je imunosupresivni potencijal najvažnija karakteristika MDSC [389], u nastavku je ispitano kako dobijene mijeloidne ćelije po protokolima u prisustvu i bez PGE2 utiču na proliferaciju splenocita stimulisanu putem ConA *in vitro* (Slika 14A). Dobijeni rezultati su pokazali da i MDSC-K i MDSC-PGE2, mogu značajno da suprimiraju proliferaciju aktiviranih splenocita, što je još jedan od dokaza u prilog karakterizaciji dobijenih ćelija kao MDSC. Za utvrđivanje potencijalnih mehanizama koje diferencirane ćelije koriste u ovim imunosupresivnim aktivnostima, ispitana je ekspresija gena za enzime iNOS, COX-2 i ARG-1 pomoću qPCR-a (Slika 14B). Ovi molekuli su označeni kao ključni nosioci imunosupresije MDSC [85,431,432]. MDSC-K i MDSC-PGE2 su eksprimirale gene za ispitivane enzime, dok su MDSC diferencirane u prisustvu PGE2 imale značajno viši nivo ekspresije *Nos2* gena i posledično statistički značajno povećanje produkcije NO u odnosu na MDSC-K. Kod MDSC-PGE2 izmeren je viši nivo ekspresije *Ptgs2* gena, dok nije bilo razlike između ovih ćelija u ekspresiji *Arg1*.



Slika 14. Karakterizacija imunosupresivne aktivnosti MDSC *in vitro*. MDSC-K i MDSC-PGE2 su dobijene po protokolima koji su uključivali dodavanje FLT-3, GM-CSF i IL-6 bez ili sa PGE-2, a njihova imunosupresivna aktivnost je okarakterisana **A)** kokultivacijom sa splenocitima stimulisanim ConA i obeleženim FarRed. MDSC (6×10^4 , 3×10^4 , $1,5 \times 10^4$, $0,75 \times 10^4$ ćelija po bunariću) su kokultivisane sa splenocitima (3×10^5 ćelija po bunariću) u odnosu 1:5 do 1:40 tokom četiri dana. Prikazani su reprezentativni dijagrami izmerene proliferacije u kokulturama sa odnosom MDSC:splenociti 1:10 i 1:40. Na linijskom grafikonu sa rezultatima sumiranim iz tri eksperimenata proliferacija splenocita bez MDSC prikazana je isprekidanom linijom, u prisustvu MDSC-K plavom bojom i u prisustvu MDSC-PGE2 zelenom bojom. **B)** Analiza relativnih nivoa ekspresije iRNK za ARG-1 (*Arg1*), COX-2 (*Ptgs2*) i iNOS (*Nos2*). Nivoi ekspresije ovih gena su normalizovani u odnosu na vrednosti ekspresije gena za β -aktin. Produkcija NO je izmerena Griess reakcijom i rezultati su prikazani kao dijagrami sa stubićima. Prikazani su rezultati iz četiri eksperimenata koji su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Statistička značajnost je utvrđena korišćenjem Studentovog T testa ($*p < 0,05$).

4.2.2. Ispitivanje imunosupresivnog potencijala MDSC na simptome EAE

S obzirom da su MDSC dobijene iz kostne srži ispoljavale fenotip karakterističan za ove ćelije i posedovale snažan imunosupresivni potencijal, dalje je ispitivano da li transfer ovako dobijenih ćelija može dovesti do supresije neuroinflamacije *in vivo*, za šta je korišćen model EAE na DA pacovima. Tretmani MDSC-K i MDSC-PGE2 su primenjeni u pojedinačnim dozama jedan dan nakon indukcije bolesti, a simptomi bolesti su praćeni od 8. do 27. dana (Slika 15A). Na osnovu praćenja kliničkog toka bolesti, uočeno je da je primena MDSC-PGE2 dovela do smanjenja simptoma EAE u odnosu na netretirane životinje, kao i u odnosu na one tretirane MDSC-K (Slika 15B). Takođe, i pojedinačni parametri koji su korišćeni za analizu imunoterapijskog efekta tretmana, su pokazali da tretman MDSC-PGE2 statistički značajno smanjuje maksimalni klinički skor (Slika 15C), kumulativni indeks (Slika 15D), odlaže pojavu prvih simptoma EAE (Slika 15E) i skraćuje trajanje bolesti (Slika 15F) u poređenju sa kontrolnom EAE grupom.



Slika 15. Primena MDSC u modelu EAE kod DA pacova. EAE je indukovano homogenatom kičmene moždine u CFA injektiranjem u desnu šapu DA pacova. MDSC-K i MDSC-PGE2 diferencirane četiri dana *in vitro* i prečišćene na gustinskom gradijentu, su aplikovane intraperitonealno prvog dana nakon indukcije EAE. **A)** Shematski prikaz dizajna eksperimenta. **B)** Kriva kliničkog toka bolesti gde svaka tačka predstavlja

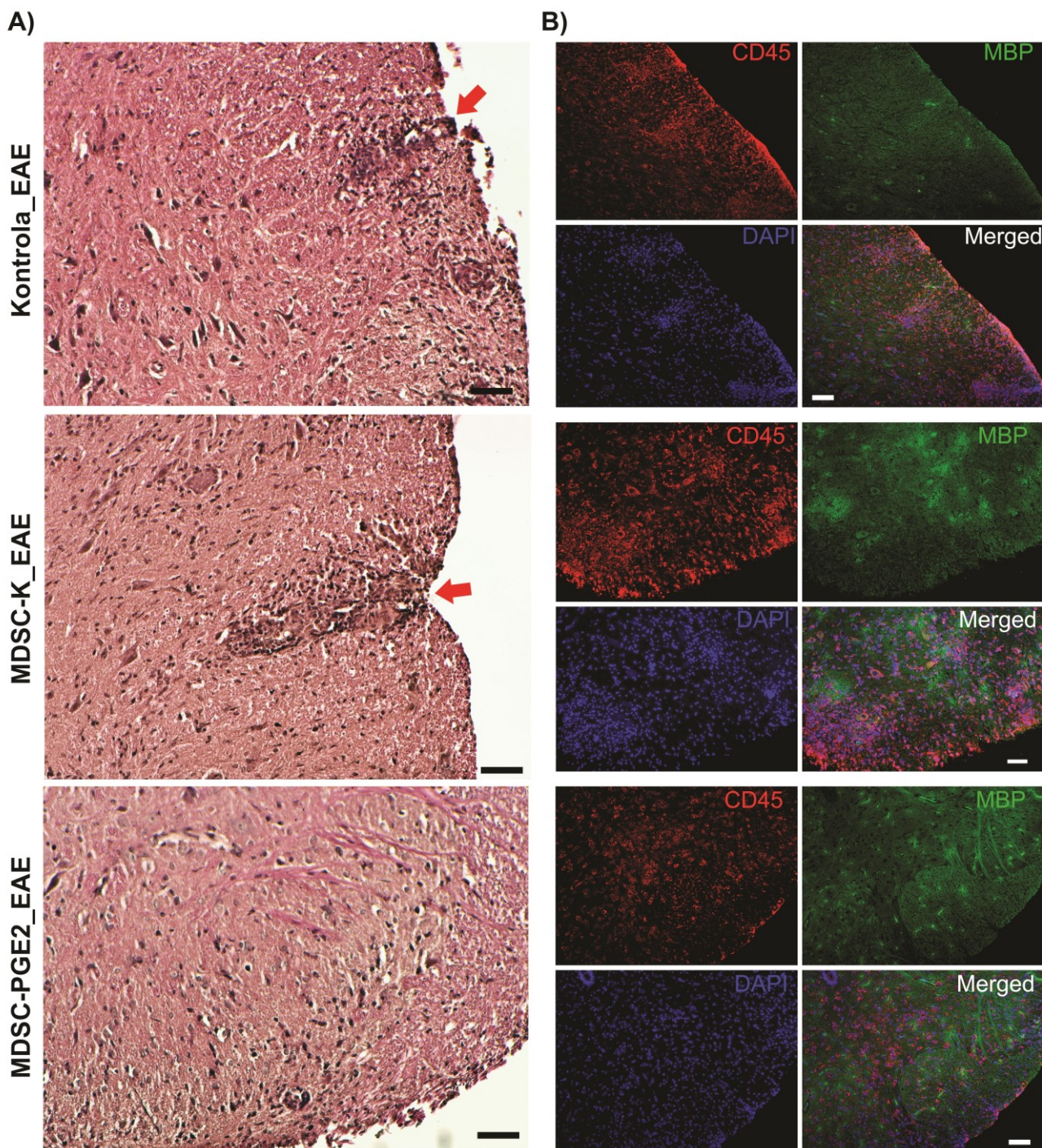
srednju vrednost \pm standardna greška za pet životinja po grupi. Statistička značajnost između tačaka svakog dana posmatranja simptoma je izračunata pomoću Two-way ANOVA sa Dennett's *post-hoc* testom. Dijagrami sa stubićima predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna devijacija za C) maksimalni klinički skor, D) kumulativni indeks, E) dan pojave prvih simptoma bolesti i F) trajanje bolesti kod kontrolne EAE grupe (ctl_EAE - crvena boja), i grupa koje su primile tretmane MDSC-K (MDSC-K_EAE - plava boja) i MDSC-PGE2 (MDSC-PGE2_EAE - zelena boja). Studentov T test je korišćen za poređenje između tretmana i kontrolne grupe. Eksperimenti su urađeni četiri puta nezavisno pri čemu su dobijeni slični rezultati, a prikazani su rezultati jednog reprezentativnog eksperimenta (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). G) Procena vremena neophodnog da se dostignu indikovani EAE klinički skorovi za svaku životinju dobijena je korišćenjem Kaplan-Meier krive. Za poređenje grupa korišćen je log-rang test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Iako svi parametri ukazuju da tretman MDSC-PGE2 nakon indukcije EAE dovodi do smanjenja simptoma bolesti, sve životinje su razvile neki od simptoma bolesti kao što je delimični gubitak tonusa u repu (Slika 15G). Detaljnijom analizom pojave novih simptoma po danu pokazano je da sve životinje u kontrolnoj EAE grupi i grupi koja je tretirana MDSC-K i samo jedna životinja iz MDSC-PGE2 grupe razvijaju klinički skor ≥ 2 . Ovi rezultati ukazuju da samo MDSC-PGE2, ali ne i MDSC-K, ispoljavaju dobar imunosupresivni potencijal *in vivo*.

4.2.3. Karakterizacija potencijalnih mehanizama u osnovi imunoterapijskog efekta MDSC *in vivo*

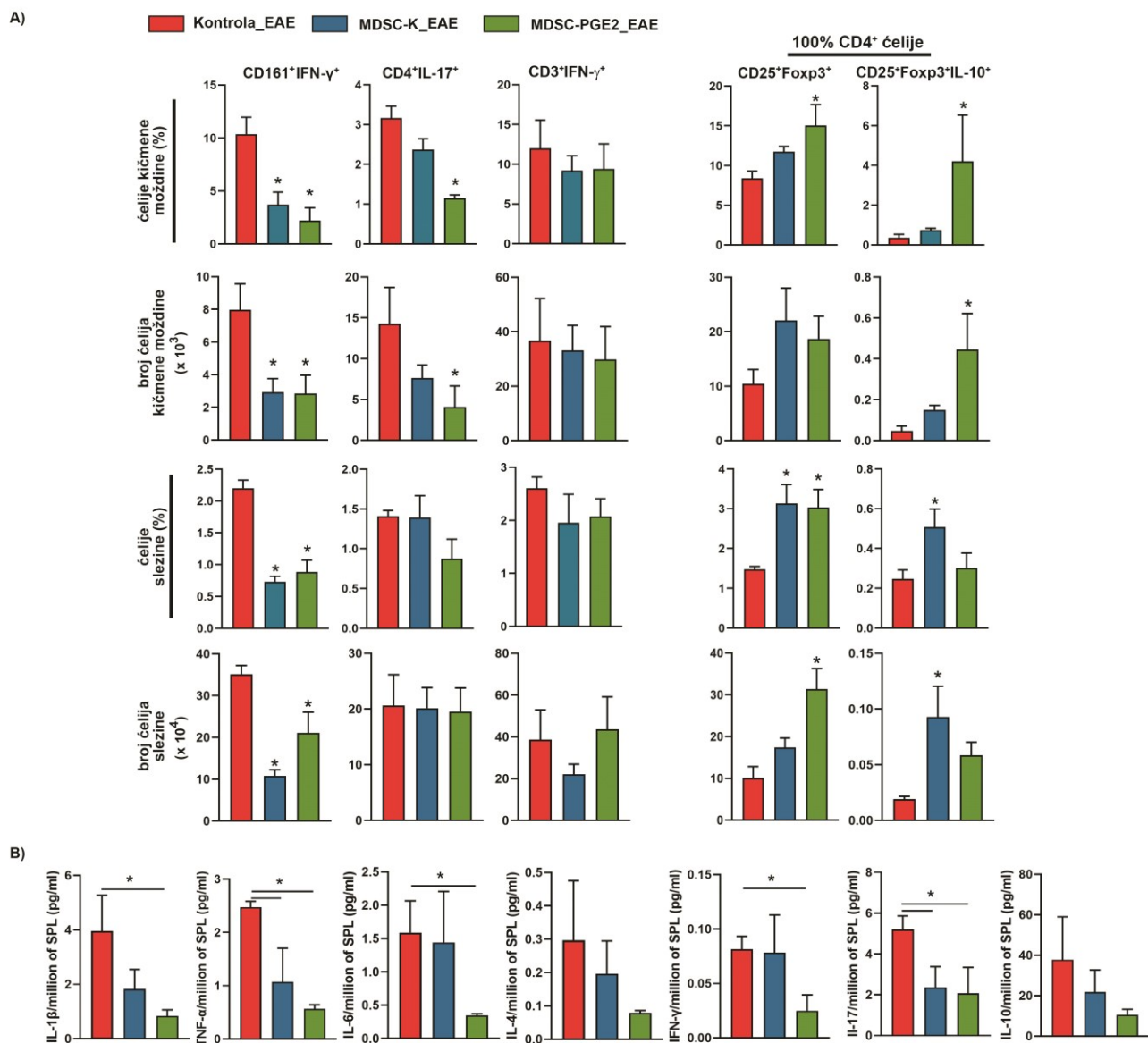
Tokom neuroinflamacije, Th17 i Th1 ćelije mogu proći kroz krvno-moždanu barijeru i infiltrirati se u CNS, zbog čega su označene kao ključne patološke ćelije u neuroinflamaciji [434]. Kako bi se utvrdili efekti primene MDSC na lokalni i sistemski imunski odgovor u EAE, sakupljene su kičmene moždine, odnosno slezine životinja 15. dana od indukcije EAE. Histološka analiza lumbalnog regiona kičmene moždine je pokazala da u piku bolesti u kontrolnoj EAE grupi postoje multifokalni infiltrati u beloj masi (Slika 16A). Slično je pokazano i kod životinja koje su dobile tretman MDSC-K. Sa druge strane, kod životinja koje su dobile tretman MDSC-PGE2 pronađeni su samo manji, veoma retki ćelijski infiltrati, a najčešće su potpuno izostajali na analiziranim presecima. Imunofluorescentna analiza preseka tkiva kičmene moždine koji su obojeni CD45/MBP/DAPI pokazala je da postoji niža ekspresija MBP u beloj masi kod životinja u EAE i MDSC-K_EAE grupi, u odnosu na MDSC-PGE2_EAE grupu (Slika 16B).

Dalja karakterizacija ćelijskog infiltrata kičmene moždine i ćelija slezine podrazumevala je analizu na protočnom citometru (Slika 17A, Slika 18 i Slika 19), a ukupan broj ćelija od interesa je nakon izolacije iz tkiva preračunat bojenjem tripan plavim. Rezultati su ukazali na to da tretman MDSC-PGE2 nakon indukcije EAE, značajno smanjuje procenat i ukupan broj CD4⁺IL-17⁺ ćelija u kičmenoj moždini, ali ne i u slezini. Pokazano je da u slezini i kičmenoj moždini dolazi do smanjenja IFN- γ ⁺CD161⁺ NK ćelija u obe grupe životinja koje su primile MDSC, dok ukupan broj i procenat T ćelija koje produkuju IFN- γ nije bio promenjen među grupama. Analiza Treg populacija u infiltratima pokazala je da postoji povećana zastupljenost CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u kičmenoj moždini samo životinja koje su primile MDSC-PGE2, kao i u slezinama kod obe grupe tretiranih životinja, u poređenju sa kontrolnim, netretiranim životinjama. Uočen je i povećan ukupan broj CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ ćelija u kičmenoj moždini samo životinja koje su tretirane sa MDSC-PGE2, dok je njihove povećana zastupljenost u slezini primećena samo kod MDSC-K grupe (Slika 17A). Ovi rezultati ukazuju na to da tretman sa MDSC indukuje stvaranje Treg, ali je samo u grupi tretiranoj sa MDSC-PGE2 omogućena i njihova migracija u moždano tkivo.

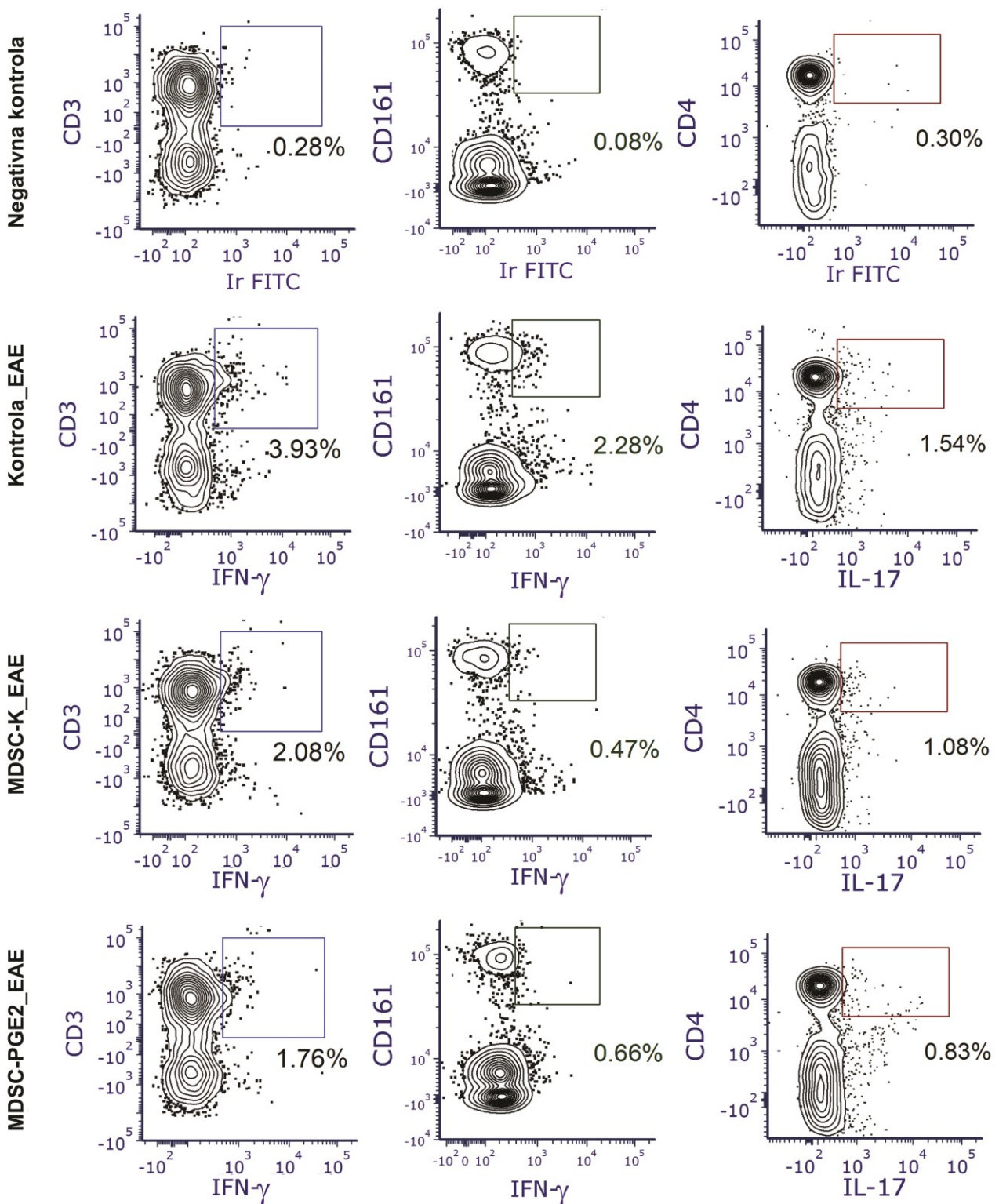


Slika 16. Analiza ćelijskih infiltrata kičmene moždine u piku bolesti. EAE je indukovao injekcijom homogenata kičmene moždine u CFA u desnu šapu DA pacova. MDSC-K i MDSC-PGE2 diferencirane četiri dana *in vitro* i prečišćene na gustinskom gradijentu, su aplikovane intraperitonealno prvog dan nakon indukcije EAE. Kvalitativna analiza ćelijskih infiltrata u kičmenim moždinama kontrolnih EAE životinja i onih koje su nakon imunizacije tretirane MDSC-K i MDSC-PGE2 je urađena na presecima kičmene moždine. **A)** Hematoksilin-eozin bojenje preseka, crvene strelice pokazuju na infiltrate. **B)** Imunofluorescentno bojenje preseka kičmene moždine na MBP (Alexa 488, zeleni signal), CD45 (Alexa 546, crveni signal) u kombinaciji sa DAPI bojenjem (plavi signal). Merna skala -50 μm .

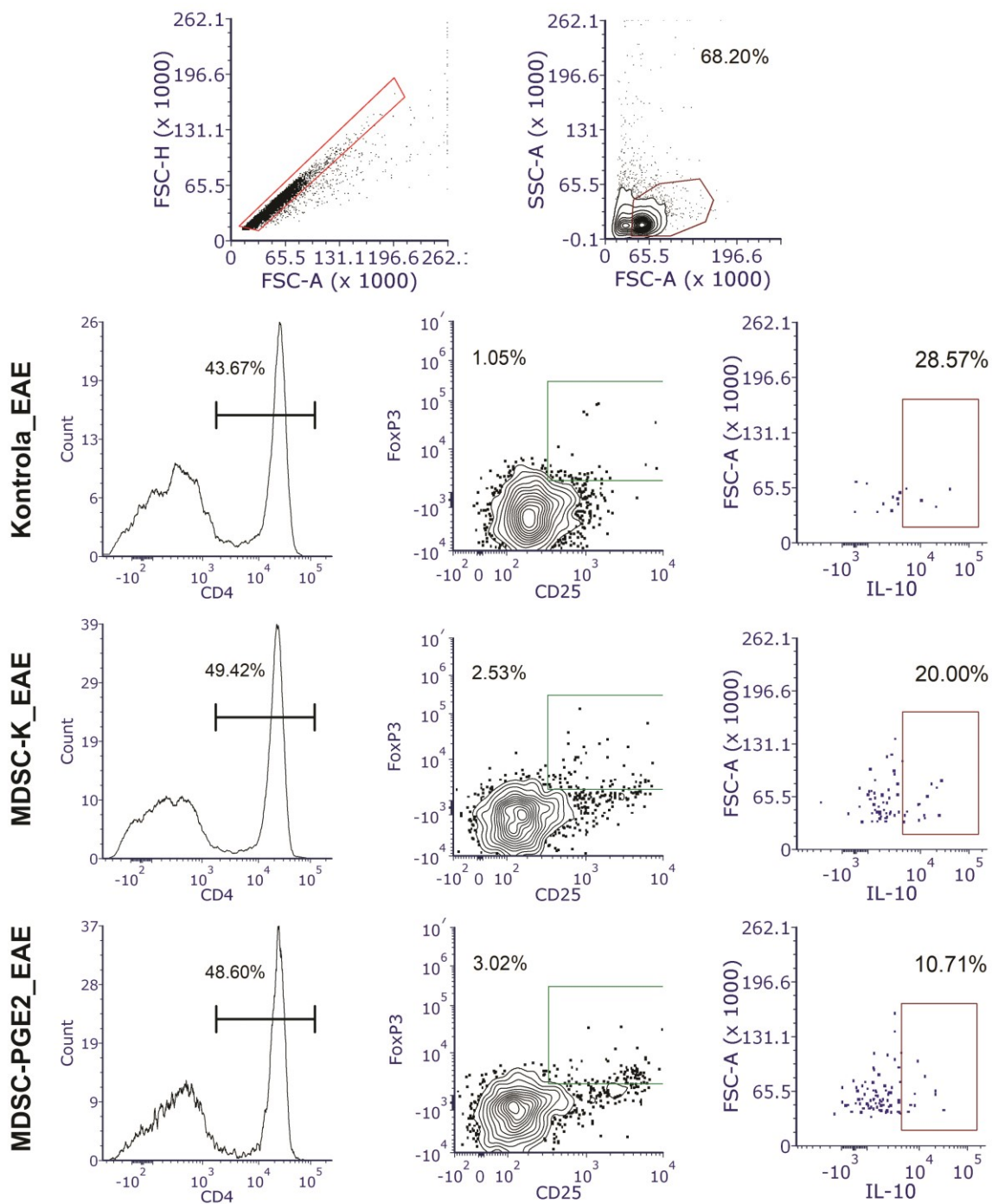
Kako bi se bolje utvrdili mehanizmi efekata MDSC tretmana na sistemskom nivou dodatno je izmerena produkcija citokina IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-17, IFN- γ i IL-10 u kratkotrajnoj kulturi splenocita izolovanih u piku bolesti iz kontrolne i tretiranih grupa životinja (Slika 17B). Rezultati su pokazali da dolazi do značajnog smanjenja produkcije proinflamatornih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 i IFN- γ) u kulturi splenocita poreklom od životinja iz MDSC-PGE2 grupe, dok je u kulturi splenocita životinja iz MDSC-K grupe došlo do smanjenja produkcije samo TNF- α i IL-17.



