



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Александар Ацовић

**Улога индоламин 2,3 деоксигеназе у имуномодулацији  
улцерозног колитиса: параметри инфламације у усној дупљи  
и колону**

Докторска дисертација

Коментори:

др сци. мед. Владислав Воларевић, ванредни професор  
др сци. мед. Владимир Ристић, доцент

Крагујевац, 2020. године

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Александар Ацовић
Датум место рођења: 26.09.1990. Крушевац
Садашње запослење: Истраживач приправник, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Улога индоламин 2,3 деоксигеназе у имуномодулацији улцерозног колитиса: параметри инфламације у усној дупљи и колону
Број Страница: 134
Број слика: 10 слика, 54 графикона, 7 табела
Број библиографских података: 225
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука
Научна област (УДК): Медицина
<b>Коментори:</b> проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу доц. др Владимир Ристић, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум и пријава теме: 05.04.2019
Број одлуке и датум прихватање теме докторске дисертације: IV-03-584/16 од 10.07.2019
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник 2. проф. др Милош Дука, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална хирургија, члан; 3. доц. др Јелена Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 4. доц. др Наташа Здравковић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан; 5. НС Бојана Симовић-Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
1. проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник 2. доц. др Јелена Миловановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 3. НС Бојана Симовић-Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Улцерозни колитис је инфламацијска болест црева која се карактерише фазама егзацербације и ремисије. Због сличности у погледу молекулских механизма одговорних за настанак и прогресију, мишији колитис индукован декстран натријум сулфатом (DSS-колитис) је један од најчешће коришћених експерименталних модела за испитивање улцерозног колитиса. Аналогно улцерозном колитису људи, имунске ћелије (макрофаги, дендритске ћелије (DCs), неутрофили, Т лимфоцити) имају најважнију улогу у патогенези DSS-колитиса. Регулаторни Т лимфоцити (Treg), продукцијом имуносупресивних цитокина, супримирају инфламацију и подстичу регенерацију оштећене слузнице црева. Постоји драматична разлика у току DSS-колитиса код мишева различитих сојева. Тако, BALBc мишеви развијају лакши облик болести са спонтаном регенерацијом слузокоже црева док C57BL/6 мишеви развијају тежу форму болести која прогредира у хроничитет. У *lamina propri*-ји црева се триптофан метаболише кинуренинским путем, активношћу ензима индоламин 2,3 диоксигеназе (IDO). Највећа активност IDO-а је забележена у DCs и мезенхимским матичним ћелијама (MSCs) које се због својих имуномодулативних карактеристика примењују у терапији инфламацијских болести, укључујући и улцерозни колитис.

Резултати ове студије су показали да DCs BALBc мишева поседују знатно већи капацитет продукције IDO-а наспрам DCs C57BL/6 животиња, што следствено индукује експанзију Treg лимфоцита који супримирају инфламацију и подстичу регенерацију слузнице црева. Степен оштећења слузнице црева, па тако и развој болести, се најпозданије утврђују колоноскопијом, али се ова инвазивна дијагностичка метода не може често изводити. Одређивање фекалног калпротектина представља најчешће коришћени алтернативни дијагностички параметар за праћење тока болести и успешности терапије. Ипак, недостатак валидираног *cut-off*-а и недовољна специфичност овог теста, указује на потребу за увођење нових неинвазивних дијагностичких метода којим се може процењивати успешност терапије и степен регенерације оболеле слузнице. Резултати ове студије указују да се праћењем концентрације кинуренина у гингивалној течности, серуму и фецесу може пратити прогресија улцерозног колитиса.

Због чињенице да су MSCs један од најзначајних извора IDO-а, у овој студији је испитиван и значај IDO/кинууренинског пута за терапијске ефекте MSCs у имуномодулативности DSS-колитиса. Концентрација инфламацијских цитокина, посебно

IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , утичу на промену фенотипа и ефекторских функција MSCs. MSCs су након апликације у мишеве соја C57BL/6 (у којима је серумска концентрација инфламацијских цитокина била висока), узроковале значајан пораст концентрације кинуренина у серуму што је резултирало експанзијом Treg лимфоцита у цревима, смањењем инфламације и ублажавањем симптома колитиса. Са друге стране, након апликације у DSS-ом третиране BALBc мишеве (код којих су биле ниске вредности инфламацијских цитокина), MSCs нису узроковале IDO/кинуренин-зависну експанзију Treg лимфоцита у цревима већ су индуковале експанзију инфламацијских ћелија у колону што је довело до погоршања колитиса.

# ABSTRACT

Ulcerative colitis is an entity of inflammatory bowel disease characterized by stages of exacerbation and remission. Due to the similarity with respect to the molecular mechanisms responsible for the onset and progression, murine colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS-colitis) is one of the most commonly used experimental models for testing ulcerative colitis. Analogous to human ulcerative colitis, immune cells (macrophages, dendritic cells (DCs), neutrophils, T lymphocytes) play the most important role in the pathogenesis of DSS-colitis. Regulatory T lymphocytes (Tregs), by producing immunosuppressive cytokines, suppress inflammation and promote the regeneration of damaged intestinal mucosa. There is a striking difference in the course of DSS-colitis in mice of different strains. Thus, BALBc mice develop a milder form of disease with spontaneous regeneration of intestinal mucosa while C57BL/6 mice develop a more severe form of disease that progresses to chronicity. In the lamina propria of the intestine, tryptophan is been metabolized by kynurenine via the activity of the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). The highest activity of IDOs has been reported in DCs and mesenchymal stem cells (MSCs), which, because of their immunomodulatory properties, are used in the treatment of inflammatory diseases, including ulcerative colitis. The results of this study showed that DCs of BALBc mice have a significantly higher IDO production capacity than DCs of C57BL/6 animals, which consequently induces the expansion of Treg cells that suppress inflammation and promote mucosal regeneration.

The degree of damage to the intestinal mucosa, as well as the development of the disease, are most reliably determined by colonoscopy, but this invasive diagnostic method cannot be performed frequently. The determination of fecal calprotectin is the most commonly used alternative diagnostic parameter for monitoring the course of the disease and the success of therapy. However, the lack of validated cut-off and the lack of specificity of this test indicate the need for the introduction of new, non-invasive diagnostic methods that can evaluate the success of therapy and the degree of regeneration of diseased mucosa. Our results indicate that the monitoring of local and systemic parameters of ulcerative colitis can be observed by monitoring the concentrations of immunomodulatory factors in gingival fluid, serum and feces. MSCs have been used in the treatment of ulcerative colitis for their immunomodulatory properties, but the results are bidirectional. As one of the most significant sources of IDO, we examined the role of IDO/kynurenine pathway in immunomodulation of mesenchymal stem cells in a model of DSS-induced colitis. After application of MSCs in C57BL/6 strain mice,

they polarized the immune response and transferred the medium from proinflammatory to immunosuppressive environment, where Treg lymphocyte expansion suppressed inflammation and allowed regeneration. On the other hand, the application of MSCs in animals of the BALBc strain contributed to the overall exacerbation of the disease followed by an increase in inflammation parameters.

Ова докторска дисертација надам се, је мој скромни допринос *смислу*, јер је данас обесмишљавање свега и свакога досегло такве размере да су људи оковани лажима прихватили да *суштине и смисла* нема и да их не треба ни бити.

Они који у то поверују, постају робови којима не само да је немогуће подарити *слободу* већ нису способни ни да о њој сањају. Смртно преплашени не виде да су без те идеје у ствари мртви.

Лек је ту, надхват руке и зове се *истина*.

Изгарао сам да у овој тези ничег другог осим ње и не буде: можда је та откривена и саопштена истина мала, можда је мања од бозона, али ако сам збиља исправно радио та истина ће једног дана говорити о томе да смо, они који су ми помагали и ја, да се посао заврши, били слободни људи вакцинисани истином, а ти људи су: ментори, колеге из лабораторије, Кућа, облак и муње проф. Арсенијевића, приче моје мајке, пријатељи, љубав и сенке, Царица и понеки људи којима не смем да се захвалим јавно.....

Тако макар сада изгледа, а ако време покаже да неко од нас ипак није био такав то ће значити само једно - да се у самољубној мемљивој потаји опијао таштином па и нек му је Бог у помоћи, јер давно је речено, да је говорити понеку лаж – ситна слабост, а живети лаж права истинска, *суштинска* пропаст.

# Садржај

1. УВОД.....	12
1.1. Улцерозни колитис.....	13
1.1.1. Имунопатогенеза улцерозног колитиса .....	14
1.1.2. Орални знаци и манифестације улцерозног колитиса .....	17
1.2. Мишији колитис индукован декстран натријум сулфатом ( <i>Dextran Sodium Sulphate-DSS</i> ): експериментални модел улцерозног колитиса ...	18
1.2.1. Декстран натријум сулфат (DSS).....	18
1.2.2. Индукција колитиса DSS-ом.....	19
1.2.3. Клинички параметри и хистолошка слика колитиса изазваног DSS-ом.....	20
1.2.4. Патогенеза DSS колитиса.....	20
1.2.5. Ћелије урођене имуности у патогенези акутног DSS колитиса.	21
1.2.6. Цитокини у патогенези колитиса изазваног DSS-ом .....	22
1.3. Индоламин 2,3 деоксигеназа у улцерозном колитису.....	23
1.3.1. Имуномодулација IDO/кинуренинским путем .....	24
1.3.2. Модулација имунског одговора IDO/кинуренинским путем у улцерозном колитису .....	26
1.3.3. IDO у усној дупљи .....	27
1.4. MSCs у терапији улцерозног колитиса .....	28
1.4.1. Диферентовање MSCs у епителне ћелије црева .....	28
1.4.2. Улога MSCs у ангиогенези.....	29
1.4.3. Имуномодулацијска својства MSCs .....	29
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	31
3. ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	32
3.1. Пацијенти .....	32
3.1.1. Узорковање сулкусне течности од оболелих од улцерозног колитиса и здравих контрола .....	34
3.1.2. Мерење цитокина, фекалног калпотетктина, <i>CRP</i> -а и концентрација кинуренина у серуму, столици и гингивалној течности пацијената са улцерозним колитисом и здравих контрола.....	34



3.1.3. Анализа фенотипа ћелија изолованих из ламине проприје ткива дебелог црева пацијената оболелих од улцерозног колитиса .....	35
3.2. Лабораторијске животиње.....	36
3.2.1. Индукција експерименталног колитиса применом DSS -а.....	37
3.2.2. Одређивање клиничког скорa .....	37
3.3. Хистолошка анализа .....	38
3.3.1. Израда и припрема исечака ткива .....	38
3.3.2. Бојење препарата.....	38
3.3.3. Хистолошки скор .....	38
3.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO).....	39
3.5. Ћелијска линија мишијих мезенхимских матичних ћелија (MSCs) .	39
3.5.1 Апликација MSCs.....	40
3.6. Изолација моноклеара присутних у ламини проприји зида дебелог црева .....	40
3.6.1. Анализа популација моноклеарних ћелија проточном цитометријом .....	40
3.6.2. Обележавање мембранских маркера.....	43
3.6.3. Мерење интрацелуларних цитокина .....	43
3.7. Мерење цитокина и кинуренина у серумима експерименталних животиња.....	44
3.8. Изолација дендритских ћелија мишева соја C57BL/6 и BALB/c .....	44
3.8.1. Анализа фенотипа и улоге дендритских ћелија.....	45
3.9. Деплеција и адаптивни трансфер дендритских ћелија у мишеве третиране DSS-ом којима су претходно деплетирани дендритске ћелије .....	45
3.10. Деплеција Treg лимфоцита и адаптивни трансфер дендритских ћелија мишевима на DSS-у којима су претходно деплетирани дендритске ћелије .....	46
4. РЕЗУЛТАТИ .....	47
4.1. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике клиничких и хистолошких скорова између мишева соја C57BL/6 и BALB/c регистроване током развоја и регенерације колитиса изазваног DSS-ом	47
4.2. Активирани дендритске ћелије BALB/c мишева имају већи капацитет експресије IDO-а и продукују имуносупресивни кинуренин, IL-10 наспрам активираних дендритских ћелија C57BL/6 мишева .....	55

4.3. Дендритске ћелије BALBc мишева индукују експанзију Treg лимфоцита које супримирају инфламацију и убрзавају регенерацију DSS-ом оштећене слузнице црева .....	58
4.3.1. У инфилтратима слузнице колона оболелих BALBc мишева присутан је значајно већи број Treg лимфоцита него у инфилтратима оболелих C57BL/6 мишева.....	58
4.3.2. Дендритске ћелије промовишу експанзију Treg ћелија и подижу серумску концентрацију имуносупресивног кинуренина који игра кључну улогу у регенерацији слузнице црева код мишева соја BALB/c у моделу DSS колитиса.....	61
4.4. Инхибиција ензимске активности IDO-а, смањује експанзију Treg лимфоцита и онемогућава регенерацију слузнице црева оболелих мишева.....	66
4.5. Дендритске ћелије активношћу IDO-а индукују експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита што је одлучујуће за регенерацију слузнице црева BALB/c мишева у моделу колитиса изазваног DSS-ом .	70
4.6. Фази ремисије и регенерације слузнице црева у људи оболелих од улцерозног колитиса карактеришу веће концентрације кинуренина и у серумима и у фецесима.....	74
4.7. Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних Treg лимфоцита у сузници колона оболелих од улцерозног колитиса који су у фази ремисије болести .....	82
4.8. Мања концентрација кинуренина и веће концентрације инфламацијских цитокина измерене су у сулкусним течностима оболелих од улцерозног колитиса у поређењу са здравим особама .....	87
4.9. Интраперитонеална апликација мезенхималних матичних ћелија мишевима соја C57BL/6 смањује све клиничке, биохемијке и хистолошке параметре колитиса изазваног DSS-ом .....	91
4.10. Примена MSCs код оболелих мишева значајно смањује и концентрацију проинфламацијских цитокина у серуму .....	94
4.11. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује број инфламацијских дендритских ћелија и макрофага у зиду црева .....	95
4.12. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује процентуални удео инфламацијских CD4+ ћелија, а повећава проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји .....	97
4.13. MSCs повећава имуномодулацијски капацитет аплицираних DCs .....	98

4.14. Интраперитонеална апликација мезенхимских матичних ћелија BALBc мишева погоршава колитис мишева истог соја.....	101
4.15. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно повећава процентуални удео инфламацијских макрофага, а смањује проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји .....	103
4.16. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно смањује проценат толерогених дендритких ћелија које продукују IL-10.....	105
4.17. Из ламине проприје оболелих BALBc мишева након третмана MSC детектован је знатно већи проценат инфламацијских CD4+ Т лимфоцита .....	108
4.18. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике у клиничким и хистолошким скоровима између оболелих C57BL/6 и BALB/c којима су апликоване MSCs .....	110
5. ДИСКУСИЈА .....	113
5.1. У колитису изазваном DSS-ом, IDO регулише интеракцију DCs и Treg ћелија у ламини проприји црева .....	113
5.2. Концентрација кинуренина у серуму, фецесу и сулкусној течности: потенцијално нов прогностички параметар код оболелих од улцерозног колитиса.....	115
5.2.1. Одређивање концентрације кинуренина у серуму и фецесу може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса.....	115
5.2.2. Одређивање концентрације кинуренина у сулкусној течности може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса.....	117
5.3. Утицај IDO/кинуренин сигналног пута на терапијске ефекте MSCs у модулацији колитиса индукованог DSS-ом .....	118
6. ЗАКЉУЧАК.....	120
РЕФЕРЕНЦЕ .....	122
Биографија.....	147
Библиографија .....	148
КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	149
Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације .....	160

# 1. УВОД

Назив инфламацијска болест црева је први пут употребљен 1875. године (1). Упркос несумњивом значају и континуираним истраживачким напорима ни до данас у потпуности нису разјашњени ни етиологија ни сви патогенетски механизми улцерозног колитиса и Кронове болести. Последњих деценија нагомилала су се знања о етиологији и патогенези инфламацијских болести црева као и о њиховим оралним манифестацијама, али су ти подаци несистематизовани и често контрадикторни. Једна од највећих недоумица се односи на улогу аминокиселине триптофана и њених метаболита, као и на значај ензима индоламин 2,3 деоксигеназе (енгл. *Indoleamine-2,3-Dioxygenase*, IDO) у развоју улцерозног колитиса и у настанку оралних манифестација ове болести.

Због тога су у овој студији анализирани молекулски механизми који су одговорни за IDO-зависну модулацију улцерозног колитиса људи и регенерацију оболеле слузнице црева мипева којима је колитис изазван применом декстран натријум сулфатом (енгл. *Dextran Sodium Sulfate*, DSS). Овај део истраживања је обављен на моделу болести изазване у два различита соја мишева: C57BL/6 и BALB/c како би се утврдио значај IDO-а за сојне разлике у прогресији колитиса које постоје између ових животиња (2). Други део истраживања, обављен на хуманом материјалу, бави се екстраполацијом резултата добијених у мишјем моделу на болест људи и то како на њене манифестације у колону тако и на промене које се региструју у усној дупљи оболелих од улцерозног колитиса, са циљем да се утврди могућа примена IDO-а у постављању дијагнозе и праћењу ефеката терапије улцерозног колитиса.

С' друге стране, могућност модулације улцерозног колитиса, мезенхимским матичним ћелијама (енгл. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) представља потенцијално нов терапијски приступ у лечењу ове болести. MSCs, IDO-зависним механизмом, супримирају инфламацију и поспешују регенерацију оболелих ткива и органа (3). У складу са тим, у овој студији анализиран је и значај IDO-а за терапијске ефекте MSCs у модулацији колитиса изазваног DSS-ом.

## 1.1. Улцерозни колитис

*Colitis ulcerosa* (енгл. *Ulcerative Colitis*, UC) је идиопатско, инфламацијско обољење хроничног тока са фазама егзацербације и ремисије (4). Најчешће су почетне промене ограничене на ректум да би даљом прогресијом болести биле захваћене и проксималне партије колона (5). Инфламација најчешће захвата читаву дужину дебелог црева (*pancolitis*) (5). У ретким случајевима се јавља и сегментна инфламација (*proctitis*, *proctosigmoiditis*) (6). Обимне и ретке столице, ректално крварење, грчеви у стомаку, прогресиван губитак перисталтике, су пратећи симптоми оболелих од улцерозног колитиса (6). Због хроничног карактера болести и честих егзацербација поремећено је опште стање пацијента, па су оболели малаксали, анемични, а због малапсорпције и потхрањени са хиповитаминозама и дисбалансом електролита (5). UC је често удружен са спондилитисом, склерозирајућим холангитисом, нодозном пиодермијом и еритемом као и реуматоидним артритисом (7, 8).

Честе компликације су крварења и анемије, токсични мегаколон, стриктуре и перфорације црева (9). Након десет година од настанка првих симптома колитиса, ризик за настанак колоректалног карцинома значајно расте (10).

Дијагноза UC-а се поставља на основу анамнезе, клиничке слике, лабораторијских анализа, радиолошког и ендоскопског налаза и биоптата црева (11). У активној фази болести убрзана је седиментација, повећане су концентрације C-реактивног протеина (енгл. *C-Reactive Protein*, CRP), фибриногена и хепатичних ензима у серуму, а често постоји и хипоалбуминемија (12). Хематолошка испитивања потврђују тромбоцитозу, леукоцитозу и анемију (12). Златни стандард за дијагнозу представљају ендоскопски и патохистолошки налази у биоптату (12). За адекватно постављање дијагнозе UC неопходно је урадити проктосигмоидоскопију и/или колоноскопију (12). Колонскопски налаз код здравих пацијената подразумева слузницу која је сјајна, влажна, а крвни судови су јасно оцртани (13). Ендоскопске промене у инципијентној фази UC су едем, хиперемија слузнице и збрисани васкуларни цртеж (13). У даљем току болести слузница колона постаје гранулирана, истањена и склона крварењу (13, 14). Присуство улцерација, стриктура и псеудополипа су показатељи унапредовале болести (13, 14). Мукоза између улкуса није здрава већ увек показује запаљенске промене (13, 14). У фази ремисије слузница црева је равна и исхемична (14).

Улцерозни колитис почиње да се манифестује између тридесете и четрдесете године, мада је број педијатријских пацијената у сталном порасту док је заступљеност међу половима једнака (15, 16, 17). Инциденца и преваленца УС-а су у сталном порасту широм света. Инциденца је највиша у Европи: (24,3 оболела на 100 000), Канади (19,2 оболела на 100 000) и Аустралији (17,4 оболела на 100 000) (9). Преваленца у Европи (505 оболелих на 100 000), Канади (248 оболелих на 100 000) и САД (214 оболелих на 100 000) (14). Разлике у учесталости УС постоје између становника Западне и Северне Европе где се уочава већа учесталост у поређењу са земљама Источне Европе (18).

### **1.1.1. Имунопатогенеза улцерозног колитиса**

Улцерозни колитис је обољење мултифакторског карактера (19). Познато је да су главни етиолошки фактори за развој УС-а: генска предиспозиција, интегритет цревне мукозе, микробиом домаћина, модалитети и ефикасност имунског одговора домаћина и многи фактори средине (19-24). У имунопатогенези учествују ћелије урођене и стечене имуности, епителне ћелије и коменсална микрофлора (20-24).

Између 8 и 14% оболелих пријављује сличну симптоматологију код крвних сродника док рођаци првог колена имају четири пута већи ризик од настанка болести (25, 26). До данас је идентификовано преко 200 генских локуса чија измењена функција и/или састав могу да мењају функције епителне баријере или модалитет и снагу имунског одговора (активација Т ћелија, диферентовање Th17 ћелија, регулација Т и В ћелија) (27, 28).