Slika 17. Analiza imunskog odgovora životinja u piku bolesti. Imunski odgovor u piku bolesti kod životinja koje su primile tretmane MDSC-K i MDSC-PGE2 i kontrolnih, netretiranih životinja je analiziran protočnom citometrijom ukupnog ćelijskog infiltrata nakon izolacije ćelija i pravljenja ćelijskih suspenzija iz tkiva kičmene moždine i slezine. **A)** Procentualni sadržaj i ukupni broj NK ćelija koje proizvode IFN- γ (CD161⁺IFN- γ ⁺), Th17 ćelija (CD4⁺IL-17⁺) i T limfocita koji proizvode IFN- γ (CD3⁺IFN- γ ⁺) u kičmenoj moždini i slezini koje su izolovane kod pet životinja iz svake grupe u piku bolesti (Dan 15). Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Slici 18, dok je strategija formiranja graničnika za analizu Treg populacije prikazana je na Slici 19. **B)** Dijagramom sa stubićima su prikazani izmereni nivoi produkcije citokina od strane ConA stimuliranih splenocita koji su izolovani iz životinja sve tri grupe. Za **A)** i **B)** su prikazane srednje vrednosti \pm standardna devijacija analiziranih podataka za pet životinja iz jednog eksperimenta od dva sa sličnim rezultatima. One-way ANOVA sa Tukey *post hoc* testom je korišćena za poređenje sa kontrolnim EAE životinjama (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



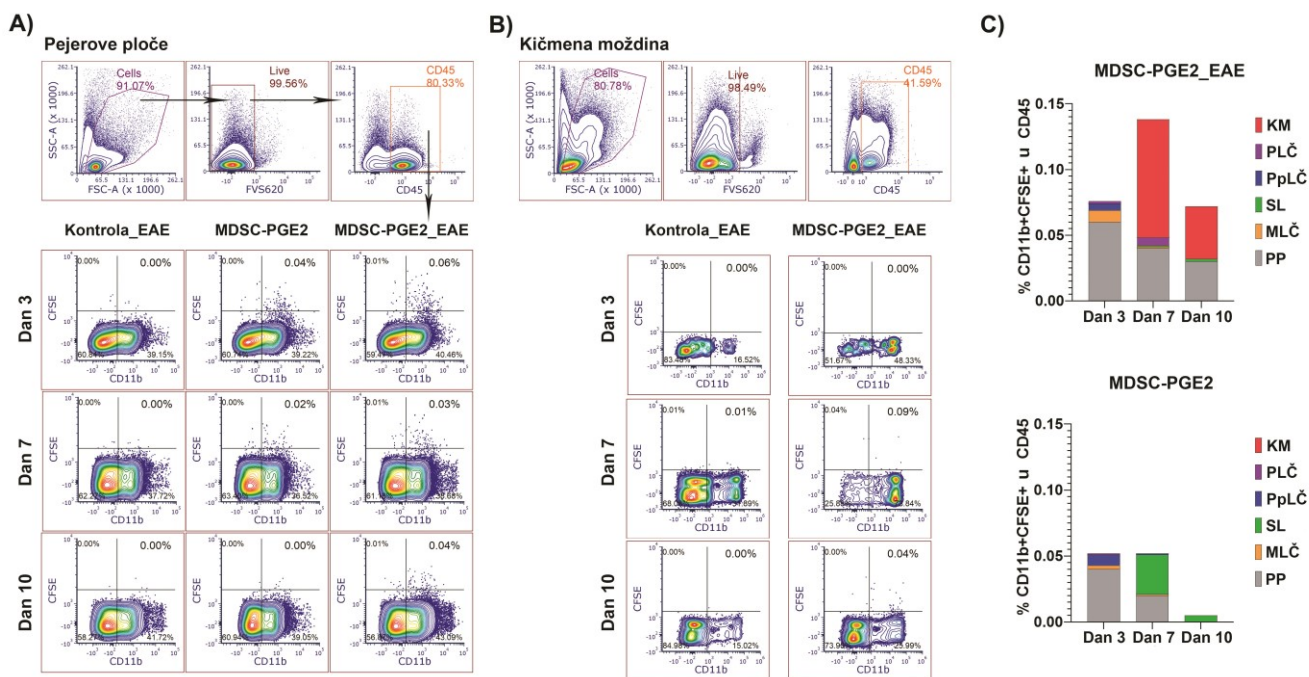
Slika 18. Strategija analize NK ćelija, Th17 ćelija i IFN- γ -produkujućih T ćelija u piku EAE. Prikazane su reprezentativne strategije analize NK ćelija koje proizvode IFN- γ (analizirane su kao limfocitne ćelije koje ekspresiraju CD161 i IFN- γ), Th17 ćelija (analizirane su kao limfocitne ćelije pozitivne za CD4 i IL-17), i T ćelija koje proizvode IFN- γ (analizirane su kao limfocitne ćelije koje su pozitivne za CD3 i IFN- γ) izolovanih iz ciljnih tkiva u piku bolesti kod kontrolnih EAE životinja, i onih životinja koje su nakon imunizacije tretirane sa MDSC-K ili MDSC-PGE2 (Rezultat u okviru Slike 17). Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.



Slika 19. Strategija analize Treg i T ćelija koje proizvode IL-10 kod životinja u piku bolesti. Reprezentativne strategije analize Treg (analizirane su kao limfocitne ćelije koje ekspresiraju CD4, CD25 i FoxP3) i Treg ćelija koje proizvode IL-10 (također ekspresiraju CD4, CD25 i FoxP3) izolovanih iz ciljnih tkiva u piku bolesti kod kontrolnih EAE životinja, i onih životinja koje su nakon imunizacije dobile tretmane MDSC-K i MDSC-PGE2 (Rezultat u okviru Slike 17). Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.

4.2.4. Analiza migracije MDSC nakon intraperitonealne primene u modelu EAE kod DA pacova

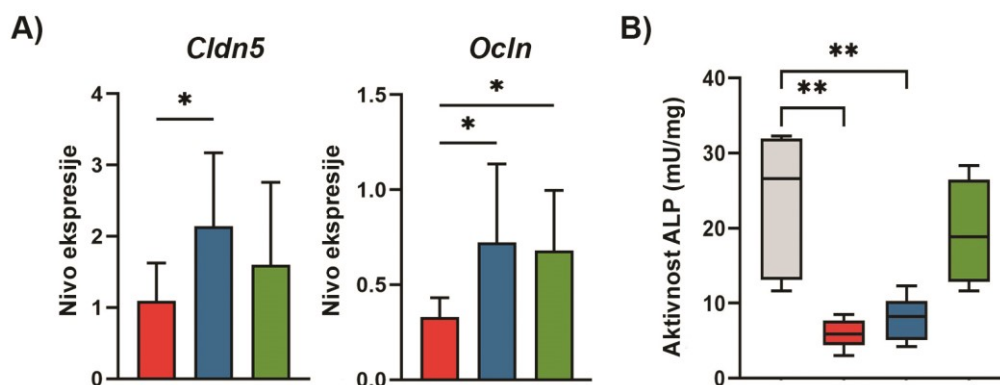
Pošto je tretman MDSC-PGE2 ćelijama pokazao najbolji efekat na smanjenje simptoma u EAE, u sledećem delu istraživanja praćena je migracija ovih ćelija obeleženih CFSE, nakon aplikacije kod životinja kojima je indukovana EAE i u kontrolnoj grupi životinja kojima nije indukovana EAE. Limfna tkiva i uzorci kičmene moždine su sakupljeni trećeg (Dan 3), sedmog (Dan 7) i desetog (Dan 10) dana nakon indukcije EAE (Slika 20). Rezultati su pokazali da se kod obe grupe životinja trećeg dana uočavaju CFSE-obeležene ćelije u okviru CD45⁺CD11b⁺ ćelijske populacije u Pejerovim pločama i MLČ, dok je manji broj ćelija bio zastupljen u preponskim (ingvinalnim) limfnim čvorovima (Slika 20C). Analiza ćelija sedmog dana je pokazala da su CFSE-obeležene ćelije u imunizovanoj grupi zastupljene u najvećoj meri u Pejerovim pločama, limfnim čvorovima i kičmenoj moždini, a mogle su se detektovati i desetog dana u Pejerovim pločama i kičmenoj moždini. Sa druge strane, kod zdravih životinja CFSE-obeležene ćelije su detektovane sedmog i desetog dana u najvećem broju u slezini (Slika 20C). Kako je kod zdravih životinja nivo CD45⁺ ćelija bio nizak u kičmenoj moždini nije ni analizirana migracija CFSE-obeleženih ćelija u grupi neimunizovanih životinja. Ovi rezultati ukazuju na to da MDSC-PGE2 nakon aplikacije idu preko GALT do CNS u toku EAE, dok kod neimunizovanih životinja većina ovih ćelija preko GALT migrira u slezinu.



Slika 20. Migracija MDSC-PGE2 nakon intraperitonealne primene. Rezultati protočne citometrije pokazuju da su MDSC-PGE2 koje su obeležene CFSE i date intraperitonealno pacovima kojima je indukovana EAE i zdravim pacovima (po devet životinja u obe grupe) pronađene u populaciji CD45⁺CD11b⁺ ćelija u Pejerovim pločama (PP), kičmenoj moždini (KM), preponskim (PpLČ), pazušnim (PLČ), mezenteričnim limfnim čvorovima (MLČ) i slezini (SL) nakon tri, sedam i deset dana od indukcije bolesti i primene MDSC-PGE2. Prikazani su reprezentativni dijagrami za analizu u **A)** Pejerovim pločama i **B)** kičmenoj moždini, dok **C)** dijagrami sa stubićima prikazuju procente ćelija u svim ispitivanim organima.

4.2.5. Uticaj MDSC na integritet intestinalne barijere u modelu EAE kod DA pacova

Poznato je da inflamacija u EAE, pored lokalne inflamacije, može da utiče na integritet intestinalne barijere čime se omogućava prolazak bakterijskih antigena dublje u tkivo i krvotok gde mogu da pojačaju intenzitet imunskog odgovora [435]. Kako su za održavanje epitelne barijere neophodni proteini koji učestvuju u ostvarivanju čvrstih međućelijskih veza [280], prvo je ispitano kako primenjeni tretmani kod imunizovanih životinja utiču na ekspresiju iRNK koje kodiraju za proteine okcludin i klaudin, a koji su neophodni za održavanje barijere u crevima. Primećeno je da primena MDSC-K i MDSC-PGE2 kod imunizovanih životinja povećava ekspresiju okcludina i klaudina u crevima u odnosu na kontrolnu EAE grupu (Slika 21A). Kako bi se potvrdili rezultati koji ukazuju na zaštitnu ulogu MDSC u održavanju intestinalne barijere u EAE, izmerena je aktivnost enzima alkalne fosfataze u fecesu kao jednog od testova funkcije intestinalne barijere [436]. U skladu sa uticajem na proteine okluzivnih veza, uočeno je smanjenje aktivnosti ovog enzima kod kontrolne EAE i MDSC-K grupe, dok je zadržana visoka aktivnost u fecesima životinja MDSC-PGE2 grupe (Slika 21B).



Slika 21. Analiza efekta MDSC na integritet epitelne barijere creva imunizovanih DA pacova. Ispitivana je ekspresija **A)** klaudina i okcludina u crevima u piku EAE kontrolnih, MDSC-K i MDSC-PGE2 tretiranih životinja, a njihove vrednosti su izražene u odnosu na nivo ekspresije β -aktina i predstavljene kao relativna promena ekspresije u odnosu na srednju vrednost zdravih životinja. **B)** Dijagrami kutije za test aktivnosti enzima alkalne fosfataze u fecesu kod životinja u piku bolesti sve tri grupe i zdravih životinja. Za rezultate pod **A)** i **B)** prikazane su srednje vrednosti \pm standardna devijacija analiziranih podataka za pet životinja iz jednog eksperimenta od dva sa sličnim rezultatima. One-way ANOVA sa Tukey *post hoc* testom je korišćena za poređenje sa kontrolnim EAE životinjama (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

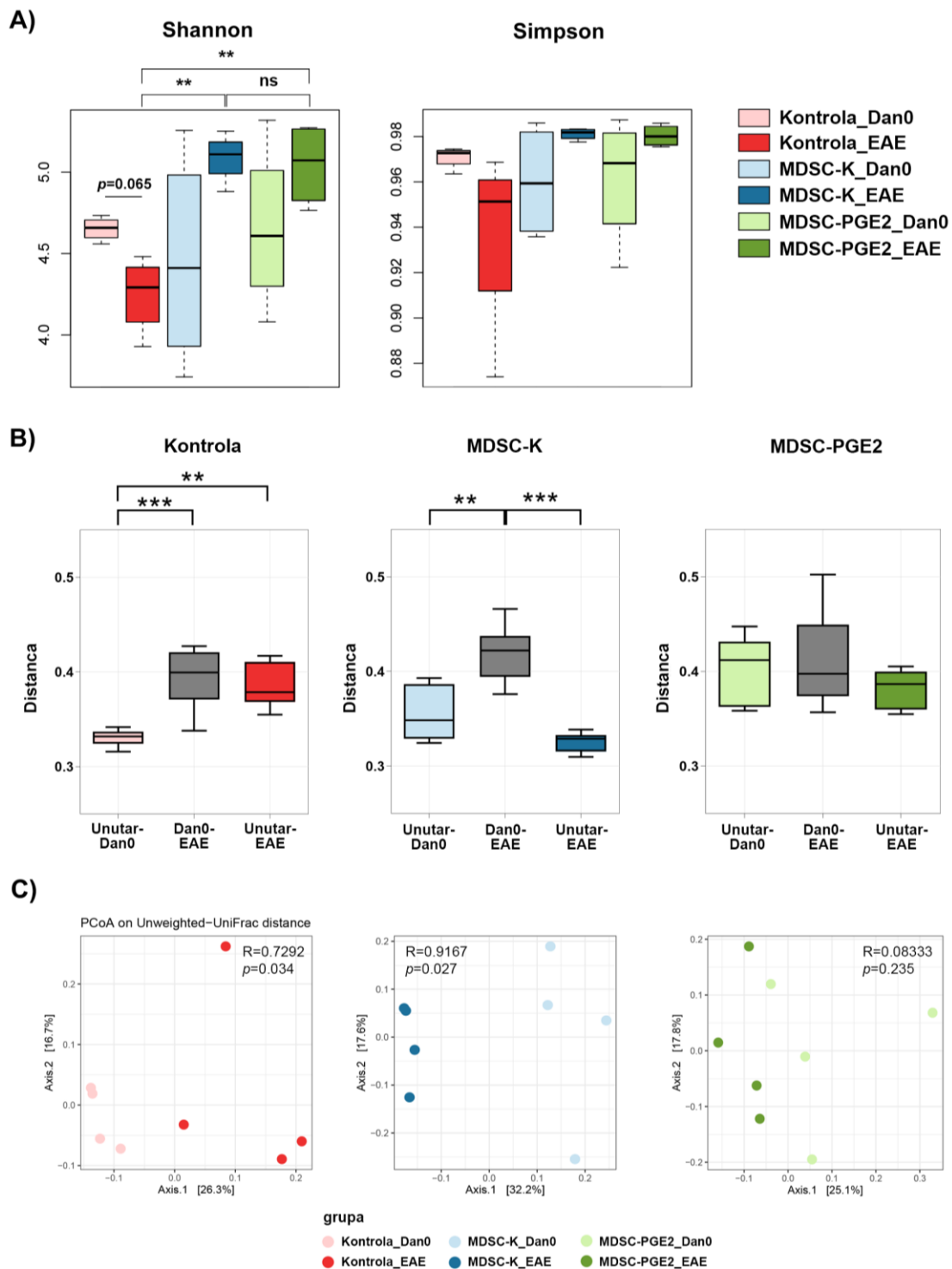
4.2.6. Povezanost sastava mikrobiote creva i efekata MDSC u modelu EAE kod DA pacova

Poznato je da je narušavanje sastava mikrobiote creva povezano sa razvojem autoimunosti [346], kao i da ovi događaji doprinose daljem razvoju aktivne inflamacije [437]. Disbioza mikrobiote creva je stoga označena kao važan sredinski faktor koji doprinosi patogenezi različitih autoimunskih bolesti [202]. Pokazano je da razlike u sastavu mikrobiote ne postoje kada se porede pacijenti koji su dobijali terapiju IFN- β -1b i zdrave kontrole, što ukazuje da primena terapije dovodi do uspostavljanja ponovne eubioze i poboljšanja praćenih parametara kod pacijenata [438]. Stoga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio usmeren ka otkrivanju povezanosti sastava mikrobiote creva i primene MDSC kod DA pacova sa EAE. S obzirom da smo pokazali da obrazac migracije MDSC nakon primene kod imunizovanih životinja pokazuje da ove ćelije vrlo rano migriraju u creva, kao i da ispoljavaju zaštitni efekat na integritet intestinalne barijere,

dalje je ispitano da li postoji povezanost efekta MDSC-K i MDSC-PGE2 ćelija u tretmanu EAE i sastava mikrobiote creva ovih životinja. Za utvrđivanje alfa diverziteta u uzorcima izračunati su Šenonov i Simpsonov indeks, a za njihovo poređenje između uzoraka pre imunizacije (Dan 0) i u piku bolesti (Dan 15), u okviru svake grupe korišćen je upareni Welch-ov two-sample T test, dok je poređenje vrednosti alfa diverziteta između grupa u piku bolesti vršeno neuparenim Welch-ovim two-sample T testom. Ove analize su pokazale da unutar kontrolne netretirane EAE grupe, diverzitet mikrobiote opada u piku bolesti, u poređenju sa sastavom mikrobiote creva pre indukcije EAE, dok je primena MDSC-K i MDSC-PGE2 kod imunizovanih životinja dovela do očuvanja diverziteta (Slika 22A). Kada se poredе vrednosti Šenonovog indeksa tri grupe u piku bolesti, pokazane su statistički značajne razlike u diverzitetu mikrobiote creva između kontrolne EAE grupe sa jedne strane i MDSC-K i MDSC-PGE2 grupa sa druge strane, dok između životinja koje su tretirane sa MDSC-K i MDSC-PGE2 ne postoje razlike u diverzitetu mikrobiote creva u piku bolesti.

Pored alfa diverziteta, još jedan način da se kvantifikuje diverzitet mikrobiote creva je pravljenje matrica distance beta diverziteta. Stoga su za sve tri grupe napravljene matrice distanci za poređenje uzoraka u paru (engl. *Pairwise distance matrices*) koristeći Unweighed UniFrac algoritam koji uzima u obzir samo informaciju o prisustvu ili odsustvu taksona u uzorku (Slika 22B). Dobijene vrednosti su obeležene kao „Unutar-Dan0“ što označava različitost u sastavu mikrobiote creva između životinja unutar grupe pre imunizacije, „Unutar-EAE“ između životinja unutar grupe u piku bolesti (Dan 15) i oznaka „Dan0-EAE“ ukazuje na različitost između uzoraka sakupljenih pre imunizacije (Dan 0) i u piku bolesti.

Analizom kontrolne EAE grupe pokazano je da indukcija bolesti dovodi do većih vrednosti distanci unutar-EAE grupe u piku bolesti. Sličan obrazac se uočava i kada su analizirani uzorci pre imunizacije i u piku bolesti (Dan0-EAE). Kod MDSC-K grupe, primećeno je značajno povećanje distanci u „Dan 0-EAE“ grupi, kada se ona poredi sa distancama unutar pojedinačnih grupa („Unutar-Dan 0“ i „Unutar-EAE“), dok kod životinja tretiranih MDSC-PGE2 nema statistički značajnih razlika u vrednostima distanci između grupa. Kako bi se ovi rezultati bolje pojasnili, dobijene vrednosti Unweighted UniFrac distanci prikazane su pomoću PCoA dijagrama rasipanja uz statističku obradu ANOSIM testom (Slika 22C). ANOSIM analiza je pokazala da postoji statistički značajna različitost kada se uporede vrednosti beta diverziteta za životinje kontrolne EAE grupe, pre indukcije bolesti i u piku ($R=0,7292$, $p=0,034$). Slično je dobijeno i za MDSC-K grupu ($R=0,9167$, $p=0,027$), dok ANOSIM kod MDSC-PGE2 grupe pokazuje vrednost blizu 0 ($R=0,08333$, $p=0,235$). Ovi rezultati ukazuju na to da tretman MDSC-PGE2 sprečava narušavanje diverziteta mikrobiote creva do čega dovodi indukcija EAE.



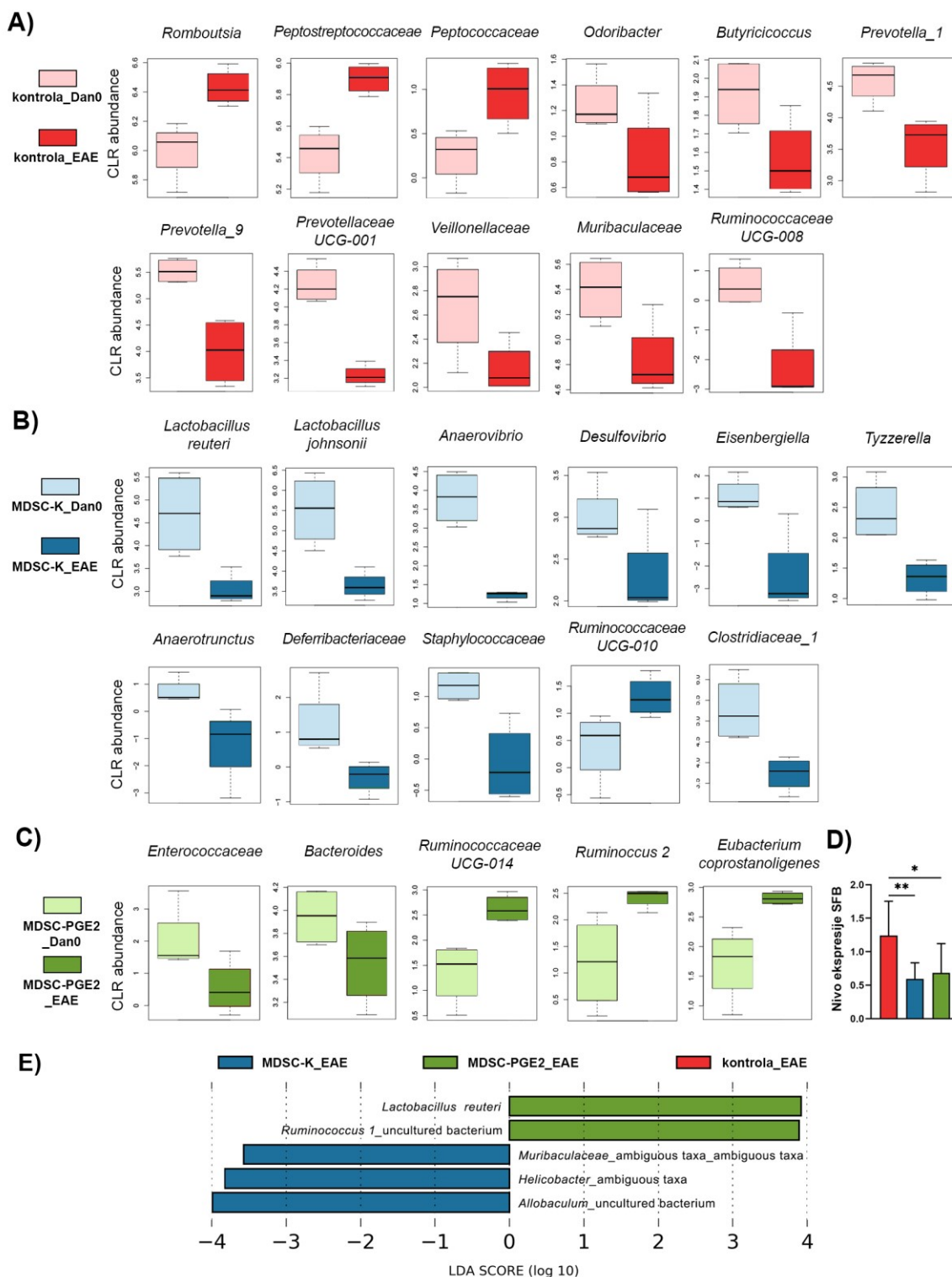
Slika 22. Analiza diverziteta mikrobiote creva kod DA pacova nakon indukcije bolesti i primene tretmana. **A)** Dijagrami kutije predstavljaju Šenonov i Simpsonov indeks kod kontrolne EAE grupe (Dan 0 - Kontrola_Dan0, Dan 15 - Kontrola_EAE), grupe koja je dobila tretman MDSC-K (Dan 0 - MDSC-K_Dan0 i Dan 15 - MDSC-K_EAE) i grupe koja je dobila tretman MDSC-PGE2 (Dan 0 - MDSC-PGE2_Dan0 i Dan 15 - MDSC-PGE2_EAE). Dan 0 i EAE grupa unutar svake grupe poređene su korišćenjem Welch-ovog Two Sample T testa, dok su neuparena poređenja analizirana neuparenim Welch-ovim Two Sample T testom uz BH FDR korekciju. **B)** Unweighted UniFrac distance između uzoraka, unutar jedne grupe pre indukcije bolesti (Unutar-Dan0), unutar jedne grupe u piku bolesti (Unutar-EAE) i između grupa pre imunizacije i u piku bolesti (Dan0-EAE). Neupareni Welch-ov Two Sample T test je korišćen za poređenje između promenljivih. **C)** PCoA dijagrami rasipanja pokazuju Unweighted UniFrac distance preračunate za beta diverzitet i razliku između uzoraka po grupama. Dobijeni procenat varijanse koji opisuje svaku glavnu komponentu je naznačen na osama. ANOSIM statistika je korišćena za određivanje značajnosti u varijacijama između uzoraka u grupama kao i između grupa (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2.7. Povezanost zastupljenosti bakterija mikrobiote creva i efekata MDSC u EAE

Prethodno je pokazano da u MS i EAE postoje promene u sastavu mikrobiote creva, i to povećanje bakterija koje imaju proinflamatorni efekat ili smanjenje zastupljenosti bakterija sa imunoregulatornim efektima na domaćina [202,353]. Stoga je dalje ispitano da li su indukcija EAE i primena MDSC praćeni promenama u sastavu mikrobiote creve. Analiza je prodrazumevala poređenje relativnih zastupljenosti različitih taksonomskih kategorija (nivo roda, porodice i vrste) između uzoraka sakupljenih pred imunizaciju i u piku EAE. Prvo su upoređeni taksoni u okviru kontrolne EAE grupe, podeljeni u dve grupe, uzorke pre indukcije EAE (Dan 0) i uzorke koji su sakupljeni u piku bolesti (Dan 15). Rezultati pokazuju da se relativna zastupljenost roda *Romboutsia* i dve porodice *Peptostreptococcaceae* i *Peptococcaceae* povećava u piku bolesti kontrolnih imunizovanih životinja, dok se relativna zastupljenost rodova *Odoribacter*, *Butyricoccus* i rodova iz porodice *Prevotellaceae* (*Prevotella_1*, *Prevotella_9* i *Prevotellaceae_UCG-001*), kao i porodica *Veillonellaceae*, *Muribaculaceae* i *Ruminococcaceae UCG-008* smanjuje u piku bolesti u odnosu na nivo pre indukcije bolesti (Slika 23A). Što se tiče životinja koje su tretirane sa MDSC-K, analiza je pokazala da postoji smanjena relativna zastupljenost vrsta *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus reuteri* u piku bolesti u odnosu na nivo pre imunizacije (Slika 23B). Pokazano je da niže relativne zastupljenosti imaju i rodovi *Anaerovibrio*, *Desulfovibrio*, *Eisenbergiella*, *Tyzzarella* i *Anaerotruncus*, kao i porodice *Deferribacteriaceae*, *Staphylococcaceae* i *Clostridiaceae_1* kada se porede životinje iz MDSC-K grupe u piku sa životinjama pre indukcije bolesti. Za razliku od EAE i MDSC-K grupa, kod MDSC-PGE2 uočene su minimalne promene u zastupljenosti taksona mikrobiote creva, kao što su smanjenje relativne zastupljenosti porodice *Enterococcaceae* i roda *Bacteroides*, i povećanje zastupljenosti porodice *Ruminococcaceae UCG-014*, rodu *Ruminococcus_2* i vrsti *Eubacterium coprostanoligenes* (Slika 23C) u piku bolesti.

Dodatno je analizirano prisustvo SFB u fecesu životinja, s obzirom da ova grupa bakterija predstavlja stalne stanovnike crevnog trakta ljudi i glodara, ali je povećanje zastupljenosti ovih bakterija povezano sa težinom kliničke slike MS [354,439]. Rezultati qPCR analize su pokazali da u fecesima pacova koji su dobili tretman MDSC-K i MDSC-PGE2 postoji manja zastupljenost ove grupe bakterija u odnosu na EAE kontrolnu grupu (Slika 23D). Može se zaključiti da indukcija EAE dovodi do poremećaja u sastavu mikrobiote creva i da je disbioza primetna i kod životinja koje su bile tretirane MDSC-K, dok životinje tretirane MDSC-PGE2 imaju neznatne promene u sastavu mikrobiote creva.

S obzirom da postoje promene u sastavu mikrobiote unutar grupa - između životinja pre indukcije EAE i u piku bolesti, dalje je ispitano da li postoje diferencijalno zastupljeni taksoni i između tri grupe u piku bolesti (Slika 23E). Za ovo poređenje korišćena je LEfSe analiza sa unapred određenim parametrima uz povećanje diskriminacije na LDA > 3,5. Rezultati pokazuju da se u piku bolesti kao najzastupljeniji biomarkeri MDSC-PGE2 grupe izdvajaju *Lactobacillus reuteri* i *Ruminococcus_1*, dok je u grupi MDSC-K primećena dominantnost *Muribaculaceae*, *Helicobacter* i *Allobaculum* kao biomarkera grupe. Kod EAE grupe u piku bolesti nisu pronađeni taksonomski biomarkeri.



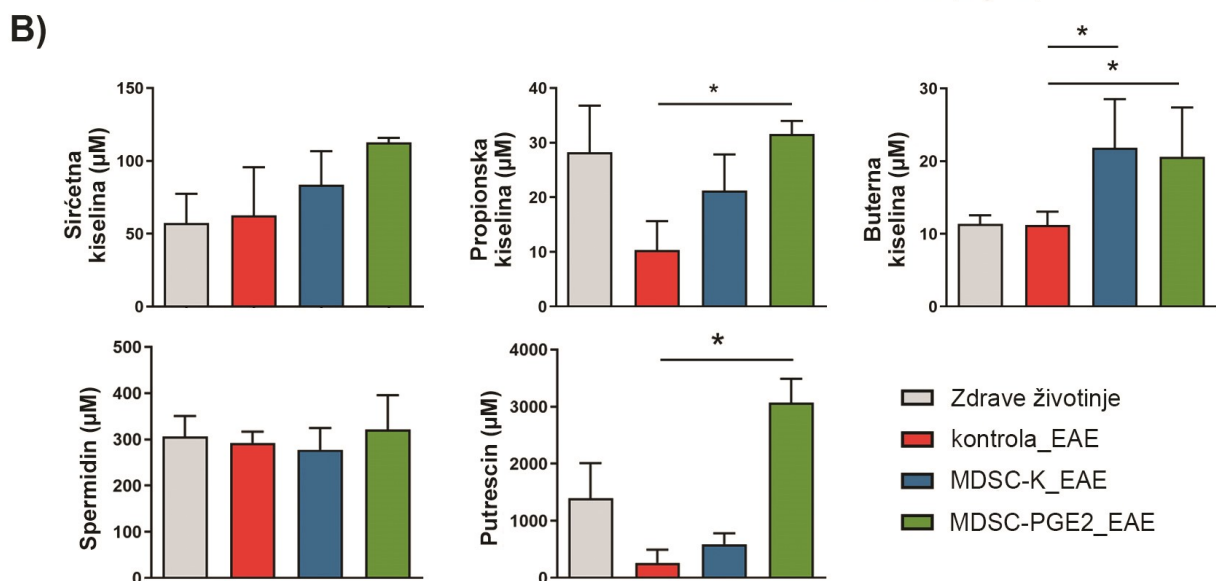
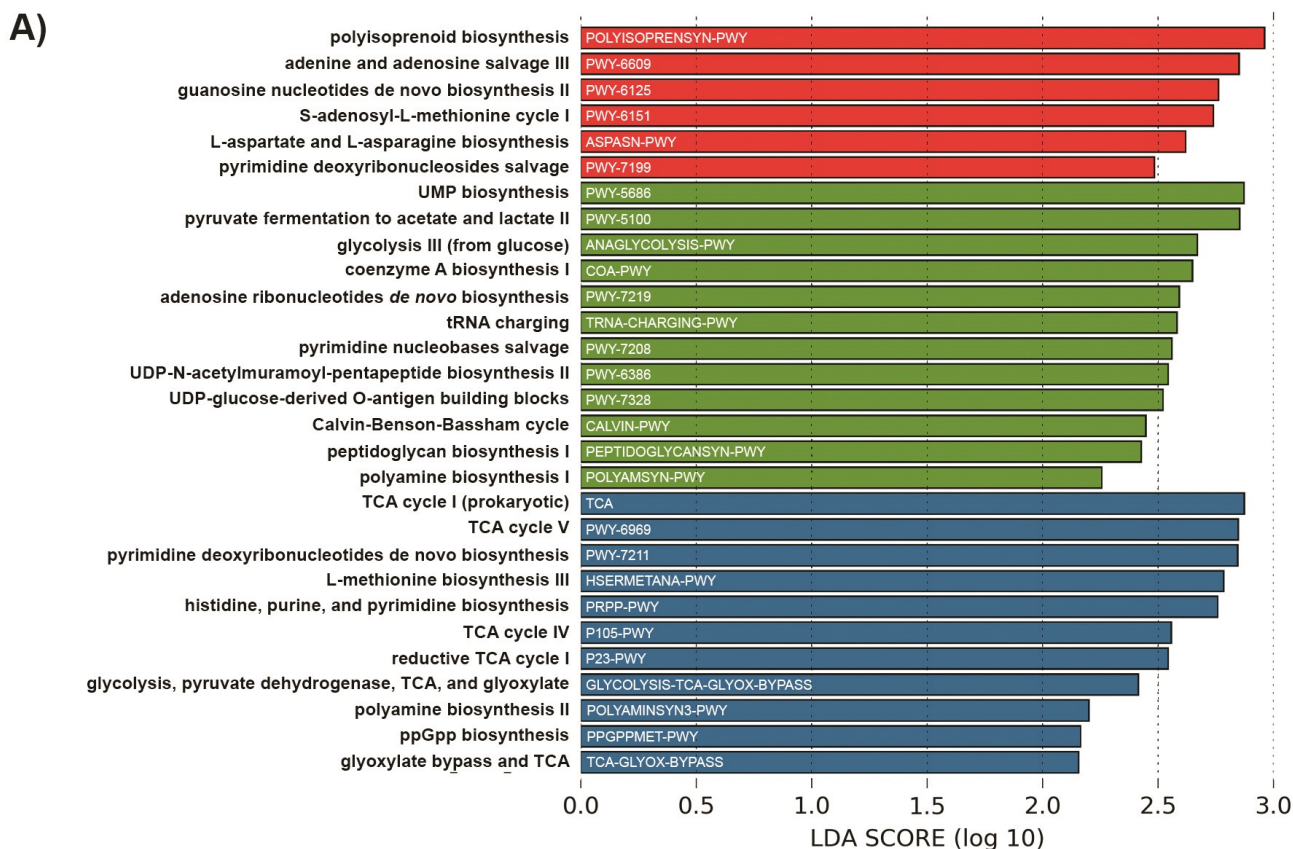
Slika 23. Analiza diferencijalne zastupljenosti taksona. Dijagrami kutije predstavljaju statistički značajne relativne zastupljenosti taksona nakon CLR transformacije (engl. *Centered Log-Ratio*) kod uzoraka pre imunizacije (_Dan0) i u piku bolesti (_EAE). Taksoni sa $W > 1$ nakon ANCOM analize su dalje ispitani Pairwise Wilcoxon testom ili uparenim Studentovim T testom uz BH FDR korekciju. **A)** uzorci kontrolne EAE grupe; **B)** uzorci grupe koja je primila MDSC-K tretman nakon imunizacije; i **C)** uzorci grupe koja je primila MDSC-PGE2 tretman nakon imunizacije. **D)** Rezultati qPCR analize zastupljenosti SFB u fecesu u kontrolnoj grupi, MDSC-K i MDSC-PGE2 grupama. Za poređenje je korišćena One-Way ANOVA sa Tukey *post hoc* testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **E)** LefSe analiza diferencijalne zastupljenosti na nivou vrste između tri grupe u piku bolesti. Prikazani su samo najznačajniji biomarkeri koji su zastupljeni preko nivoa diskriminacije LDA $> 3,5$ uz alfa vrednost 0,05 za faktorski Kruskal-Wallis test i strategiju unakrsnog upoređivanja svih grupa. Vrste koje imaju pozitivan LDA skor (zeleni horizontalni stubići) su najzastupljeniji kod MDSC-PGE2 grupe, dok negativan LDA (plavi horizontalni stubići) skor imaju vrste zastupljene u MDSC-K grupi.

4.2.8. Predikciona analiza metaboličke aktivnosti mikrobiote creva i kvantifikacija odabranih metabolita

Mikrobiota creva predstavlja izvor brojnih metabolita koji deluju na komponente koje čine intestinalnu barijeru, a prolaskom kroz intestinalnu barijeru mogu da dođu u krvotok i ostvaruju efekte na ćelije različitih tkiva [440]. Stoga je u daljim istraživanjima ispitana potencijalna metabolička aktivnost mikrobiote creva pomoću PICRUST2 protokola, koji je praćen LEfSe analizom kako bi se utvrdile razlike između grupa. Grafički su prikazani samo rezultati koji prelaze statistički značajan prag diskriminacije LDA > 2 (Slika 24A). U EAE kontrolnoj grupi u piku bolesti kao biomarkeri se izdvajaju putevi biosinteze purinskih (PWY-6125) i pirimidinskih (PWY-7199) nukleotida, aminokiselina (ASPASN-PWY), poliprenila (POLYISOPRENSYN-PWY), ciklus S-adenozil-L-metionina (PWY-6151) i put uključen u razgradnju i ponovnu sintezu nukleotida (PWY-6609). Kod MDSC-K grupe uočen je najveći broj diskriminatornih puteva, kao što su putevi uključeni u biosintezu: purinskih (PWY-7219) i pirimidinskih (PWY-5686, PWY-7208) nukleotida, koenzima A (COA-PWY), aminoacil-t(ranskripcione)-RNK (TRNA-CHARGING-PWY), UNDP-N-acetilmuramoilpentapeptida (PWY-6386), lipopolisaharida (PWY-7328) peptidoglikana (PEPTIDOGLYCANSYN-PWY), i poliamina (POLYAMSYN-PWY), kao i u fermentaciju do SCFA (PWY-5100), fiksaciju CO₂ (CALVIN-PWY) i energetske puteve (ANACLYCOLYSIS-PWY). Diferencijalno zastupljeni prediktivni putevi kod MDSC-PGE2 grupe uključuju puteve sinteze: purinskih (PRPP-PWY) i pirimidinskih (PWY-7211, PRPP-PWY) nukleotida, aminokiselina (HSERMETANA-PWY), poliamina (POLYAMINSYN3-PWY) i metaboličkih regulatora (PPGPPMET-PWY); u glikolizu (TCA-GLYOX-BYPASS), fiksaciju CO₂ (P23-PWY) i energetske puteve (TCA, PWY-6969, P105-PWY, GLYCOLYSIS-TCA-GLYOX-BYPASS).

Na osnovu dobijenih rezultata, dalje je izmerena koncentracija SCFA (sirćetne, propionske i buterne kiseline) i poliamina (spermidina i putrescina) u uzorcima sve tri grupe u piku bolesti i kod zdravih životinja koje nisu bile imunizovane niti su dobile MDSC kao tretman posle indukcije EAE. Koncentracije propionske kiseline i putrescina su bile smanjene kod EAE i MDSC-K grupe u poređenju sa zdravom kontrolom, dok su ova dva metabolita u MDSC-PGE2 grupi značajno premašila i nivo ovih metabolita izmeren kod zdravih životinja. Nivo buterne kiseline nije se značajno promenio indukcijom bolesti, ali njegova koncentracija u fecesu DA pacova koji su nakon indukcije tretirani sa MDSC-K i MDSC-PGE2 značajno je premašila nivo izmeren kod zdravih i EAE životinja (Slika 24B).

Generalno, može se zaključiti da tretman MDSC, i to pre svega tretman pomoću MDSC-PGE2 nakon indukcije EAE dovodi do održavanja nivoa produkcije imunoregulatornih metabolita mikrobiote u crevima, a u nekim slučajevima i do značajnog povećanja njihove koncentracije u fecesu, čime su potvrđeni najznačajniji rezultati predikcione funkcijske analize.

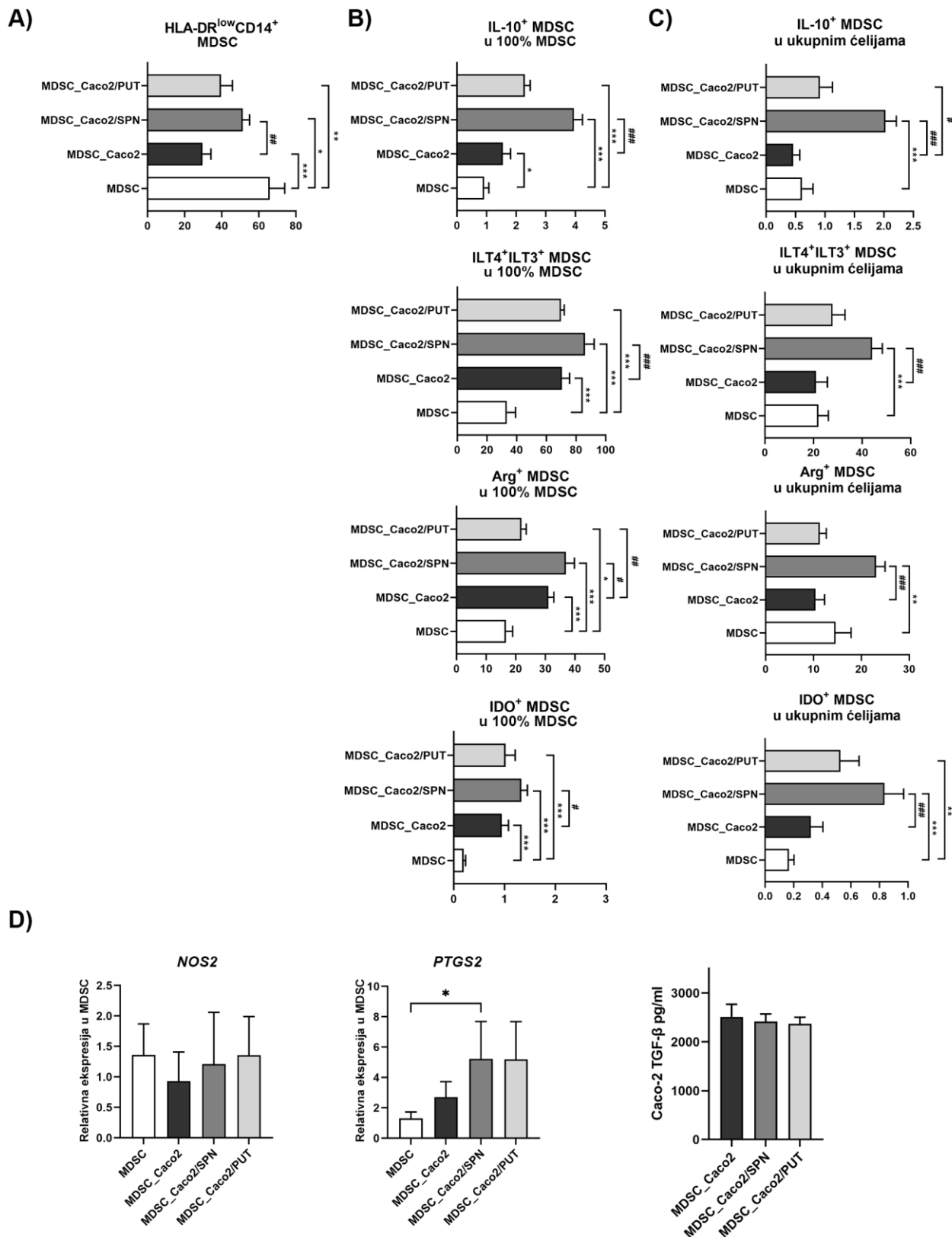


Slika 24. Predikciona analiza metaboličke aktivnosti mikrobiote i kvantifikacija odabranih metabolita bakterija u fecesu. A) Rezultati PICRUSt2 analize koja vrši predikciju metaboličke aktivnosti mikrobiote na osnovu nukleotidnih sekvenci i formira tabelu sa metaboličkim putevima bakterija u uzorcima. Njihova diferencijalna zastupljenost u sve tri grupe u piku bolesti ispitana je LEfSe protokolom gde je LDA skor bio > 2. Na horizontalnim stubićima su prikazani MetCyc identifikacioni brojevi za svaki metabolički put, dok su puna imena na engleskom jeziku ispisana ispred dijagrama sa horizontalnim stubićima. Kontrolna EAE grupa je označena crevenom bojom, MDSC-K grupa plavom i MDSC-PGE2 zelenom bojom. **B)** Nivo SCFA i poliamina izmeren pomoću HPLC u fecesu životinja u piku bolesti i kod zdravih kontrolnih životinja (označene sivom bojom). Statistička značajnost između grupa poređena je Kruskal-Wallis testom (* $p < 0,05$).

4.2.9. Modelovanje interakcije humanih MDSC i metabolita mikrobiote *in vitro*

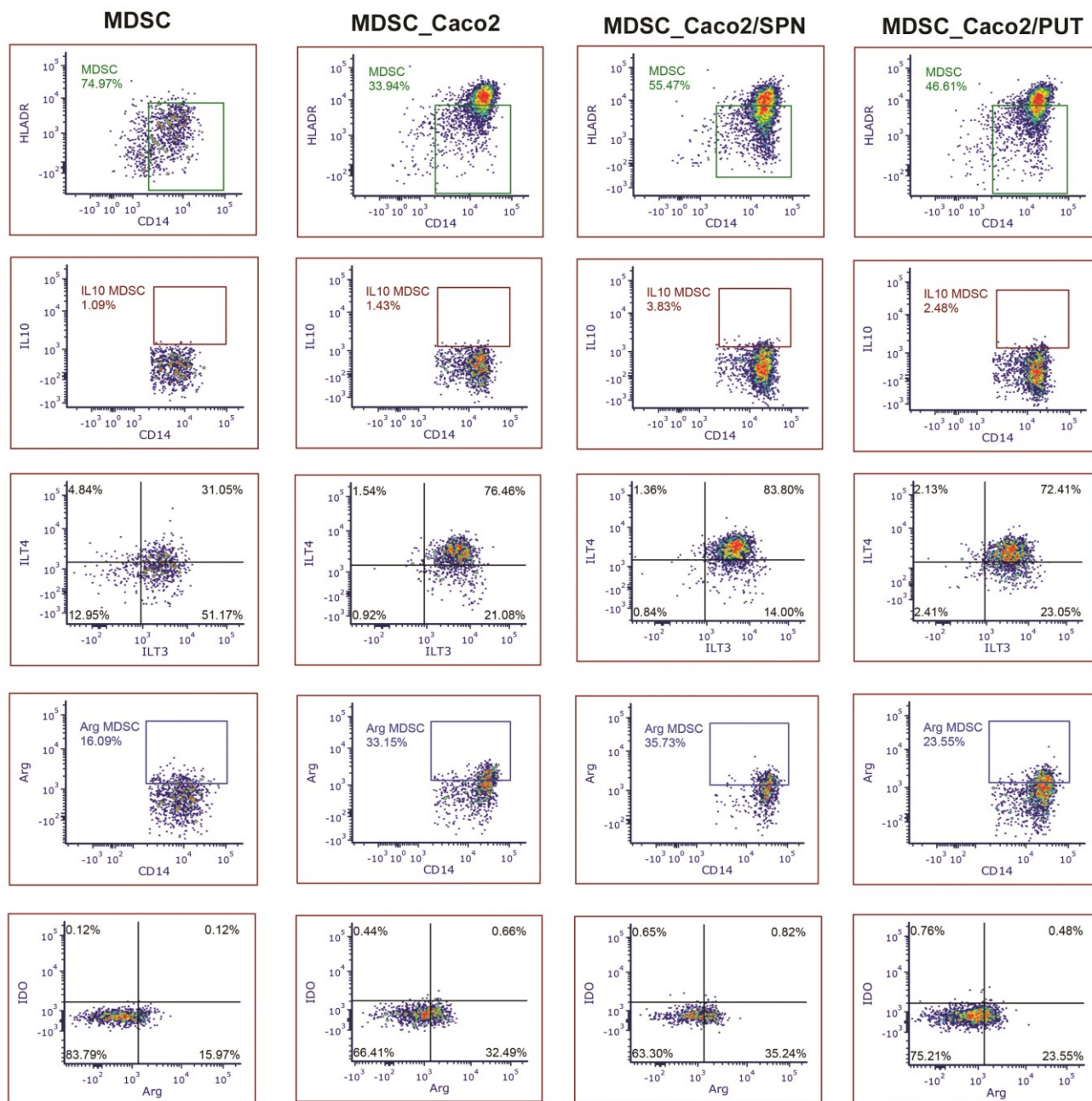
Pokazano je da *in vitro* diferencirane MDSC nakon primene na DA pacovima kod kojih je indukovana EAE, migriraju u creva u ranim fazama razvoja EAE, i da poliamini mogu imati važnu ulogu u zaštitnom efektu koji ove ćelije ispoljavaju u EAE. Stoga je u sledećem koraku ispitano kako putrescin i spermidin direktno deluju na humane epitelne ćelije creva *in vitro* i na diferencijaciju MDSC. Takođe, u *transwell* sistemu je ispitano kakav je efekat epitelnih ćelija creva, netretiranih i tretiranih poliaminima, na diferencijaciju i aktivnost MDSC. Analizom fenotipa ćelija dobijenih diferencijacijom monocita u prisustvu GM-CSF i IL-6, bez prisustva Caco-2 ćelija i metabolita, pokazano je da postoji veći broj ćelija koje po fenotipu odgovaraju MDSC (HLA-DR^{low}CD14⁺), nego u kokulturi sa Caco-2 ćelijama i poliaminima (Slika 25A).