Епителна баријера се убраја у прву линију урођене имунске одбране (29). Пехарасте ћелије продукују муцин који прекрива апикалне делове епителних ћелија (29). Смањена количина излученог муцина је један од узрока веће пропустљивости епитела што омогућује продор бактерија и њихову интеракцију са епителом црева (29). Протеазе бактерија даље оштећују епителни слој и омогућавају продор микроорганизама у дубље слојеве (29). Овакво оштећења епитела повећава пермеабилност па бактерије продиру у субепител што за последицу има активацију механизма урођене имуности преко TLR-рецептора (*engl. Toll-like receptors*, рецептори слични толу) (30). У ћелијама урођене имуности- макрофаги и дендритске ћелије (*енгл. Dendritic cells, DCs*) се након препознавања молекулских образаца покреће сигнални пут NF-κB чиме започиње транскрипција гена за синтезу проинфламацијских цитокина: Фактора некрозе

туморских ћелија- $\alpha$  (енгл. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), Интерферона- $\gamma$  (енгл. *Interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ), IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23 (енгл. *Interleukin*, IL) (31).

Велики број макрофага локализованих у ламини проприји активира се антигенима бактерија које су продрле кроз оболелу слузницу и након активације, развијају инфламацијски M1 фенотип кога карактерише повећана секреција проинфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23) и хемокина (CXCL9 и CXCL10). Ови медијатори запаљења индукују настанак Th1 и Th17 имунског одговора и поспешују инфлукс ефекторски Th1 и Th17 ћелија у оболело ткиво (32-34). IL-6 којег у највећој мери излучују макрофаге у току акутне фазе имунског одговора, у активираним Т лимфоцитима покреће сигнални пут STAT3 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, STAT3) што повећава експресију гена за продукцију антиапоптоских молекула: Bcl-2 и Bcl-xL, који не дозвољавају улазак активираних Т лимфоцита у апоптозу чиме доприносе развоју хроничне форме болести (35, 36). Поред тога, макрофаги могу да секретују и протеазе, реактивни азот и кисеоник којима директно оштећују слузницу црева (34).

DCs су спона између урођене и стечене имуности (33, 37). Након преузимања антигена ове активирание ћелије лимфним путевима доспевају до лимфног чвора где презентују антиген Т лимфоцитима (33, 37). DCs поседују TLRs, који препознају уобичајне макромолекуле, и NLRs (енгл. *NOD-like Receptors*), који су задужени за препознавање интра- и екстра- целуларних патогена (33, 37, 38). С' обзиром да је пермеабилност интестиналне мукозе повећана, антигени који продру у дубље слојеве црева активираће ту присутне DCs које ће даље појачано узорковати антигене из лумена (33, 37). У активацији, поларизацији и матурацији DCs главну улогу игра липополисахарид (LPS) који се повезује са TLR4 (33, 37). Једна од последица овог препознавања је синтеза и продукције IL-12 што поларизује имунски одговор у правцу Th1. Уз то, DCs секретују и друге проинфламацијске цитокине и хемокине који омогућују инфлукс неутрофила у ткиво и активацију других имунских ћелија (33, 37).

Након преузимања антигена и миграције у периферне лимфне чворове антиген презентујуће ћелије (енгл. *Antigen Presenting Cells*, APCs) активирају Т лимфоците специфичне за пептиде протеинских антигена фагоцитованих бактерија (33). Активирани Т лимфоцити пролиферишу и диферентују у ефекторске и/или регулацијске лимфоците (33, 39). Дисбаланс у корист ефекторских Т лимфоцита омогућује наставак започете инфламације (32, 39). Неадекватан имунски одговор Т лимфоцита којима је продужен век трајања због активације сигналног пута STAT3, а продукција

проинфламацијских цитокина потстакнута, индукује, потпомаже и одржава инфламацију (32-36). Поред цитокина повећана је и продукција реактивног кисеоника, азота и хемокина који подстичу инфламацијску каскаду (4, 40). Тип доминантног инфламацијског одговора ће детерминисати даљи ток и симптоме болести (41, 42).

Диферентовање наивних Т лимфоцита у ефекторске, а тиме и поларизација имунског одговора се може одвијати у неколико праваца: Th1, Th2 и Th17 што ће зависити пре свега од поларизације урођеног имунског одговора односно од цитокина које синетеишу и излучују APCs, што на почетку и концу зависи од природе патогена који је покренуо реакцију али и од природе узоркованих пептида (42- 44). У први мах се сматрало да је улцерозни колитис превасходно обољење које карактерише дисбаланс између Th1 и Th2 субсета ефекторских лимфоцита, међутим у последње време великим бројем истраживања је указано на значај Th17 ћелија у патогенези ове болести (44).

Активирани CD4+Т лимфоцити диферентују се у ефекторске и/или регулацијске Т лимфоците (33). Дисбаланс између регулацијских и ефекторских води у инфламацију (39). Т помагачки лимфоцити индукују даљи имунски одговор и у зависности од цитокинског репертоара које продукују могу се поделити на Th1, Th2 и Th17 ћелије (42-44). Оне продукују разноврсни миље цитокина као што су IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23, IL-6, IL-2. APC продукцијом IL-12 активирају пут STAT4 при чему се Т наивне ћелије диферентују у Th1 лимфоците које карактерише продукција IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  (45-47). Присуство ових ћелија у инфилтратима субмукозе је показатељ узнапредовале болести (48).

IL-4 активира сигнални пут STAT6 у наивним лимфоцитима након чега долази до њихове поларизације у правцу ефекторских Th2 лимфоцита (49). Цитокини који карактеришу овај субсет лимфоцита су IL-4, IL-5, IL-13 (49). IL-5 подстиче сазревање еозинофила и регрутује их на место инфламације (49). Број активираних еозинофила у позитивној је корелацији са тежином болести (50). Еозинофили директно оштећују мукозу и повећавају пермеабилност мукозе ослобађањем главног базног протеина (енгл. *Major Basic Protein*, MBP) (50).

Под дејством IL-6 и IL-23, које продукују APC, активира се пут Jak-STAT при чему се наивни Т лимфоцити након преписивања транскрипционог фактора STAT3 диферентују у субсет Th17 лимфоцита, које карактерише продукција цитокина: IL17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$  и IL-23 (42, 51). Th17 лимфоцити након продукције TNF- $\alpha$  потенцирају активацију, сазревање и миграцију неутрофила (52). Инфилтрат неутрофила у цревима представља један од главних хистопатолошких обележја улцерозног колитиса (53).



Неутрофили оштећују епителне ћелије црева и имају важну улогу и у акутној и у хроничној фази болести (53, 54). Продукцијом реактивних кисеоничних једињења (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS), серин протеаза, металопротеиназа и мијелопероксидаза, неутрофили узрокују ерозије, абсцесе и оштећења епителне баријере црева (54).

### **1.1.2. Орални знаци и манифестације улцерозног колитиса**

Оралне манифестације и орални знаци улцерозног колитиса изучавани су у малом броју студија (55). Оралним знацима се сматрају: вегетацијски пиостоматитис (*pyostomatitis vegetans*), афтозне улцерације, обложен језик и пародонтопатија док су симптоми непријатан задах (*halitosis*) и поремећено чуло укуса (55). С' обзиром да се оралним манифестацијама није придавао велики значај није потпуно разјашњено да ли су оне последица болести или терапије (55, 56). Оралне манифестације су чешће и озбиљније у поодмаклим стадијумима болести (56). У акутној фази улцерозног колитиса преко 50% пацијената има непријатан задах (57).

Вегетацијски пиостоматитис је ретка појава код здравих, а веома је чест код оболелих од улцерозног колитиса (58). Ове лезије се уочавају као мултипле беле и жуте буле које због динамике оралне средине брзо пуцају и ерозирају (59). Хистолошки се уочава еозинофилни и неутрофилни инфилтрат (59, 60). Најчешће захватају тврдо и меко непце, букалну мукозу, вестибуларну површину гингиве, а најређе се детектују на поду усне дупље и језику (61, 62). Три пута чешће се региструје код мушкараца (61, 63).

Афтозне улцерације су најчешћа орална манифестација улцерозног колитиса (64). Појава улцерација може и не мора да прати акутизацију болести и за оболеле су болне и нелагодне (64). Обично трају око две недеље (65).

Оболели од улцерозног колитиса у односу на здраве испитанике чешће показују знаке пародонтопатије (66). Праћењем дубине пародонталних џепова и губитка епителног припоја зуба, установљено је да оболели од улцерозног колитиса чешће обољевају од пародонтопатије него оболели од Кронове болести (66, 67). Истраживањима је показано да оболели чешће показују симптоме пародонтопатије која је генерализована док је инфламација мањег интензитета у односу на испитанике који је немају улцерозни колитис (68).

Студијама је показано да преко 50% оболелих имају непријатан задах у односу на здраве испитанике (56, 57). Око 20% оболелих пријављује поремећено чуло укуса, док пацијенти који имају панколитис имају кисео укус у устима (56).

## **1.2. Мишији колитис индукован декстран натријум сулфатом (*Dextran Sodium Sulphate-DSS*): експериментални модел улцерозног колитиса**

Постоји неколико експерименталних модела колитиса. Уз сва ограничења, која зависе од сличности и разлика са патогенезом и клиничким манифестацијама улцерозног колитиса људи, ови модели су пружили значајне информације о етиологији и патогенези улцерозног колитиса. Експериментални модели се могу поделити на: спонтано настале, индуковане, пренете адоптивним трансфером, настале генском манипулацијом (69-71). Чини се да су најпогоднији они експериментални модели у којима се колитис индукује хемијски зато што се болест брзо и једноставно изазива, а њен почетак, трајање и клинички ток који подразумева средње тешку инфламацију омогућују лако праћење и једноставну контролу и манипулацију процеса (72). У њих се између осталих убрајају и индукције колитиса: декстран натријумовим сулфатом (енгл. *Dextran Sulphate Sodium*, DSS), оксазолоном, ди- и три- нитробензен сулфонском киселином, сирћетном киселином, карагинаном и јодоацетатамидом (72).

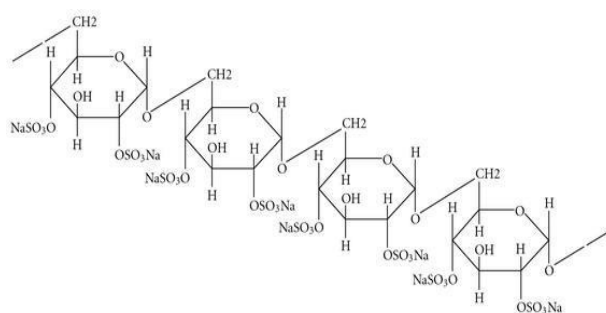
Део експерименталних резултата приказаних у овој дисертацији, добијен је у моделу мишијег колитиса индукованог DSS-ом.

### **1.2.1. Декстран натријум сулфат (DSS)**

Декстран је разгранати глукан (полисахарид састављен од молекула глукозе) у облику ланаца који могу бити различите дужине (од неколико до преко 2000kDa) којег је, као продукт микроорганизама укључених у ферментацију вина, открио Луј Пастер (*Louis Pasteur*) 1861 године (73, 74). Основни прави ланац чине глукозне јединице међусобно повезане  $\alpha$ -1,6 гликозидним везама, а гранање ланца започиње  $\alpha$ -1,3 повезивањем (74). Може се синтетисати из сахарозе уз помоћ бактерија *Leuconostoc spp* (*Leuconostoc mesenteroides*) и *Streptococcus spp* (*Streptococcus mutans*), а занимљиво је да је и зубни плак богат декстранима (74).

DSS је дериват декстрана који се добија естерификацијом декстрана хлорсумпорном киселином. Тако се добијају полианјонска једињења веома различитих молекулских маса: 5-1400 kDa (Слика 1), при чему се зна да су за изазивање колитиса најпогодније фракције молекулске масе између 40-60kDa у којима је сумпор заступљен са 16-20% (75). Сумпор је садржан у две сулфатне групе по глукозним резидуима и чини 17% масе молекула (75). DSS је бели пудер лако растворљив у води (100mg/ml) (75).

1985. године је први пут је описан колитис хрчака изазван применом DSS (76). Касније је DSS коришћен и за индукцију колитиса мишева (77) и данас је најчешће коришћени модел ове болести.



**Слика 1. Хемијска структура декстран натријум сулфата.** Декстран натријум сулфат је полианјонски дериват декстрана различите молекулске масе, а добијен је естерификацијом са хлорсумпорном киселином.

DSS се везује за мембране ендозома па се тако мале количине овог молекула већ првог дана администрације региструју у макрофагима лимфног ткива зида дебелог црева, мезентеричних лимфних чворова и у Купферовим ћелијама (78). У макрофагима јетре агенс је присутан и осам дана након уношења, али се не региструје у срчаном мишићу, CNS-у и плућима. Излучује се како фецесом тако и урином (78).

### 1.2.2. Индукција колитиса DSS-ом

Чини се да је за индукцију колитиса, као уосталом и за изазивање карцинима колона, врло важна молекулска маса DSS-а (79, 80). DSS-ом могу да се изазову и акутни и хронични колитис, што углавном зависи од примењене концентрације раствора, дужине и учесталости администрације DSS-а (77).

За индукцију акутног колитиса користи се седмодневно појење мишева раствором 2-5%

DSS-a у води за пиће (75, 77, 81, 82). Хронични колитис се изазива континуираном администрацијом 1-2% DSS-a са водом за пиће у дужем периоду времена (75, 77, 83, 84).

### **1.2.3. Клинички параметри и хистолошка слика колитиса изазваног DSS-ом**

Клиничка слика и хистопатолошки параметри у мишјем моделу подражавају карактеристике улцерозног колитиса код људи. Тако су акутне клиничке манифестације: губитак телесне масе, дијареја, окултна крварења, напострешена длака, анемија а може наступити и смртни исход (85). На хистолошким препаратима се могу уочити: губитак муцина, дегенерација и некроза епителних ћелија да би се нешто касније регистровала инфилтрација ламине проприје и субмукозе неутрофилима што се обично карактерише као криптитис па и апсцес крипти (2).

### **1.2.4. Патогенеза DSS колитиса**

Тачан механизам којим DSS иницира колитис није до краја разјашњен. DSS повећава пропустљивост мукозе дебелог црева за велике молекуле укључивши и сам DSS. Тако се првог дана по почетку аплицирања DSS-a уочава губитак неких компоненти чврстих веза *zonulae occludens-1* које прати појачана експресија гена и синтеза инфламацијских цитокина (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , и IL-12) у зиду црева (86-90). Други механизам, који не искључује првопоменути варијанту, заснива се на директним токсичким ефектима DSS-a на ћелије мукозе колона, у прилог чега говоре и промене интегрин- $\alpha 4$  и субјединице M290 исказаних на епителним ћелијама, што за последицу има ометање па и прекид интеракције ових ћелија са интраепителним  $\gamma\delta T$  лимфоцитима (91). Иако се мисли да  $\gamma\delta T$  лимфоцити присутни у епителу црева учествују у очувању и зарастању мукозе, улога ових ћелија у патогенези експерименталног колитиса ипак није позната (92). Не може се занемарити ни улога бактерија у патогенези болести поготово у светлу чињеница да примена метронидазола и ципрофлоксацина ублажава симптоме и хистолошку слику акутног експерименталног колитиса, а не мења параметре хроничног обољења у мишева (93). Ипак, тачна улога ових бактерија није ни издалека јасна, нарочито остаје збуњујуће да обескличени мишеви гајени по стерилним каутелама и појени раствором DSS-a задобијају тежак колитис који се ублажава када се апликују антигени пореклом из

бактерија које чине нормалну флору црева (93, 94).

Врло је важно знати да Т лимфоцити ( $CD4^+$  и  $CD8^+$ ) изгледа не играју битну улогу у индукцији акутног колитиса што се закључује из следећих чињеница: у слузници црева се запажа смањење броја  $CD8^+$  Т лимфоцита док је присуство  $CD4^+$  Т лимфоцита непромењено током акутног колитиса и то како код BALB/c тако и код C57BL/6 мишева (95); експериментални DSS колитис се може развити и у SCID (енгл. *Severe Combined Immunodeficient*) као и  $CD4^+$  дефицијентних, NK (енгл. *Natural Killer cells*)-дефицијентних и атимичних CD-1 мишева (енгл. *Nude mice*) (96, 97).

### 1.2.5. Ћелије урођене имуности у патогенези акутног DSS колитиса

У патогенези акутног колитиса изазваног DSS-ом учествују DCs, макрофаги, NK и NKT ћелије, неутрофили, еозинофили и мастоцити (98).

Новији експериментални подаци јасно показују да су макрофаги врло важни у индукцији акутног колитиса (99). DSS се врло брзо везује за мембране ендозома фагоцитних ћелија, што индукује активацију инфлазома NLRP3 (енгл. *NOD-like receptor- NLR family, pyrin domain containing 3*, NLRP3). Активација NLRP3 инфлазома индукује синтезу инфламацијских цитокина: IL-1 $\beta$  и IL-18 који су су кључни медијатори инфламације у DSS колитису (100). У даљем току NLRP3 узрокује и синтезу реактивних кисеоничних једињења (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROSs) у одговору на DSS (101-104). DSS у макрофагама појачава и експресију индуцибилне синтетазе азот монооксида (енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS) па ће тако и ослобођени азот монооксида (енгл. *Nitrogen Oxide*, NO) учествовати у развоју оштећења током индукције колитиса DSS-ом (105).

Токсичко оштећење епитела дебелог црева, осим што омогућује улазак DSS-а у субепителну зону и активацију макрофага, уклања и баријеру за инвазију бактерија из лумена у субепително ткиво у којем се везују за TLRs исказане на DCs и тако активира ове ћелије па и оне ослобађају инфламацијске цитокине (IL-12, TNF- $\alpha$ ) као и хемотактичке цитокине MIP-1 $\alpha$  (енгл. *Macrophage Inflammatory Protein-1  $\alpha$* , MIP-1 $\alpha$ ), MCP-1 (енгл. *Monocyte Chemotactic Protein*, MCP-1), CXCL1/KC и CCL11 (енгл. *Keratinocyte-derived Chemokine*, CXCL1/KC; CCL11) (106, 107). Секреција поменутих хемотактичких супстанци прикупља неутрофиле, макрофаге и еозинофиле на место уласка бактерија у субепител колона (105, 106, 107, 108, 109). Посебно битну улогу у

фагоцитози продрлих интестиналних бактерија играју неутрофили који, ослобађањем цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6) и ROS, доприносе развоју инфламације, резултирајући тешким оштећењем зида дебелог црева (108-110).

И *in vitro* и *in vivo* је показано да НК ћелије имају заштитну улогу у овако изазваном колитису и то тако што смањују регрутацију и функцију неутрофила, при чему мењају поларизацију и цитокински профил након директног контакта ћелија-ћелија преко инхибиторног рецептора NKG2A (111).

Мастоцити и еозинофили такође имају важну улогу у развоју колитиса (111-115). Мастоцити продукују хистамин, триптазе и TNF- $\alpha$  чиме омогућују већи улазак неутрофилних леукоцита и осталих ћелија запаљења у ткиво колона (112).

Еозинофили ослобађају пероксидазу и катјонске протеине чијом активношћу утичу на оштећење слузнице црева, доприносећи прогресији колитиса (113, 114, 115).

NKT ћелија имају протективну улогу у DSS колитиса (117, 118). Коадминистрација DSS-а и  $\alpha$ -галактоцерамида ( $\alpha$ -GalCer), активатора NKT ћелија, ублажава клиничку слику, успорава развој болести и смањује оштећење ткива (116). NKT су издашан извор анти-запаљењских цитокина (TGF- $\beta$  и IL-10). Па тако адоптивно трансферисање NKT ћелија претходно третираних  $\alpha$ -GalCer-ом ублажава симптоме болести (115, 116 117).

### **1.2.6. Цитокини у патогенези колитиса изазваног DSS-ом**

DSS узрокује повећавану експресију IL-1 $\beta$ , IL-12 и TNF- $\alpha$  (117). Запажају се повећане концентрације TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-6 као и IL-1 $\beta$ , у акутној фази улцерозног колитиса код људи, а постоји и позитивна корелација између концентрације ових цитокина и тежине болести (118-121). У самом запаљеном ткиву, поред поменутих цитокина, повећава се експресија гена и секреција IFN- $\gamma$  и IL-4 (121, 122).

### 1.3. Индоламин 2,3 деоксигеназа у улцерозном колитису

Триптофан је есенциална аминокиселина која има више важних структурних и функционалних улога у гастроинтестиналном тракту (123). Неопходан је за стабилност ћелијске мембране и везивање протеина за њен фосфолипидни двослој, јер у великом проценту изграђује трансмембранске домене (123). Поред тога, триптофан је прекурсор серотонина (*5-hydroxytryptamine*, 5-НТ), мелатонина и ниацина (123). Сисари га не синтетишу па је неопходно да га унесе исхраном (124-126). Млеко, сир, црвено месо, јаја, риба су намирнице богате триптофаном (124). После варења, триптофан апсорбује епителне ћелије црева, након чега се транспортује крвотоком (124-126). Зависно од функције и метаболизма, поједине ћелије имају различите потребе за триптофаном, па је апсорпција и дистрибуција триптофана строго контролисан процес (124-126).

Натријум зависни трансмембрански протеини који су експримирани на апикалној површини ентероцита регулишу апсорпцију триптофана који показује најмањи афинитет према овим протеинима (125, 126).

Триптофан се метаболише на три начина (122). Може се под дејством микробиома трансформисати у лиганд хидроугљеничног арил рецептора (AhR), који мења функције епителне баријере црева и регулише имунску хомеостазу у цревима (122). Осим тога триптофан хидроксилаза регулише продукцију серотонина из триптофана, а IDO разграђује триптофан кинуренинским путем (122). Метаболити триптофана имају важну улогу у регулацији функција епителних ћелија и очувању њихове вијабилности као и у модулацији имунског одговора у гастроинтестиналном тракту (122).