Sa druge strane, iako je broj dobijenih MDSC smanjen u kokulturi sa netretiranim Caco-2 ćelijama i Caco-2 ćelijama tretiranim poliaminima, MDSC dobijene u ovim uslovima ekspimiraju značajno više nivoa imunosupresivnih molekula IL-10, ILT3, ILT4, ARG-1 i IDO-1 u poređenju sa MDSC dobijenim u odsustvu Caco-2 ćelija. Takođe je pokazano da tretman Caco-2 ćelija spermidinom dodatno utiče na povećanje ekspresije svih ispitivanih imunosupresivnih molekula, dok tretman putrescinom utiče samo na povećanje ekspresije ARG-1. Kada je analiziran udeo MDSC koje ekspimiraju ove imunosupresivne molekule, pokazano je da je procenat MDSC koje proizvode IL-10 i MDSC koje proizvode IDO-1 značajno viši u kokulturama sa Caco-2 ćelijama tretiranim spermidinom ili putrescinom, dok je procenat MDSC koje proizvode ILT4 i ILT3 i MDSC koje ekspimiraju ARG-1 povećan samo prilikom tretmana Caco-2 spermidinom. Dalje je ispitan relativni nivo ekspresije mRNA za iNOS i COX-2 u MDSC (Slika 25D), gde je pokazano da ne postoje statistički značajne promene u ekspresiji iNOS, a tretmani spermidinom i putrescinom u kokulturi povećavaju nivo ekspresije COX-2 u odnosu na MDSC diferencirane u odsustvu Caco-2 ćelija. Kod Caco-2 ćelija nije primećeno povećanje nivoa produkcije TGF- β 1 nakon dodavanja poliamina u kokulture.



Slika 25. Analiza fenotipskih i funkcionalnih markera humanih MDSC. **A)** Ukupan procenat MDSC (ćelije koje eksprimiraju CD14 i nizak nivo HLA-DR) diferenciranih od monocita bez Caco-2 ćelija ili u kokulturi sa Caco-2 ćelijama tretiranim ili ne poliaminima. **B)** Ekspresija IL-10, ILT3, ILT4, ARG-1 i IDO-1 je analizirana u 100 % MDSC (uzete su u analizu samo ćelije koje eksprimiraju CD14 i eksprimiraju nizak nivo HLA-DR) i **C)** analiziran je procenat MDSC koje eksprimiraju IL-10, ILT3, ILT4, ARG-1 i IDO-1 u ukupnoj populaciji ćelija dobijenih u kokulturi iz monocita. Reprezentativni dotplotovi ove analize prikazani su na Slici 26. Razlike u ekspresiji molekula na MDSC diferenciranim u prisustvu Caco-2 ćelijama tretiranim ili ne poliaminima u odnosu na MDSC diferenciranim u odsustvu Caco-2 ćelija označene su sa *, i u odnosu na MDSC

diferenciranim u prisustvu Caco-2 bez poliamina označene su sa #. D) Relativni nivoi ekspresije iRNK za iNOS i ARG-1 u MDSC diferenciranih u kokulturi Caco-2 izraženi u odnosu na vrednosti za GAPDH i predstavljeni kao nivo promene ekspresije u odnosu na MDSC diferencirane u prisustvu Caco-2 bez poliamina (#). Nivo produkcije TGF- β 1 izmeren u supernatantima Caco-2 određen je na osnovu standardne krive. Za proveru statističke značajnosti je korišćen One-Way ANOVA test uz višestruko poređenje za veći broj grupa sa Dunnett testom za korekciju. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta. */# $p < 0,05$, **/# $p < 0,01$, ***/### $p < 0,001$. (SPN - spermidin, PUT - putrescin).



Slika 26. Analiza humanih MDSC dobijenih u kokulturi sa Caco-2 ćelijama. Reprezentativni dotplotovi analize MDSC okarakterisanih kao CD14⁺ HLA-DR^{low/-} ćelije. Analizirana je ekspresija IL-10, ILT3, ILT4, ARG-1 i IDO-1 kod ćelija koje su diferencirane samostalno ili u prisustvu Caco-2 ćelija i/ili poliamina. Unutar odgovarajućih kvadrantata su navedeni procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul. (SPN - spermidin, PUT - putrescin).

5. DISKUSIJA

U poslednje dve decenije brojne studije su ukazale na ključnu ulogu mikrobiote creva kao važnog sredinskog faktora koji ima ulogu u nastanku i razvoju brojnih bolesti, naročito onih koje su povezane sa neadekvatnim imunskim odgovorom. Međutim, do danas nije u potpunosti utvrđeno na koji način sastav i funkcija mikrobiote creva mogu da doprinesu poboljšanju različitih pristupa za lečenje ovih bolesti, pre svega procedura koje su zasnovane na imunskim ćelijama. U tom smislu imunogene i supresorske mijeloidne ćelije *in vitro* diferencirane od prekursorskih ćelija, imaju ogroman terapijski potencijal, ali još uvek nije poznato kako su njihov fenotip, funkcijske karakteristike i terapijski efekti povezani sa mikrobiotom creva i koji molekularni mehanizmi učestvuju u njihovoj međusobnoj interakciji.

5.1. POVEZANOST SASTAVA I FUNKCIJE MIKROBIOTE CREVA SA POTENCIJALOM MONOCITA PERIFERNE KRVI ZDRAVIH DONORA DA SE *in vitro* DIFERENCIRAJU U IMUNOGENE DC

Nekoliko kliničkih studija koje su koristile vakcine na bazi DC kod pacijenata obolelih od kancera pokazalo je da DC dobijene po različitim protokolima imaju kapacitet za pokretanje tumor-specifičnog imunskog odgovora posredovanog Th1 i Tc1 limfocitima [175,392,441-445]. Međutim, prijavljeno je da DC koje su sazrevale u prisustvu CD40L i IFN- γ , ne produkuju jednake količine IL-12p70 kod svih pacijenata sa melanomom IV stadijuma, kao i da su za efikasan antitumorski odgovor neophodne DC koje imaju veći kapacitet za produkciju IL-12p70 i imaju viši nivo ekspresije kostimulatornih molekula CD40 i CD86 [445]. Iako su bezbedne za primenu, DC vakcine daju različite rezultate i kod većine pacijenata prijavljen je slabo izražen odgovor na terapiju, zbog čega je neophodna optimizacija dizajna vakcina [176]. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na postojanje značajne varijacije u fenotipu i funkciji *in vitro* diferenciranih DC poreklom od monocita periferne krvi 14 zdravih donora, što je u skladu sa različitim efektima DC vakcina koji su zabeleženi u literaturi. Dobijene DC su se u velikoj meri međusobno razlikovale između donora prema fenotipu i funkciji kako u nezrelom stadijumu, tako i u zreлом stadijumu, indukovanom pomoću LPS/IFN- γ . Primećeno je da se za svaki ispitivani fenotipski marker uočava različit nivo ekspresije među donorima, iako kod najvećeg broja donora dobijene DC nakon stimulacije povećavaju ekspresiju površinskih receptorskih i koreceptorskih molekula (HLA-DR, CD86 i CD40) koji su važni za aktivaciju T limfocita. Među dobijenim DC kod većine donora uočavala se povećana ekspresija IL-10 i ILT3 nakon stimulacije LPS/IFN- γ . Iako su ovi molekuli poznati po tome što DC omogućavaju supresiju imunskog odgovora [446] moguće je da se njihova ekspresija kod DC povećava kao rezultat mehanizama negativne povratne sprege koji se pokreću u odgovoru na stimulaciju. U tom smislu je ova analiza pokazala pozitivnu korelaciju

između nivoa ekspresije ILT3 i nivoa ekspresije CD83, CD86 i HLA-DR na imDC. Pošto u toku diferencijacije monocita do imDC nije dodavan stimulus koji bi mogao da dovede do sazrevanja ovih ćelija, ova korelacija bi mogla da ukaže i na razlike u nivou prethodne *in vivo* stimulacije monocita kod pojedinačnih zdravih donora. Takođe, uočena je i negativna korelacija između povećanja ekspresije ILT3 nakon stimulacije i potencijala DC da dodatno povećaju nivo ekspresije CD83 i CD86. Na osnovu toga se može zaključiti da je sposobnost sazrevanja imDC negativno korelisana sa ekspresijom funkcijskih molekula na imDC i promenama u ekspresiji ILT3. Dodatno, ekspresiranje funkcijskih molekula od strane mDC u velikoj meri zavisi i od nivoa ekspresije ovih molekula od strane imDC. Tome u prilog ide rezultat studije u kojoj su pomoću ILT3 *knock out* DC pokazali da kada je gen koji kodira za ovaj receptor inaktiviran dolazi do povećanja osetljivosti TLR ovih ćelija na ligande i do produkcije proinflamatornih citokina [447]. Ovo bi značilo da nivo ILT3 na imDC može da ukaže na potencijal za dobijanje imunogenih DC. Ovaj rezultat ukazuje i na potrebu analize ekspresije ILT3 na monocitima/imDC kao prediktivnog markera koji bi mogao da ukaže da li će terapija imunskim ćelijama poreklom od donora biti efikasna u borbi protiv tumora.

Takođe, u drugoj studiji je pokazano da pored nivoa ekspresije površinskih markera i produkcija citokina varira između donora, što se može odraziti na efikasnost terapije kancera DC vakcinama [448]. Rezultati te studije ukazuju da nakon primene DC vakcina direktno u tumorsko tkivo, dolazi do povećanja infiltracije limfocita kod 54 % pacijenata i da postoji značajna korelacija između produkcije IL-12 i IL-8 od strane DC i efikasnosti ovih ćelija u fazi I/II kliničke studije na solidnim tumorima. U skladu sa rezultatima koji su dobili Subbiah i saradnici, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da DC poreklom od nekih donora smanjuju produkciju proinflamatornih citokina IL-6, IL-8, IL-12p70 i TNF- α u odgovoru na stimulaciju LPS/IFN- γ , što nije odgovor koji je poželjan u imunoterapiji tumora. Takođe i produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10 je varirala među donorima nakon stimulacije DC signalima za sazrevanje. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za analizu imunogenog potencijala DC bolje posmatrati odnos između produkcije IL-12p70 i IL-10, nego pojedinačne citokine. Pronalazak kombinacije markera koji bi omogućili imunogenost DC od presudnog je značaja za poboljšanje efikasnosti DC vakcina u terapiji tumora. Međutim, postojanje varijabilnosti u svojstvima DC predstavlja izazov za uspešnu DC vakcinaciju kod pacijenata sa kancerom. Jedna studija iz 2014, pokazala je da se varijabilnost u odgovoru DC na različite stimulse poreklom od mikroorganizama, kao što su LPS poreklom od *Escherichia coli*, influenza virus i IFN- β , između različitih donora može povezati sa razlikama u velikom broju genskih varijanti istih donora [425]. Sa druge strane, u mišjem modelu kancera je pokazano da uspeh antitumorske terapije bazirane na adoptivnom transferu T limfocita zavisi od prisustva različitih bakterijskih taksona u crevima ovih miševa. Oralna primena antibiotika vankomicina koji prvenstveno deluje lokalizovano na nivou creva protiv Gram-pozitivnih bakterija dovela je do smanjenja rasta tumorskog tkiva i povećanja broja CD8 α DC koje produkuju IL-12 [449]. Dodatno, još nekoliko studija je pokazalo da se efikasnost imunoterapije CPI može povećati modulacijom mikrobiote creva, bilo da je u pitanju primena anti-CTLA-4 ili anti-PD-L1 antitela [363,364].

Iako je predmet ove doktorske disertacije ispitivanje imunoloških parametara DC koje su dobijene od monocita periferne krvi zdravih donora, ispitivani parametri daju podatke koji mogu biti relevantni za ispitivanje efikasnosti DC vakcina u terapiji tumora. Prethodna istraživanja su pacijente i zdrave donore grupisala na osnovu varijabilnosti

njihovog imunskog odgovora na one koji dobro odgovaraju i one koji slabije odgovaraju na osnovu arbitrarnih vrednosti [427,450–452]. Pored korišćenja linearne regresije sa korekcijom za pol i godine u analizi, zdravi donori su za potrebe analiza u ovom istraživanju podeljeni na osnovu odgovora njihovih DC na stimulus LPS/IFN- γ na one koji imaju slabiji i jači odgovor u odnosu na medijalnu vrednost za ispitivanu populaciju donora. U ovoj disertaciji je po prvi put do sada pokazano da diferencijacija imunogenih DC od monocita periferne krvi zdravih donora, njihov fenotip i funkcijske odlike, značajno korelišu sa sastavom i zastupljenošću pojedinačnih članova mikrobiote creva. Takođe je pokazano da su DC dobijene od monocita zdravih donora sa nižim diverzitetom mikrobiote imale imunogeniji potencijal nakon sazrevanja u mDC. Primećeno je da donori koji imaju niži diverzitet mikrobiote u crevima imaju smanjeni kapacitet imDC da produkuju TNF- α i veći kapacitet da produkuju IL-10, imunoregulatorni citokin. Fenotipski marker DC, CD1a je visoko eksprimiran na imDC donora koji imaju niži alfa diverzitet. Inače, prisustvo ovog markera je u literaturi povezano sa većim proinflamatornim potencijalom kod DC i sposobnošću da pokrenu diferencijaciju Th1 ćelija [453]. Ovo može da ukaže da nezrelost DC potiče od nižeg stepena prethodne aktivacije monocita u cirkulaciji, te da je ovo povezano sa nižim diverzitetom mikrobiote, odnosno da monociti donora sa nižim diverzitetom mikrobiote creva imaju naivniji fenotip jer su izloženi nižoj raznovrsnosti produkata mikroorganizama. Takođe, ovakve DC su jače odgovorile na stimulse i postale imunogenije DC. Moguće je i da bi ovakve DC bile i efikasnije u borbi protiv tumora. Ovo je hipoteza koja bi trebalo da bude ispitana u narednim istraživanjima. U slučaju beta diverziteta, uočava se da donori koji imaju viši nivo ekspresije CD1a imaju sličnije zajednice u crevima, što ukazuje da postoje neznatne izmene njihovog diverziteta, a da je to povezano sa manjom aktiviranošću njihovih prekursorskih ćelija. Kada se uzme sve navedeno u obzir, može se zaključiti da bi donori koji imaju manji diverzitet mikrobiote u crevima bili bolji kandidati za antitumorsku terapiju DC. U prilog zaključku idu i rezultati drugih studija koji pokazuju asocijaciju između oralne upotrebe antibiotika koja značajno smanjuje diverzitet mikrobiote creva kod životinja i većeg kapaciteta njihovih DC da odgovore na stimulus [449,454]. Ovo otvara mogućnost ispitivanja efekata primene antibiotika kod pacijenata pre uzimanja uzoraka periferne krvi na smanjenje diverziteta bakterija u njihovim crevima, manje izolovanosti prekursorskih ćelija metabolitima mikroorganizama, nezrelijem statusu ovih prekursora i njihovom većem kapacitetu da se diferenciraju u imunogene DC.

U daljim istraživanjima u okviru disertacije je ispitivano da li i relativna zastupljenost pojedinih bakterijskih taksona može da bude povezana sa razlikama u imunogenom fenotipu i funkcijama *in vitro* dobijenih DC. Pronađeno je nekoliko asocijacija na nivou razdela, porodice, roda i vrste sa osobinama DC. Na najvišem taksonomskom nivou, primećeno je da je povećana zastupljenost razdela Verrucomicrobia u crevima prisutna kod donora čije imDC eksprimiraju niži nivo CD1a i nakon stimulusa sazrevaju u mDC koje imaju niži nivo ekspresije CD83 i IL-6. Jedinu okarakterisani predstavnik ovog razdela kod ljudi jeste *Akkermansia muciniphila*, koja produkuje različite enzime koji razlažu mucin čime učestvuje u njegovom recikliranju, a time učestvuje i u održavanju integriteta intestinalne barijere [455]. Takođe je poznata i njena uloga u poboljšanju odgovora na antitumorsku imunoterapiju. U terapiji koja ciljana inhibira PD-1, ova vrsta je povezana sa većom produkcijom IFN- γ od strane T limfocita na periferiji i efektivnijim antitumorskim odgovorom [366]. U našem dizajnu moglo bi se pretpostaviti da veća zastupljenost ove bakterije kod nekih zdravih donora u odnosu na medijanu za analiziranu populaciju donora može biti povezana sa nešto jačom razgradnjom mucina i

nešto većom propustljivošću intestinalne barijere kod ovih donora. To pak može biti povezano sa nešto većim prolaskom različitih stimulatornih molekula iz lumena creva u ostala tkiva što može uticati na to da se monociti više aktiviraju. Prema ovoj hipotezi koju je potrebno proveriti u narednim istraživanjima, ovakvi monociti diferenciraju se u imDC koje će biti više aktivirane, i imati slabiji potencijal da odgovore na dodatni stimulus u kulturi, pa će dati i manje imunogene DC. Treba istaći da su u ovim istraživanjima korišćeni zdravi donori koji nisu bili izloženi nama poznatim uticajima koji bi doveli do patološkog narušavanja intestinalne barijere. Stoga se ovde može govoriti samo o normalnom opsegu vrednosti svih ispitivanih osobina. Dalje, u opsežnoj studiji, Schrimmer i saradnici su pokazali da postoji negativna korelacija između zastupljenosti roda *Barnesiella* u crevima zdravih donora i kapaciteta PBMC za produkciju IFN- γ u odgovoru na stimulaciju bakterijskim antigenima [297]. Na osnovu njihovih rezultata bi se moglo zaključiti da povećano prisustvo *Barnesiellaceae* u crevima onemogućava adekvatan odgovor imunskih ćelija na stimulus. U skladu sa ovim su i rezultati dobijeni u istraživanjima ove disertacije, gde je pokazano da donori koji imaju nižu relativnu zastupljenost porodice *Barnesiellaceae* u crevima imaju monocite koji se diferenciraju *in vitro* u imDC sa visokim nivoom ekspresije CD1a, i posledično sazrevaju u mDC sa većim imunogenim potencijalom. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati studije u kojoj je opisan fenomen da je povećana zastupljenost porodice *Barnesiellaceae* povezana sa imunoregulatornim fenotipom imunskih ćelija kod pacijenata koji dobro podnose terapiju anti-CTLA-4 antitelima, i ne razvijaju kolitis, kao jednu od čestih nuspojava ove terapije [456]. Pored sniženog nivoa *Barnesiellaceae*, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazali su da je smanjena zastupljenost roda *Bilophila* karakteristična za zdrave donore čije DC ekspimiraju veće nivoe CD1a. Tom rezultatu ide u prilog rezultat Schrimera i saradnika koji su pokazali da PBMC poreklom od zdravih donora sa manjom zastupljenošću roda *Bilophila* mogu na LPS stimulus da odgovore povećanom produkcijom TNF- α [297]. Svi rezultati disertacije prodiskutovani u kontekstu do sada opisanih fenomena, kada se sagledaju u celini, ukazuju da je niska zastupljenost *Verrucomicrobia*, *Barnesiellaceae* i *Bilophila* u crevima zdravih donora povezana sa većom sposobnošću monocita periferne krvi zdravih donora da se *in vitro* diferenciraju u imunogene DC.

Pored ova tri bakterijska taksona, kod donora čije DC imaju veći nivo ekspresije CD1a, primećene su niže relativne zastupljenosti *Alistipes onderdonkii* i *Butyricimonas*. Još jedna vrsta iz roda *Alistipes*, *Alistipes finegoldii* bila je negativno asocirana sa ekspresijom CD1a na imDC. Takođe je pokazano da je manja zastupljenost roda *Butyricimonas* povezana sa nižim odnosom produkcije citokina IL12p70 i IL-10 kod imDC, a ovakve DC mogu bolje da odgovore na stimulaciju LPS/IFN- γ . Poznato je da *Butyricimonas*, *Alistipes onderdonkii* i *Alistipes finegoldii* produkuju SCFA [428,457], stoga je vrlo verovatno da veća zastupljenost SCFA kod zdravih donora sprečava monocite da se diferenciraju u DC koje bi ostvarile potpuni imunogeni potencijal. Iako je prethodno opisano da SCFA ostvaruju svoj imunoregulatorni efekat na aktivaciju monocita i imunogeni potencijal DC *in vitro* [458], u ovoj disertaciji je po prvi put pokazano da prisustvo bakterija koje produkuju SCFA u crevima zdravih donora negativno koreliše sa kapacitetom monocita periferne krvi da se *in vitro* diferenciraju u imunogene DC. Međutim, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se pojasnili molekularni mehanizmi koji su u osnovi ovog fenomena. Kako bi se utvrdili najbolji kriterijumi koji bi ukazivali na uspešnu antitumorsku terapiju potrebno je kombinovati više različitih pristupa, kao što su grupisanje donora DC na osnovu ekspresije markera, primene kriterijuma za evaluaciju odgovora kod solidnih tumora [452] i analiza mikrobiote creva. Osim promena u zastupljenosti taksona koji

produkuju SCFA pokazana je i asocijacija koncentracije SCFA u fecesu zdravih donora i niskog imunogenog kapaciteta DC. Zastupljenost ukupnih SCFA i njihovih pojedinačnih udela u ukupnim SCFA je bila manja u fecesima donora čije DC su eksprimirale više nivoe CD1a, CD40, CD83, CD86, IL-8 i IL-12p70, dok su kod njih izmereni i niži nivoi imunosupresivnih molekula IL-10 i ILT-3. Takođe, treba naglasiti da se u većim koncentracijama buterna kiselina povezuje sa imunoregulatornim fenotipom DC s obzirom da zdravi donori koji imaju veće nivoe buterne kiseline imaju i povećanu ekspresiju ILT3 na DC. Kaiser i saradnici su pokazali da buterna kiselina ostvaruje anti-inflamatorni potencijal indukcijom tolDC posredstvom receptora kuplovanog sa G proteinom i inhibicijom aktivnosti histon-acetilaze [459]. Dodatno je pokazana i negativna asocijacija između zastupljenosti SCFA i potencijala DC za indukciju Th1 imunskog odgovora, pre svega između udela buterne kiseline u ukupnim SCFA i produkcije IFN- γ od strane Th1 ćelija. Ovim rezultatima ide u prilog literaturni podatak koji ukazuje na ulogu buterne kiseline u sprečavanju monocita da se diferenciraju u DC, njihovu ulogu u sprečavanju sazrevanja DC [458] i njihov potencijal da usmere odgovor ka Th1 ćelijskom profilu [459]. SCFA nastaju kao krajnji produkt fermentacije vlakana od strane bakterija u crevima, među kojima buterna kiselina služi za ishranu epitelnih ćelija kolona, a višak ove SCFA najvećim delom se koristi za ishranu hepatocita zajedno sa sirćetnom i propionskom kiselinom [460–462]. U znatnoj koncentraciji, SCFA se mogu naći i u krvi, dok je njihova funkcija najizraženija u crevima gde doprinose održavanju integriteta intestinalne barijere i pomoću svojih imunomodulatornih svojstava utiču na regulaciju imunskog sistema posredno preko epitelnih ćelija [463]. U ovoj disertaciji su izmerene koncentracije SCFA u fecesima zdravih donora koje potencijalno ostvaruju svoje imunomodulatorne efekte preko epitelnih ćelija na cirkulišuće monocite. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se izmerila količina cirkulišućih SCFA u serumu donora da bi se izveo zaključak o tome kako povećana zastupljenost SCFA utiče na regulaciju funkcije monociti i njihovog kapaciteta da se diferenciraju u imunogene DC. S obzirom da je preduslov za uspešnu primenu DC vakcina u antitumorskoj terapiji njihov kapacitet da pokrenu tumor specifičan imunski odgovor posredovan Th1 i CD8⁺ T limfocitima, nivo buterne kiseline koji je u ovoj disertaciji povezan sa manjim kapacitetom DC da produkuju IL-12p70 mogao bi da bude značajan molekul za ciljanu terapiju. Kada se sve navedeno uzme u obzir, može se zaključiti da modifikacije sastava mikrobiote koje bi dovele do smanjenja zastupljenosti bakterija koje proizvode SCFA u crevima mogu da utiču na veću efikasnost antitumorskih terapija, i mogle bi da predstavljaju potencijalan vid pripreme pacijenata za efikasniju primenu DC vakcina. Kako su bakterije koje produkuju SCFA izuzetno osetljive na promene u ishrani, smanjenjem unosa hrane koja sadrži biljna vlakna kod pacijenata obolelih od kancera pre sakupljanja monocita za pripremu DC vakcine, mogao bi da bude jedan od načina za povećanje efikasnosti primene antitumorske terapije na bazi DC.