IDO у својој грађи садржи хем (127). Триптофан се под дејством IDO-а конвертује у N-формилкинуренин након чега се спонтано разлаже на активне метаболите као што су 3-хидроксикинуренин (3-НК), антранилну киселину, кинуренинску киселину (3-НАА), пиколинску и хинолонску киселину (QA) која је уједно и прекурсор никотинамид аденин динуклеотида (NAD<sup>+</sup>) (126). Продукти кинуренинског пута NAD<sup>+</sup> и аденозин три фосфат (АТФ) учествују у стварању енергије за ћелијски метаболизам, па је IDO/кинуренински пут битан за вијабилност и пролиферацију ћелија (126). IDO се продукује у више ћелијских типова и органа укључујући и гастроинтестинални тракт (127-131). Епителне ћелије, фибробласти, мезенхимске матичне ћелије као и имунске ћелије продукују IDO (130). Највећа активност овог ензима забележена је у дендритским

ћелијама, макрофагима, В лимфоцитима, NK ћелијама, активираним моноцитима, гранулоцитима (129-132).

Поред катаболизма триптофана, IDO је важан молекул за пренос сигнала (133). IDO поседује два инхибиторна рецепторска мотива (ITIMs), који након фосфорилације делују као места за везивање различитих молекула, при чему се активира позитивна (транскрипција) или негативна (посттранслациона) модулација IDO-а (133). Молекулски шаблони који продужавају време полуживота IDO-а одржавају имуносупресију док молекули који скраћују време полуживота IDO-а анулирају имуносупресивне ефекте и промовишу инфламацију (133).

Код људи, поред IDO-а, у појединим ткивима метаболизам триптофана катализују и IDO2 и триптофан 2,3 диоксигеназу (TDO) (129). TDO се продукује у јетри где контролише концентрацију триптофана док је IDO2 детектован у плаценти (129, 131).

*Pefefferkorn* је први показао имуномодулацијске ефекте IDO-а демонстрирајући да рекомбинантни IFN- $\gamma$  инхибира раст *Toxoplasmae gondi* у фибробластима домаћина после разградње триптофана (134). Акумулација токсичних метаболита кинуренина (3-НК, QA, 3-НАА) ограничила је раст овог интрацелуларног паразита, чиме је показан значај IFN- $\gamma$  у активацији IDO/кинуренинског пута (134). Након везивања IFN- $\gamma$  за свој рецептор долази до активације Јанус киназа (Jak1 и Jak2), што омогућује фосфорилацију и димеризацију преносника сигнала и активације транскрипције (STAT1), који након уласка у једро индукује преписивање гена за IFN- $\gamma$  (134, 135). IFN- $\gamma$  је најпотентнији активатор IDO-а (134, 135).

### 1.3.1. Имуномодулација IDO/кинуренинским путем

У првим студијама повећана активност IDO-а, која узрокује акумулацију кинуренина, посматрана је само као важан механизам ћелијског метаболизма због утицаја на продукцију NAD<sup>+</sup> и АТР-а (135, 136). Међутим, велики број експерименталних студија је затим показао да IDO доводи до локалне деплеције триптофана и “изгладњивања” ћелије док метаболити као што су 3-НАА, KYNA, QA и 3-НК директно инхибирају пролиферацију активираних Т и В лимфоцита што супримира стечени имунски одговор (137-139). Посебно је занимљива чињеница да су на апоптозу која је индукована IDO/кинуренинским путем посебно осетљиви Th1 лимфоцити које продукују IFN- $\gamma$  у



поређењу са Th2 лимфоцитима који продукују IL-4 па тако кинуренин селективно уводи у апоптозу Th1 лимфоците посредством Fas лиганда што активацијом каспазе-8 ослобађа цитохром C из митохондрија (140). С обзиром да су Th1 лимфоцити главни извор IFN- $\gamma$  могуће је да се њиховим селективним усмрћивањем одржава баланс између Th1 и Th2 ћелија (140).

IDO је круцијалан у комуникацији између DCs и наивних Т лимфоцита јер DCs појачаном продукцијом IDO-а стварају кинуренин што промовише стварање и експанзију Т регулаторних лимфоцита (Treg) и на тај начин индукују и одржавају имунску толеранцију (141, 142). Наиме, кинуренин промовише експресију транскрипционог фактора FoxP3 (*Forkhead box P3*, FoxP3) који опредељује наивне CD4+ Т лимфоците ка имуносупресивним CD4+FoxP3+Treg лимфоцитима (135, 140, 142).

Током иницијалне активације мирујућих Treg путем Т ћелијског рецептора (TCR) сигнали пренети протеин киназом В (PKB/Akt) и путем mTOR (енгл. *mammalian Target of Rapamycin*) могу да дестабилизују имуносупресивни фенотип ових ћелија и да их репрограмирају у инфламацијске Т ћелије (139, 143, 144). Ниске концентрације триптофана у локалној средини активирају путеве стреса укључујући GCN2 киназе чиме се супримирају сигнални путеви Akt/mTOR2 (143). На сличан начин повишена активност IDO-а активацијом GCN2 киназа делује на  $\zeta$  ланце TCR комплекса активираних цитотоксичних CD8+Т лимфоцита, чиме се омета њихова активација и цитотоксичност (139, 144).

Поред директног имуносупресивног ефекта на активиране Т ћелије, IDO учествује и у интраћелијској сигнализацији када одржава регулацијски фенотип плазмоцитоидних DCs (pDCs) (145). Ове ћелије су битан извор IFN-тип 1, који су способни да покрену експресију гена за продукцију IDO-а што као последицу има експанзију Treg лимфоцита (145). Овај процес је делом регулисан активацијом AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) (133, 146). Након што IDO деплетира триптофан, метаболити кинуренинског пута се понашају као лиганди за AhR што доводи до његове транслокације у једро. У једру AhR индукује транскрипцију циљаних гена међу којима је и FoxP3 што резултира генерисањем FoxP3+Treg лимфоцита (133, 146, 147).

Поред генерисања нових Treg лимфоцита, IDO/кинуренинским путем конвертују се инфламацијски CD4+Т лимфоцити у Treg (148). Имуномодулаторне DCs стимулисане TGF- $\beta$  формирају интраћелијски скафолд за који се везује Src хомологи регион са два фосфатазна домена (енгл. *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) који дефосфорилишу протеине у трансдукционој каскади CD4+Т лимфоцита и конвертује их

у имуносупресиве Treg лимфоците (148). У лимфним чворовима IDO онемогућава конверзију FoxP3+Treg у Th17 лимфоците (које би продуковале IL-17) што резултира акумулацијом Treg у периферном ткиву (141, 148). Treg продукују IL-10, TGF- $\beta$  па долази до супресије Th1 (IFN- $\gamma$ ) и Th17 (IL-17+) ћелија (141).

IDO поред модулације стеченог имунског одговора, модулира и урођену имуност (149). IDO промовише конверзију инфламацијских M1 у алтернативно активираних M2 макрофаге који продукују IL-10 и TGF- $\beta$  (149). Метаболити кинуренинског пута активирају Akt и MAPK киназе p38 сигналног пута у мастоцитима при чему се ослобађају леукотријени и простагландини међу којима је и PGE2 који је нарочито битан за супресију цитотоксичних NK ћелија (149).

### **1.3.2. Модулација имунског одговора IDO/кинуренинским путем у улцерозном колитису**

Ћелије које су способне да продукују IDO то чине и кад нема запаљења, да би у току инфламације значајно повећале ову синтезу (150). Код пацијената оболелих од инфламацијских болести црева као и у анималним моделима измерене су значајно веће концентрације IDO-а (141, 150-152). Након фармаколошке инхибиције IDO-а или деплецијом гена за IDO значајно расте морталитет животиња којима је индукован колитис 2,4,6-тринитробензенсулфонском киселином (TNBS) или DSS-ом (141, 150, 151). Повећане серумске концентрације кинуренина прати значајно већи број Treg лимфоцита у колону што доводи до ублажавања инфламације (153). *Wolf* и сарадници су први показали појачану продукцију IDO-а у мононуклеарним ћелијама (CD123+) које инфилтришу субмукозу колона (154). Анализом биоптата слузнице колона пацијената оболелих од UC-а показано је да су CD123+ pDCs главни извор IDO-а који утиче на активираних Т лимфоците и смањује оштећење мукозе (132). Повећана активност IDO-а је забележена и у субпопулацији CD8 $\alpha$ + pDCs, као и другим субпопулацијама CD16+, CD56+, CD80+, CD103+, CD123+ регулацијских pDCs (132). Док су код мишева један од главних извора IDO-а CD103+DCs дотле код људи популација CD123+pDCs која продукује IDO чини 0,2 до 0,8% ћелија периферне крви, које одлазе на место инфламације и индукују толеранцију (132). DCs које продукују IDO експримирају у великој мери TLR7 и TLR9 рецепторе (155). Након симултане активације агонистима TLR7 и TLR9 активирани DCs колона појачано експримирају IDO чиме ублажавају

колитис мишева (155). Сигнални пут IFN- $\gamma$ /STAT-1 је у активираним DCs веома битан за продукцију IDO-а што је показано у STAT-1 дефицијентним мишевима код којих се не бележи активност овог ензима (156). Појачан имунски одговор Th1 повећава концентрације IFN- $\gamma$  и подстиче експресију IDO-а у CD103+ DCs, док појачан имунски одговор Th2, коме је својствена појачана продукција IL-4, инхибира продукцију IDO-а у DCs црева (157). CD123+/IDO+pDCs људи и мишије CD103+/DCs продукују велике количине IDO-а који конвертује ефекторске Th1 и Th17 лимфоците у Treg чиме се ствара имunosупресивна средина у колону (141, 158).

Поред DCs појачана активности IDO-а је детектована и у епителним ћелијама колоне, нарочито на ободима улцерација, што наводи на закључак да IDO има битну улогу и у процесима зарастања оштећене мукозе (159).

Поред описане конверзије активираних инфламацијских лимфоцита IDO има и антимикробни ефекат у колону (159). Пошто се IDO продукује највише у пределима где је епителна баријера оштећена, овај молекул деплецијом триптофана онемогућава размножавање и продор бактерија чија пролиферација зависи од триптофана (159). Поред тога, овај ензим регулише и имунски одговор на коменсалне бактерије (63) и има битну улогу у интеракцији између пробиотских бактерија и имунског система (160, 161). Такође, је у експерименталном моделу колитиса индукованог TNBS-ом показано да *Bifidobacteria* повећава продукцију IDO-а у DCs колоне што за последицу има експанзију Treg лимфоцита и ублажавање колитиса (161).

Недавне студије су показале да су, поред DCs и епителних ћелија, и MSCs значајан извор IDO-а (162, 163).

### **1.3.3. IDO у усној дупљи**

Истраживања су показала да IDO смањује инфламацију и у усној дупљи (164-169). IDO продукују гингивални фибробласти, мезенхимске матичне ћелије гингиве (G-MSCs), мезенхимске матичне ћелије зубне пулпе (DP-MSCs), мезенхимске матичне ћелије периодонталног лигамента (PDL-MSCs) као и DCs које су инфилтрисане ткиво оралних лезија (170). IDO се константно продукује у гингиви људи, а његова експресија расте током хроничне пародонтопатије (170). Експериментално је доказано да бактеријски продукти и инфламацијски цитокини појачавају продукцију IDO-а у пародонталним

лезијама (164-167, 170). Након активације гингивалних фибробласта, G-MSCs, DP-MSCs, PDL-MSCs као и DCs, LPS-ом или IFN- $\gamma$  све ове ћелије продукујуIDO и тако супримирају експанзију инфламацијских CD4+T-bet+IFN- $\gamma$  (Th1) као и CD4+ROR $\gamma$ T+IL-17 (Th17) лимфоцита и конвертују их у Treg лимфоците, стварајући имуносупресивну микросредину (167-170). Матичне ћелије изоловане из периапикалних лезија (PL-MSCs) су способне да, посредствомIDO-а, генеришу толерогени фенотип DCs које, затим, због смањене алостимулацијске активности индукују анергију ефекторских Th1 лимфоцита и експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита (168).

## **1.4. MSCs у терапији улцерозног колитиса**

MSCs, су се у бројним експерименталним и клиничким студијама, показале као потенцијално нов терапијски агенс за модулацију UC-а (171). Сматра се да MSCs поседују велики потенцијал за лечење улцерозног колитиса због способности да се диферентују у епителне ћелије црева, да потенцирају ангиогенезу и најважније, да поседују изразита имуносупресивна својства (172).

### **1.4.1. Диферентовање MSCs у епителне ћелије црева**

Комуникација MSCs са епителним ћелијама црева и са имунским ћелијама битна је за одржавање хомеостазе црева (173).

У *in vivo* експериментима MSCs изоловане из костне сржи су се диферентовале у епителне ћелије у присуству фактора раста кератиноцита (енгл. *Keratinocyte Growth Factor*, KGF), хепатоцита (енгл. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF), епидермалног фактора раста (енгл. *Epidermal Growth Factor*, EGF) и инсулину-сличног фактора раста (енгл. *Insulin-like Growth Factor-II*, IGFII) (174). Уз то, резултати појединих студија указују и да након трасплантације, MSCs попримају особине резидентних ћелија црева фузијом, а не диферентовањем у епителне ћелије (175).

### 1.4.2. Улога MSCs у ангиогенези

MSCs могу да подстакну ангиогенезу продукцијом неколико про-ангиогенетских фактора: Фактор раста васкуларног ендотела- VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*), Базни фактор раста фибробласта- bFGF (енгл. *basic Fibroblast Growth Factor*), Плацентални фактор раста- PGF (енгл. *angiopoietin-1, Placental Growth Factor*), Фактор раста пореклом из тромбоцита- PDGF (енгл. *Platelet-Derived Growth Factor*), TGF- $\beta$ , IL-6, Фактора раста епидермиса- EGF (енгл. *Epidermal Growth Factor*), Фактор раста хепатоцита- HGF (енгл. *Hepatocyte Growth Factor*), Хемотактички протеин моноцита- MCP-1 (енгл. *Monocyte Chemotactic Protein-1*) чиме подстичу пролиферацију функционалних ендотелних ћелија и тако индукују нео-васкуларизацију важну за регенерацију ткива (176). MSCs, култивисане у посебним условима, поседују потенцијал да се диферентују у ендотелне ћелије и да створе капиларну мрежу, како је потврђено *in vitro* и *in vivo* (177, 178).

### 1.4.3. Имуномодулациска својства MSCs

MSCs могу, директним контактом као и продукцијом солубилних медијатора, да утичу на ћелије имунског ситета. MSCs супримирају инфламацијске M1 макрофаге и промовишу њихову конверзију у имуносупресивне M2 ћелије (179). Такође, MSCs супримирају сазревање DCs и мењају њихов цитокински профил тако што инхибирају продукцију проинфламацијских (IFN- $\gamma$ , IL-12), а подстичу продукцију анти-инфламацијских цитокина (IL-10) што резултира супресијом ефекторских функција инфламацијских Т лимфоцита (180). MSCs мењају цитокински профил CD4+Т лимфоцита тако што супримирају синтезу цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-17) својствених Th1 и Th17 лимфоцитима док подстичу продукцију IL-4 и IL-10 карактеристичних за ефекторске Th2 лимфоците (181). MSCs могу да инхибирају пролиферацију Th1 и Th17 ефекторских лимфоцита активацијом PD-1 рецептора, док продукцијом Трансформишућег фактора раста- $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) или IL-10 повећавају инфилтрат Treg лимфоцита у цревима чиме супримирају инфламацију (182). MSCs су познате као потентни извор IDO-а (183, 184). Након стимулације IFN- $\gamma$ , MSCs продукују IDO, при чему инхибирају Т и В ћелијски одговор и инхибирају

цитотоксичност, пролиферацију и продукцију имунопотенцирајућих цитокина NK ћелија (185-192).

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Главни циљ овог истраживања је да се испита улога IDO-а у настанку и развоју улцерозног колитиса и индукцији регенерације оштећене слузнице.

Сагласно овом генералном циљу утврђени су и експериментални захтеви:

1. Испитати молекулске механизме којима IDO подстиче регенерацију мукозе црева код пацијената оболелих од улцерозног колитиса.
2. Испитати могућност одређивања концентрације кинуренина у серуму, фецесу, и сулкусној течности као новог дијагностичког параметра за праћење регенерације слузнице црева код оболелих од улцерозног колитиса.
3. Испитати значај IDO/кинуренин сигналног пута у имуномодулацији улцерозног колитиса мезенхималним матичним ћелијама.

## 3. ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3.1. Пацијенти

У овој студији учествовало је укупно 65 пацијената оболелих од улцерозног колитиса (38 мушкараца и 27 жена), просечне старости 50 година (у опсегу од 23-79 година). Такође, системом случајног одабира у студију су укључене здраве особе као контролна група. 11 мушкараца и 9 жена, просечне старости 48 година (од 25 до 75 година) прегледане су у просторијама Клиничког центра Крагујевац. Оболели од улцерозног колитиса су сврстани у две групе: оболели са прогресивном болешћу и пацијенти са спонтаном регенерацијом слузнице црева, а сврставани су у групе на основу *Мауо* скорa, ендоскопског налаза, хистолошке и клиничке процене (Табела 1) (193, 194).

<p>Фреквенција пражњења црева</p> <p>0- Нормална за пацијента 1- 1 до 2 столице више него уобичајно 2- 3 до 4 столице више него уобичајно 3- преко 5 столица више него уобичајно</p>	<p>Ректално крварење</p> <p>0- Нема крварења 1- Крварење у мање од пола пражњења 2- Свеже крви у већини евакуација 3- Свежа крв приликом свих евакуација</p>
<p>Ендоскопски налаз</p> <p>0- Нормална мукоза, ремисија 1- Блажи облик (енантем, избрисан васкуларни шаблон) 2- Умерен облик болести (изражен енантем, избрисан васкуларни шаблон, крхост слузнице, ерозије) 3- Тежи облик болести ( спонтано крварење, улцерације)</p>	<p>Глобална медицинска процена</p> <p>0- Нормално 1- Благ облик 2- Умерен облик 3- Тежи облик</p>
<p>Скор(поени)</p>	<p>Озбиљност болести</p>
<p>≤2</p>	<p>Клиничка ремисија</p>
<p>3-5</p>	<p>Благ облик</p>
<p>6-10</p>	<p>Средњи облик</p>
<p>11-12</p>	<p>Тежи облик</p>

Табела 1. *Мауо* клинички скор



Колоноскопију је радио један гастроентеролог док су процену стања болести и скорирање, независно један од другог процењивала два гастстроентеролога. Оболели који су *Mayo* скором, од оцене 3 или 2 прешли у опсег оцењивања 1 и 0 категорисани као пацијенти са спонтаном регенрацијом мукозе док пацијенти са оценом 2 и 3 су категорисани као пацијенти са погресивним обликом болести. Клинички скор је установљен на основу *Truelove and Witts* индекса клиничке активности (195) (Табела 2). Хистолошки скор болести је одређен *Geboes*-овом скалом (196). Пацијенти са дијагностикованим колоректалним карциномом и Кроновом болешћу су искључени из студије. Од пацијената су узорковани биоптат црева, фецес и крв, док је од здравих пацијената узоркована столица и крв. Испитивања су изведена у: Клиници за Гастроентерологију, Клиничког центра Крагујевац, Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Етички комитети ових установа одобрили су извођење овог истраживања (одобрење број 01-5149 од 18.05.2015. године). Од свих учесника студије добијена је писана сагласаност.

Параметри	Благи облик	Тежи облик
Пражњење црева	$\leq 4$	$\geq 6$
Температура	Нормална	$>37.5$ 2х дневно
Срчана фреквенција	$<100$	$>100$
Хемоглобин	Нормално	$\leq 75\%$
Крваве столице	Повремено	Чиста крв
Седиментација (mm)	$<30$	$>30$

Табела 2. *Truelove and Witts* индекса клиничке активности

### **3.1.1. Узорковање сулкусне течности од оболелих од улцерозног колитиса и здравих контрола**

Дан након колоноскопије од оболелих је узоркована сулкусна течност из гингивалног сулкуса осам зуба. По два предња и по два бочна зуба у горњој и доњој вилици. Зуби нису били претходно конзервативно збрињавани, нису имали пародонталне џепове и сулкуси нису били дубљи од 4 милиметра. Пре узорковања, уклоњене су наслаге, зуби су изоловани папирним поенима, посушени и у гингивални сулкус је унет апсорпциони папир (*Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA*). Апсорпциони папир је држан 30 секунди, након чега је пребачен у епедорф тубу са 150 микролитара FBS-а (*fetal bovine serum*). Апсорпциони папири који су били контаминирани крвљу, конкрементима, пљувачком или наслагама су одбацивани. Узорци су вортексовани, и центрифугирани на 1500G, на 4°C, 5 минута. Затим су складиштени на -20°C до анализе (197).

### **3.1.2. Мерење цитокина, фекалног калпотетктина, CRP-а и концентрација кинуренина у серуму, столицу и гингивалној течности пацијената са улцерозним колитисом и здравих контрола**

Дан пред колоноскопију је од пацијенат узиман узорак крви и столице. Из крви пацијената изолован је серум центрифугирањем, на 450g, 10 минута, који је чуван на -80°C. Репрезентативни делови столице (5-10g) колектовани су у стерилним контејнерима и одмерени тако да би се након расподеле у аликвотама (по 1g) ресуспендовали коктемом инхибитора протеазе (*protease inhibitor cocktail- SIGMA, P83401*), разблажили у односу 1:100 и потом центрифуговани на 1500g у трајању од пет минута, при температури од 4°C. Покупљени супенатанти су потом чубани на -80°C (198). Концентрација фактора некрозе тумора (енгл. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), интерлеукина (енгл. *Interleukin*) - 10, *CXC motif chemokine 11* (CXCL-11) и IL-17, фекалног калпротетктина и Ц реактивног протеина (CRP-а) измерени су ELISA комерцијалним китовима (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*), према упутствима произвођача. Комерцијалним ELISA китовима мерили смо концентрације IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-23, IL-12, CXCL11 и IL-10 у сулкусној течности. Активност IDO је утврђена спектрометријским мерењем кинуренина (199).

### 3.1.3. Анализа фенотипа ћелија изолованих из ламине проприје ткива дебелог црева пацијената оболелих од улцерозног колитиса

Фенотип колон-инфилтришућих ћелија, добијених из биоптата црева пацијената са улцерозним колитисом анализиран је проточном цитометријом. Биоптати су опрани три пута у HBSS-у (енгл. *Hank's balanced salt solution Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*). Овако испране ћелије су инкубирани у HBSS-у са 1ml EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) десет минута при температури од 37°C. Да би се уклониле епителне ћелије узорци су благо мешани. После тога ћелије су пране HBSS-ом, инкубирани 20-30 минута у 2ml DMEM-а (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) са 1mg/ml колагеназом типа I (=336U/ml) (*Sigma-Aldrich*), 0.1mg/ml DNase-ом (*Sigma-Aldrich*) и 1mg/ml хијалоуронидазом (*Sigma-Aldrich*) без FCS (енгл. *fetal calf serum*) при температури од 37°C. Затим су ћелије два пране у PBS-у (енгл. *Phosphate-buffered saline*) и на концу помешане са градијентом *Ficoll*-а, да би потом биле центрифуговане на 690g у трајању од двадесет минута без употребе кочница. Пажљиво уклоњен интерфазни слој је пран у PBS-у. Добијена ћелијска суспензија опрана је два пута бафером који садржи 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.1% BSA (*Bovine Serum Albumin*), и 0.4% TCD (*Trisodium Citrate Dehydrate*) додат у PBS.  $1 \times 10^6$  ћелија је инкубирано са моноклонским анти-хуманим површинским антителима CD4, CD56 (200, 201). Интраћелијским бојењем обележене су ћелије које продукују IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 и FoxP3 (Табела 3). Пре интраћелијског бојења ћелије су претходно стимулисане 4h на 37°C са 5 $\mu$ g/ml *phorbol 12-myristate 13-acetate*-ом (PMA) (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*), 5  $\mu$ g/ml *ionomycin*-ом (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*) и 1 $\mu$ l *Golgi plug* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). После тога обављена је фиксација и пермеабилитација применом *BD Cytofix/Cytoperm kit*-а (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*) и обележене одговарајућим моноклоналним антителима коњугованим са флуорохром-ом.

Површинско обележавање					
Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотиш	Произвођач	CAT или REF
CD4	APC	RPA-T4	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	557871
CD56	PE	B159	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	561903
Интраћелијско обележавање					
Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотиш	Произвођач	CAT или REF
IL-10	PerCP	JES3-19F1	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences	566567
IFN-γ	PE	GIR-94	Mouse IgG2b, κ	BD Biosciences	558937
IL-17	FITC	N49-653	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	560491
FoxP3	PerCP	259D/C7	Mouse BALB/c IgG1	BD Biosciences	560045

Табела 3. Моноклонска антитела

### 3.2. Лабораторијске животиње

Истраживање је спроведено на сојевима мишева BALB/c и C57BL/6. Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња, Факултета медицинских наука одобрио је све предложене процедуре (одобрење број 01-6052 од 15.05.2017. године). Коришћени су мишеви мушког пола, 6 до 8 недеља старости. Мишеви су боравили у контролисаним условима са дневно/ноћним циклусом од 12 сати, сталне температуре од 28°C. Мишеви су имали слободан приступ храни, води или декстран наријум сулфату (енгл. *dextran sodium sulphate*, DSS) зависно од припадности експерименталној групи.

### 3.2.1. Индукција експерименталног колитиса применом DSS -а

Један од најчешће коришћених хемијских анималних модела колитиса је модел изазван DSS-ом. Овај модел болести је одабран због сличности са хуманом симптоматологијом и патохистолошком сликом за ову студију. 3% DSS молекулске тежине од 40 kDa (TdB Consultancy, Uppsala, Sweden), растворен је у дестилованој води. Мишеви су имали слободан приступ раствору 5 дана након чега је наступио период опоравка од 7 дана када су мишеви добијали воду (202). Контролна група мишева је примала дестиловану воду. Праћењем клиничког скорa посматран је ток болести док је степен оштећења установљен патохистолошком анализом.

### 3.2.2. Одређивање клиничког скорa

Клиничким скором (енгл. *Disease Activity Index, DAI*) праћен је ток болести (202) (Табела 4). Посматрани су губитак телесне тежине, конзистенција столице и присуство ректалног крварења током 12 дана трајања експеримента. Ови параметри, чести су симптоми улцерозног колитиса. Жртвовање мишева обављено је 12-ог дана помоћу диетилетра (ВЕТА НЕМ, Београд).

Скор	Губитак телесне масе	Конзистенција фецеса	Ректално крварење
0	нема губитка	нормална	нема крварења
1	1-5%	нормална	нема крварења
2	6-10%	ретка	слабо крварење
3	11-15%	ретка слузава	видљиво крварење
4	>15%	дијареја	велико крварење

*DAI\** се рачуна као збир свих параметара

Табела 4. Клинички скор (енгл. *Disease Activity Index, DAI*)

### **3.3. Хистолошка анализа**

#### **3.3.1. Израда и припрема исечака ткива**

После жртвовања, одстрањен је колон мишева и премерен од цекума до ректума. Изоловано дебело црево је испреано PBS-ом, пресечено лонгитудинално и уролано *Swiss roll* техником (203). Фиксација узорака обављена је помоћу 4% раствора формалина, у трајању од 24 сата. Комади ткива су након фиксације дехидрирани у више наврата алкохолом растућих кинцентрација (70%-100%), третирани ксилолом и одложени у парафин. Ткиво је сечено серијски, микротомом (*Leica RM 2135, Austria*), до дебљине од 4 $\mu$ m.

#### **3.3.2. Бојење препарата**

Након депарафинизације ксилолом и дехидратације, исечци су обојени стандардном хистолошком техником хенатоксилином и еозином, потом монтирани и посматрани под светлосним микроскопом.

#### **3.3.3. Хистолошки скор**

За анализу је одабран дистални аноректални регион. Епителне лезије и запаљенски инфилтрати анализирани су оубичајним протоколом, посматрањем светлосном микроскопијом (увећање 40 $\times$  и 100 $\times$ ) и скорирани на основу оштећења епитала, ћелијског инфилтрата (Табела 5) и фотографисани дигиталним апаратом (BX51, *Olympus, Japan*) (204).

Скор	Епител	Инфилтрација
0	ненарушена морфологија	одсуство инфилтрације
1	губитак пехарастих ћелија	инфилтрат око базе крипте
2	недостатак пехарастих ћелија већих размера	инфилтрата се простиру до мускуларног слоја слузнице
3	делимични нестанак крипти	Запаљенске ћелије се простиру до мускуларног слоја слузнице која је истањена и едематозна
4	Збрисане крипте у већини видних поља	запаљенски инфилтрата се простиру до субмукозе
Скор се добија сабирањем оба параметра са максималним скором 8		

Табела 5. Хистолошки скор

### 3.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO)

Како би смо инхибирали активност IDO-а, BALB/с мишевима који су примали DSS, првих пет дана експеримента упоредо је апликован и хемијски инхибитор IDO-а, *1-methyltryptophan (1-MT, Sigma-Aldrich)* растворен у дестилованој води у концентрацији од 2 mg/ml (205).

### 3.5. Ћелијска линија мишијих мезенхимских матичних ћелија (MSCs)

У истаживању су коришћене комерцијалне линије мишијих MSCs изоловане из коштане сржи мишијег соја C57BL/6 (Gibco/Invitrogen, кат. број S1502-100) као и комерцијане MSCs изоловане из костне сржи BALBc мишева (Cell Biologics кат.број 1308071612 lot. 5043). Ћелије су узгајане у DMEM медијуму (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са додатком L-глутамин, неесенцијалне аминокиселине (10x), *penicillin/streptomycin* и фетални говеђи серум. Инкубација је обављена у условима аутоматске регулације температуре (37C°), концентрације угљендиоксида у ваздуху (5%) и у апсолутној влажности. Све радње обављене су у складу са упутством испоручиоца (Gibco/Invitrogen).

### 3.5.1 Апликација MSCs

Другог и петог дана мишевима је интраперитонеално апликовано  $1 \times 10^6$  MSCs ресуспендованих у 200 $\mu$ l 0.9% NaCl (206). Мишеви су примали MSCs свог соја.

### 3.6. Изолација мононуклеара присутних у ламини проприји зида дебелог црева

Из издвојених колона изоловане су ћелије по установљеном протоколу (207). Колон је пресечен лонгитудинално и додатно уситњен на 3-4 дела. Овако добијени исечци су испрани HBSS-ом (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) без Mg и Ca. Пре дигестије ткиво је потопљено у HBSS (коме су додати FBS, HEPES, EDTA). Припрема је трајала тридесет минута на 37°C (водено купатило) након чега су фрагменти црева поново третирани HBSS-ом и даље уситњавани да би се даље обрађивали колагеназом D и *Dnase*. Ова процедура трајала је један сат на температури од 37°C у воденом купатилу по уобичајној и описаној процедури. После тога садржај је пропуштана кроз ћелијске стрејнере различитих дијаметара (100 $\mu$ m и 40 $\mu$ m). Филтрат је центрифугован (450g, 10 минута). Талог је помешан са *Percoll*-ом (30%), а потом је пажљиво усут *Percoll* али сада седамдесетоцентни. Све заједно је центрифуговано (1100g, 20 минута), без кочења. Добијена су три слоја: 1. епителне ћелије у површинском слоју, 2. у средњем слоју су мононуклеари, 3. дебрис и мртве ћелије на дну. Пажљиво је покупљен слој у коме су мононуклеари и пренет у медијум а број ћелија за Флоу цитометрију дотеран на  $1 \times 10^6$  ћелија по узорку и инкубиран са одговарајућим моноклонским антимишјим антителима.

#### 3.6.1. Анализа популација мононуклеарних ћелија проточном цитометријом

Проточном цитометријом установљен је процентуални удео и укупан број сваке популације имунских ћелија важних у патогенези експерименталног модела колитиса и то: CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита, CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NKT ћелија; NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>NK ћелија; CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија,



CD11c+I-A+ дендритских ћелија које експримирају МНС (*Major histocompatibility complex*) молекула II класе, CD11c+CD80+CD86+ дендритских ћелија које експримирају костимулаторне молекуле, CD11c+CD11b+ позитивних инфламацијских и CD11c+CD8+ регулацијских DCs; CD45+F4/80+ макрофага) (Табела 6).

Проточна цитометрија је рађена на ћелијама непосредно након изолације. Након изоловања, ћелије су пребројане и *trypan-blue* одређена је њихова вијабилност. За даљу анализу коришћени су само узорци у којима је вијабилност ћелија била већа од 90%.

Површинско обележавање					
Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотиш	Произвођач	CAT или REF
CD4	APC	GK1.5	Rat LEW, IgG2b, κ	BD Biosciences	552051
CD8	PerCP	53-6.7	Rat LOU, LOU/C, LOU/M IgG2a, κ	BD Biosciences	561092
CD3	PE	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	BD Biosciences	552774
CD80	FITC	L307.4	Mouse C3H, C3H/He, C3H/Bi IgG1, κ	BD Biosciences	563084
CD86	APC	2331	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD Biosciences	560956
CD25	FITC	7D4	Rat LEW, IgM, κ	BD Biosciences	553071
F4/80	PE	6F12	Rat IgG2a, κ	BD Biosciences	563900
CD45	FITC	104	Mouse SJL IgG2a, κ	BD Biosciences	553772
CD11b	APC	ICRF44	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	561015
CD11c	PE	HL3	Armenian Hamster IgG1, λ2	BD Biosciences	557401
CD40	PerCP	MR1	Armenian Hamster IgG3, κ	BD Biosciences	553658
Интраћелијско обележавање					
Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотиш	Произвођач	CAT или REF
IL-10	PerCP	JES5-16E3	Rat IgG2b	BD Biosciences	564081
IFN-γ	PE	XMG1.2	Rat IgG1, κ	BD Biosciences	561040
IL-17	APC	TC11-18H10	Rat LEW, IgG1, κ	BD Biosciences	555068
IL-4	PE	11B11	Rat IgG1	BD Biosciences	562044
IL-12	FITC	C15.6	Rat IgG1	BD Biosciences	560564
IL-1β	PE	AS10	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD Biosciences	557539
FoxP3	FITC	MF23	Rat IgG2b	BD Biosciences	560407

Табела 6. Моноклонска антитела

### 3.6.2. Обележавање мембранских маркера

Белези функционалног фенотипа инфилтришуих запаљенских ћелија добијених из колона одређивани су уз помоћ анти-мишијих моноклонских антитела жељених специфичности. По  $1 \times 10^6$  ћелија изолованих из колона мишева је ресуспендовано у пуферу за бојење (енгл. Staining Buffer; BD). Потом су им додавана моноклонска антитела (обележена различитим флуоресцентним бојама специфична за мембранске белеге различитих ћелија. Употребљаване су концентрације антитела пренма уобичајеним протоколима. После инкубације у тами и трајању од пола сата на  $+4^{\circ}\text{C}$ , ћелије су пране центрифуговањем на 250g у пуферу за бојење, такође на  $+4^{\circ}\text{C}$ . Након тога, ћелије су центрифугиране 5 минута на. Талогу ћелија је поново додаван пуфер (207). Одмах потом је рађена проточна цитометрија на апарату *FACSCalibur* (BD) мерењем најмање 10.000 промена у сваком узорку. Добијене вредности су анализоване уз помоћ софтверских алата: *CELLQUEST* (BD) и *Flowing Software 2.5.1*.

### 3.6.3. Мерење интрацелуларних цитокина

За ову сврху употребљен је поступак *BD Cytotfix/CytopermTM* према стандардном протокоу и то тако што су ћелије третиране форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, PMA, *Sigma*) и јономицином (енгл. *Ionomycin*, *Sigma*), који активирају протеин киназу C (енгл. *Protein Kinase C*, PKC) и покретачи уласка  $\text{Ca}^{++}$  у ћелије што покреће синтезу цитокинских молекула у ћелијама које су претходно биле активисане другим стимулусима (208). Узорци су инкубирани 4-6 сати што је довољан период за индукцију цитокина, а дужа инкубација ћелија у активатору изазива цитопатогени ефекат.

Како би побољшали детекцију цитокинпродукујућих ћелија, користили смо *BD GolgiStopTM* и *BD GolgiPlugTM* према наведеном протоколу. Употребљени су и моненсин и брефелдин А, који спутавају транспорт протеина унутар ћелија што резултује накупљањем цитокинских молекула, и тако је повећана могућност за детекције цитокин продукујућих. Због цитотоксичности примењених агенаса време њиховог деловања је одређено према упутствима произвођача.

На ћелијама су прво обележени мембрански маркери према наведеној процедури, и то пре фиксације, јер се ови маркери могу оштити фиксативима и пермеабилитаторима.

После тога ћелије су инкубиране у присуству моноклонских антитела, обележених различитим флуоресцентним бојама, усмерених на мембранске белеге. После испирања у пуферу центрифуговањем на 250g, добијеном талогу је пре инкубације (двадесет минута на температури леда) додаван *Cytofix/CytoPerm™ (BD Pharmingen)*. Ћелије су потом пране у *Perm/Wash™* пуферу (*BD Pharmingen*) и центрифуговане на 250g. Талогу су потом додавана моноклонска антитела за унутарћелијско обележавање цитокина, а затим је следила инкубација (пола сата на температури леда). Потом је талогу додаван пуфер за прање ћелија (*Perm/Wash™*). Називи и карактеристике коришћених моноклонских антитела као и њихова специфичност према цитокинима приказана су у Табели 6.

После инкубације ћелије су поново пране на исти начин у пуферу за бојење и ћелијска суспензија анализована проточном цитометријом. Прањено је најмање 10.000 догађаја по узорку. Добијене вредности су обрађиване софтверима *FACSCalibur (BD Biosciences)* и *Flowing Software 2.5.1*.

### **3.7. Мерење цитокина и кинуренина у серумима експерименталних животиња**

Комерцијалним *ELISA* китовима измерене су серумске концентрације IL-12, IL-1 $\beta$  и IL-10 мишева који су примали DSS као и контролним мишевима. Серумске концентрације кинуренина мерили смо фотоспектрометријом (202).

### **3.8. Изолација дендритских ћелија мишева соја C57BL/6 и BALBc**

Из слезина мишева соја C57BL/6 и BALBc изолована је ћелијска суспензија из које је добијена чиста популација дендритских ћелија. Уситњена и хомогенизована слезина је протискивана кроз ћелијске стрејнере (енгл. *cell strainer, BD Pharmingen, USA*) а овако просејаним ћелијама додаван медијум и све заједно центрифуговано на 250g. Еритроцити су одстрањени додавањем раствора за лизирање који је био у контакту са талогом пет минута након чега је његово дејство прекинуто медијумом и центрифуговано. Ћелијски талог је суспендован у медијуму, а овако добијене суспензије спленоцита су биле извор за издвајање дендритских ћелија помоћу колона. Након пребројавања, ћелије су центрифуговане на 200g. Добијени талог је суспендован пуфером према опште

прихваћеном протоколу и додавано су магнетне куглице (енгл. *MicroBeads*) обележене помоћу анти CD11c моноклонским антителима. Суспензија је енергично промешана и потом инкубирана 15 минута у расхлађивачу. После наречене инкубације ћелије опране центрифуговањем у пуферу на 200g. Талог је поново суспендован у пуфера и ћелије су такоо биле спремне за магнетну сепарацију позитивном селекцијом на MACS сепаратору (енгл. *Magnetic cell sorting; Miltenyi Biotec*, Немачка) као што је описано и опште прихваћено (202).

### **3.8.1. Анализа фенотипа и улоге дендритских ћелија**

Након изолације, дендритске ћелије су стимулисане липополисахаридом (*LPS*, 10 ng/ml), 48 часова након чега су анализирани проточном цитометријом (209).

## **3.9. Деpleција и адаптивни трансфер дендритских ћелија у мишеве третиране DSS-ом којима су претходно деплетирани дендритске ћелије**

Дендритске ћелије црева (CD103<sup>+</sup> DCs) продукују IDO, чиме подстичу експанзију колон инфилтришућих Treg ћелија (210). Употребом сапорина (*Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA*) (211) селективно смо деплетирали дендритске ћелије BALB/c мишевима који су примали DSS. С обзиром да сапорин смањује укупан број дендритских ћелија у временском периоду од недељу дана, мишевима је апликовано 2mg/kg петог дана експеримента па су дванаестог дана експеримента посматране клиничке и хистолошке манифестације након деплеције ових ћелија.

Дендритским ћелијама које су претходно изоловане из слезина здравих BALB/c мишева, активност IDO-а је инхибирана употребом 1 метил триптофана. Сапорин који је коришћен за деплецију дендритских ћелија се елиминише из организма након 3 дана. Адаптивним трансфером мишевима је, петог експерименталног дана, интраперитонеално апликовано  $2 \times 10^5$  DCs једнократно (212). Зависно од експерименталне групе, животињама су убризгаване нормалне дендритске ћелије или дендритске ћелије са инхибираном активношћу IDO-а.

Како би смо установили утицај MSCs на DCs, из мишева соја C57BL/6 изоловали смо DCs по претходно описаном протоколу. Након изолације дендритске ћелије смо кокултивисали са MSCs.

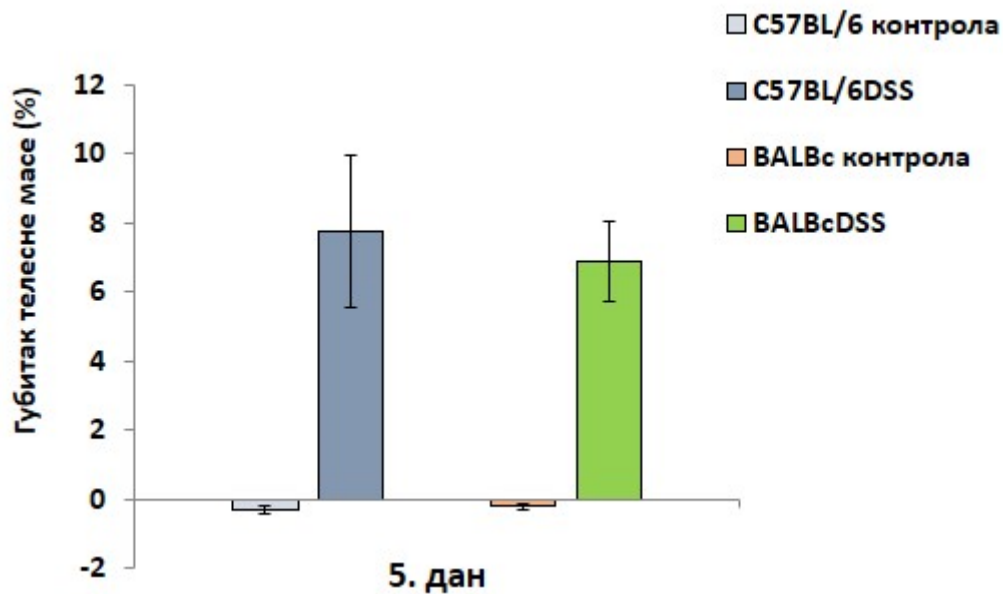
### **3.10. Деплеција Treg лимфоцита и адаптивни трансфер дендритских ћелија мишевима на DSS-у којима су претходно деплетирани дендритске ћелије**

Интраперитонеалном апликацијом циклофосфамида (*CY, Galenika A.D., Belgrade, Serbia*) у дози од 10 mg/kg или апликацијом анти-CD25 антитела (*PC61 mAb, Sigma-Aldrich, Munich, Germany*) у дози од 250 mg/kg, 3 дана након давања DSS-а деплетирали смо Treg лимфоцити (213, 214). Адаптивним трансфером интраперитонеално су апликоване дендритске ћелије ( $2 \times 10^6$ ) BALB/c мишевима петог дана експеримента (212).