Pored ovih bakterija sa pretpostavljenim imunosupresivnim efektom, rezultati ove doktorske disertacije po prvi put pokazuju da se rodovi *Bifidobacterium* i *Collinsella* nalaze u fecesima donora čiji se monociti diferenciraju u imunogene DC sa svojstvima koja su poželjna za antitumorsku terapiju. Nekoliko studija je pokazalo povoljan efekat vrsta roda *Bifidobacterium* kod bolesti povezanih sa poremećajem imunskog sistema, bilo da se primenjuje kao probiotik ili postbiotik [464]. Kada se navedeno uzme u obzir, rezultati disertacije ukazuju na potencijalnu primenu *Bifidobacterium* kao suplementacije uz terapiju DC vakcinama. Tome u prilog idu i podaci da vrste *Bifidobacterium animalis* i *Bifidobacterium longum* mogu da pokrenu Th1 imunski odgovor, i potencijalno predstavljaju kandidate za dalja istraživanja njihove primene kao suplementacije prilikom

antitumorske terapije [465–467]. Pored primene živih bakterija kao probiotika, moguće je primeniti i njihove imunomodulatorne produkte ili komponente kao što je to pokazano za strukturni protein pila kod *Bifidobacterium bifidum* i EPS kod *Bifidobacterium breve* UCC2003 [468,469]. Ovo je pre svega značajno s obzirom da je u disertaciji pokazano da postoji pozitivna korelacija između relativne zastupljenosti *Bifidobacterium bifidum* i ekspresije CD83 mDC. CD83 je inače ključan za održavanje imunogenosti DC u mikrosredini koja je bogata IL-10 [470], pa je visoka ekspresija ovog molekula na mDC dobar parametar za definisanje stabilnih imunogenih DC. S obzirom da je imunski sistem pacijenata koji su oboleli od kancera već kompromitovan, korišćenje prečišćenih i detaljno okarakterisanih postbiotika moglo bi da na bezbedan način dovede do obnove funkcije imunskih ćelija kod pacijenta. U disertaciji je pokazano i da, ukoliko donori imaju veću relativnu zastupljenost porodice *Enterobacteriaceae* u crevima, to negativno koreliše sa njihovim DC da povećaju ekspresiju ILT3 nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ . Upotreba dobro okarakterisanih bakterija iz ove porodice, kao što je *Escherichia coli* Nissle 1917 mogla bi da predstavlja dobar početak u istraživanjima efekata modifikacije mikrobiote u cilju dobijanja DC sa niskom zastupljenošću ILT3 nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ . Kao što je već napomenuto u disertaciji, DC su najpotentnije mijeloidne ćelije u indukciji ćelijske adaptivne imunosti, te je model humanih DC korišćen kao model za ispitivanje povezanosti mikrobiote creva i imunogenih svojstava mijeloidnih ćelija. U narednom delu je ispitano kakva je povezanost supresivnih svojstava mijeloidnih ćelija sa mikrobiotom creva. U tom smislu je odabran model MDSC, kao populacije koja ispoljava najpotentnija supresivna svojstva [471,472].

5.2. POVEZANOST SASTAVA I FUNKCIJE MIKROBIOTE CREVA SA FENOTIPOM, SUPRESIVNIM KAPACITETOM I IMUNOTERAPIJSKIM POTENCIJALOM *in vitro* DIFERENCIIRANIH MDSC

MDSC obuhvataju vrlo heterogenu populaciju nezrelih mijeloidnih ćelija koje nastaju tokom infekcija, inflamacije i u tumoru, a odlikuje ih sposobnost snažne inhibicije imunskog odgovora [473]. Kako MDSC u tumorskom tkivu omogućavaju malignim ćelijama da izbegnu imunski nadzor i da suprimiraju antitumorski odgovor, dosta su ispitivane u kontekstu njihove funkcije u tumorskom tkivu. Međutim, još uvek nije najjasnija njihova uloga u autoimunskim bolestima i njihov potencijal za korišćenje u terapiji ovih bolesti. Postoji nekoliko studija u kojima su istraživači koristili glodarske modele autoimunskih bolesti u kojima su primenjivali adoptivni transfer MDSC. Do sada su u mišjem modelu EAE korišćene *ex vivo* izolovane MDSC i praćen je njihov efekat na tok bolesti [247], dok ne postoje podaci o upotrebi *in vitro* dobijenih MDSC u tretmanu EAE. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su MDSC diferencirane iz prekursorskih ćelija kostne srži DA pacova u prisustvu GM-CSF, FLT3 i IL-6, s obzirom da literaturni podaci pokazuju da je ova kombinacija stimulatornih molekula dovoljna da indukuje ekspresiju transkripcionog faktora STAT-3 koji omogućava imunosupresivna svojstva MDSC [387–390,472]. Kada se u protokolima za diferencijaciju koriste samo GM-CSF i FLT3 dobijaju se makrofage i imDC koje na svojoj ćelijskoj membrani ekspimiraju MHC II, OX62, CD68, CD80 i CD86, što je pokazano i u ovoj disertaciji [391,392]. Od ranije je poznato da PGE2, proizveden aktivnošću enzima COX-2, omogućava akumuliranje MDSC u tumorskom tkivu [54,249], a u prethodnoj studiji je pokazano da ukoliko se u protokol za diferencijaciju humanih MDSC iz monocita periferne krvi doda PGE2, dobijaju se M-MDSC, koje imaju veći supresivni kapacitet i sposobnost da indukuju Treg u odnosu na M-MDSC diferencirane bez PGE2 [249]. Koristeći sličan pristup, u ovoj studiji je takođe

pokazano da PGE2 povećava imunosupresivni potencijal MDSC pacova, diferenciranih pomoću GM-CSF, FLT3 i IL-6. Posle diferencijacije MDSC i centrifugiranja na gradijentu gustine, morfološkom analizom su detektovane i mononuklearne i polimorfonuklearne MDSC. Dobijena populacija ćelija je eksprimirala CD11b+SIRP- α +HIS48+MHC II- fenotip što je u skladu sa do sada opisanim fenotipskim markerima pacovskih MDSC [431]. S obzirom da se kao marker pacovskih DC koristi OX62 i da je njegova ekspresija zapažena u veoma niskom nivou u dobijenim kulturama, može se zaključiti da se po korišćenom protokolu dobija nizak procenat DC. Kako u literaturi ne postoje kriterijumi koji bi jasno odvojili pacovske MDSC od ostalih mijeloidnih ćelija, trenutno nije moguće isključiti doprinos drugih mijeloidnih ćelija efektu koji je uočen *in vivo* i *in vitro* u ovoj disertaciji.

Rezultati disertacije ukazuju da su kostimulatorni molekuli CD80 i CD86 kod dobijenih ćelija nisko eksprimirani, a da su kod ćelija gajenih u prisustvu PGE2 njihove vrednosti zanemarljive, što ukazuje na slabu sposobnost ovih ćelija za indukciju T ćelijskog odgovora. Kako bi se dodatno okarakterisala potencijalna funkcija dobijenih ćelija, analizirana je ekspresija COX-2, ARG-1 i iNOS, enzima koji doprinose supresivnim svojstvima MDSC. Ćelije dobijene na oba načina eksprimiraju ova tri enzima, ali primećeno je da MDSC koje su diferencirane u prisustvu PGE2 imaju značajno povećanu ekspresiju COX-2 i iNOS, dok njegovi efekti na ekspresiju ARG-1 nisu bili značajni. Ovi rezultati su u skladu sa studijom u kojoj je pokazano da MDSC koje se infiltriraju u tumorsko tkivo mozga pacova eksprimiraju sva tri enzima, ali primarni mehanizam njihovog supresivnog efekta predstavlja produkcija NO [85]. Takođe, Dugast i saradnici su pokazali da MDSC kod pacova svoju funkciju pre svega ostvaruju u direktnom kontaktu sa efektorskim T limfocitima i produkcijom NO od strane iNOS [432]. Rezultati ove disertacije ukazuju da *in vitro* diferencirane MDSC, bilo da su gajene bez ili u prisustvu PGE2 mogu da inhibiraju proliferaciju ConA-aktiviranih splenocita. Ipak, EAE simptome je značajno smanjio samo tretman MDSC koje su bile diferencirane u prisustvu PGE2. Ovaj tretman je uticao na odlaganje početka bolesti i skratio trajanje bolesti, u poređenju sa kontrolnim EAE životinjama.

Ključni događaj u patogenezi MS i EAE predstavlja infiltracija Th1 i Th17 ćelija specifičnih za antigene mijelina u CNS gde ih APC ponovo aktiviraju. Za razliku od ovih patoloških T limfocita, brojnost Treg se povećava tokom relapsa, a njihova uloga u kontroli inflamacije je dobro poznata [205,474]. Rezultati disertacije su pokazali da MDSC-K tretman pacova sa EAE ne utiče značajno na promene u T ćelijskoj populaciji koja produkuje IFN- γ . S druge strane, i MDSC-K i MDSC-PGE2 tretman su uticali na smanjenje brojnosti populacije NK ćelija koje produkuju IFN- γ u kičmenoj moždini i slezini. U EAE, NK ćelije koje produkuju IFN- γ mogu imati dvostruku ulogu - inflamatornu i imunoregulatornu. Ove uloge verovatno mogu biti specifične za različite stadijume u razvoju bolesti, pošto je utvrđeno da NK ćelije tokom početnih faza EAE predstavljaju glavni izvor IFN- γ , što omogućava migraciju encefalogenih T ćelija u CNS. Njihova imunoregulatorna funkcija se javlja u kasnijim fazama EAE, kada NK ćelije koje produkuju IFN- γ vrše inhibiciju proliferacije Th17 ćelija [475-477]. Stoga je moguće da primena MDSC neposredno nakon imunizacije može da utiče na inflamatornu ulogu NK ćelija što dovodi do smanjenja simptoma bolesti u EAE kod MDSC-PGE2 tretmana. Takođe, samo tretman MDSC-PGE2 je smanjio procenat Th17 ćelija (CD4+IL-17+) u kičmenoj moždini, kao i produkciju proinflamatornih citokina IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ i IL-17 od strane splenocita u piku bolesti. Za razliku od toga, MDSC-K tretman je doveo do smanjenja produkcije samo dva proinflamatorna citokina, TNF- α i IL-17. Oba tretmana su

indukovala Treg koje su detektovane kao CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelije u slezini, dok je samo MDSC-PGE2 tretman povećao procenat Treg ćelija u ciljnom tkivu, kičmenoj moždini, kao i njihovu produkciju IL-10. Potencijalni mehanizmi koji dovode do indukcije Treg koje proizvode IL-10 i inhibicije Th17 ćelija, ali ne i IFN- γ T ćelija moguće da uključuju povećani kapacitet MDSC-PGE2 da proizvode NO. U studiji koju su sproveli Neidbala i saradnici, pokazano je da Treg, koje su indukovane *in vitro* NOC-18 molekulom koji polako oslabljuje NO u kulturi (NO-Treg), proizvode IL-10 i utiču na redukciju Th17 ćelija, ali ne i Th1 ćelije, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije [478,479]. Takođe, prethodna studija sa humanim M-MDSC koje su diferencirane u prisustvu PGE2 pokazala je da ovako dobijene ćelije posredstvom ILT3 i ILT4 imaju povećan kapacitet da indukuju Treg koje proizvode IL-10 [249]. Međutim, do sada nije dovoljno istražena uloga ILT3 i ILT4 u supresiji simptoma EAE od strane MDSC kod pacova. Stoga su neophodna dodatna istraživanja kako bi se utvrdili molekularni mehanizmi koji su uključeni u indukciju Treg od strane MDSC-PGE2 *in vivo*.

Do sada je poznato da promene u sastavu mikrobiote creva doprinose razvoju MS i da su povezane sa progresijom ove bolesti [202,353]. Osim toga, pokazano je da se encefalogene Th17 ćelije indukuju u okviru *lamina propria* u crevima pre pojave prvih simptoma EAE, što dovodi do inflamacije i oštećenja intestinalne barijere, što ukazuje na to da je imunski sistem creva ključan za razvoj EAE [480,481]. U ovoj disertaciji je pokazano da MDSC-PGE2 nakon primene kod pacova kojima je indukovana EAE, u toku prva tri dana migriraju u imunski kompartment creva kao što su Pejerove ploče i MLC, gde ostaju i nekoliko dana posle i odakle se kreću dalje ka kičmenoj moždini, gde mogu da regulišu patološke mehanizme u EAE. S obzirom da jedan od njihovih imunosupresivnih mehanizama uključuje produkciju NO, pokazano je da pri određenim uslovima NO dovodi do zaštite intestinalne barijere i da se u modelu kolitisa kod miševa MDSC koje ekspresiraju NOS2 akumuliraju u crevima, nakon čega mehanizmima zavisnim od NO dovode do supresije inflamacije u koje su uključeni T limfociti [482,483]. Moguće je da rana migracija MDSC-PGE2 koje proizvode NO u creva može da bude odgovorna za uočenu supresiju Th17 ćelija na sistemskom nivou i njihovu manju infiltraciju u CNS.

Prema nama poznatim dosadašnjim literaturnim podacima, ova doktorska disertacija je po prvi put ukazala na značaj primene *in vitro* diferenciranih MDSC u EAE u cilju sprečavanja narušavanja sastava mikrobiote creva i funkcionalnosti intestinalne barijere. Interakcije domaćina i mikrobiote su zasnovane na solubilnim metabolitima koje proizvode članovi mikrobiote, kao što su SCFA, derivati triptofana, modifikovane žučne kiseline i poliamini, koji ostvaruju različite efekte na fiziološki status i imunski sistem domaćina [484]. Rezultati ove teze su pokazali da je EAE povezan sa smanjenjem zastupljenosti različitih bakterija koje potencijalno proizvode SCFA, kao što su bakterije iz porodice *Prevotellaceae* (*Prevotella_1*, *Prevotella_9* i *Prevotellaceae* UCG-001), rodova *Odoribacter*, *Butyricoccus* i *Ruminococcaceae* UCG-008, kao i *Muribaculaceae* koje su povezane sa produkcijom propionske kiseline, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima [485]. Smanjenje relativne zastupljenosti rodova *Odoribacter*, *Butyricoccus*, *Prevotella* i porodice *Veillonellaceae* u ovoj disertaciji je u skladu sa prethodno pokazanim promenama kod pacijenata sa težom kliničkom slikom MS [202,353,485]. Dodatno, pored smanjenja zastupljenosti bakterija koje ostvaruju povoljne efekte na domaćina, indukcija EAE je povezana sa povećanom zastupljenošću roda *Romboutsia*, porodica *Peptostreptococcaceae* i *Peptococcaceae* koji su prethodno povezane sa MS i EAE [486,487].

Rezultati disertacije su pokazali da u piku bolesti dolazi do promena u velikom broju bakterijskih taksona u crevima i kod životinja koje su primile tretman MDSC-K. Kada su upoređene relativne zastupljenosti taksona u piku bolesti i pre indukcije EAE, uočeno je da dolazi do redukcije potencijalno štetnih bakterija kod životinja u piku bolesti, kao što su rod *Desulfovibrio* čiji predstavnici redukuju sulfate i produkuju vodonik-sulfid u crevima, što je u literaturi povezano sa indukcijom ulceroznog kolitisa [488]. Takođe, proinflamatorne bakterije iz rodova *Eisenbergiella* i *Tyzzerella* koji pripadaju porodici *Lachnospiraceae* [489,490] su imale nižu zastupljenost u piku bolesti kod životinja koje su primile MDSC-K tretman. U piku bolesti u grupi životinja koje su tretirane MDSC-K uočeno je i smanjenje relativne zastupljenosti roda *Anaerotruncus*, koji je u pozitivnoj korelaciji sa produkcijom IL-17 u modelu infekcije [297], porodice *Deferribacteriaceae* i *Staphylococcaceae* koje su u literaturi povezane sa inflamatornim bolestima [491,492]. Pored smanjenja, uočeno je i povećanje zastupljenosti bakterija sa povoljnim efektom na domaćina u piku bolesti kod životinja koje su dobile MDSC-K tretman, pre svega *Ruminococcaceae* UCG-010, za koje je ranije pokazano da produkuju SCFA [493]. Rodovi *Allobaculum* i *Helicobacter* su se u okviru LEfSe analize izdvojili kao specifični biomarkeri MDSC-K grupe u piku bolesti. Rod *Allobaculum* je poznat po sposobnosti da razlaže mucin, a njegova zastupljenost negativno koreliše sa medijatorima inflamacije kod miševa [494], dok je za rod *Helicobacter* pokazano da omogućava zaštitu od demijelinizacije prouzrokovane inflamatornim stanjima u CNS [495]. Sa druge strane, neke bakterije sa prethodno opisanim anti-inflamatornim svojstvima, kao što su *Lactobacillus reuteri* [496], *Lactobacillus johnsonii* i rod *Anaerovibrio* su imale smanjenu zastupljenost u ovoj grupi [497]. Za *Anaerovibrio lipolytica* je pokazano da je kod preživara povezana sa produkcijom imunoregulatornih metabolita, kao što su sirćetna i propionska kiselina, ali i sa zastupljenošću poliamina, putrescina, kadaverina i tiramina [498,499]. Porodica *Clostridiaceae_1* čiji predstavnici su uključeni u metabolizam žučnih kiselina [500] smanjena je u piku bolesti u ovoj grupi. Kada se sve navedeno uzme u obzir, moguće da je uzrok manje efikasnosti MDSC-K tretmana upravo poremećen sastav mikrobiote creva.

U odnosu na kontrolnu EAE grupu i grupu životinja koje su primile tretman MDSC-K, kod MDSC-PGE2 grupe u piku bolesti zapažaju se neznatne promene u sastavu mikrobiote. Pokazano je da su rodovi *Enterococcus* i *Bacteroides* koji su prethodno povezani sa nastankom kolitisa [501] manje zastupljeni u piku bolesti u odnosu na trenutak pre indukcije bolesti u ovoj grupi životinja. Pokazano je i da su povećane relativne zastupljenosti bakterija koje ostvaruju povoljne efekte na domaćina, kao što su *Eubacterium coprostanoligenes* group čiji predstavnici metabolišu holesterol do koprostanola, čime se reguliše nivo holesterola u fecesu i serumu kod ljudi koji imaju ove bakterije u crevima [502], kao i *Ruminococcaceae* UCG-014 i *Ruminococcus* 2 koji produkuju SCFA čime održavaju intestinalnu barijeru [503]. Ovi rezultati su u skladu sa statistički značajnim povećanjem ekspresije proteina međucelijskih veza enterocita kao i aktivnošću enzima alkalne fosfataze u fecesu kod životinja koje su primile MDSC-PGE2 tretman, što sve ukazuje da ove ćelije zaista doprinose očuvanju epitelne barijere. LEfSe analiza je pokazala da *Lactobacillus reuteri* i *Ruminococcus* 1 mogu biti biomarkeri MDSC-PGE2 grupe u piku bolesti. Nekoliko studija je pokazalo da *Lactobacillus reuteri*, komensalna vrsta iz razdela Firmicutes ima ulogu u supresiji produkcije proinflamatornih citokina od strane epitelnih ćelija i monocita čime smanjuje inflamaciju u crevima u različitim životinjskim modelima inflamatornih bolesti [504–506]. Sveukupno, rezultati pokazuju da primena MDSC-PGE2 dovodi do održavanja diverziteta mikrobiote creva i potencijalno pomera ravnotežu u sastavu mikrobiote ka većoj zastupljenosti članova sa imunoregulatornim svojstvima.

Među članovima mikrobiote pokazano je da SFB obuhvataju različite grupe komensalnih bakterija, imaju ulogu u diferenciranju Th17 ćelija i produkciji IL-17 u crevima, ali povećana učestalost ovih bakterija je povezana sa razvojem EAE [507] na šta su ukazali i rezultati ove disertacije. Pokazano je i da tretman imunizovanih životinja sa oba tipa MDSC, MDSC-K i MDSC-PGE2, dovodi do smanjenja nivoa SFB u fecesu u piku bolesti kada se upoređi sa EAE kontrolnom grupom. Smanjenje zastupljenosti predstavnika SFB u fecesu takođe može da bude još jedan od mehanizama koji dovodi do smanjenja simptoma EAE nakon primene MDSC.

Kako je diferencijalna analiza zastupljenosti taksona ukazala da bakterije koje proizvode različite imunomodulatorne metabolite mogu imati važnu ulogu u razvoju EAE ili u terapijskom efektu MDSC, urađena je predikciona analiza metaboličkih puteva. Ova analiza je pokazala da se izdvajaju biomarkeri u sve tri grupe u piku bolesti, pa se tako put uključen u sintezu metabolita koji predstavlja prekursor metionina - S-adenozil-L-metionina (SAM) u ciklusu I, izdvaja kao dobar biomarker EAE kontrolne grupe u piku bolesti, dok je put biosinteze L-metionina biomarker MDSC-K grupe. Potencijalno povećanje zastupljenosti metaboličkih puteva koji učestvuju u sintezi SAM primećeno je kod životinja u kontrolnoj EAE i MDSC-K grupi. Dobijeni rezultat je u skladu sa istraživanjem Roy i saradnika iz 2020. godine u kojem je pokazano da je spoljašnja stimulacija SAM i L-metioninom neophodna za diferencijaciju Th ćelija u Th1 i Th17 ćelije koje su uključene u progresiju EAE. Ista studija je pokazala da izbacivanje hrane sa metioninom iz ishrane ograničava patološke aktivnosti Th1 i Th17 ćelija i smanjuje neuroinflamaciju kod miševa sa EAE [508]. S druge strane, putevi koji su uključeni u Krebsov ciklus (engl. *Tricarboxylic Acid Cycle*, TCA) i glioksilatni ciklus, uključeni u produkciju sukcinata, kod MDSC-K grupe i putevi koji su uključeni u sintezu sirćetne i mlečne kiseline (put III glikolize i put II fermentacije piruvata do sirćetne i mlečne kiseline) u MDSC-PGE2 grupi izdvajaju se kao bakterijski metabolički biomarkeri [509]. Sirćetna, propionska i buterna kiselina su dominantne SCFA koje nastaju fermentacijom biljnih vlakana od strane bakterija u debelom crevu. One utiču na homeostazu u crevima stimulacijom produkcije TGF- β od strane epitelnih ćelija, epigenetičkim modifikacijama FoxP3 lokusa kod Treg, stimulacijom produkcije IL-10 i retinoične kiseline kod DC i makrofaga čime se održava imunološka tolerancija [510]. Putevi u kojima kao produkti nastaju poliamini, spermidin i putrescin, kao što su superput II sinteze poliamina (POLYAMINSYN3-PWY) i put I sinteze poliamina (POLYAMINSYN-PWY) primetno su zastupljeniji kod MDSC-K, odnosno MDSC-PGE2 grupe životinja. Za ova dva poliamina postoje literaturni podaci koji ukazuju da spermidin ostvaruje imunoregulatorni efekat u tretmanu EAE i da nakon primene spermidina u modelu EAE kod miševa, dolazi do inhibiranja funkcije makrofaga i smanjenja progresije bolesti [511], dok putrescin nastaje u lumenu creva i predstavlja važan faktor održavanja homeostaze u crevima tako što omogućava kolonocitima energiju neophodnu za proliferaciju [330]. Takođe je pokazano da poliamini mogu da regulišu ekspresiju TLR2, s obzirom da inhibicija enzima ornitindekarboksilaze koji katalizuje reakciju sinteze putrescina od prekursorske aminokiseline ornitina, dovodi do smanjenja TLR2 na nivou iRNK i proteina, što predstavlja još jedan od mehanizama održavanja intestinalne barijere [512]. Ovi podaci su u skladu sa dobijenim rezultatima disertacije, koji pokazuju da tretmani MDSC-K i MDSC-PGE2 povećavaju ekspresiju kludina i okcludina u crevima, čime potencijalno štite intestinalnu barijeru od sistemske inflamacije u EAE i MS.

Rezultati HPLC analize su potvrdili rezultate dobijene predikcionom analizom metaboličke aktivnosti mikrobiote. MDSC-PGE2 tretman je stimulisao produkciju propionske kiseline, buterne kiseline i putrescina, što ide u prilog očuvanoj intestinalnoj barijeri kod ovog tretmana i predstavlja jedan od potencijalnih mehanizama očuvanja integriteta epitela. Svakako su neophodna dodatna istraživanja kako bi se opisali detaljni mehanizmi kojima različiti metaboliti utiču na funkcionalni status intestinalne barijere i imunskog sistema u crevima, na periferiji i u CNS-u prilikom primene terapija zasnovanih na MDSC. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povećanje bakterijskih metaboličkih puteva sa anti-inflamatornim efektom uključenim u sintezu SCFA i poliamina kod MDSC-PGE2 grupe u piku bolesti doprinosi efikasnosti ovog tretmana kod EAE.

S obzirom da rezultati disertacije ukazuju da nakon primene u modelu EAE kod DA pacova MDSC prvo migriraju u creva i da su u fecesu pacova koji su tretirani sa oba tipa MDSC povećane zastupljenosti bakterijskih puteva koji dovode do sinteze poliamina, detaljnije je ispitana interakcija epitelnih ćelija creva, poliamina i MDSC *in vitro*, pri čemu su kao model sistem korišćene humane Caco-2 ćelije i MDSC diferencirane iz monocita zdravih donora [249]. Rezultati su pokazali da Caco-2 ćelije smanjuju diferencijaciju monocita u MDSC. Međutim, MDSC koje se diferenciraju u prisustvu Caco-2 ćelija koje su tretirane poliaminima ili bez ovih metabolita, imaju veći imunosupresivni kapacitet u odnosu na samostalno diferencirane MDSC. Postoje podaci koji ukazuju da se poliamini uglavnom transportuju kroz epitelnu barijeru koju uspostavljaju diferencirane Caco-2 ćelije paracelularno, dok manje količine akumuliraju Caco-2 ćelije [513]. Takođe, pokazano je i da diferencirane Caco-2 ćelije eksprimiraju receptore koji usvajaju poliamine sa većim afinitetom, ali manjom aktivnošću nego nediferencirane ćelije [514]. Kako poliamini pomažu mijeloidnim ćelijama tumorskog tkiva da prežive kisele uslove mikrookruženja tumora time što normalizuju unutarćelijski pH i pojačavaju njihovu imunosupresivnu aktivnost, moguće je da u modelu koji je korišćen u ovoj disertaciji spermidin i putrescin prolaze transepitelno do monocita koji se diferenciraju u MDSC i utiču na pojačavanje njihovog supresivnog potencijala [515]. Ovu hipotezu je neophodno dodatno ispitati.