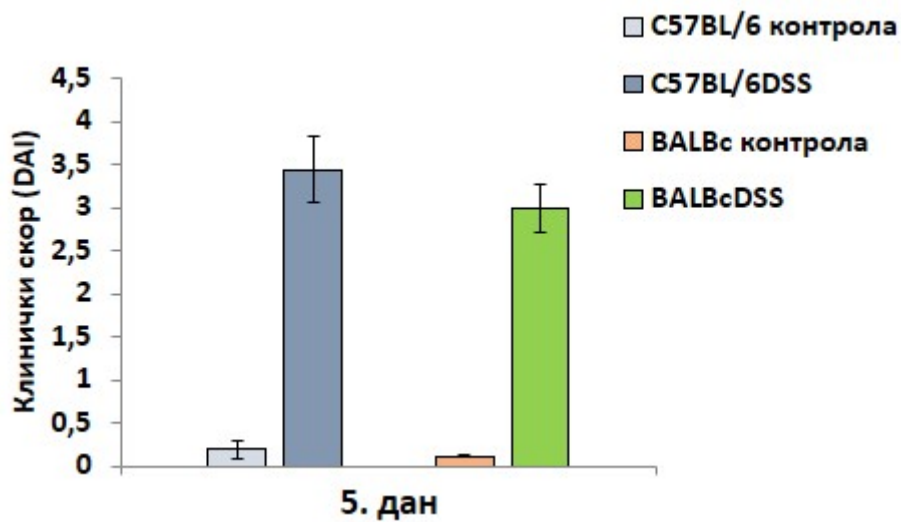
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике клиничких и хистолошких скорова између мишева соја C57BL/6 и BALB/c регистроване током развоја и регенерације колитиса изазваног DSS-ом

До петог дана након иницијалне апликације DSS-а нису уочене значајне разлике у испољавању болести између мишева соја C57BL/6 и BALB/c. Примећене су слузаве столице у оба соја животиња са спорадичном појавом крви у траговима у мишева соја C57BL/6. Није постојала статистички значајна разлика ни у губитју телесне тежине ни у клиничком скору између експерименталних група (Графикон 1а,б). Након петог дана разлике у испољавању болести између C57BL/6 и BALB/c мишева су биле све израженије и дванаестог дана разлика у губитку телесне тежине и клиничком скору је била статистички значајна (Графикон 2а,б). Код животиња соја C57BL/6 су уочене обилне крваве столице, иритација ректума као опште лошије стање наспрам мишева другог соја код којих се након искључивања DSS-а клиничка слика побољшала, где су уочене скоро па нормалне столице. Клинички скор је био статистички значајно већи код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6. Значајно већи губитак телесне масе је детектован код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 наспрам мишева BALBc соја (Графикон 2а,б).



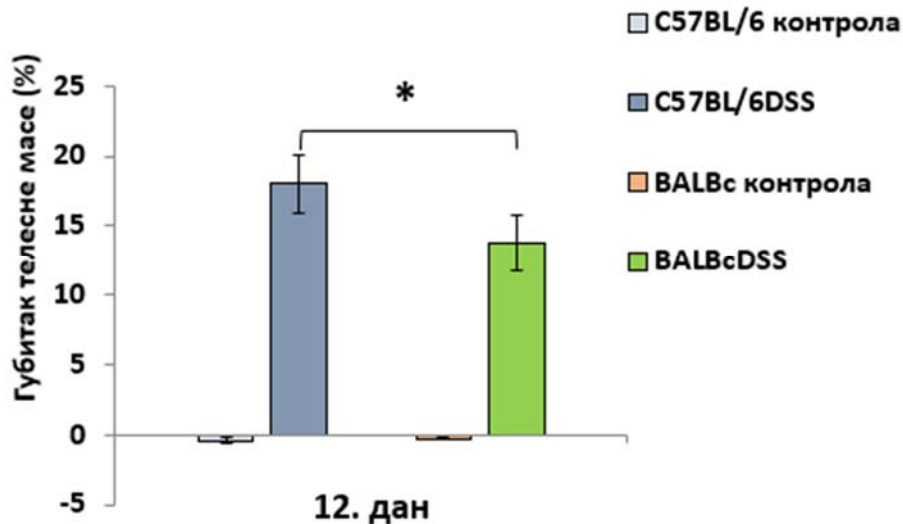
Графикон 1а



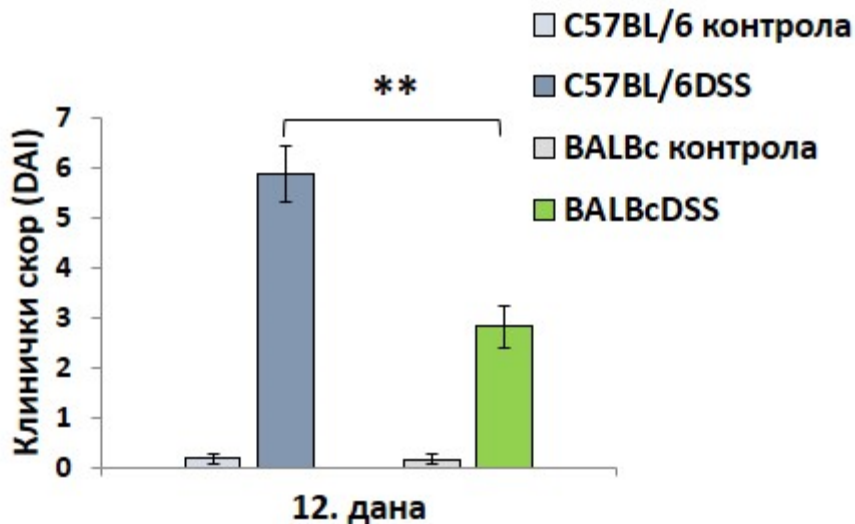
Графикон 1б

Графикон 1. Клинички (DAI) скор. Петог дана од индукције DSS колитиса у мишевима оба соја нису уочене значајне разлике у губитку телесне масе (а) и DAI (енгл. Disease Activity Index) клиничком скору (б).





Графикон 2а



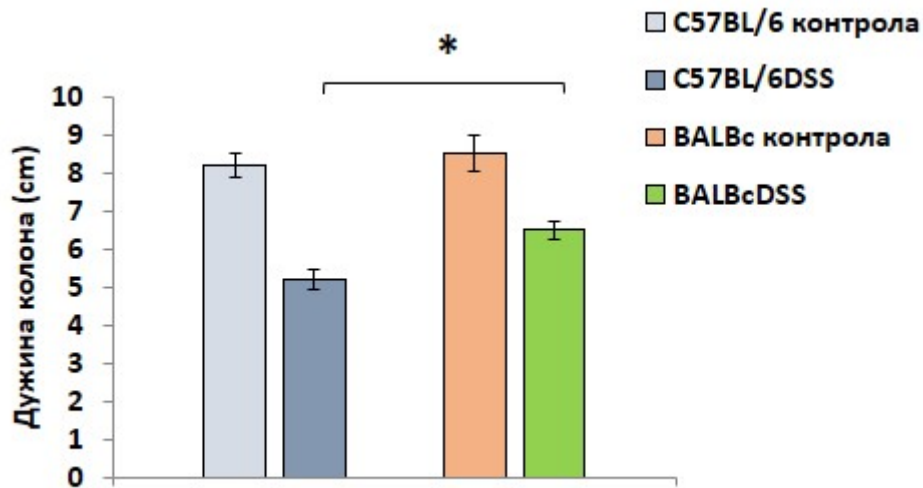
Графикон 2б

Графикон 2. Клинички (DAI) скор. Након 12. дана експеримента мишеви соја BALB/c су развили лакши облик боести који се одликовао значајно мањим губитком телесне масе као и знатно нижим клиничким скором

Уочене разлике у клиничкој слици болести су потврђене патолошким и хистолошким налазима. Колитис у људи се одликује скраћењем колоне. Модел колитиса који смо одабрали поред ћелијских механизма наликује људском и у овом аспекту па је праћење дужини колоне неопходно. Након 12-дана експеримента изоловани колони мишева C57BL/6 су били значајно краћи у односу на животиње соја BALB/c (Графикон 3).

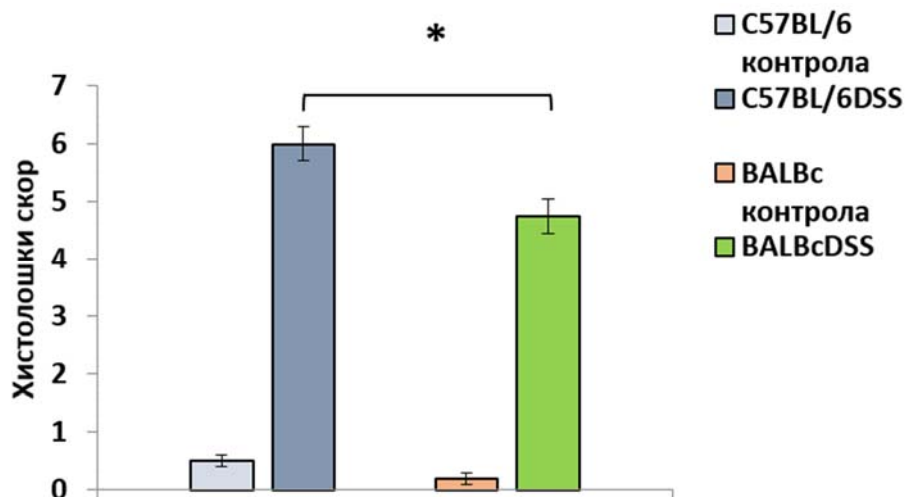
Патохистолошком анаизом колоне мишева посматрано је: свеуобухватно оштећење структура као и инфилтрација ткива колоне имунским ћелијама код DSS-ом третираних

мишева као и нетретираних животиња. На хистолошким препаратима DSS-ом третираних BALBc мишева је уочено значајно мање оштећење ткива колона уз ћелијски инфилтрат који је мање целуларан и углавно ограничен. На посматраним препаратима мишева другог соја јасно се уочава деструкција крипти, ерозија епитела праћена истањењем ламине проприје док је ћелијски инфилтрат дифузан, изражен а ћелије прожимају све слојеве зида колона (Графикон 4, Слика 2).



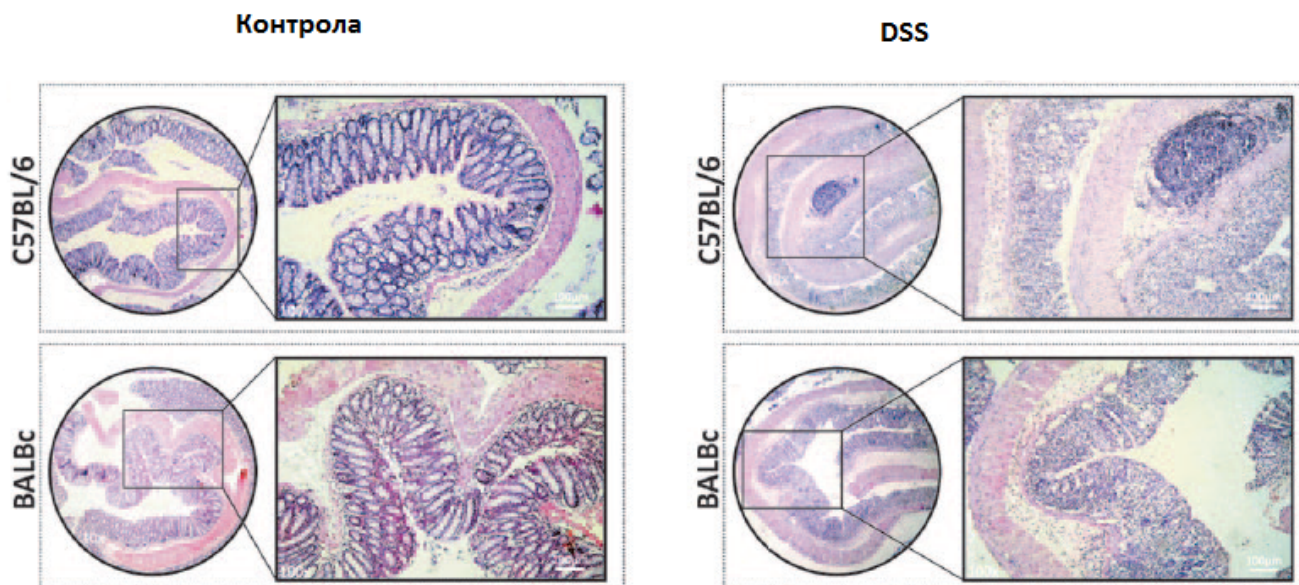
Графикон 3

Графикон 3. Дужина колона. Колон је био статистички значајно краћи код DSS-ом третираних C57BL/6 мишева.



Графикон 4

Графикон 4. Хистолошки скор. Статистички значајно већи хистолошки скор уочен је код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 наспрам BALBc мишева



Слика 2

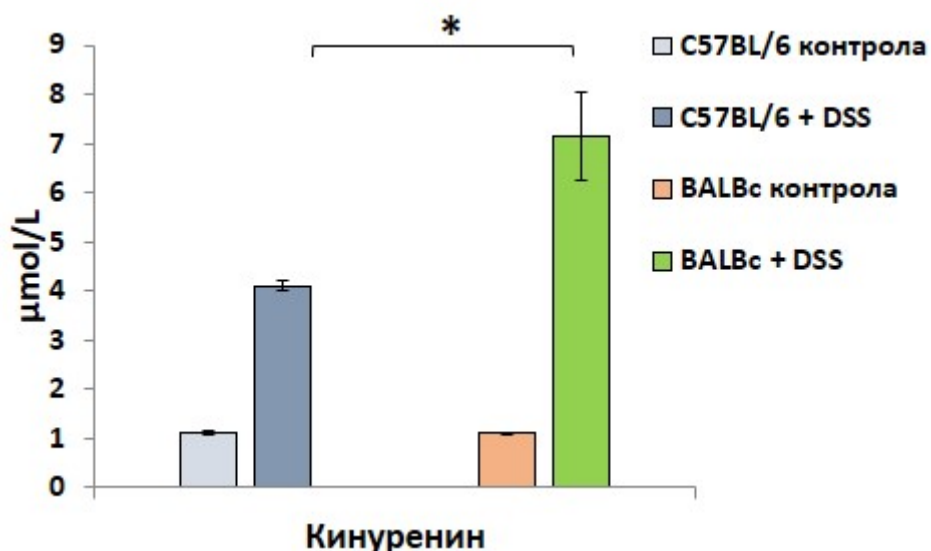
Слика 2. Репрезентативни препарати ткива дебелог црева после примене DSS-а. Код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 оштећења епителних ћелија црева су била опсежнија, масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева другог соја поред ограниченог ћелијског инфилтрата нису уочена већа оштећења структура (увећање 40 $\times$ , 100 $\times$ )

Различити степен инфламације/инфилтрације као и пратеће оштећење слузнице црева верификовани су осим регистровања хистолошких промена и мерењем концентрација кинуренина, супресивног IL-10 и инфламацијских IL-12 и IL-1 $\beta$  у серуму.

У епителу мукозе дебелог црева мишева соја C57BL/6 запажа се смањен број пехарастих ћелија, збрисане крипте што наводи на закључак да је епител тешко оштећен, а на неким местима и потпуно деструиран. У ламини проприји мукозе као и у едематозној субмукози запажају се леукоцитни инфилтрати изражени нарочито у дисталним партијама колона (Слика 2).

Код мишева соја BALB/c је хистолошка слика другачија: архитектура епитела слузнице је готово ненарушена, а у ламини проприји се запажа, ту и тамо, само минимална инфилтрација леукоцитима (Слика 2).

Значајно већа концентрација кинуренина измерена је у серуму DSS-ом третираних BALBc мишева наспрам C57BL/6 животиња које су примале DSS (Графикон 5).

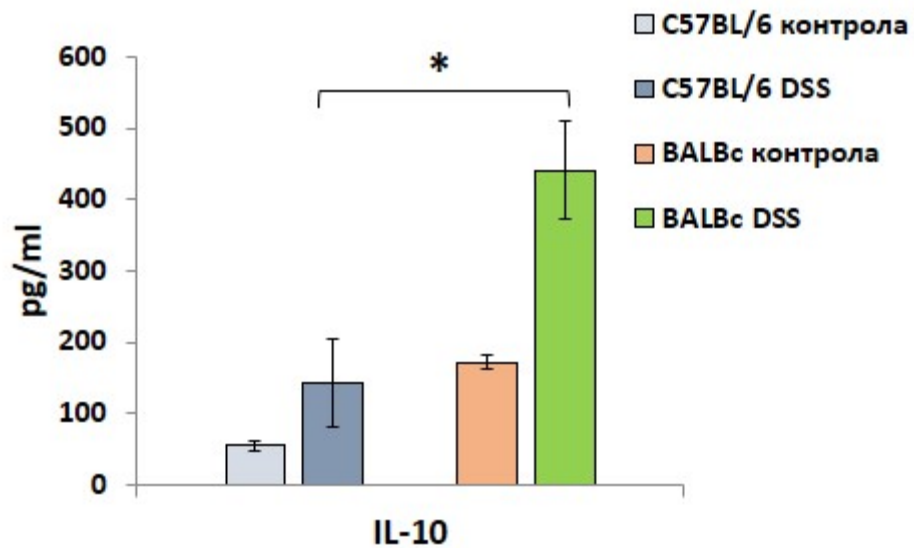


Графикон 5

Графикон 5. Серумске концентрације кинуренина. Фотоспектрометријским мерењем кинуренина у серуму мишева оба соја знатно већа концентрација је измерена у серуму BALBc мишева

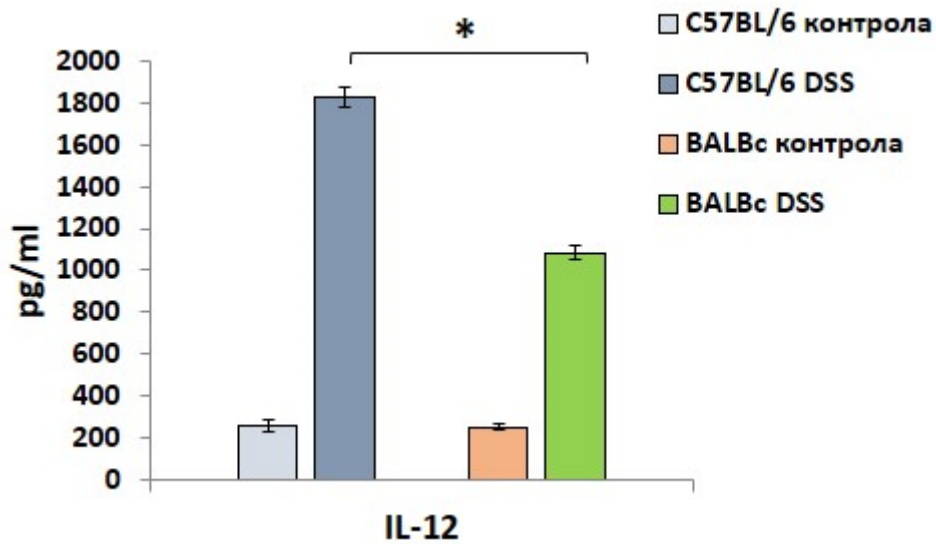
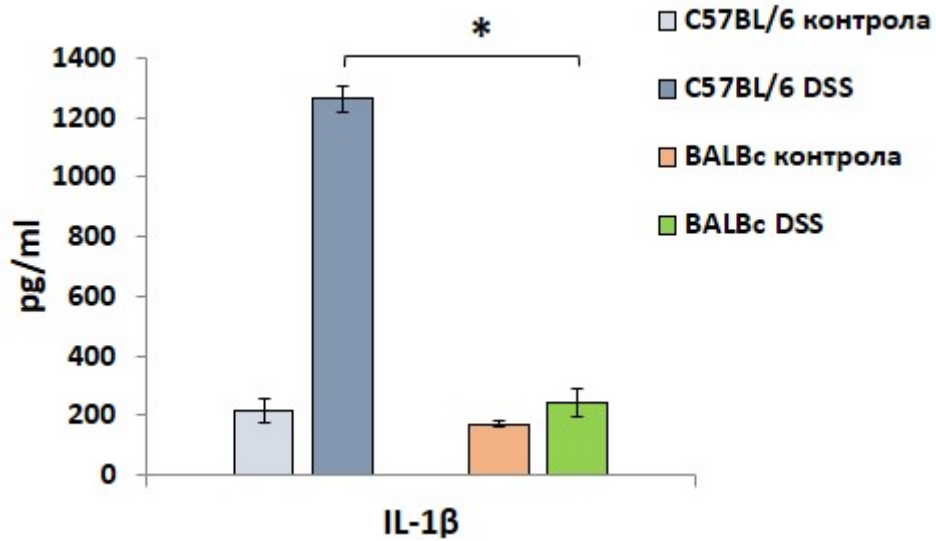
У серуму BALBc мишева који су примали DSS измерена је знатно већа концентрација имуносупресивног IL-10 (Графикон 6а), а концентрације инфламацијских цитокина (IL-12, IL-1β) значајно мање у поређењу са животињама другог соја (Графикон 6б). Код мишева соја C57BL/6 који су примали DSS се уочава супротан феномен: значајно мање концентрације IL-10 и веће серумске концентрације IL-12 и IL-1β (Графикон 6 а, б).