Suplementacija pacijenata koji boluju od MS bakterijskim metabolitima, kao što su SCFA i poliamini ili korekcije u ishrani u smeru hrane bogate biljnim vlaknima mogu dovesti do poboljšanja efikasnosti MDSC terapije. Iako su neki od puteva potencijalno zastupljeniji u MDSC-K tretmanu, ipak potencijalna zastupljenost puta sinteze štetnog metionina u MDSC-K grupi kao i u kontrolnoj EAE, može biti uzrok izostanka efekata ovog tretmana.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- **Kapacitet humanih monocita periferne krvi za *in vitro* diferencijaciju u imunogene DC povezan je sa svojstvima mikrobiote creva**

1. Između zdravih donora postoji varijabilnost u fenotipu i funkciji *in vitro* diferenciranih imDC koja je verovatno poreklom od razlika u nivou prethodne *in vivo* stimulacije monocita kod pojedinačnih zdravih donora;
2. Viši nivo ekspresije proinflamatornih molekula - TNF- α , IL-6, IL-8, kao i imunoregulatornog molekula ILT3, na imDC povezan je sa slabijim potencijalom ovih ćelija za sazrevanje u imunogene mDC u odgovoru na LPS/IFN- γ stimulaciju;
3. Visoka ekspresija CD1a na imDC i visok odnos između produkcije IL-12p70 i IL-10 predstavljaju dobre prediktivne markere imunogenosti mDC, koje bi trebalo uzeti u razmatranje prilikom dizajniranja DC vakcina;
4. DC poreklom od monocita zdravih donora sa nižim diverzitetom mikrobiote u crevima imaju veći imunogeni potencijal, što se ogleda u visokoj ekspresiji CD1a koji je povezan sa proinflamatornim potencijalom mDC;
5. Rodovi *Bifidobacterium* i *Collinsella* su karakteristični za donore čiji se monociti diferenciraju u DC većeg imunogenog potencijala poželjnog za antitumorsku terapiju, dok zastupljenost roda *Butyricimonas* i vrste *Alistipes finegoldi* negativno koreliše sa imunogenim potencijalom DC;
6. Monociti donora sa nižim nivoom buterne kiseline, metabolita mikrobiote creva, diferenciraju se u mDC sa smanjenim imunogenim kapacitetom.

- **Supresivni kapacitet i imunoterapijski potencijal MDSC dobijenih *in vitro* su povezani sa mikrobiotom creva**

1. Diferencijacijom prekursora kostne srži u prisustvu GM-CSF, FLT3 i IL-6 bez (MDSC-K) ili sa dodatkom PGE2 (MDSC-PGE2), dobijaju se ćelije fenotipa karakterističnog za MDSC pacova i kapacitetom da inhibiraju proliferaciju ConA-aktiviranih splenocita, pri čemu MDSC-PGE2 odlikuje značajno veća ekspresija COX-2 i iNOS;
2. Primena MDSC-PGE2 značajno smanjuje simptome bolesti, odlaže početak i skraćuje trajanje bolesti u modelu EAE kod DA pacova;
3. MDSC-K i MDSC-PGE2 utiču na smanjenje broja NK ćelija koje proizvode IFN- γ u kičmenoj moždini i slezini, dok samo MDSC-PGE2 smanjuju procenat Th17 ćelija u kičmenoj moždini, kao i produkciju proinflamatornih citokina IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ i IL-17 od strane splenocita izolovanih iz životinja u piku bolesti;
4. MDSC-K i MDSC-PGE2 indukuju Treg sa CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ fenotipom u slezini, dok samo MDSC-PGE2 povećavaju procenat Treg koje proizvode IL-10 u kičmenoj moždini;

5. MDSC-PGE2 nakon primene u modelu EAE kod DA pacova u toku prva tri dana migriraju u imunske kompartmane creva kao što su Pejerove ploče i MLC, dok sedmog dana migriraju u kičmenu moždinu gde mogu da regulišu patološke mehanizme bolesti;
6. MDSC-PGE2 tretman DA pacova nakon indukcije bolesti održava integritet barijere creva, diverzitet mikrobiote creva i potencijalno pomera ravnotežu u sastavu mikrobiote ka većoj zastupljenosti članova sa imunoregulatornim svojstvima kao što je *Lactobacillus reuteri*, i većoj produkciji SCFA (propionske i buterne kiseline) i poliamina (putrescina) u fecesu;
7. Kada se humani monociti diferenciraju u MDSC u *in vitro* modelu intestinalne barijere, dodatak spermidina i putrescina stimuliše njihov imunosupresivni kapacitet.

7. LITERATURA

- [1] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Fourth. United States: Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, [2014]; 2014.
- [2] Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001;97:3333–41. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.11.3333>.
- [3] Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev* 2010;238:37–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x>.
- [4] Boehm T, Hess I, Swann JB. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol* 2012;33:315–21. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.005>.
- [5] Ohl L, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin Immunol* 2003;15:249–55. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.08.003>.
- [6] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Jr CAJ, Travers P, et al. Immunobiology. 5th ed. Garland Science; 2001.
- [7] Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018;14:49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.
- [8] Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;1:5. <https://doi.org/10.1186/rr25>.
- [9] Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1–13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>.
- [10] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- [11] Muñoz-Wolf N, Lavelle EC. Innate Immune Receptors. In: Di Virgilio, F., Pelegrín, P. (eds) NLR Proteins. *Methods in Molecular Biology*. vol. 1417. Humana Press, New York, NY; 2016.
- [12] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol* 2018;37:20–36. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>.
- [13] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135–45. <https://doi.org/10.1038/35100529>.
- [14] El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019;43:187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
- [15] Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol CB* 2011;21:R488–493. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>.
- [16] Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005;26:509–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.08.006>.
- [17] Asea A. Heat Shock Proteins and Toll-Like Receptors. In: Bauer S, Hartmann G, editors. *Toll- Recept. TLRs Innate Immun.*, Berlin, Heidelberg: Springer; 2008, p. 111–27. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_6.
- [18] Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008;8:279–89. <https://doi.org/10.1038/nri2215>.

- [19] Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2020;20:375–88. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>.
- [20] Katzmarski N, Domínguez-Andrés J, Cirovic B, Renieris G, Ciarlo E, Le Roy D, et al. Transmission of trained immunity and heterologous resistance to infections across generations. *Nat Immunol* 2021;22:1382–90. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01052-7>.
- [21] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- [22] Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 2007;26:726–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.004>.
- [23] Palucka K, Banchereau J. Dendritic Cells: A Link Between Innate and Adaptive Immunity. *J Clin Immunol* 1999;19:12–25. <https://doi.org/10.1023/A:1020558317162>.
- [24] Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998;188:2163–73. <https://doi.org/10.1084/jem.188.11.2163>.
- [25] Trombetta ES, Mellman I. Cell Biology of Antigen Processing *in Vitro* and *in Vivo*. *Annu Rev Immunol* 2005;23:975–1028. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538>.
- [26] Klein E, Koch S, Borm B, Neumann J, Herzog V, Koch N, et al. CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 2005;17:477–87. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh228>.
- [27] Strioga M, Schijns V, Powell DJ, Pasukoniene V, Dobrovolskiene N, Michalek J. Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immun* 2013;19:98–111. <https://doi.org/10.1177/1753425912449549>.
- [28] Veglia F, Gabrilovich DI. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol* 2017;45:43–51. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.01.002>.
- [29] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180:1263–72. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1263>.
- [30] Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbí AL, et al. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;174:4070–80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4070>.
- [31] McKenna K, Beignon A-S, Bhardwaj N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Virol* 2005;79:17–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.17-27.2005>.
- [32] Lombardi VC, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. *Eur J Clin Invest* 2015;45 Suppl 1:1–8. <https://doi.org/10.1111/eci.12363>.
- [33] Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471–85. <https://doi.org/10.1038/nri3865>.
- [34] Barrat FJ, Su L. A pathogenic role of plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity and chronic viral infection. *J Exp Med* 2019;216:1974–85. <https://doi.org/10.1084/jem.20181359>.
- [35] Papaioannou NE, Salei N, Rambichler S, Ravi K, Popovic J, Küntzel V, et al. Environmental signals rather than layered ontogeny imprint the function of type 2 conventional dendritic cells in young and adult mice. *Nat Commun* 2021;12:464. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20659-2>.
- [36] Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 2013;34:440–5. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>.
- [37] Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev* 2010;234:120–41. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x>.

- [38] Agrawal A. Dendritic Cell-Airway Epithelial Cell Cross-Talk Changes with Age and Contributes to Chronic Lung Inflammatory Diseases in the Elderly. *Int J Mol Sci* 2017;18:1206. <https://doi.org/10.3390/ijms18061206>.
- [39] Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:435–46. <https://doi.org/10.1038/nri2335>.
- [40] Ermland K, Wüthrich M, Klein BS. Dynamic interplay among monocyte-derived, dermal, and resident lymph node dendritic cells during the generation of vaccine immunity to fungi. *Cell Host Microbe* 2010;7:474–87. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.010>.
- [41] Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Broxmeyer HE, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997;100:2552–61. <https://doi.org/10.1172/JCI119798>.
- [42] Marciscano AE, Anandasabapathy N. The role of dendritic cells in cancer and anti-tumor immunity. *Semin Immunol* 2021;52:101481. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101481>.
- [43] Qu C, Brinck-Jensen N-S, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2014;19:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.09.023>.
- [44] Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2020;20:7–24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>.
- [45] Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells *In Vivo*. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00350>.
- [46] Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001;22:394–400. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)01952-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)01952-4).
- [47] Saei A, Hadjati J. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161:293–303. <https://doi.org/10.1159/000350328>.
- [48] Hegde S, Leader AM, Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. *Immunity* 2021;54:875–84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.004>.
- [49] Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 2016;7:12150. <https://doi.org/10.1038/ncomms12150>.
- [50] Zhang W, Li J, Qi G, Tu G, Cheng Y, Ming X. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J Transl Med* 2018;16. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1395-9>.
- [51] Ding Z-C, Munn DH, Zhou G. Chemotherapy-induced myeloid suppressor cells and antitumor immunity: The Janus face of chemotherapy in immunomodulation. *Oncoimmunology* 2014;3:e954471. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.954471>.
- [52] Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol* 2011;11:802–7. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.01.003>.
- [53] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–74. <https://doi.org/10.1038/nri2506>.
- [54] Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 Promotes Tumor Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 2007;67:4507–13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4174>.
- [55] Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol Baltim Md 1950* 2004;172:464–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.464>.
- [56] Priceman SJ, Deng J, Jove R, Yu H. JAK/STAT Signaling in Myeloid Cells, Elsevier; 2013, p. 435–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394296-8.00026-9>.
- [57] Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer* 2019;120:16–25. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1>.

- [58] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001;2:907–16. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.
- [59] Markowitz J, Wang J, Vangundy Z, You J, Yildiz V, Yu L, et al. Nitric oxide mediated inhibition of antigen presentation from DCs to CD4+ T cells in cancer and measurement of STAT1 nitration. *Sci Rep* 2017;7:15424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14970-0>.
- [60] Feng S, Cheng X, Zhang L, Lu X, Chaudhary S, Teng R, et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activation through nitrating LCK in mouse cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115:10094–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800695115>.
- [61] Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 2011;208:1949–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20101956>.
- [62] Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02499>.
- [63] Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care* 2014;18:R163. <https://doi.org/10.1186/cc14003>.
- [64] Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Res* 2009;69:1553-1560. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1921>.
- [65] Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 2008;222:180–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x>.
- [66] Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2011;118:5498–505. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365825>.
- [67] Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009;30:377–86. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014>.
- [68] Obermajer N, Kalinski P. Key role of the positive feedback between PGE2 and COX2 in the biology of myeloid-derived suppressor cells. *OncImmunology* 2012;1:762–4. <https://doi.org/10.4161/onci.19681>.
- [69] Serafini P. Editorial: PGE2-producing MDSC: a role in tumor progression? *J Leukoc Biol* 2010;88:827–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510303>.
- [70] Nguyen NT, Nakahama T, Le DH, Van Son L, Chu HH, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. *Front Immunol* 2014;5:551. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00551>.
- [71] Savitz J. The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Mol Psychiatry* 2020;25:131–47. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0414-4>.
- [72] Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;185:3190–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>.
- [73] Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:19961–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014465107>.
- [74] Li X, Li Y, Yu Q, Qian P, Huang H, Lin Y. Metabolic reprogramming of myeloid-derived suppressor cells: An innovative approach confronting challenges. *J Leukoc Biol* 2021;110:257–70. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR0421-597RR>.
- [75] Knier B, Hiltensperger M, Sie C, Aly L, Lepennetier G, Engleitner T, et al. Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity. *Nat Immunol* 2018;19:1341–51. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0237-5>.

- [76] Köstlin N, Ostermeir A-L, Spring B, Schwarz J, Marmé A, Walter CB, et al. HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. *Eur J Immunol* 2017;47:374–84. <https://doi.org/10.1002/eji.201646564>.
- [77] Xu Z, Ho S, Chang C-C, Zhang Q-Y, Vasilescu E-R, Vlad G, et al. Molecular and Cellular Characterization of Human CD8 T Suppressor Cells. *Front Immunol* 2016;7.
- [78] de Goeje PL, Bezemer K, Heuvers ME, Dingemans A-MC, Groen HJ, Smit EF, et al. Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2015;4:e1014242. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1014242>.
- [79] Cassetta L, Baekkevold ES, Brandau S, Bujko A, Cassatella MA, Dorhoi A, et al. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother CII* 2019;68:687–97. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02302-2>.
- [80] Apodaca MC, Wright AE, Riggins AM, Harris WP, Yeung RS, Yu L, et al. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. *J Immunother Cancer* 2019;7:230. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0674-1>.
- [81] Rhodes NP, Hunt JA, Williams DF. Macrophage subpopulation differentiation by stimulation with biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997;37:481–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19971215\)37:4<481::AID-JBM6>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19971215)37:4<481::AID-JBM6>3.0.CO;2-H).
- [82] Francis WR, Ireland RE, Spear AM, Jenner D, Watts SA, Kirkman E, et al. Flow Cytometric Analysis of Hematopoietic Populations in Rat Bone Marrow. Impact of Trauma and Hemorrhagic Shock. *Cytometry A* 2019;95:1167–77. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23903>.
- [83] Beyer M, Wang H, Peters N, Doths S, Koerner-Rettberg C, Openshaw PJ, et al. The beta2 integrin CD11c distinguishes a subset of cytotoxic pulmonary T cells with potent antiviral effects *in vitro* and *in vivo*. *Respir Res* 2005;6:70. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-70>.
- [84] Hume DA, Caruso M, Keshvari S, Patkar OL, Sehgal A, Bush SJ, et al. The Mononuclear Phagocyte System of the Rat. *J Immunol Baltim Md* 1950 2021;206:2251–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100136>.
- [85] Jia W, Jackson-Cook C, Graf MR. Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma + vaccination model. *J Neuroimmunol* 2010;223:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.03.011>.
- [86] Wu X, Zhu D, Tian J, Tang X, Guo H, Ma J, et al. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Exosomal Prostaglandin E2 Ameliorates Collagen-Induced Arthritis by Enhancing IL-10+ B Cells. *Front Immunol* 2020;11.
- [87] Cambier JC. Signal transduction by T- and B-cell antigen receptors: converging structures and concepts. *Curr Opin Immunol* 1992;4:257–64. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90074-o](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90074-o).
- [88] Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>.
- [89] Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, Mackiewicz A, Schmidt M. Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci* 2020;21:9254. <https://doi.org/10.3390/ijms21239254>.
- [90] Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem* 2020;295:914–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009411>.
- [91] Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003;4:835–42. <https://doi.org/10.1038/ni969>.
- [92] James CA, Xu Y, Aguilar MS, Jing L, Layton ED, Gilleron M, et al. CD4 and CD8 co-receptors modulate functional avidity of CD1b-restricted T cells. *Nat Commun* 2022;13:78. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27764-w>.
- [93] Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 2017;8.

- [94] Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:607–18. <https://doi.org/10.1038/nri2368>.
- [95] Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* 2009;129:1628–42. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.30>.
- [96] Deseke M, Prinz I. Ligand recognition by the $\gamma\delta$ TCR and discrimination between homeostasis and stress conditions. *Cell Mol Immunol* 2020;17:914–24. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0503-y>.
- [97] Mak TW, Saunders ME, Jett BD, editors. Chapter 11 - NK, $\gamma\delta$ T and NKT Cells. *Primer Immune Response Second Ed.*, Boston: Academic Cell; 2014, p. 247–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00011-X>.
- [98] Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 2003;4:733–9. <https://doi.org/10.1038/ni957>.
- [99] Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol* 2020;17:587–99. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0465-0>.
- [100] Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, et al. Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. *Science* 2000;288:522–7. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.522>.
- [101] Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000;191:927–36. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.927>.
- [102] Petro TM, Chen SS, Panther RB. Effect of CD80 and CD86 on T cell cytokine production. *Immunol Invest* 1995;24:965–76. <https://doi.org/10.3109/08820139509060721>.
- [103] Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:749–61. <https://doi.org/10.1038/nri3307>.
- [104] Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nat Immunol* 2011;12:597–606. <https://doi.org/10.1038/ni.2059>.
- [105] Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, Hwang E-S, Jang E, Bolm AN, et al. T-bet represses TH17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol* 2011;12:96–104. <https://doi.org/10.1038/ni.1969>.
- [106] Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN- γ and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7749–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332767100>.
- [107] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, Sun B. Th1/Th2 Cell Differentiation and Molecular Signals. In: Sun B, editor. *T Help. Cell Differ. Their Funct.*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2014, p. 15–44. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_2.
- [108] Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 2012;13:722–8. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>.
- [109] Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front Immunol* 2015;6.
- [110] Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity* 1996;4:313–9. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80439-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80439-2).
- [111] Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity* 2003;18:415–28. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00057-8).
- [112] Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2018;18:121–33. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>.

- [113] Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:925135. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.
- [114] Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 2007;282:34605–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705100200>.
- [115] Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275–81. <https://doi.org/10.1038/nm1710>.
- [116] Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol* 2009;2:403–11. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.100>.
- [117] Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7. <https://doi.org/10.1038/nature07036>.
- [118] Alroqi FJ, Chatila TA. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16:27. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0606-9>.
- [119] Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci* 2019;110:2080–9. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>.
- [120] Schmidt A, Zhang X-M, Joshi RN, Iqbal S, Wahlund C, Gabrielsson S, et al. Human macrophages induce CD4⁽⁺⁾Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells via binding and re-release of TGF- β . *Immunol Cell Biol* 2016;94:747–62. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.34>.
- [121] Wang L, Simons DL, Lu X, Tu TY, Solomon S, Wang R, et al. Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nat Immunol* 2019;20:1220–30. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0429-7>.
- [122] Schmitt EG, Williams CB. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol* 2013;4:152. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00152>.
- [123] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30:626–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>.
- [124] Sun C-M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine *lamina propria* dendritic cells promote *de novo* generation of Foxp3⁺ T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775–85. <https://doi.org/10.1084/jem.20070602>.
- [125] Schmidt A, Oberle N, Krammer P. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front Immunol* 2012;3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>.
- [126] Jawed JJ, Dutta S, Majumdar S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2019;117:109098. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109098>.
- [127] Mittrücker H-W, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014;62:449–58. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>.
- [128] Reiser J, Banerjee A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8⁽⁺⁾ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J Immunol Res* 2016;2016:8941260. <https://doi.org/10.1155/2016/8941260>.
- [129] Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:24–35. <https://doi.org/10.1038/nri3567>.
- [130] Kane BA, Bryant KJ, McNeil HP, Tedla NT. Termination of immune activation: an essential component of healthy host immune responses. *J Innate Immun* 2014;6:727–38. <https://doi.org/10.1159/000363449>.
- [131] Reale M, Conti L, Velluto D. Immune and Inflammatory-Mediated Disorders: From Bench to Bedside. *J Immunol Res* 2018;2018:7197931. <https://doi.org/10.1155/2018/7197931>.
- [132] Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000;21:167–223. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(00)00007-8).

- [133] Hodgson S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9:1–4. <https://doi.org/10.1631/jzus.B073001>.
- [134] Kiwerska K, Szyfter K. DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy – a double-edged sword. *J Appl Genet* 2019;60:329–34. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00516-9>.
- [135] Patel A. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol* 2020;6:1488. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>.
- [136] Oien KA. Pathologic Evaluation of Unknown Primary Cancer. *Semin Oncol* 2009;36:8–37. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.10.009>.
- [137] Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2005;7:513–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.024>.
- [138] Sentman CL, Barber MA, Barber A, Zhang T. NK Cell Receptors as Tools in Cancer Immunotherapy. *Adv. Cancer Res.*, vol. 95, Academic Press; 2006, p. 249–92. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)95007-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)95007-6).
- [139] Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol CB* 2020;30:R921–5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>.
- [140] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- [141] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003;21:713–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942>.
- [142] Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:131–44. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>.
- [143] Alshamsan A. Induction of tolerogenic dendritic cells by IL-6-secreting CT26 colon carcinoma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34:465–9. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.625034>.
- [144] Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer* 2020;19. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01258-7>.
- [145] Dougan M, Dranoff G. The Immune Response to Tumors. *Curr Protoc Immunol* 2009;85:20.11.1–20.11.4.
- [146] Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009;27:83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132544>.
- [147] Huang L, Xu H, Peng G. TLR-mediated metabolic reprogramming in the tumor microenvironment: potential novel strategies for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2018;15:428–37. <https://doi.org/10.1038/cmi.2018.4>.
- [148] Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 2018;7. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
- [149] Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol* 2008;38:2412–8. <https://doi.org/10.1002/eji.200838318>.
- [150] Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature* 2011;475:226–30. <https://doi.org/10.1038/nature10169>.
- [151] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204:1303–10. <https://doi.org/10.1084/jem.20062129>.
- [152] Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* 2004;9 Suppl 5:10–7. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-90005-10>.
- [153] Yuan Y, Jiang Y-C, Sun C-K, Chen Q-M. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol Rep* 2016;35:2499–515. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4660>.

- [154] Arkhypov I, Lasser S, Petrova V, Weber R, Groth C, Utikal J, et al. Myeloid Cell Modulation by Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 2020;21:6319. <https://doi.org/10.3390/ijms21176319>.
- [155] Lee C-R, Lee W, Cho SK, Park S-G. Characterization of Multiple Cytokine Combinations and TGF- β on Differentiation and Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19:869. <https://doi.org/10.3390/ijms19030869>.
- [156] Wang L, Lan J, Tang J, Luo N. MCP-1 targeting: Shutting off an engine for tumor development. *Oncol Lett* 2022;23. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13144>.
- [157] Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, Zhang X, Choi O, Tolentino LL, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114:1988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610630114>.
- [158] Björck P, Leong HX, Engleman EG. Plasmacytoid dendritic cell dichotomy: identification of IFN- α producing cells as a phenotypically and functionally distinct subset. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;186:1477–85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000454>.
- [159] Fu C, Peng P, Loschko J, Feng L, Pham P, Cui W, et al. Plasmacytoid dendritic cells cross-prime naive CD8 T cells by transferring antigen to conventional dendritic cells through exosomes. *Proc Natl Acad Sci* 2020;117:23730–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002345117>.
- [160] Qian B, Li J, Zhang H, Kitamura T, J J, Campion L, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475. <https://doi.org/10.1038/nature10138>.
- [161] Kang S, Xie J, Ma S, Liao W, Zhang J, Luo R. Targeted knock down of CCL22 and CCL17 by siRNA during DC differentiation and maturation affects the recruitment of T subsets. *Immunobiology* 2010;215:153–62. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.03.001>.
- [162] Liu Y, Zheng C, Huang Y, He M, Xu W, Li B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm* 2021;2. <https://doi.org/10.1002/mco2.55>.
- [163] Alatrash G, Jakher H, Stafford PD, Mittendorf EA. Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12:631–45. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.795944>.
- [164] Das S, Johnson DB. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* 2019;7:306. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0805-8>.
- [165] Hayes C. Cellular immunotherapies for cancer. *Ir J Med Sci* 1971 - 2021;190:41–57. <https://doi.org/10.1007/s11845-020-02264-w>.
- [166] Tvedt THA, Vo AK, Bruserud Ø, Reikvam H. Cytokine Release Syndrome in the Immunotherapy of Hematological Malignancies: The Biology behind and Possible Clinical Consequences. *J Clin Med* 2021;10:5190. <https://doi.org/10.3390/jcm10215190>.
- [167] Radford K, Shortman K, O’Keeffe M. Chapter 12 - Dendritic Cells in Autoimmune Disease. In: Rose NR, Mackay IR, editors. *Autoimmune Dis. Fifth Ed.*, Boston: Academic Press; 2014, p. 175–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00012-5>.
- [168] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109–18. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>.
- [169] Domínguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 2010;234:90–104. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x>.
- [170] Tang-Huau T-L, Segura E. Human *in vivo*-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol* 2019;86:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.018>.
- [171] Kuhn S, Yang J, Ronchese F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8+ T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. *Front Immunol* 2015;6:584. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00584>.

- [172] Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;507–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.507>.
- [173] Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, et al. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF- α converting enzyme (TACE). *Blood* 2009;114:4517–26. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215020>.
- [174] Han TH, Jin P, Ren J, Slezak S, Marincola FM, Stroncek DF. Evaluation of 3 clinical dendritic cell maturation protocols containing lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 2009;32:399–407. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31819e1773>.
- [175] Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaft LE. Personalized Dendritic Cell Vaccines – Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00766>.
- [176] Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun* 2019;10:5408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13368-y>.
- [177] Kwak T, Wang F, Deng H, Condamine T, Kumar V, Perego M, et al. Distinct Populations of Immune-Suppressive Macrophages Differentiate from Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cell Rep* 2020;33:108571. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108571>.
- [178] Liu G, Bi Y, Shen B, Yang H, Zhang Y, Wang X, et al. SIRT1 limits the function and fate of myeloid-derived suppressor cells in tumors by orchestrating HIF-1 α -dependent glycolysis. *Cancer Res* 2014;74:727–37. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2584>.
- [179] Liu Y, Cao X. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell Mol Immunol* 2015;12:1–4. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.83>.
- [180] Hao Z, Li R, Wang Y, Li S, Hong Z, Han Z. Landscape of Myeloid-derived Suppressor Cell in Tumor Immunotherapy. *Biomark Res* 2021;9:77. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00333-5>.
- [181] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol Baltim Md* 1950 2009;182:4499–506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>.
- [182] Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 2003;24:301–5. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00132-7).
- [183] Invernizzi P, Pasini S, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;33:12–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.03.005>.
- [184] Lasrado N, Jia T, Massilamany C, Franco R, Illes Z, Reddy J. Mechanisms of sex hormones in autoimmunity: focus on EAE. *Biol Sex Differ* 2020;11:50. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00325-4>.
- [185] Smilek DE, Ehlers MR, Nepom GT. Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. *Dis Model Mech* 2014;7:503–13. <https://doi.org/10.1242/dmm.015099>.
- [186] Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol* 2017;8.
- [187] Ellis JA, Kemp AS, Ponsonby A-L. Gene–environment interaction in autoimmune disease. *Expert Rev Mol Med* 2014;16:e4. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.5>.
- [188] Makin S. Cracking the genetic code of autoimmune disease. *Nature* 2021;595:S57–9. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01839-6>.
- [189] Fridkis-Hareli M. Immunogenetic mechanisms for the coexistence of organ-specific and systemic autoimmune diseases. *J Autoimmune Dis* 2008;5:1. <https://doi.org/10.1186/1740-2557-5-1>.
- [190] Chervonsky AV. Microbiota and Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a007294. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007294>.