Након мерења кинуренина (Графикон 5) и цитокина (IL-10, IL-12 и IL-1β) уочава се тренд где се код DSS-ом третираних животиња соја BALBc примећује да раст концентрације кинуренина прати раст концентрације IL-10 (Графикон 6а) док су серумске концентратије IL-12 и IL-1β значајно мање (Графикон 6б).



Графикон ба

Графикон ба. Серумске концентрације IL-10. У серумима BALBc мишева третираних DSS-ом су регистроване значајно веће концентрације IL-10 у серуму наспрам животиња другог соја који је примао DSS.

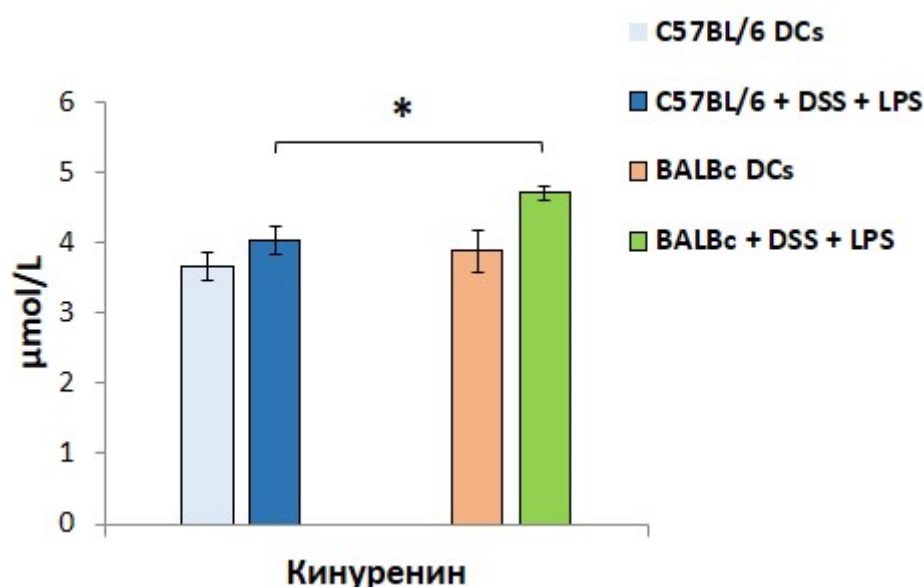


Графико бб

Графикон бб. Серумске концентрације IL-10 IL-1 $\beta$  и IL-12. Веће концентрације су проинфламацијских цитокина измерене у серумима C57BL/6 мишева наспрам BALBc мишева који су примали DSS.

## 4.2. Активирани дендритске ћелије BALBc мишева имају већи капацитет експресије IDO-а и продукују имunosупресивни кинуренин, IL-10 наспрам активираних дендритских ћелија C57BL/6 мишева

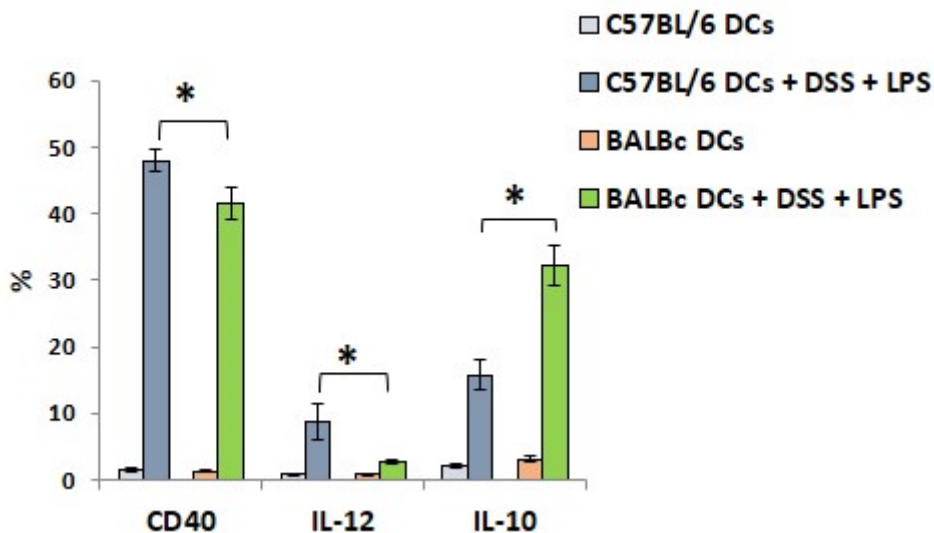
У намери да се утврде ћелијски и молекулски механизми одговорни за сојне разлике у одговору на DSS, прво су анализирани разлике у фенотипу и функцији дендритских ћелија између C57BL/6 и BALB/c мишева. Због чињенице да су дендритске ћелије један од главних извора IDO-а у дигестивном тракта (141) најпре је *in vitro* испитиван ефекат примене липополисахарида (LPS) на фенотип DCs изолованих из слезине C57BL/6 и BALB/c животиња 2 дана након апликације DSS-а. Значајно веће концентрације кинуренина измерене су у супернатантима LPS-ом реактивираних дендритских ћелија BALBc мишева указујући на већу активност IDO-а (Графикон 7).



Графикон 7

Графикон 7. Капацитет продукције IDO-а. Мерењем концентрација кинуренина у супернатантима установљено је да су DCs BALBc мишева су знатно више продуковале имunosупресивни кинуренин наспрам DCs C57BL/6

Уз то проточном цитометријом је установљено да је статистички сигнификантно већи % толерогених DCs које експримирају имуносупресивни IL-10, и статистички мањи проценат активираних инфламацијских дендритских ћелија (које експримирају CD40 и продукују IL-12) био присутан у популацији LPS-ом реактивираних дендритских ћелија BALBc мишева у поређењу са дендритским ћелијама C57BL/6 мишева, (Графикон 8). DCs соја C57BL/6 су у знатно већем проценту биле поларизоване у проинфламацијске ћелије које продукују IL-12 (Графикон 8). Ово наводи на закључак да дендритске ћелије ова два соја мишева одговарају на неспецифичне (LPS) и специфичне (DSS) стимулусе различитом поларизацијом, па тако док ћелије соја BALBc продукују имуносупресивне медијаторе докле истоврсне ћелије C57BL/6 на истоветну стимулацију одговарају продукцијом имунопотенцирајућих фактора.



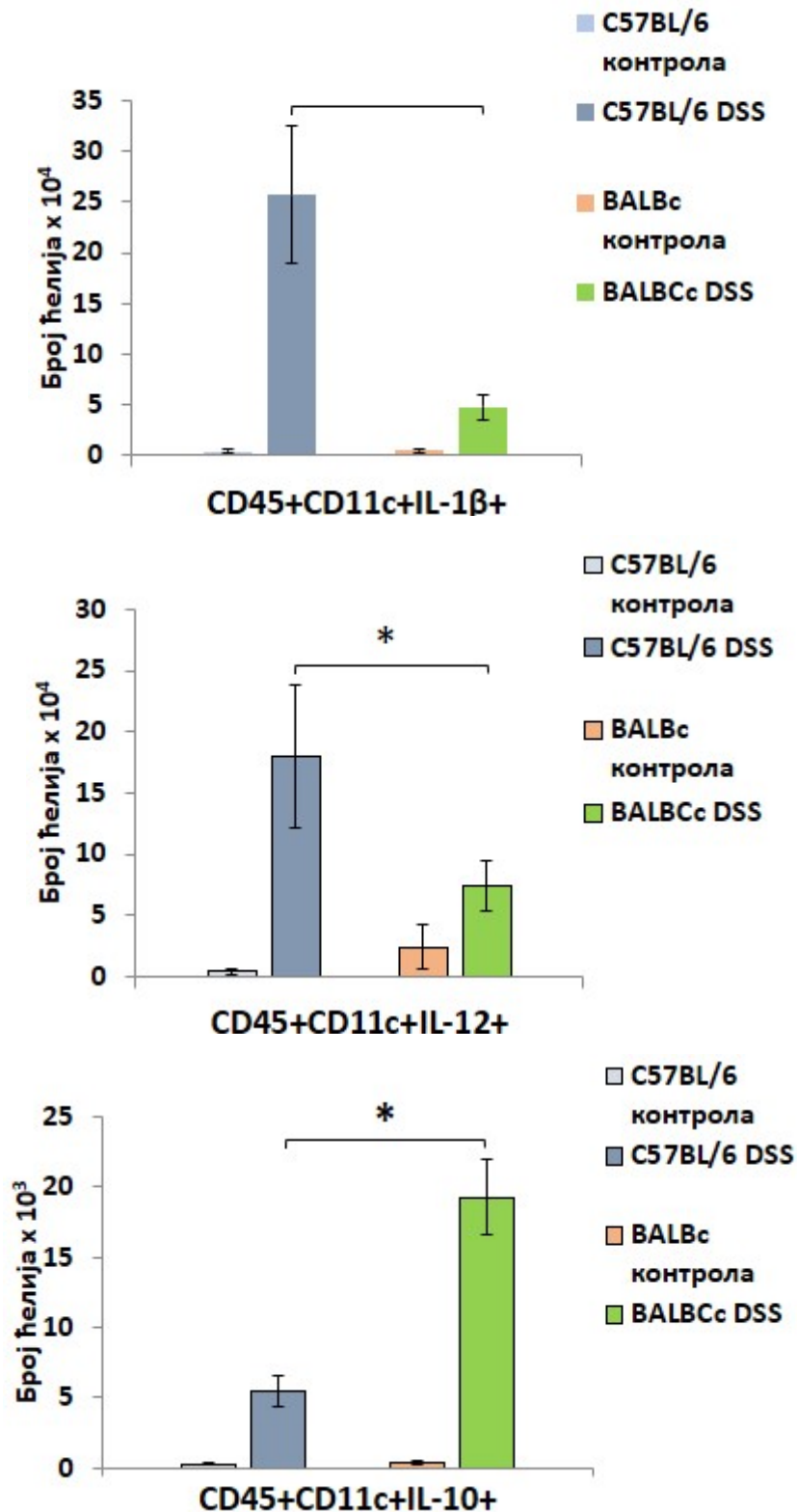
Графикон 8

Графикон 8. Разлика у фенотипу и функцији LPS-ом реактивираних DCs мишева соја C57BL/6 и BALBc. Активирани DCs BALBc мишева продукују значајно више имуносупресивног IL-10, а мали проценат ових ћелија је продуковао IL-12 и експримирао CD40 наспрам стимулираних DCs C57BL/6 мишева.

У *ex vivo* експериментима испитана је продукција цитокина у дендритским ћелијама добијеним из ламине проприје колона оболелих мишева оба соја и добијени резултати корелирани су са резултатима добијеним *in vitro*. Статистички значајно већи број толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10 и статистички мањи број инфламацијских DCs позитивних на IL-12 и IL-1 $\beta$  присутних у ламини проприји колона DSS-ом третираних BALBc мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима, што је потврдило



сојне разлике у фенотипу активираних дендритских ћелија забележеним *in vitro* (Графикон 9).



Графикон 9

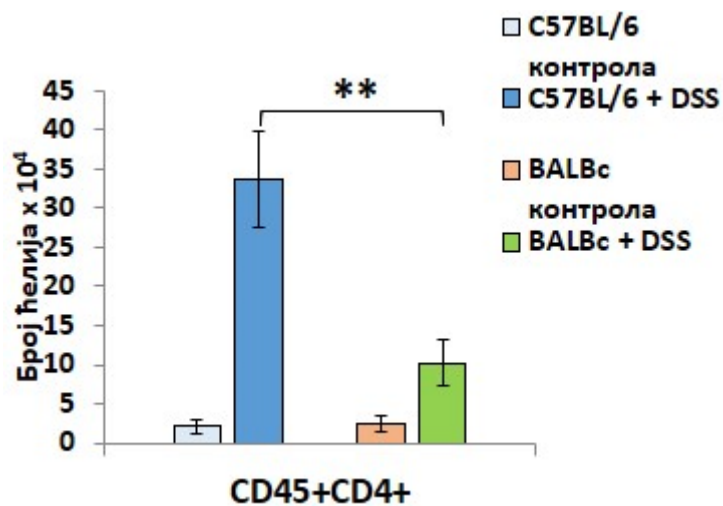
Графикон 9. Разлике у броју толерогених и проинфламацијских дендритских ћелија у ламини проприји DSS-ом третираних мишева соја BALB/c и C57BL/6

### **4.3. Дендритске ћелије BALBc мишева индукују експанзију Treg лимфоцита које супримирају инфламацију и убрзавају регенерацију DSS-ом оштећене слузнице црева**

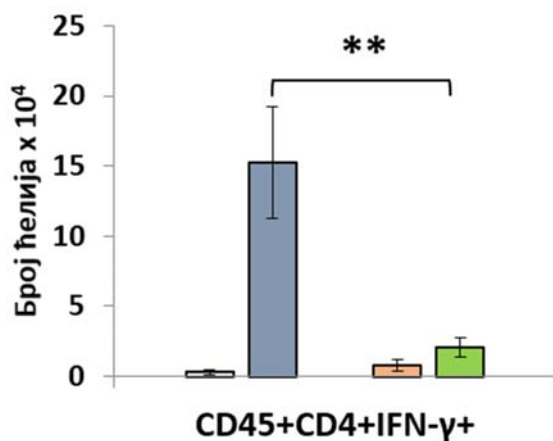
Након што је показан имуносупресивни фенотип дендритских ћелија добијених из ламине проприје оболелих BALBc мишева испитан је механизам ове супресије, тако што је прво проточном цитометријом анализирана процентуална и нумеричка заступљеност ефекторских субопулација CD<sup>+</sup> Т лимфоцита у инфилтратима слузнице црева оболелих мишева, а затим је активним трансфером дендритских ћелија из слезина здравих мишева соја BALB/c у мишеве истог соја којима су претходно деплетирани Treg лимфоцити испитано да ли дендритске ћелије своје имуносупресивне ефекте испољавају директно или индиректно, преко Treg лимфоцита.

#### **4.3.1. У инфилтратима слузнице колона оболелих BALBc мишева присутан је значајно већи број Treg лимфоцита него у инфилтратима оболелих C57BL/6 мишева**

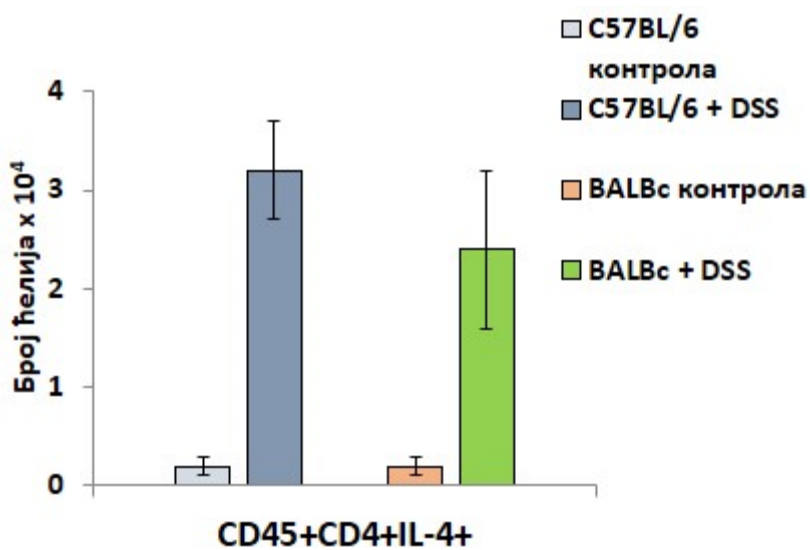
Са циљем испитивања разлика у капацитету BALBc и C57BL/6 дендритских ћелија за поларизацију Т ћелијског имунског одговора, проточном цитометријом је анализирана процентуална заступљеност и број Th1, Th2 и Th17 CD4<sup>+</sup>Т лимфоцита који су инфилтрисали ламину проприју црева оболелих мишева. У ламини проприји третираних BALB/c мишева био је статистички значајно мањи број Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) и Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) лимфоцита, већи број број CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> ћелија док није било разлике у броју CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> лимфоцита између експерименталних група (Графикон 10).



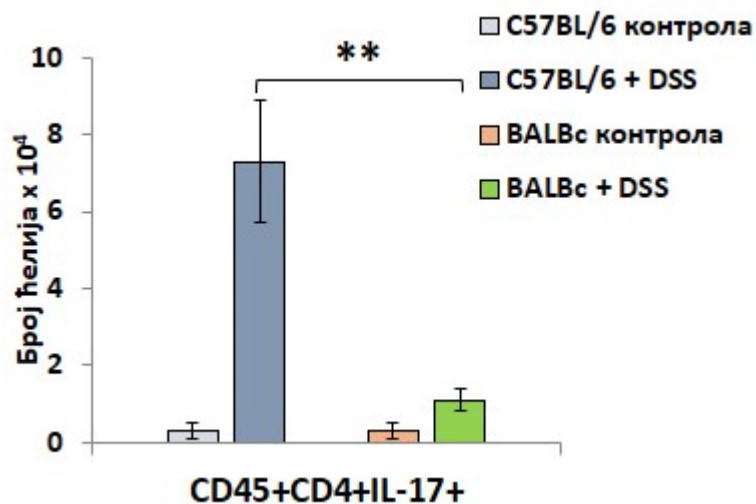
Графикон 10а



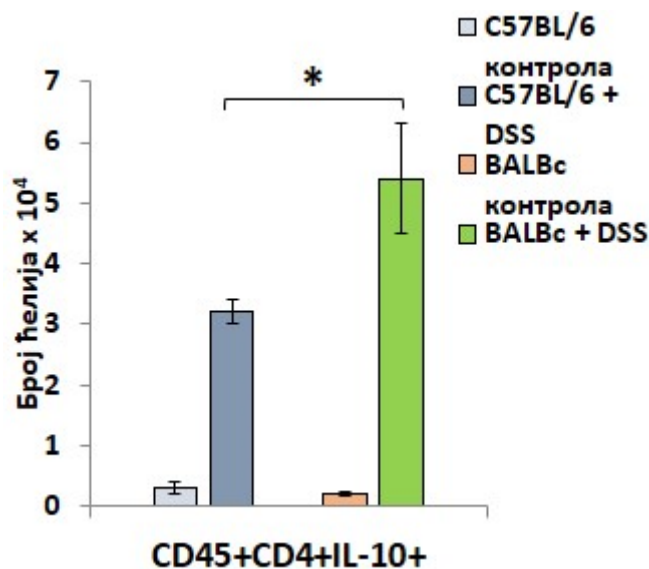
Графикон 10б



Графикон 10в



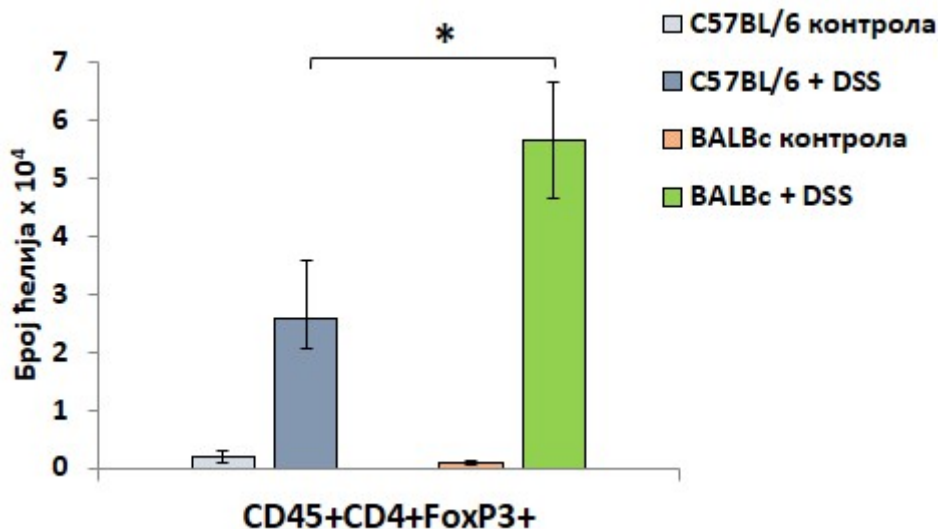
Графикон 10г



Графикон 10д

Графикон 10 (а-д). Присуство ефекторских CD4+T лимфоцита у ламини проприји црева DSS-ом третираних C57BL6 и BALBc мишева

Такође је у слузници црева оболелих мишева соја BALB/c детектован знатно већи број Treg (CD4+CD45+FoxP3+) лимфоцита наспрам третираних мишева соја C57BL/6 (Графикон 11).



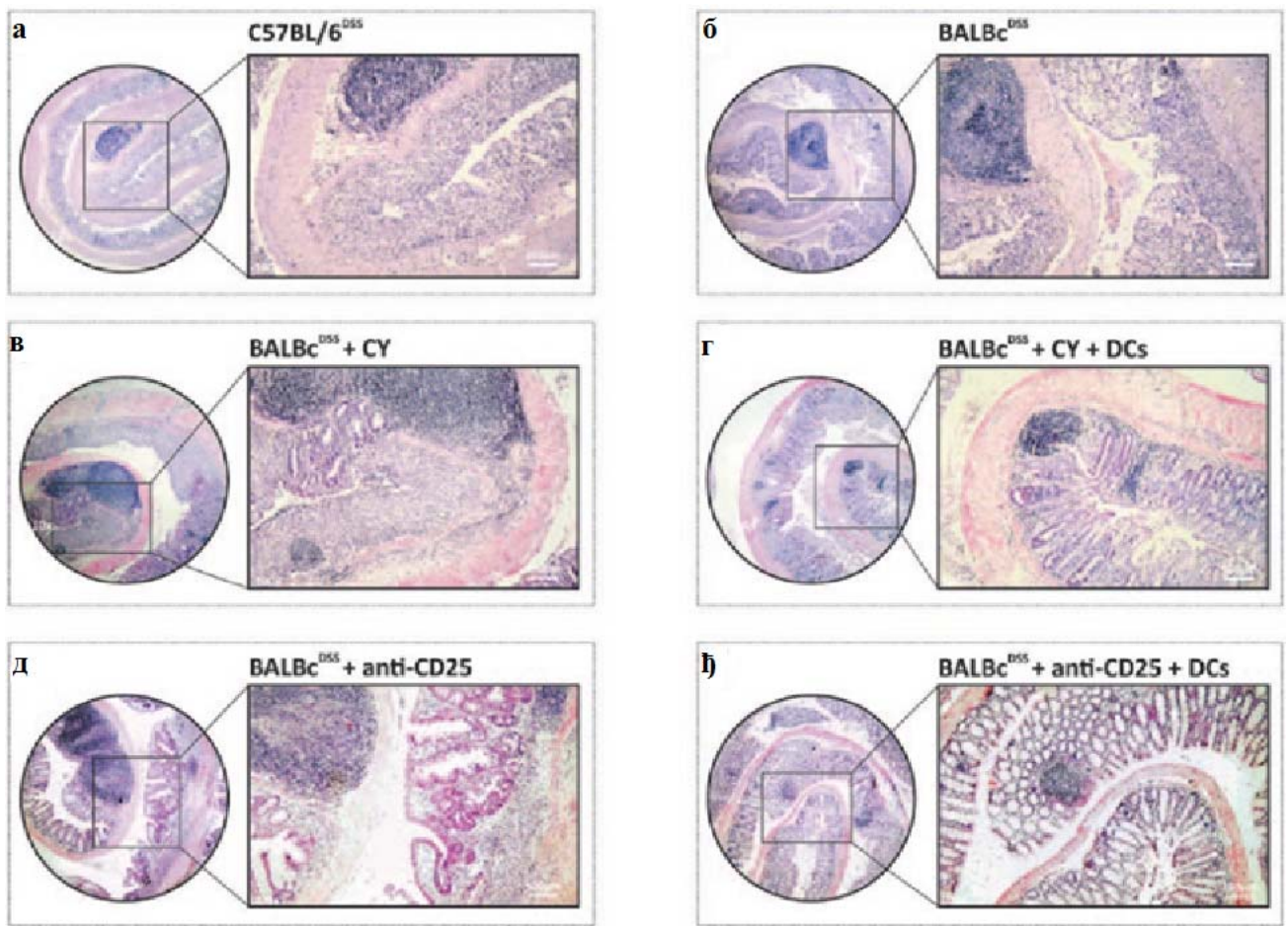
Графикон 11

Графикон 11. Присуство Трег лимфоцита у ламини проприји црева DSS-ом третираних C57Bl6 и BALBc мишева

#### 4.3.2. Дендритске ћелије промовишу експанзију Трег ћелија и подижу серумску концентрацију имуносупресивног кинуренина који игра кључну улогу у регенерацији слузнице црева код мишева соја BALB/c у моделу DSS колитиса

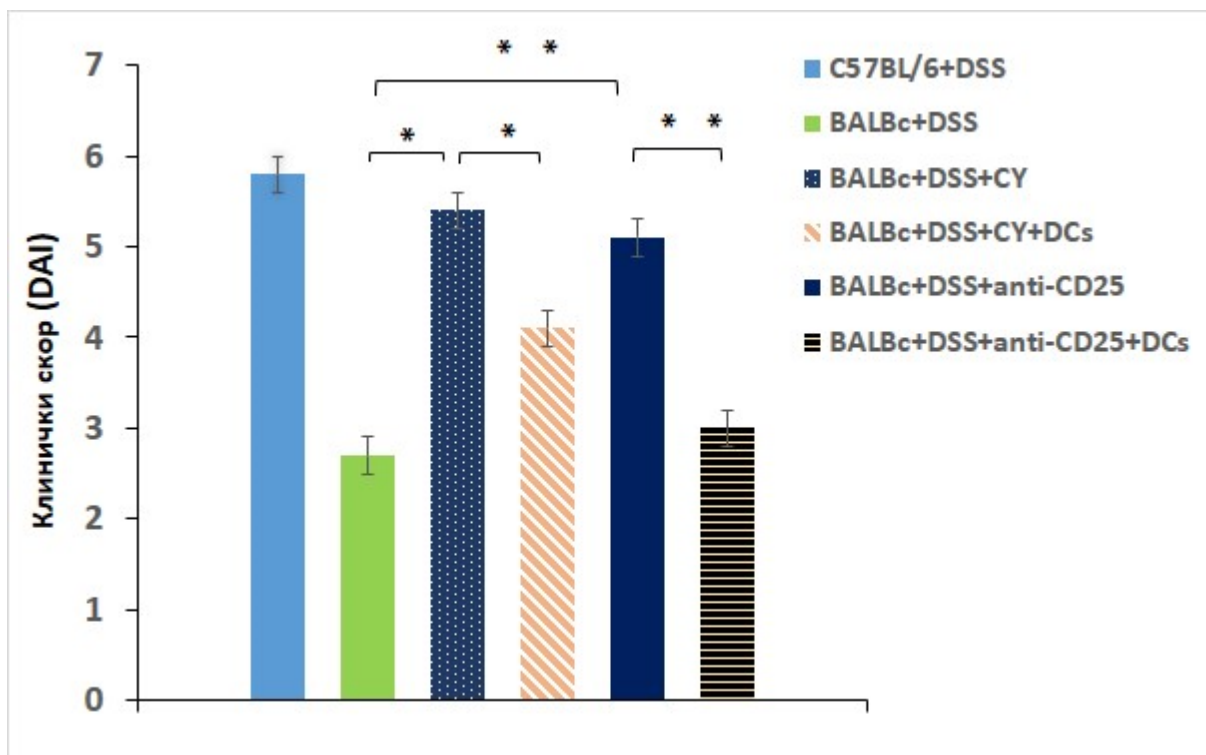
Да би се испитала улога имуносупресивних DCs за експанзију Трег лимфоцита, дендритске ћелије, изоловане из слезина здравих мишева соја BALB/c су пренесене у DSS-ом третиране мишеве истог соја, петог дана након иницијалне апликације DSS-а. Претходно су овим мишевима, апликацијом *Cyclofosamid*-а (10mg/kg) или анти CD25 антитела (250 mg) деплетирани Трег лимфоцити 3 дана пре администрације DSS-а.

Одстрањивање Трег лимфоцита је за последицу имало драматично погоршање колитиса у оба соја мишева. Након интраперитонеалног примања *Cyclofosamid*-а или анти CD25 антитела у мишеве BALB/c соја болест се погоршала што се очитовало израженим крвавим столицама, значајним губитком конзинтенције фекалне масе док је хистолошка анализа показала значајна оштећења епитела, збрисане крипте, губитак пехарастих ћелија као и масовно присуство лимфоцита у ламини проприји оболелих црева (Слика 3, Графикон 12а,б). У серуму се бележи повећање концентрација IL-12 уз истовремено смањење концентрација IL-10, као и кинуренина (Графикон 13а,б,в).

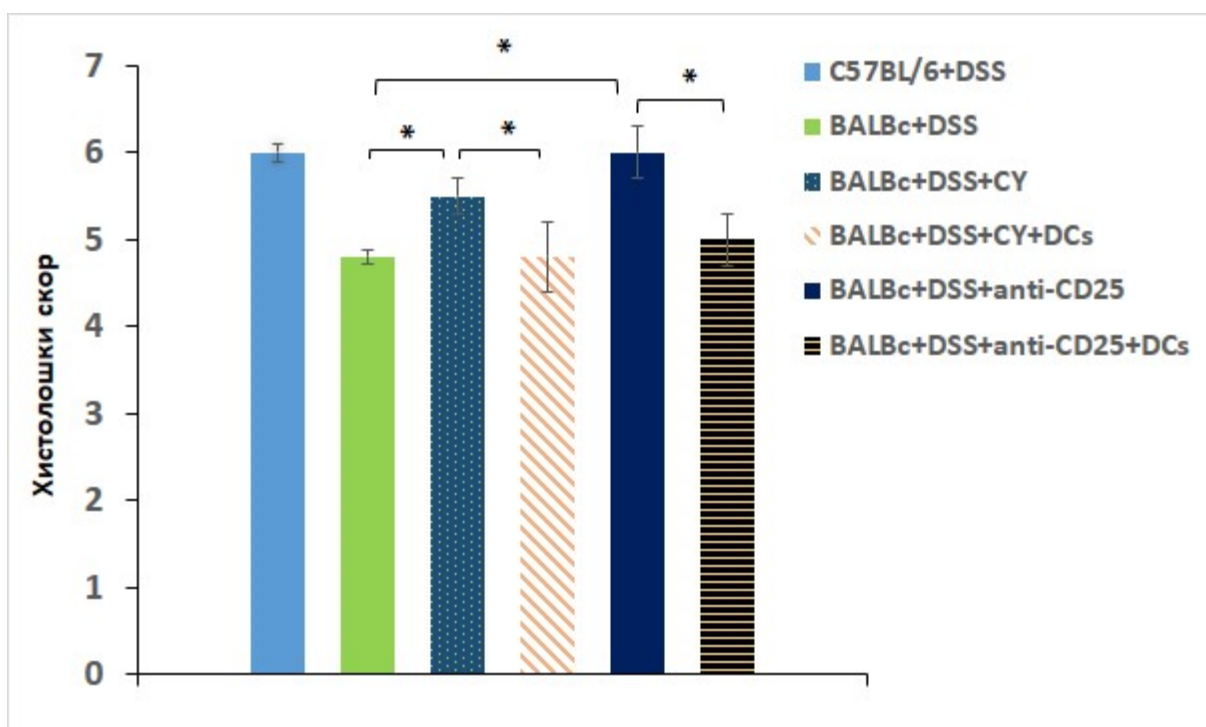


Слика 3

Слика 3. Репрезентативни исечци ткива колоне. На препаратима BALBc мишева након деплеције Treg лимфоцита уочавају се значајна оштећења епитела, збрисане крипте, губитак пехарстих ћелија као и изражени ћелијски инфилтрати (в,г). Након апликавања DCs адоптивним трансфером уочава се значајно побољшање где је архитектура готово очувана а ћелијски инфилтрати минимални (д,ж).

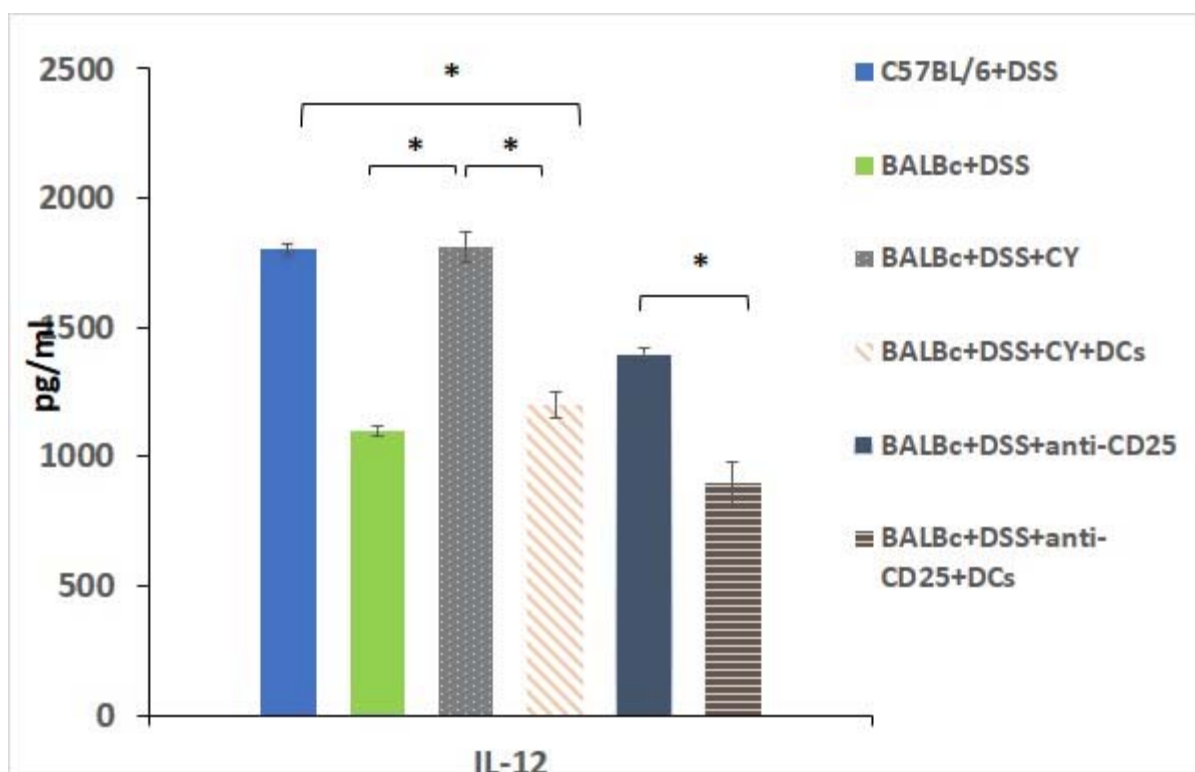


Графикон 12а

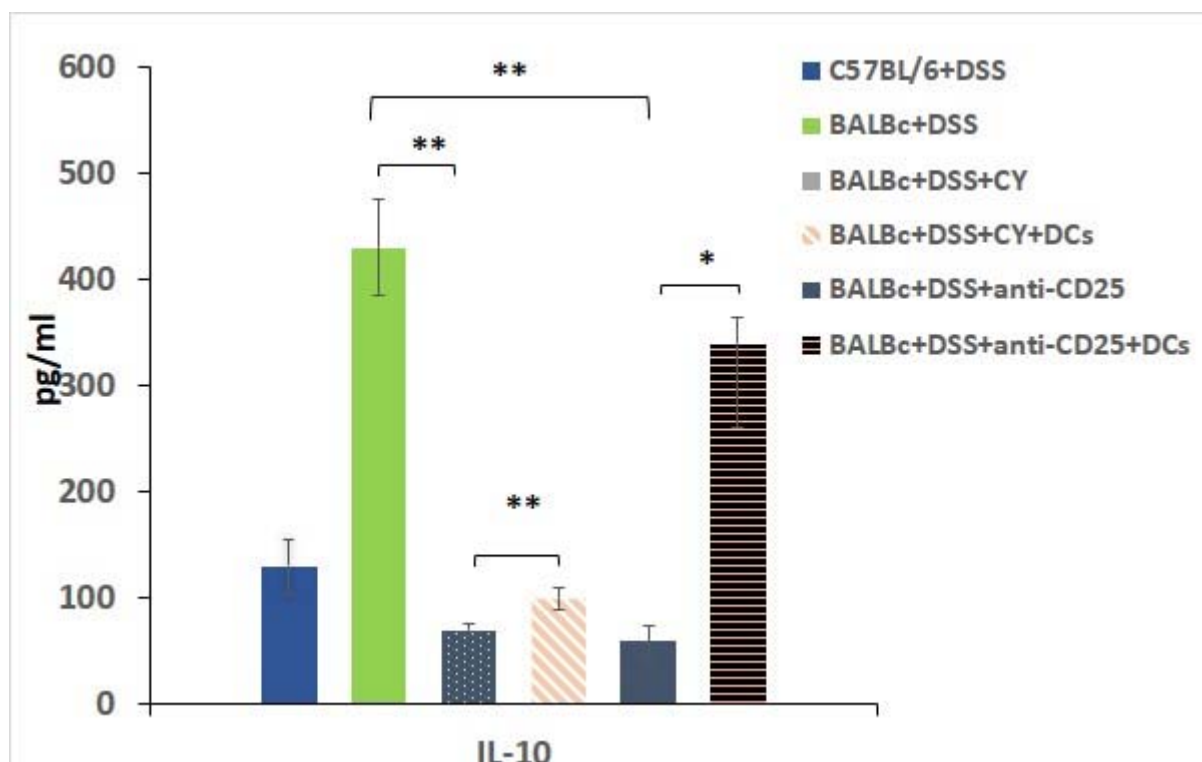


Графикон 12б

Графикон 12. Клинички (а) и хистолошки скор (б) DSS-ом третираних BALB/c мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити и трансфероване дендритске ћелије.

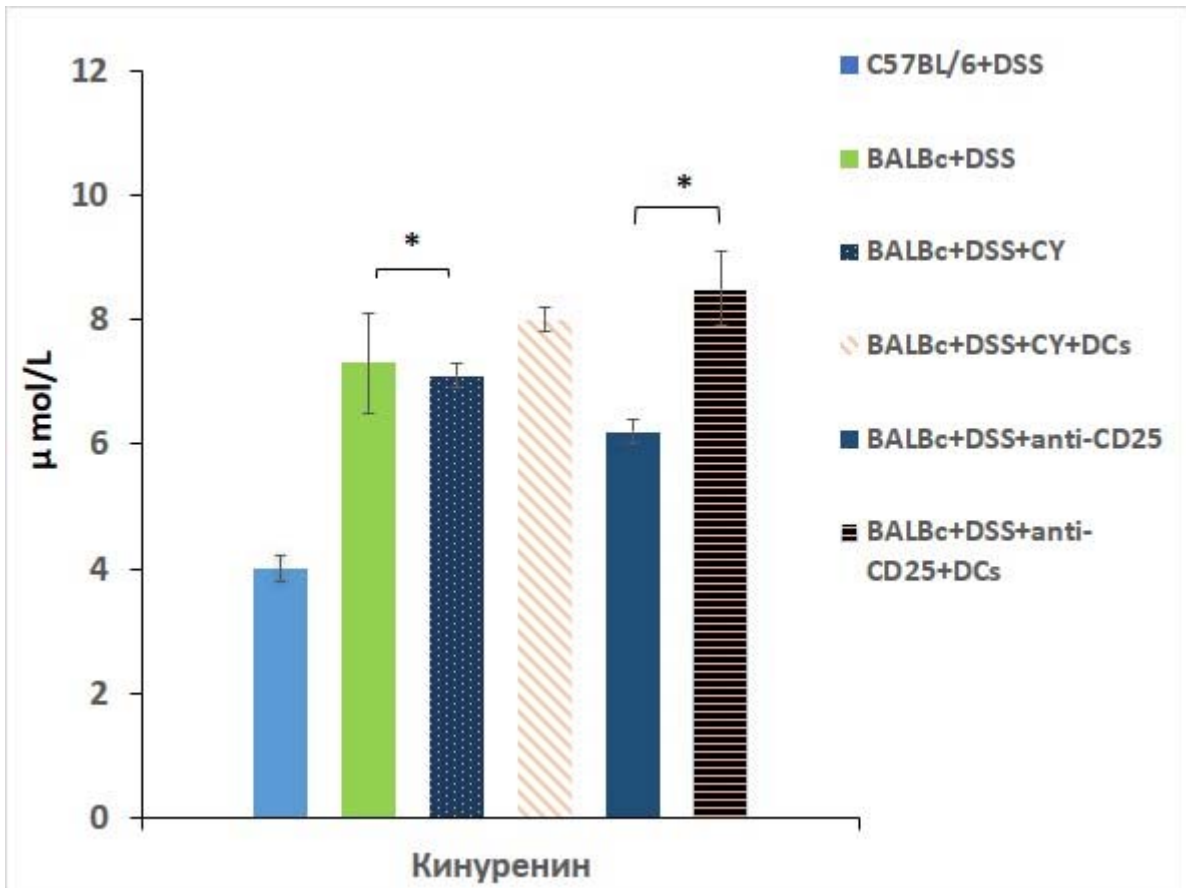


Графикон 13а



Графикон 13б

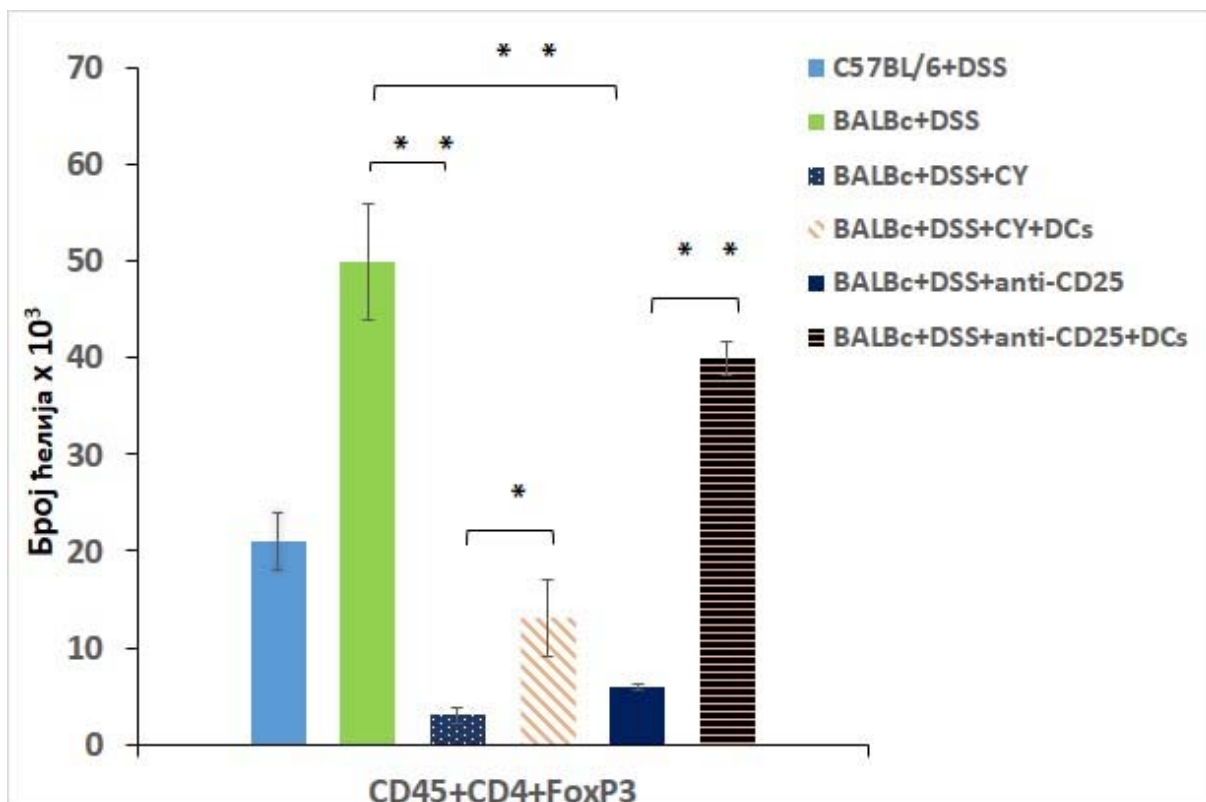




Графикон 13в

Графикон 13. Концентрација IL-12 (а), IL-10(б) и кинуренина(в) у серуму DSS-ом третираних BALB/c мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити и трансфероване дендритске ћелије.