- [191] Wang L, Wang F-S, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 2015;278:369–95. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>.
- [192] Burbelo PD, Iadarola MJ, Alevizos I, Sapio MR. Transcriptomic Segregation of Human Autoantigens Useful for the Diagnosis of Autoimmune Diseases. *Mol Diagn Ther* 2016;20:415–27. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0211-6>.
- [193] Riedhammer C, Weissert R. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2015;6.
- [194] Burkhardt H, Kalden JR. Animal models of autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 1997;17:91–9. <https://doi.org/10.1007/s002960050015>.
- [195] Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol (Berl)* 2017;133:223–44. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1631-4>.
- [196] Hunzelmann N, Moinzadeh P, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, et al. High frequency of corticosteroid and immunosuppressive therapy in patients with systemic sclerosis despite limited evidence for efficacy. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R30. <https://doi.org/10.1186/ar2634>.
- [197] Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler J* 2020;26:1816–21. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>.
- [198] Drulović i saradnici. Vodič kroz multiplu sklerozu. Društvo Multiple skleroze Srbije; 2020.
- [199] Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017;13:25–36. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>.
- [200] Zhang Q, Lin C-Y, Dong Q, Wang J, Wang W. Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: A meta-analysis of non-family-based studies. *Autoimmun Rev* 2011;10:474–81. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.03.003>.
- [201] King IL, Dickendesher TL, Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 2009;14:3190–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-168575>.
- [202] Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. The Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: An Overview of Clinical Trials. *Cell Transplant* 2019;28:1507–27. <https://doi.org/10.1177/0963689719873890>.
- [203] Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. *Clin Med Lond Engl* 2020;20:380–3. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2020-0292>.
- [204] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet Lond Engl* 2008;372:1502–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7).
- [205] Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010;162:1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>.
- [206] Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain J Neurol* 2006;129:606–16. <https://doi.org/10.1093/brain/awl007>.
- [207] Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 2007;131:1164–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>.
- [208] Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707–17. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q).
- [209] Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci* 2011;33:199–209. <https://doi.org/10.1159/000328989>.
- [210] Strachan-Whaley M, Rivest S, Yong VW. Interactions Between Microglia and T Cells in Multiple Sclerosis Pathobiology. *J Interferon Cytokine Res* 2014;34:615–22. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0019>.

- [211] Mapunda JA, Tibar H, Rezagui W, Engelhardt B. How Does the Immune System Enter the Brain? *Front Immunol* 2022;13.
- [212] Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2013;333:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.05.010>.
- [213] Ten Brinke A, Hilkens CMU, Cools N, Geissler EK, Hutchinson JA, Lombardi G, et al. Clinical Use of Tolerogenic Dendritic Cells-Harmonization Approach in European Collaborative Effort. *Mediators Inflamm* 2015;2015:471719. <https://doi.org/10.1155/2015/471719>.
- [214] Calahorra L, Camacho-Toledano C, Serrano-Regal MP, Ortega MC, Clemente D. Regulatory Cells in Multiple Sclerosis: From Blood to Brain. *Biomedicines* 2022;10:335. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020335>.
- [215] Camacho-Toledano C, Machín-Díaz I, Calahorra L, Cabañas-Cotillas M, Otaegui D, Castillo-Triviño T, et al. Peripheral myeloid-derived suppressor cells are good biomarkers of the efficacy of fingolimod in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2022;19:277. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02635-3>.
- [216] Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Hartung H-P, Zettl UK. Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2016;12:217–33. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.21>.
- [217] Hart BA 't, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2011;17:119–25. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.006>.
- [218] Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 2014;122:173–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X>.
- [219] Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006;1:1810–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285>.
- [220] Rao P, Segal BM. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: Perl A, editor. *Autoimmun. Methods Protoc.*, Totowa, NJ: Humana Press; 2012, p. 363–80. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-720-4_18.
- [221] Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis* 2008;67 Suppl 3:iii56–60. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.098020>.
- [222] Loos J, Schmaul S, Noll TM, Paterka M, Schillner M, Löffel JT, et al. Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy. *J Neuroinflammation* 2020;17:357. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02021-x>.
- [223] Gran B, Zhang G-X, Yu S, Li J, Chen X-H, Ventura ES, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;169:7104–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.7104>.
- [224] Xie C, Ciric B, Yu S, Zhang G-X, Rostami A. IL-12Rβ2 has a protective role in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2016;291:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.12.009>.
- [225] Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950* 1996;157:3223–7.
- [226] Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLOS ONE* 2010;5:e15531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015531>.
- [227] Sonar SA, Shaikh S, Joshi N, Atre AN, Lal G. IFN-γ promotes transendothelial migration of CD4+ T cells across the blood-brain barrier. *Immunol Cell Biol* 2017;95:843–53. <https://doi.org/10.1038/icb.2017.56>.

- [228] Ding X, Yan Y, Li X, Li K, Ciric B, Yang J, et al. Silencing IFN- γ binding/signaling in astrocytes versus microglia leads to opposite effects on central nervous system autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950* 2015;194:4251–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303321>.
- [229] Miller N, Wang J, Tan Y, Dittel B. Anti-inflammatory mechanisms of IFN- γ studied in experimental autoimmune encephalomyelitis reveal neutrophils as a potential target in multiple sclerosis. *Front Neurosci* 2015;9.
- [230] Simmons SB, Liggitt D, Goverman JM. Cytokine-regulated neutrophil recruitment is required for brain but not spinal cord inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014;193:555–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400807>.
- [231] Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 2010;24:1023–34. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141978>.
- [232] McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390–7. <https://doi.org/10.1038/ni1539>.
- [233] Duncker PC, Stoolman JS, Huber AK, Segal BM. GM-CSF Promotes Chronic Disability in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Altering the Composition of Central Nervous System-Infiltrating Cells, but Is Dispensable for Disease Induction. *J Immunol Baltim Md 1950* 2018;200:966–73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701484>.
- [234] Dal Canto RA, Shaw MK, Nolan GP, Steinman L, Fathman CG. Local delivery of TNF by retrovirus-transduced T lymphocytes exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol Orlando Fla* 1999;90:10–4. <https://doi.org/10.1006/clim.1998.4653>.
- [235] Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Killer (NK) Cells. *J Exp Med* 1997;186:1677–87. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1677>.
- [236] Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005;163:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.02.011>.
- [237] Stinissen P, Zhang J, Vandevyver C, Hermans G, Raus J. $\gamma\delta$ T cell responses to activated T cells in multiple sclerosis patients induced by T cell vaccination. *J Neuroimmunol* 1998;87:94–104. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00060-5).
- [238] Ponomarev ED, Dittel BN. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2005;174:4678–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4678>.
- [239] Giles DA, Washnock-Schmid JM, Duncker PC, Dahlawi S, Ponath G, Pitt D, et al. Myeloid cell plasticity in the evolution of central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 2018;83:131–41. <https://doi.org/10.1002/ana.25128>.
- [240] Chu F, Shi M, Lang Y, Chao Z, Jin T, Cui L, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice via blocking NF- κ B pathway. *Clin Exp Immunol* 2021;204:199–211. <https://doi.org/10.1111/cei.13572>.
- [241] Mastorodemos V, Ioannou M, Verginis P. Cell-based modulation of autoimmune responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications. *Neuroimmunomodulation* 2015;22:181–95. <https://doi.org/10.1159/000362370>.
- [242] Melero-Jerez C, Fernández-Gómez B, Lebrón-Galán R, Ortega MC, Sánchez-de Lara I, Ojalvo AC, et al. Myeloid-derived suppressor cells support remyelination in a murine model of multiple sclerosis by promoting oligodendrocyte precursor cell survival, proliferation, and differentiation. *Glia* 2021;69:905–24. <https://doi.org/10.1002/glia.23936>.
- [243] Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, et al. Crucial Role of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Regulation of Central Nervous System

- Autoimmune Disease. *J Immunol* 2012;188:1136–46.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101816>.
- [244] Moliné-Velázquez V, Cuervo H, Vila-del Sol V, Ortega MC, Clemente D, de Castro F. Myeloid-Derived Suppressor Cells Limit the Inflammation by Promoting T Lymphocyte Apoptosis in the Spinal Cord of a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 2011;21:678–91. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00495.x>.
- [245] Cantoni C, Cignarella F, Ghezzi L, Mikesell B, Bollman B, Berrien-Elliott MM, et al. Mir-223 regulates the number and function of myeloid-derived suppressor cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)* 2017;133:61–77. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1621-6>.
- [246] Iacobaeus E, Douagi I, Jitschin R, Marcusson-Ståhl M, Andrén AT, Gavin C, et al. Phenotypic and functional alterations of myeloid-derived suppressor cells during the disease course of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 2018;96:820–30. <https://doi.org/10.1111/imcb.12042>.
- [247] Zhang J, Hodges A, Chen S-H, Pan P-Y. Myeloid-derived suppressor cells as cellular immunotherapy in transplantation and autoimmune diseases. *Cell Immunol* 2021;362:104300. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104300>.
- [248] Drujont L, Carretero-Iglesia L, Bouchet-Delbos L, Beriou G, Merieau E, Hill M, et al. Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection. *PloS One* 2014;9:e100013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100013>.
- [249] Tomić S, Joksimović B, Bekić M, Vasiljević M, Milanović M, Čolić M, et al. Prostaglandin-E2 Potentiates the Suppressive Functions of Human Mononuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells and Increases Their Capacity to Expand IL-10-Producing Regulatory T Cell Subsets. *Front Immunol* 2019;10:475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00475>.
- [250] Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest* 2022;132. <https://doi.org/10.1172/JCI154944>.
- [251] Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, et al. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* 2015;348:1261359. <https://doi.org/10.1126/science.1261359>.
- [252] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007;449:804–10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>.
- [253] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès M-CC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020;8:103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
- [254] Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48:155–71.
- [255] Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005;122:107–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>.
- [256] Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. *New Microbiol* 2016;39:1–12.
- [257] Martinez JE, Kahana DD, Ghuman S, Wilson HP, Wilson J, Kim SCJ, et al. Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Front Endocrinol* 2021;12.
- [258] Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>.
- [259] Hugenholtz F, de Vos WM. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2018;75:149–60. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8>.

- [260] Yi P, Li L. The germfree murine animal: An important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Vet Microbiol* 2012;157:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.024>.
- [261] Douglas AE. Simple animal models for microbiome research. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:764–75. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0242-1>.
- [262] Li D, Gao C, Zhang F, Yang R, Lan C, Ma Y, et al. Seven facts and five initiatives for gut microbiome research. *Protein Cell* 2020;11:391–400. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00697-8>.
- [263] Cao S, Feehley TJ, Nagler CR. The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens. *FEBS Lett* n.d.;588:4258–66. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.026>.
- [264] Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci Rep* 2016;6:30594. <https://doi.org/10.1038/srep30594>.
- [265] Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489–99. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>.
- [266] Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun* 2016;7:12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>.
- [267] Peek Jr RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28–37.
- [268] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22:292–8. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>.
- [269] Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
- [270] Quigley EM. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterol Hepatol* 2013;9:560–9.
- [271] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:11971–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>.
- [272] Hoang DM, Levy EI, Vandenplas Y. The impact of Caesarean section on the infant gut microbiome. *Acta Paediatr* 2021;110:60–7. <https://doi.org/10.1111/apa.15501>.
- [273] Gordon JL, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The human gut microbiota and undernutrition. *Sci Transl Med* 2012;4:137ps12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004347>.
- [274] Kim S, Jazwinski SM. The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 2018;64:513–20. <https://doi.org/10.1159/000490615>.
- [275] Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 2017;46:562–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>.
- [276] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
- [277] Lee JY, Wasinger VC, Yau YY, Chuang E, Yajnik V, Leong RW. Molecular Pathophysiology of Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases. *Proteomes* 2018;6:17. <https://doi.org/10.3390/proteomes6020017>.
- [278] Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013;93:525–69. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>.
- [279] Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res* 2018;2018:2645465. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>.

- [280] Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:61-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>.
- [281] Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 2010;180:591-8. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0440-7>.
- [282] Lueschow SR, McElroy SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front Immunol* 2020;11.
- [283] Kucharzik T, Hudson JT, Lügering A, Abbas JA, Bettini M, Lake JG, et al. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut* 2005;54:1565-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061168>.
- [284] Bauché D, Marie JC. Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin Transl Immunol* 2017;6:e136. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.9>.
- [285] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:141-53. <https://doi.org/10.1038/nri3608>.
- [286] Nordman H, Davies JR, Lindell G, de Bolós C, Real F, Carlstedt I. Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. *Biochem J* 2002;364:191-200. <https://doi.org/10.1042/bj3640191>.
- [287] Macierzanka A, Mackie AR, Krupa L. Permeability of the small intestinal mucus for physiologically relevant studies: Impact of mucus location and *ex vivo* treatment. *Sci Rep* 2019;9:17516. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53933-5>.
- [288] Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:352-61. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>.
- [289] Wang BX, Wu CM, Ribbeck K. Home, sweet home: how mucus accommodates our microbiota. *FEBS J* 2021;288:1789-99. <https://doi.org/10.1111/febs.15504>.
- [290] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013;13:790-801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>.
- [291] Yu S, Gao N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2015;72:3343-53. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1931-1>.
- [292] Lee J, Mo J-H, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-T, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327-36. <https://doi.org/10.1038/ncb1500>.
- [293] Hyun J, Romero L, Riveron R, Flores C, Kanagavelu S, Chung KD, et al. Human intestinal epithelial cells express interleukin-10 through Toll-like receptor 4-mediated epithelial-macrophage crosstalk. *J Innate Immun* 2015;7:87-101. <https://doi.org/10.1159/000365417>.
- [294] Nicoletti C. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 2000;47:735-9. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.735>.
- [295] Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254-8. <https://doi.org/10.1126/science.1102901>.
- [296] Gross M, Salame T-M, Jung S. Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol* 2015;6.
- [297] Schirmer M, Smeekens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell* 2016;167:1125-1136.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020>.
- [298] Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol* 2018;39:264-75. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003>.

- [299] Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 2013;38:769–81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>.
- [300] Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, Salimi M, Wong SH, Brewer JM, et al. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* 2014;41:283–95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.016>.
- [301] Zeng B, Shi S, Ashworth G, Dong C, Liu J, Xing F. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis* 2019;10:315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.
- [302] Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 2014;343:1249288. <https://doi.org/10.1126/science.1249288>.
- [303] Melo-Gonzalez F, Hepworth MR. Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology* 2017;150:265–75. <https://doi.org/10.1111/imm.12697>.
- [304] Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+CD8 α + T cells. *Science* 2017;357:806–10. <https://doi.org/10.1126/science.aah5825>.
- [305] Gershon MD. The enteric nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1981;4:227–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.04.030181.001303>.
- [306] Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho H-J. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3.
- [307] Grubišić V, Gulbransen BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol* 2017;595:557–70. <https://doi.org/10.1113/JP271021>.
- [308] Heiss CN, Olofsson LE. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *J Neuroendocrinol* 2019;31:e12684. <https://doi.org/10.1111/jne.12684>.
- [309] Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman SV, Gewirtz AT, Srinivasan S. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 2012;143:1006-1016.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.034>.
- [310] Cryan JF, O’Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* 2019;99:1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.
- [311] Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 2013;18:666–73. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>.
- [312] Natividad JMM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2013;69:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>.
- [313] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science* 2006;313:1126–30. <https://doi.org/10.1126/science.1127119>.
- [314] Saha JR, Butler VP, Neu HC, Lindenbaum J. Digoxin-inactivating bacteria: identification in human gut flora. *Science* 1983;220:325–7. <https://doi.org/10.1126/science.6836275>.
- [315] Holmes E, Li JV, Athanasiou T, Ashrafian H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol* 2011;19:349–59. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.006>.
- [316] Del Rio D, Zimetti F, Caffarra P, Tassotti M, Bernini F, Brighenti F, et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine-N-Oxide Is Present in Human Cerebrospinal Fluid. *Nutrients* 2017;9:1053. <https://doi.org/10.3390/nu9101053>.

- [317] Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 1997;6 Suppl 1:S43-45. <https://doi.org/10.1097/00008469-199703001-00009>.
- [318] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;62:67-72. <https://doi.org/10.1079/PNS2002207>.
- [319] Tofalo R, Cocchi S, Suzzi G. Polyamines and Gut Microbiota. *Front Nutr* 2019;6:16. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00016>.
- [320] Gasaly N, de Vos P, Hermoso MA. Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation. *Front Immunol* 2021;12:658354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.658354>.
- [321] Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:235-43. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>.
- [322] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol* 2020;11:25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>.
- [323] Sampson TR, Mazmanian SK. Control of Brain Development, Function, and Behavior by the Microbiome. *Cell Host Microbe* 2015;17:565-76. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011>.
- [324] Bolognini D, Tobin AB, Milligan G, Moss CE. The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids. *Mol Pharmacol* 2016;89:388-98. <https://doi.org/10.1124/mol.115.102301>.
- [325] Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017;19:29-41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.
- [326] Nogal A, Louca P, Zhang X, Wells PM, Steves CJ, Spector TD, et al. Circulating Levels of the Short-Chain Fatty Acid Acetate Mediate the Effect of the Gut Microbiome on Visceral Fat. *Front Microbiol* 2021;12:711359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711359>.
- [327] Shimizu J, Kubota T, Takada E, Takai K, Fujiwara N, Arimitsu N, et al. Propionate-producing bacteria in the intestine may associate with skewed responses of IL10-producing regulatory T cells in patients with relapsing polychondritis. *PloS One* 2018;13:e0203657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203657>.
- [328] Timmons J, Chang ET, Wang J-Y, Rao JN. Polyamines and Gut Mucosal Homeostasis. *J Gastrointest Dig Syst* 2012;2:001.
- [329] Rao JN, Xiao L, Wang J-Y. Polyamines in Gut Epithelial Renewal and Barrier Function. *Physiol Bethesda Md* 2020;35:328-37. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2020>.
- [330] Nakamura A, Kurihara S, Takahashi D, Ohashi W, Nakamura Y, Kimura S, et al. Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. *Nat Commun* 2021;12:2105. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22212-1>.
- [331] Noack J, Dongowski G, Hartmann L, Blaut M. The human gut bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium* produce putrescine and spermidine in cecum of pectin-fed gnotobiotic rats. *J Nutr* 2000;130:1225-31. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1225>.
- [332] Ivleva EA, Grivennikov SI. Microbiota-driven mechanisms at different stages of cancer development. *Neoplasia N Y N* 2022;32:100829. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100829>.
- [333] Chandra H, Sharma KK, Tuovinen OH, Sun X, Shukla P. Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes* 2021;13:1979882. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1979882>.
- [334] Brown SP, Cornforth DM, Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol* 2012;20:336-42. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>.
- [335] Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett* 2014;345:196-202. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.016>.

- [336] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22:299–306. <https://doi.org/10.1101/gr.126516.111>.
- [337] Greathouse KL, White JR, Vargas AJ, Bliskovsky VV, Beck JA, von Muhlinen N, et al. Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome Biol* 2018;19:123. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1501-6>.
- [338] Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, Dick JD, De Marzo AM, Isaacs WB. A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. *The Prostate* 2008;68:306–20. <https://doi.org/10.1002/pros.20680>.
- [339] Bernardes N, Seruca R, Chakrabarty AM, Fialho AM. Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects. *Bioeng Bugs* 2010;1:178–90. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.10903>.
- [340] Sznol M, Lin S, Bermudes D, Zheng L, King I. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J Clin Invest* 2000;105. <https://doi.org/10.1172/JCI9818>.
- [341] Azizian K, Pustokhina I, Ghanavati R, Hamblin MR, Amini A, Kouhsari E. The potential use of theranostic bacteria in cancer. *J Cell Physiol* 2021;236:4184–94. <https://doi.org/10.1002/jcp.30152>.
- [342] Chakrabarty AM. Microorganisms and cancer: quest for a therapy. *J Bacteriol* 2003;185:2683–6. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2683-2686.2003>.
- [343] Drózdź M, Makuch S, Cieniuch G, Woźniak M, Ziółkowski P. Obligate and facultative anaerobic bacteria in targeted cancer therapy: Current strategies and clinical applications. *Life Sci* 2020;261:118296. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118296>.
- [344] Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Chen ML, Kimbara K, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14098–103. <https://doi.org/10.1073/pnas.222539699>.
- [345] Pang Z, Gu M-D, Tang T. *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Therapy: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Front Oncol* 2022;12:891187. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891187>.
- [346] Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* 2014;1:121–41.
- [347] Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C, et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun* 2018;95:100–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.10.012>.
- [348] Tai N, Peng J, Liu F, Gulden E, Hu Y, Zhang X, et al. Microbial antigen mimics activate diabetogenic CD8 T cells in NOD mice. *J Exp Med* 2016;213:2129–46. <https://doi.org/10.1084/jem.20160526>.
- [349] Horai R, Zárate-Bladés CR, Dillenburger-Pilla P, Chen J, Kielczewski JL, Silver PB, et al. Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site. *Immunity* 2015;43:343–53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.014>.
- [350] Greiling TM, Dehner C, Chen X, Hughes K, Iñiguez AJ, Boccitto M, et al. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus. *Sci Transl Med* 2018;10:eaan2306. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan2306>.
- [351] Powell AM, Black MM. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* 2001;26:427–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00852.x>.
- [352] Vojdani A. A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity. *Autoimmune Dis* 2014;2014:437231. <https://doi.org/10.1155/2014/437231>.
- [353] Chen J, Chia N, Kalari K, Yao J, Novotna M, Paz Soldan M, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep* 2016;6:28484.

- [354] Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:4615–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000082107>.
- [355] Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrilo LE, Burroughs AR, Begum-Haque S, Dasgupta S, et al. Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. *J Immunol Baltim Md* 1950 2010;185:4101–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001443>.
- [356] Mangalam A, Shahi SK, Luckey D, Karau M, Marietta E, Luo N, et al. Human Gut-Derived Commensal Bacteria Suppress CNS Inflammatory and Demyelinating Disease. *Cell Rep* 2017;20:1269–77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.031>.
- [357] Ezendam J, De Klerk A, Gremmer ER, Van Loveren H. Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clin Exp Immunol* 2008;154:424–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03788.x>.
- [358] Sanchez JMS, Doty DJ, DePaula-Silva AB, Brown DG, Bell R, Klag KA, et al. Molecular patterns from a human gut-derived *Lactobacillus* strain suppress pathogenic infiltration of leukocytes into the central nervous system. *J Neuroinflammation* 2020;17:291. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01959-2>.
- [359] FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. 2001.
- [360] Tankou SK, Regev K, Healy BC, Cox LM, Tjon E, Kivisakk P, et al. Investigation of probiotics in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2018;24:58–63. <https://doi.org/10.1177/1352458517737390>.
- [361] Ravi AK, Muthukrishnan SK. Combination of Probiotics and Natural Compounds to Treat Multiple Sclerosis via Warburg Effect. *Adv Pharm Bull* 2022;12:515–23. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.057>.
- [362] O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2017;2:1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>.
- [363] Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015;350:1084–9. <https://doi.org/10.1126/science.aac4255>.
- [364] Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015;350:1079–84. <https://doi.org/10.1126/science.aad1329>.
- [365] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018;359:97–103. <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>.
- [366] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018;359:91–7. <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>.
- [367] Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018;359:104–8. <https://doi.org/10.1126/science.aao3290>.
- [368] Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin J-M, Morrison RM, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* 2021;371:595–602. <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>.
- [369] Wilson BE, Routy B, Nagrial A, Chin VT. The effect of antibiotics on clinical outcomes in immune-checkpoint blockade: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Immunol Immunother CII* 2020;69:343–54. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02453-2>.
- [370] Smith M, Littmann ER, Slingerland JB, Clurman A, Slingerland AE, Taur Y, et al. Intestinal Microbiota Composition Prior to CAR T Cell Infusion Correlates with Efficacy and Toxicity. *Blood* 2018;132:3492. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-118628>.

- [371] Innao V, Allegra AG, Musolino C, Allegra A. New Frontiers about the Role of Human Microbiota in Immunotherapy: The Immune Checkpoint Inhibitors and CAR T-Cell Therapy Era. *Int J Mol Sci* 2020;21:8902. <https://doi.org/10.3390/ijms21238902>.
- [372] Smith M, Dai A, Ghilardi G, Amelsberg KV, Devlin SM, Pajarillo R, et al. Gut microbiome correlates of response and toxicity following anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nat Med* 2022;28:713–23. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01702-9>.
- [373] Uribe-Herranz M, Beghi S, Ruella M, Parvathaneni K, Salaris S, Kostopoulos N, et al. Modulation of the gut microbiota engages antigen cross-presentation to enhance antitumor effects of CAR T cell immunotherapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2023;31:686–700. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.01.012>.
- [374] Abid MB, Shah NN, Maatman TC, Hari PN. Gut microbiome and CAR-T therapy. *Exp Hematol Oncol* 2019;8:31. <https://doi.org/10.1186/s40164-019-0155-8>.
- [375] Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res* 2017;5:22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>.
- [376] Stoiloudis P, Kesidou E, Bakirtzis C, Sintila S-A, Konstantinidou N, Boziki M, et al. The Role of Diet and Interventions on Multiple Sclerosis: A Review. *Nutrients* 2022;14:1150. <https://doi.org/10.3390/nu14061150>.
- [377] Penesová A, Dean Z, Kollár B, Havranová A, Imrich R, Vlček M, et al. Nutritional intervention as an essential part of multiple sclerosis treatment? *Physiol Res* 2018;67:521–33. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933694>.
- [378] Vandebergh M, Dubois B, Goris A. Effects of Vitamin D and Body Mass Index on Disease Risk and Relapse Hazard in Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2022;9:e1165. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001165>.
- [379] Hupperts R, Smolders J, Vieth R, Holmøy T, Marhardt K, Schlupe M, et al. Randomized trial of daily high-dose vitamin D3 in patients with RRMS receiving subcutaneous interferon β -1a. *Neurology* 2019;93:e1906–16. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008445>.
- [380] Piccio L, Stark JL, Cross AH. Chronic calorie restriction attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc Biol* 2008;84:940–8. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208133>.
- [381] Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Salter A, Dorsett Y, Chen L, et al. Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. *Cell Metab* 2018;27:1222–1235.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.006>.
- [382] Bender E. Could a bacteria-stuffed pill cure autoimmune diseases? *Nature* 2020;577:S12–3. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00197-z>.
- [383] Goyvaerts C, Breckpot K. Pros and Cons of Antigen-Presenting Cell Targeted Tumor Vaccines. *J Immunol Res* 2015;2015:e785634. <https://doi.org/10.1155/2015/785634>.
- [384] Dazzi F, van Laar JM, Cope A, Tyndall A. Cell therapy for autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2007;9:206. <https://doi.org/10.1186/ar2128>.
- [385] Yin B, Ma G, Yen C-Y, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, et al. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;185:5828–34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903636>.
- [386] Sofronic-Milosavljevic Lj, Radovic I, Ilic N, Majstorovic I, Cvetkovic J, Gruden-Movsesijan A. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2013;202:239–49. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0286-6>.
- [387] Rosborough BR, Mathews LR, Matta BM, Liu Q, Raich-Regué D, Thomson AW, et al. Cutting edge: Flt3 ligand mediates STAT3-independent expansion but STAT3-dependent activation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014;192:3470–3. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300058>.

- [388] Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 2010;32:790–802. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.010>.
- [389] Solito S, Pinton L, De Sanctis F, Ugel S, Bronte V, Mandruzzato S, et al. Methods to Measure MDSC Immune Suppressive Activity In Vitro and In Vivo. *Curr Protoc Immunol* 2019;124:e61. <https://doi.org/10.1002/cpim.61>.
- [390] Bian Z, Shi L, Venkataramani M, Abdelaal AM, Culpepper C, Kidder K, et al. Tumor conditions induce bone marrow expansion of granulocytic, but not monocytic, immunosuppressive leukocytes with increased CXCR2 expression in mice. *Eur J Immunol* 2018;48:532–42. <https://doi.org/10.1002/eji.201746976>.
- [391] Masurier C, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, et al. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology* 1999;96:569–77. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00728.x>.
- [392] Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 2015;42:1197–211. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>.
- [393] Bruschi F, Gruden-Movesijan A, Pinto B, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products downregulate MMP-9 in Dark Agouti rats affected by experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Parasitol* 2021;225:108112. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108112>.
- [394] Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Cvetkovic J, Mojsilovic S, Devic M, et al. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunol Res* 2015;61:312–25. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8626-4>.
- [395] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005;21:1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>.
- [396] Ferruzza S, Rossi C, Scarino ML, Sambuy Y. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 2012;26:1252–5. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.008>.
- [397] Lukic J, Strahinic I, Milenkovic M, Golic N, Kojic M, Topisirovic L, et al. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with Rat Colonic Mucosa: Implications for Colitis Induction. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5735–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.01807-13>.
- [398] Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27:863–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>.
- [399] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma Oxf Engl* 2011;27:2957–63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>.
- [400] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019;37:852–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- [401] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JL, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 2013;10:57–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>.
- [402] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *MSystems* 2017;2:e00191-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>.
- [403] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 2001;26:32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.

- [404] Vázquez-Baeza Y, Gonzalez A, Smarr L, McDonald D, Morton JT, Navas-Molina JA, et al. Bringing the Dynamic Microbiome to Life with Animations. *Cell Host Microbe* 2017;21:7–10. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.009>.
- [405] Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience* 2013;2:16. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>.
- [406] Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:27663. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>.
- [407] McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 2013;8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- [408] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;13:581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- [409] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D590–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- [410] Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>.
- [411] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol* 1993;18:117–43. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>.
- [412] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- [413] Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* 2020;38:685–8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>.
- [414] Caspi R, Altman T, Billington R, Dreher K, Foerster H, Fulcher CA, et al. MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D459–71.
- [415] Stanisavljević S, Čepić A, Bojić S, Veljović K, Mihajlović S, Đedović N, et al. Oral neonatal antibiotic treatment perturbs gut microbiota and aggravates central nervous system autoimmunity in Dark Agouti rats. *Sci Rep* 2019;9:918. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37505-7>.
- [416] De Baere S, Eeckhaut V, Steppe M, De Maesschalck C, De Backer P, Van Immerseel F, et al. Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *J Pharm Biomed Anal* 2013;80:107–15. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.032>.
- [417] Redmond JW, Tseng A. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J Chromatogr A* 1979;170:479–81. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)95481-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)95481-5).
- [418] Ismael S, Silvestre MP, Vasques M, Araújo JR, Morais J, Duarte MI, et al. A Pilot Study on the Metabolic Impact of Mediterranean Diet in Type 2 Diabetes: Is Gut Microbiota the Key? *Nutrients* 2021;13:1228. <https://doi.org/10.3390/nu13041228>.
- [419] Tomić S, Ilić N, Kokol V, Gruden-Movsesijan A, Mihajlović D, Bekić M, et al. Functionalization-dependent effects of cellulose nanofibrils on tolerogenic mechanisms of human dendritic cells. *Int J Nanomedicine* 2018;13:6941–60. <https://doi.org/10.2147/IJN.S183510>.
- [420] Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Semin Immunol* 2010;22:173–82. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.03.002>.

- [421] Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2009;155:523–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03853.x>.
- [422] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>.
- [423] Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005;106:3490–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2044>.
- [424] Filley AC, Dey M. Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *J Neurooncol* 2017;133:223–35. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2446-4>.
- [425] Lee MN, Ye C, Villani A-C, Raj T, Li W, Eisenhaure TM, et al. Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. *Science* 2014;343:1246980. <https://doi.org/10.1126/science.1246980>.
- [426] van Willigen WW, Bloemendal M, Gerritsen WR, Schreiber G, de Vries IJM, Bol KF. Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time. *Front Immunol* 2018;9:2265. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02265>.
- [427] Pierrard J, Seront E. Impact of the gut microbiome on immune checkpoint inhibitor efficacy—a systematic review. *Curr Oncol Tor Ont* 2019;26:395–403. <https://doi.org/10.3747/co.26.5177>.
- [428] Vital M, Karch A, Pieper DH. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *MSystems* 2017;2. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00130-17>.
- [429] Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol* 2016;5:e73. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>.
- [430] Li K, Shi H, Zhang B, Ou X, Ma Q, Chen Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6:362. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00670-9>.
- [431] Dolen Y, Gunaydin G, Esendagli G, Guc D. Granulocytic subset of myeloid derived suppressor cells in rats with mammary carcinoma. *Cell Immunol* 2015;1:29–35.
- [432] Dugast A-S, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol Baltim Md* 1950 2008;180:7898–906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.7898>.
- [433] Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 2017;97:4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>.
- [434] Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:a029025. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029025>.
- [435] Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain J Neurol* 2018;141:1900–16. <https://doi.org/10.1093/brain/awy131>.
- [436] Lallès J-P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 2014;72:82–94. <https://doi.org/10.1111/nure.12082>.
- [437] Zeng M, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 2017;1:18–26.
- [438] Castillo-Álvarez F, Pérez-Matute P, Oteo JA, Marzo-Sola ME. The influence of interferon β -1b on gut microbiota composition in patients with multiple sclerosis. *Neurol Engl Ed* 2021;36:495–503. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2020.05.006>.

- [439] Klaasen H, Koopman J, Van den Brink M, Bakker M, Poelma F, Beynen A. Intestinal, segmented, filamentous bacteria in a wide range of vertebrate species. *Lab Anim* 1993;2:141–50.
- [440] Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Dev* 2016;30:1589–97. <https://doi.org/10.1101/gad.284091.116>.
- [441] Saxena M, Balan S, Roudko V, Bhardwaj N. Towards superior dendritic-cell vaccines for cancer therapy. *Nat Biomed Eng* 2018;2:341–6. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0250-x>.
- [442] Huber A, Dammeijer F, Aerts JGJV, Vroman H. Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for *in vitro* Antigen Loading of Different DC Subsets? *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02804>.
- [443] Briseño CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Kc W, et al. Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep* 2016;15:2462–74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.025>.
- [444] Boulet S, Daudelin J-F, Odagiu L, Pelletier A-N, Yun TJ, Lesage S, et al. The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 2019;116:15150–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821296116>.
- [445] Carreno BM, Becker-Hapak M, Huang A, Chan M, Alyasiry A, Lie W-R, et al. IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. *J Clin Invest* 2013;123:3383–94. <https://doi.org/10.1172/JCI68395>.
- [446] Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev* 2011;241:206–27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x>.
- [447] Chang C-C, Liu Z, Vlad G, Qin H, Qiao X, Mancini DM, et al. Ig-Like Transcript 3 Regulates Expression of Proinflammatory Cytokines and Migration of Activated T Cells. *J Immunol* 2009;182:5208–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804048>.
- [448] Subbiah V, Murthy R, Hong DS, Prins RM, Hosing C, Hendricks K, et al. Cytokines Produced by Dendritic Cells Administered Intratumorally Correlate with Clinical Outcome in Patients with Diverse Cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2018;24:3845–56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2707>.
- [449] Uribe-Herranz M, Rafail S, Beghi S, Gil-de-Gómez L, Verginadis I, Bittinger K, et al. Gut microbiota modulate dendritic cell antigen presentation and radiotherapy-induced antitumor immune response. *J Clin Invest* 2020;130:466–79. <https://doi.org/10.1172/JCI124332>.
- [450] Pavlović B, Tomić S, Đokić J, Vasilijić S, Vučević D, Lukić J, et al. Fast dendritic cells matured with Poly (I:C) may acquire tolerogenic properties. *Cytotherapy* 2015;17:1763–76. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.08.001>.
- [451] Schraut W, Wendelgass P, Calzada-Wack JC, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HWL. TNF GENE EXPRESSION IN MONOCYTES OF LOW AND HIGH RESPONDER INDIVIDUALS. *Cytokine* 1997;9:206–11. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0155>.
- [452] Somarouthu B, Lee SI, Urban T, Sadow CA, Harris GJ, Kambadakone A. Immune-related tumour response assessment criteria: a comprehensive review. *Br J Radiol* 2018;91:20170457. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170457>.
- [453] Chang C-CJ, Wright A, Punnonen J. Monocyte-Derived CD1a+ and CD1a– Dendritic Cell Subsets Differ in Their Cytokine Production Profiles, Susceptibilities to Transfection, and Capacities to Direct Th Cell Differentiation. *J Immunol* 2000;165:3584–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3584>.
- [454] Stanisavljević S, Dinić M, Jevtić B, Đedović N, Momčilović M, Đokić J, et al. Gut Microbiota Confers Resistance of Albino Oxford Rats to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00942>.
- [455] Ouyang J, Lin J, Isnard S, Fombuena B, Peng X, Murette A, et al. The Bacterium *Akkermansia muciniphila*: A Sentinel for Gut Permeability and Its Relevance to HIV-Related Inflammation. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00645>.

- [456] Frankel AE, Deshmukh S, Reddy A, Lightcap J, Hayes M, McClellan S, et al. Cancer Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and the Gut Microbiota. *Integr Cancer Ther* 2019;18. <https://doi.org/10.1177/1534735419846379>.
- [457] Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front Microbiol* 2016;7:1081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01081>.
- [458] Millard AL, Mertes PM, Ittelet D, Villard F, Jeannesson P, Bernard J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol* 2002;130:245–55. <https://doi.org/10.1046/j.0009-9104.2002.01977.x>.
- [459] Kaiser MMM, Pelgrom LR, van der Ham AJ, Yazdanbakhsh M, Everts B. Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01429>.
- [460] Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int* 2012;95:50–60. https://doi.org/10.5740/jaoacint.sge_macfarlane.
- [461] Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet Lond Engl* 1980;2:712–5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)91934-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)91934-0).
- [462] Vonk RJ, Reckman G. Progress in the biology and analysis of short chain fatty acids. *J Physiol* 2017;595:419–20. <https://doi.org/10.1113/JP273260>.
- [463] Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.
- [464] Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. *Bifidobacteria* and Their Molecular Communication with the Immune System. *Front Microbiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02345>.
- [465] Miller LE, Lehtoranta L, Lehtinen MJ. The Effect of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN019 on Cellular Immune Function in Healthy Elderly Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2017;9:191. <https://doi.org/10.3390/nu9030191>.
- [466] Matsumoto M, Kitada Y, Shimomura Y, Naito Y. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 reduces levels of intestinal trimethylamine produced by intestinal microbiota in healthy volunteers: A double-blind, placebo-controlled study. *J Funct Foods* 2017;36:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.032>.
- [467] Wu B-B, Yang Y, Xu X, Wang W-P. Effects of *Bifidobacterium* supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr WJP* 2016;12:177–82. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0025-3>.
- [468] Turrone F, Serafini F, Foroni E, Duranti S, Motherway MO, Taverniti V, et al. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium–host interactions. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:11151–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303897110>.
- [469] Fanning S, Hall LJ, Cronin M, Zomer A, MacSharry J, Goulding D, et al. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal–host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115621109>.
- [470] Mittal SK, Roche PA. Suppression of Antigen Presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol* 2015;34:22–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.009>.
- [471] Amodio G, Cichy J, Conde P, Matteoli G, Moreau A, Ochando J, et al. Role of myeloid regulatory cells (MRCs) in maintaining tissue homeostasis and promoting tolerance in autoimmunity, inflammatory disease and transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68:661–72. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2264-3>.

- [472] Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* 2021;21:485–98. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>.
- [473] Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 2017;5:3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.
- [474] Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:10719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711233114>.
- [475] Arellano G, Ottum P, Reyes L, Burgos P, Naves R. Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2015;6:492.
- [476] Dungan L, McGuinness N, Boon L, Lynch M, Mills K. Innate IFN- γ promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: A role for NK cells and M1 macrophages. *Eur J Immunol* 2014;10:2093–17.
- [477] Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo DI, et al. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* 2010;207:1907–21. <https://doi.org/10.1084/jem.20092749>.
- [478] Niedbala W, Besnard A-G, Jiang HR, Alves-Filho JC, Fukada SY, Nascimento D, et al. Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;191:164–70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202580>.
- [479] Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3⁻ regulatory T cells from CD4+CD25⁻ T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:15478–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703725104>.
- [480] Duc D, Vigne S, Bernier-Latmani J, Yersin Y, Ruiz F, Gaïa N, et al. Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Rep* 2019;29:378–390.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.002>.
- [481] Nouri M, Bredberg A, Weström B, Lavasani S. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One* 2014;9:e106335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106335>.
- [482] Stettner N, Rosen C, Bernshtein B, Gur-Cohen S, Frug J, Silberman A, et al. Induction of Nitric-Oxide Metabolism in Enterocytes Alleviates Colitis and Inflammation-Associated Colon Cancer. *Cell Rep* 2018;23:1962–76. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.053>.
- [483] Haile LA, von Wasielewski R, Gamrekelashvili J, Krüger C, Bachmann O, Westendorf AM, et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 2008;135:871–81, 881.e1–5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.032>.
- [484] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 2016;16:341–52. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>.
- [485] Horton M, McCauley K, Fadrosch D, Fujimura K, Graves J, Ness J, et al. Gut microbiome is associated with multiple sclerosis activity in children. *Ann Clin Transl Neurol* 2021;9:1867–83.
- [486] Gandy K, Zhang J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci Rep* 2019;1:6923.
- [487] Johanson DM, Goertz JE, Marin IA, Costello J, Overall CC, Gaultier A. Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. *Sci Rep* 2020;10:15183. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72197-y>.
- [488] Kushkevych I, Dordević D, Kollar P, Vítězová M, Drago L. Hydrogen Sulfide as a Toxic Product in the Small–Large Intestine Axis and its Role in IBD Development. *J Clin Med* 2019;7:1054.

- [489] Paytuví-Gallart A, Sanseverino W, Winger A. Daily intake of probiotic strain *Bacillus subtilis* DE111 supports a healthy microbiome in children attending day-care. *Benef Microbes* 2020;7:611–20.
- [490] Grant CV, Loman BR, Bailey MT, Pyter LM. Manipulations of the gut microbiome alter chemotherapy-induced inflammation and behavioral side effects in female mice. *Brain Behav Immun* 2021;95:401–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.04.014>.
- [491] Berry D, Kuzyk O, Rauch I, Heider S, Schwab C, Hainzl E, et al. Intestinal Microbiota Signatures Associated with Inflammation History in Mice Experiencing Recurring Colitis. *Front Microbiol* 2015;6:1408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01408>.
- [492] Ma F, Song Y, Sun M, Wang A, Jiang S, Mu G, et al. Exopolysaccharide Produced by *Lactiplantibacillus plantarum*-12 Alleviates Intestinal Inflammation and Colon Cancer Symptoms by Modulating the Gut Microbiome and Metabolites of C57BL/6 Mice Treated by Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium Salt. *Foods Basel Switz* 2021;10:3060. <https://doi.org/10.3390/foods10123060>.
- [493] Yang B, Li M, Wang S, Ross RP, Stanton C, Zhao J, et al. *Lactobacillus ruminis* Alleviates DSS-Induced Colitis by Inflammatory Cytokines and Gut Microbiota Modulation. *Foods* 2021;10:1349. <https://doi.org/10.3390/foods10061349>.
- [494] Wong M-L, Inserra A, Lewis MD, Mastronardi CA, Leong L, Choo J, et al. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. *Mol Psychiatry* 2016;21:797–805. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.46>.
- [495] Mohebi N, Mamarabadi M, Moghaddasi M. Relation of *Helicobacter pylori* Infection and Multiple Sclerosis in Iranian Patients. *Neurol Int* 2013;5:e10. <https://doi.org/10.4081/ni.2013.e10>.
- [496] Gao C, Ganesh BP, Shi Z, Shah RR, Fultz R, Major A, et al. Gut Microbe-Mediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. *Am J Pathol* 2017;187:2323–36. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.06.011>.
- [497] Charlet R, Bortolus C, Sendid B, Jawhara S. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Lactobacillus johnsonii* modulate intestinal inflammation and eliminate fungi via enzymatic hydrolysis of the fungal cell wall. *Sci Rep* 2020;10:11510.
- [498] Prins RA, Lankhorst A, van der Meer P, Van Nevel CJ. Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica* a rumen lipolytic organism. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1975;41:1–11. <https://doi.org/10.1007/BF02565031>.
- [499] Petri R, Neubauer V, Humer E, Kröger I, Reisinger N, Zebeli Q. Feed Additives Differentially Impact the Epimural Microbiota and Host Epithelial Gene Expression of the Bovine Rumen Fed Diets Rich in Concentrates. *Front Microbiol* 2020;11:119.
- [500] Ridlon J, Kang D, Hylemon P. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;2:241–59.
- [501] Bloom S, Bijanki V, Nava G, Sun L, Malvin N, Donermeyer D, et al. Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe* n.d.;5:390–403.
- [502] Kenny D, Plichta D, Shungin D, Koppel N, Hall A, Fu B, et al. Cholesterol Metabolism by Uncultured Human Gut Bacteria Influences Host Cholesterol Level. *Cell Host Microbe* 2020;2:245–257.e6.
- [503] Liu YS, Li S, Wang XF, Xing T, Li JL, Zhu XD, et al. Microbiota populations and short-chain fatty acids production in cecum of immunosuppressed broilers consuming diets containing γ -irradiated *Astragalus* polysaccharides. *Poult Sci* 2020;100:273–82. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.089>.
- [504] Liu Y, Fatheree N, Mangalat N, Rhoads J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;5:G1087–96.

- [505] Thomas CM, Hong T, Pijkereen JP van, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, et al. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. PLOS ONE 2012;7:e31951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031951>.
- [506] Gao C, Major A, Rendon D, Lugo M, Jackson V, Shi Z, et al. Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. MBio 2015;6:e01358-01315. <https://doi.org/10.1128/mBio.01358-15>.
- [507] Glenn J, Mowry E. Emerging Concepts on the Gut Microbiome and Multiple Sclerosis. J Interferon Cytokine Res 2016;6:347-57.
- [508] Roy DG, Chen J, Mamane V, Ma EH, Muhire BM, Sheldon RD, et al. Methionine Metabolism Shapes T Helper Cell Responses through Regulation of Epigenetic Reprogramming. Cell Metab 2020;31:250-266.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.006>.
- [509] Connors J, Dawe N, Van Limbergen J. The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. Nutrients 2019;11:25. <https://doi.org/10.3390/nu11010025>.
- [510] Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature 2013;504:451-5. <https://doi.org/10.1038/nature12726>.
- [511] Yang Q, Zheng C, Cao J, Cao G, Shou P, Lin L, et al. Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages. Cell Death Differ 2016;11:1850-61.
- [512] Chen J, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Xiao L, et al. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol 2007;293:G568-76. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00201.2007>.
- [513] Milovic V, Turchanowa L, Stein J, Caspary FW. Transepithelial transport of putrescine across monolayers of the human intestinal epithelial cell line, Caco-2. World J Gastroenterol 2001; 7(2): 193-197 [PMID: 11819759 DOI: 10.3748/wjg.v7.i2.193].
- [514] D'Agostino L, Pignata S, Daniele B, D'Adamo G, Ferraro C, Silvestro G, et al. Polyamine uptake by human colon carcinoma cell line CaCo-2. Digestion 1990;46 Suppl 2. <https://doi.org/10.1159/000200408>.
- [515] Miska J, Rashidi A, Lee-Chang C, Gao P, Lopez-Rosas A, Zhang P, et al. Polyamines drive myeloid cell survival by buffering intracellular pH to promote immunosuppression in glioblastoma. Sci Adv 2021;7:eabc8929. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc8929>.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dušan D. Radojević je rođen 18. januara 1992. godine u Beogradu. Nakon završetka gimnazijskog školovanja u Mladenovcu upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 2011. godine. Osnovne akademske studije je završio sa prosečnom ocenom 9,28 i upisao master akademske studije Imunobiologije na istom fakultetu 2015. godine. Master studije je završio 2016. godine sa prosekom 9,83, nakon čega upisuje doktorske akademske studije Biološkog fakulteta na modulu Biologija ćelija i tkiva iste godine.

Tokom osnovnih i master studija bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (MPNTR), a od 2017. do 2018. godine je bio korisnik stipendije za doktorske studije koju dodeljuje isto ministarstvo. Od maja 2018. godine je preko poziva za talentovane mlade istraživače MPNTR uključen u naučno-istraživački rad i zaposlen na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu (IMGGI-UB) u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju gde je trenutno u zvanju istraživača saradnika.

Učesnik je dva projekta Fonda za nauku (Nano-MDSC-Thera ev. br. 6062673, 2020-2022; NextGenBiotics ev. br. 7744507, 2021-2024), jednog projekta Fonda za inovacionu delatnost (2019), jednog projekta fondacije Pokreni se za nauku (2020-2021) i dva projekta HORIZON (H2020-MSCA-NIGHT2014 - SCIMFONICOM 2014-15, No. 633376; H2020-MSCA-NIGHT2018 - SCIMFONICOM 2018-19, No. 818747). Tokom studija je učestvovao na nekoliko međunarodnih konferencija, bioinformatičkih radionica i kurseva u Srbiji i inostranstvu. Pohađao je kratki program studija „Bioinformatika za biologe“ na Računarskom fakultetu Univerziteta Union (30 ESPB) u periodu 2019-2021. Objavio je dva rada kao prvi autor u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti kategorije M21a. Kao koautor je objavio sedam publikacija (1 - M21a, 5 - M21, 1 - M23). Kumulativni IF radova iznosi 80.04.

Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju, Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za bioinformatiku i računarsku biologiju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Душан Радојевић

Број индекса Б3005/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај састава микробиоте црева на имуномодулаторна својства и имунотерапијски потенцијал дендритских ћелија и супресорских ћелија мијелоидног порекла

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

У Београду, 31.03.2023.

Потпис аутора

Прилог 2

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Душан Радојевић

Број индекса: Б3005/2016

Студијски програм: Биологија; модул: Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Утицај састава микробиоте црева на имуномодулаторна својства и имунотерапијски потенцијал дендритских ћелија и супресорских ћелија мијелоидног порекла

Ментор: др Јелена Ђокић, др Биљана Божић Недељковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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.

У Београду, 31.03.2023.

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

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

Утицај састава микробиоте црева на имуномодулаторна својства и имунотерапијски потенцијал дендритских ћелија и супресорских ћелија мијелоидног порекла

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 31.03.2023.

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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 прерада.** Дозвољаваате умножавање, 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.** Дозвољаваате умножавање, 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.