Трансфер BALB/c дендритских ћелија узроковао је значајан пораст кинуренина (Графикон 13в) и експанзију Treg лимфоцита у ламини проприји оболелих црева (Графикон 14) што је за резултат имало значајно ублажавање свих мерених симптома и знака колитиса, побољшање у конзистенцији столице, одсуство ректалног крварења и смањење клиничког (Графикон 12а) и хистолошког сора (Графикон 12б, Слика 2). Опажено побољшање клиничке слике праћено је и смањеним концентрацијама инфламацијског IL-12 и повећањем имunosупресивног IL-10 у серуму (Фигура 13а, 13б).



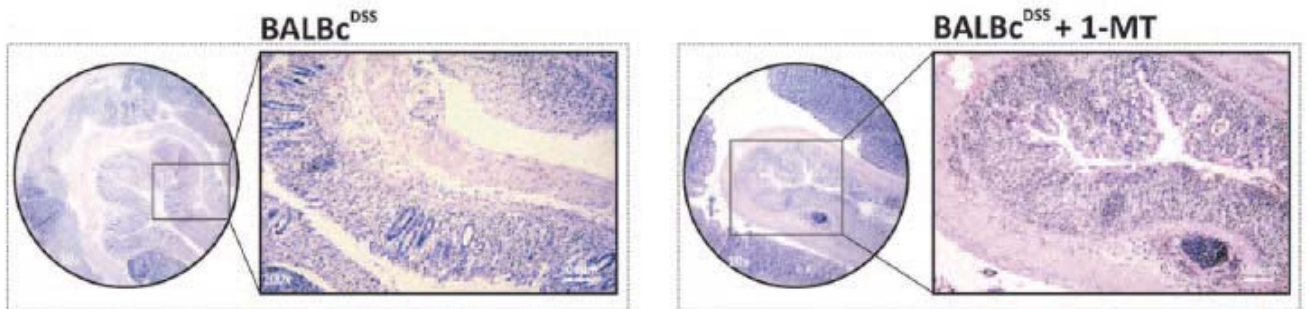
Графикон 14

Графикон 14. Број CD4+FoxP3 ћелија изолованих из ламине проприје DSS-ом третираних BALB/c мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити и трансфероване дендритске ћелије.

#### 4.4. Инхибиција ензимске активности IDO-а, смањује експанзију Treg лимфоцита и онемогућава регенерацију слузнице црева оболелих мишева

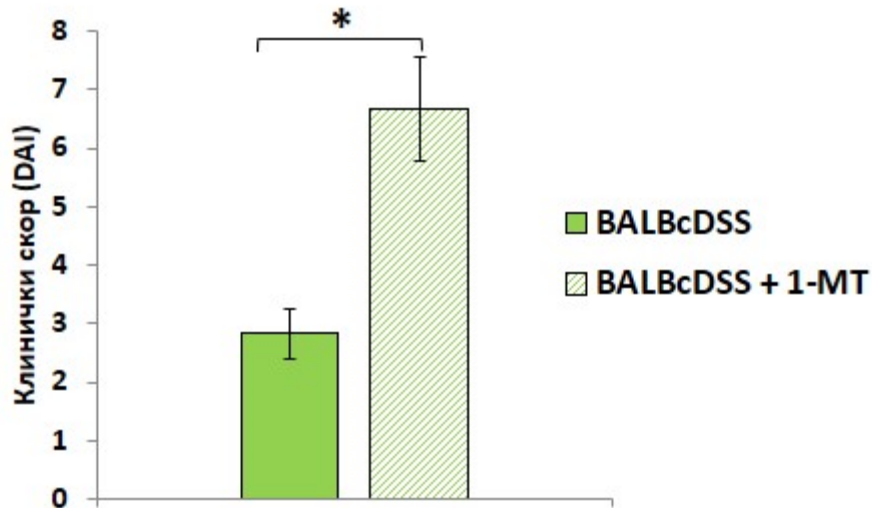
Како би се установило да ли инхибиција IDO-а утиче на процес регенерацију слузнице црева BALB/c мишеви су упоредо са DSS-ом примали и 1-MT (2mg/mL), компетативни хемијски инхибитор IDO-а (215). Инхибиција IDO-а је значајно погоршала оштећења колона BALB/c мишева и узроковала погоршања свих клиничких и хистолошких параметара болести. Хистолошка анализа показала значајна оштећења епитела, збрисане крипте, губитак пехарстих ћелија као и масовно присуство лимфоцита у ламини проприји мишева који су поред DSS-а примили и 1MT. Код BALB/c мишева третираних само DSS-ом је хистолошка слика другачија: архитектоника епитела слузнице је готово

ненарушена, а у ламини проприји се запажа, ту и тамо, само минимална инфилтрција леукоцитима (Слика 4, Графикон 15 а,б).

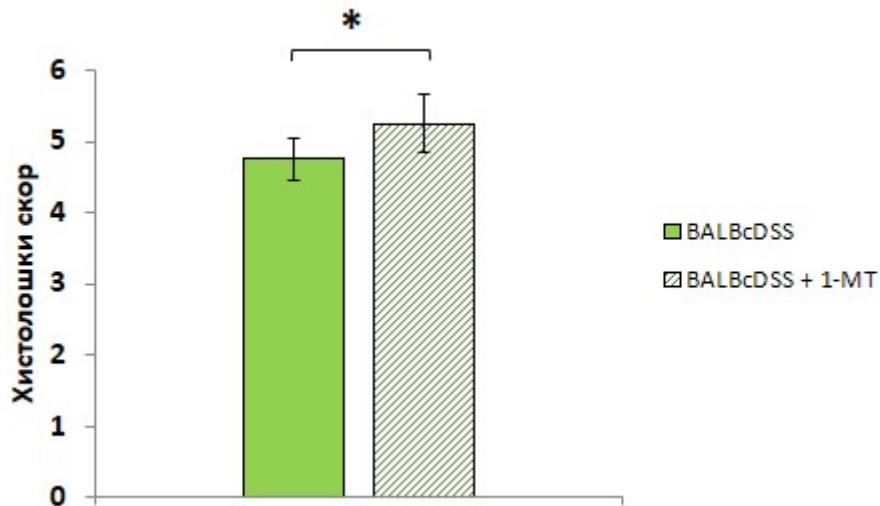


*Слика 4*

*Слика 4. Репрезентативни исечци ткива колона након хемијске блокаде IDO-а употребом 1MT-а мишевима BALBc*



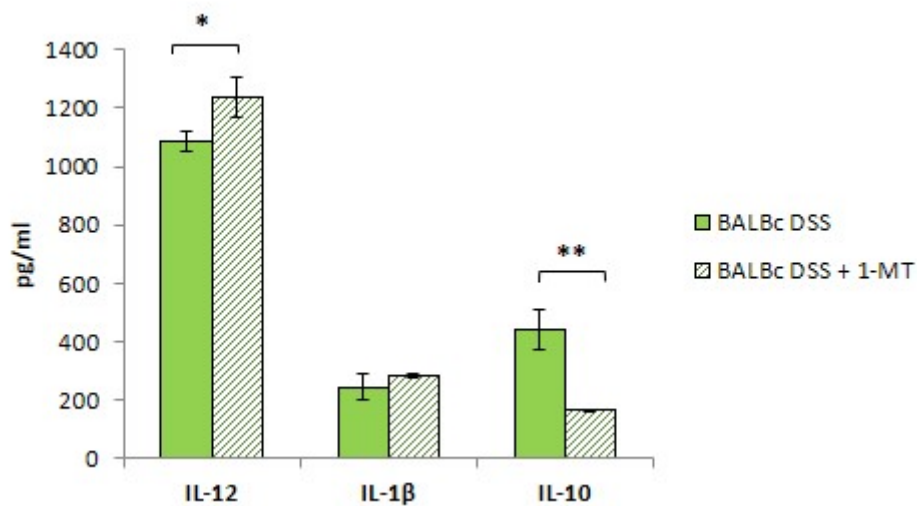
Графикон 15а



Графикон 15б

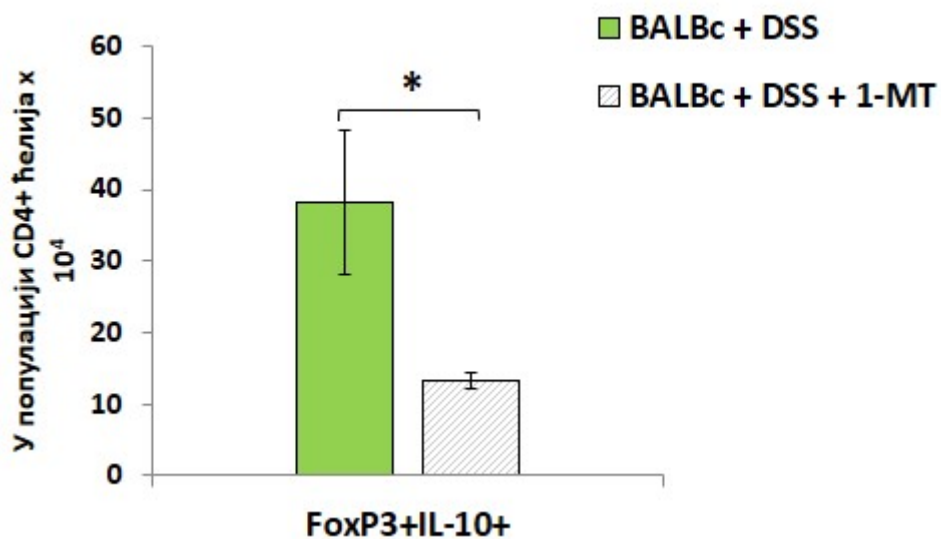
Графикон 15. Клинички (а) и хистолошки скор (б) након блокирања IDO-а употребом 1MT.

У серуму ових животиња су измерене значајно веће концентрације IL-12 као и знатно мање концентрације IL-10 (Графикон 16) а забележен је и значајно мањи број Treg лимфоцита који продукују IL-10 него у мишева третираних само DSS-ом (Графикон 17).



Графикон 16

Графикон 16. Серумске концентрације IL-12, IL-1β, IL-10 након хемијске блокаде IDO-а употребом 1-MT.



Графикон 17

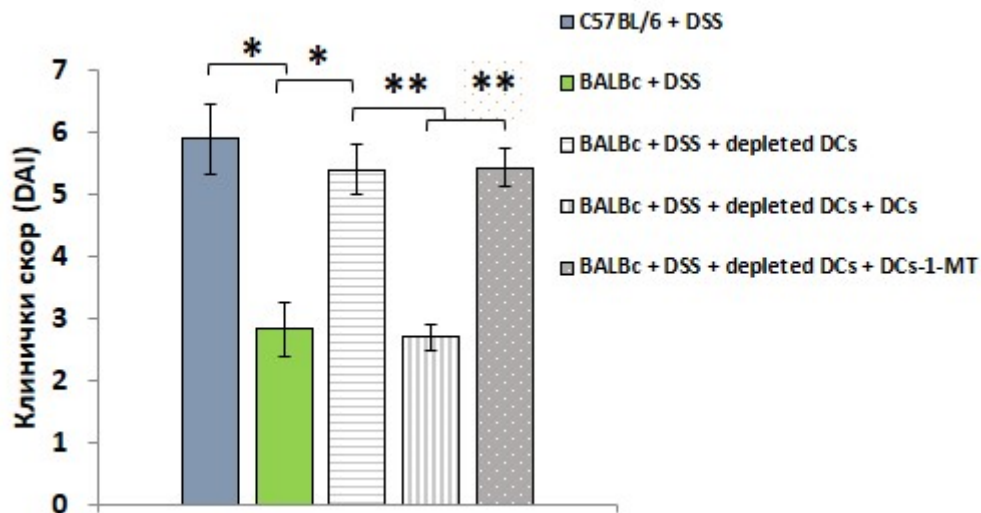
Графикон 17. Број FoxP3 ћелија које продукују IL-10 након примене 1-MT.

#### **4.5. Дендритске ћелије активношћу IDO-а индукују експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита што је одлучујуће за регенерацију слузнице црева BALB/c мишева у моделу колитиса изазваног DSS-ом**

Да би се потврдила хипотеза да је кинуренин, који је у дендритским ћелијама настао ензимском активношћу IDO-а, одговоран за експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита, који су кључни за ублажавање болести и регенерацију слузнице црева, оболелим мишева су, поред DSS-а, апликоване дендритске ћелије у којима је синтеза IDO-а инхибирана применом 1-MT (2mg/ml) и ефекат њихове примене је упоређиван са терапијским ефектима дендритских ћелија култивисаних у стандардним лабораторијским условима.

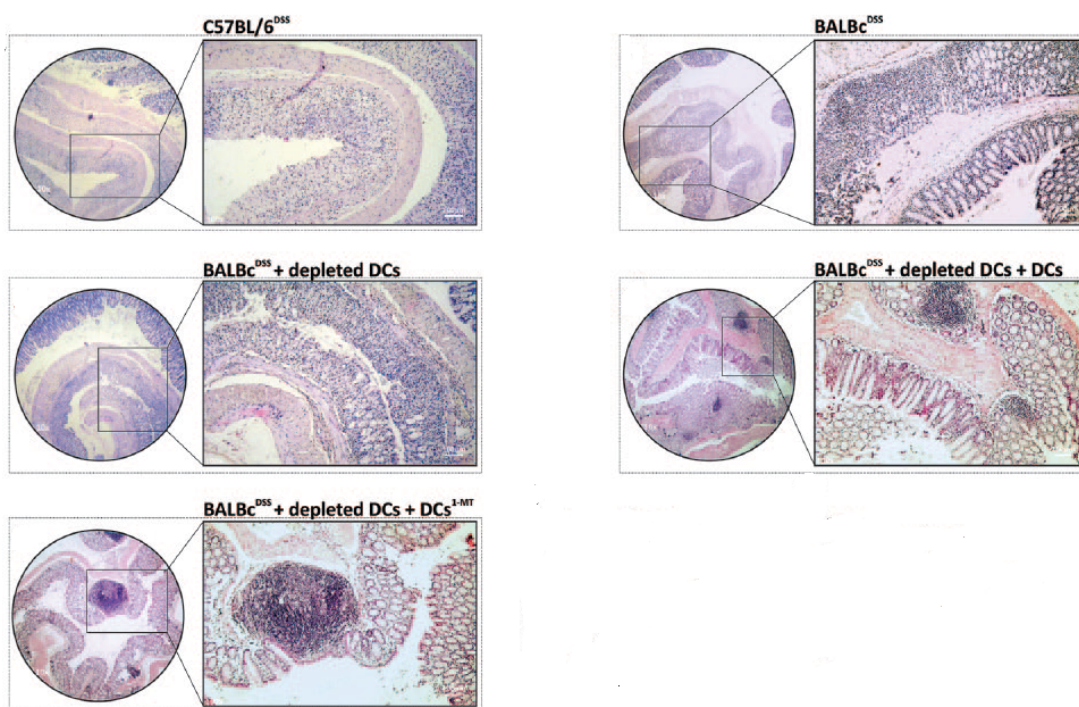
Са циљем да се елиминише утицај резидентних дендритских ћелија, из експерименталних животиња су пре трансфера дендритских ћелија деплетирале резидентне дендритске ћелије интраперитонеалном апликацијом сапорина (*Saporin, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA*) у дози од 2mg/kg. Сапорин циљно деплетира дендритске ћелије црева јер оне експримирају CD103 рецептор за који се овај имунотоксин везује. Након уласка у циљну ћелију, сапорин инхибира синтезу протеина и индукује апоптозу (211).

Деплеција дендритских ћелија узроковала је значајно погоршање колитиса код DSS-ом третираних BALB/c мишева што је било манифестовано значајно већим DAI и хистолошким скором (Графикон 18) насталим услед губитка телесне тежине, обилних водених столица, тешког оштећења цревног епитела и ректалним крварењем (Слика 5, Графикон 19).



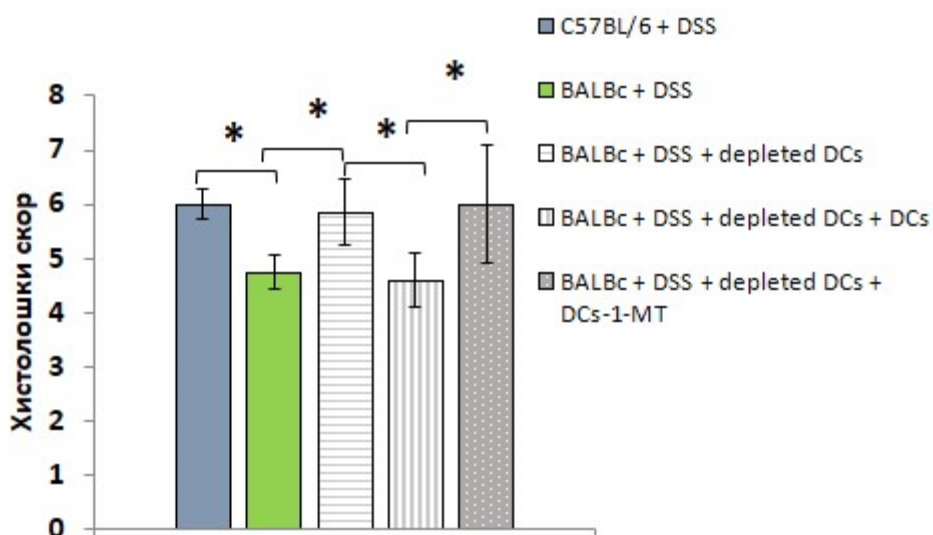
Графикон 18

Графикон 18. Клинички скор DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија.



Слика 5

Слика 5. Репрезентативни исечци ткива колона DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија. Животињама којима смо деплетирали DCs уочено је оштећење епитела праћено едемом и ћелијским инфилтратом, а сличан налаз је уочен и код групе мишева који су примили адоптивним трансфером DCs којима је инхибирана активности IDO-а употребом 1-MT. Са друге стране, BALBc мишеви који су примили DCs архитектура је готово ненарушена.

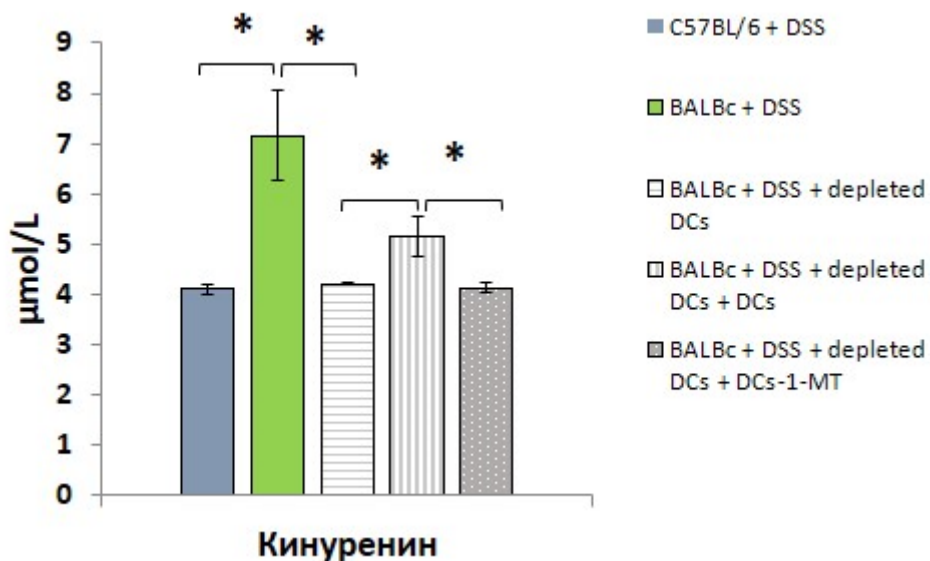


*Графикон 19*

*Графикон 19. Хистолошки скор DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија*

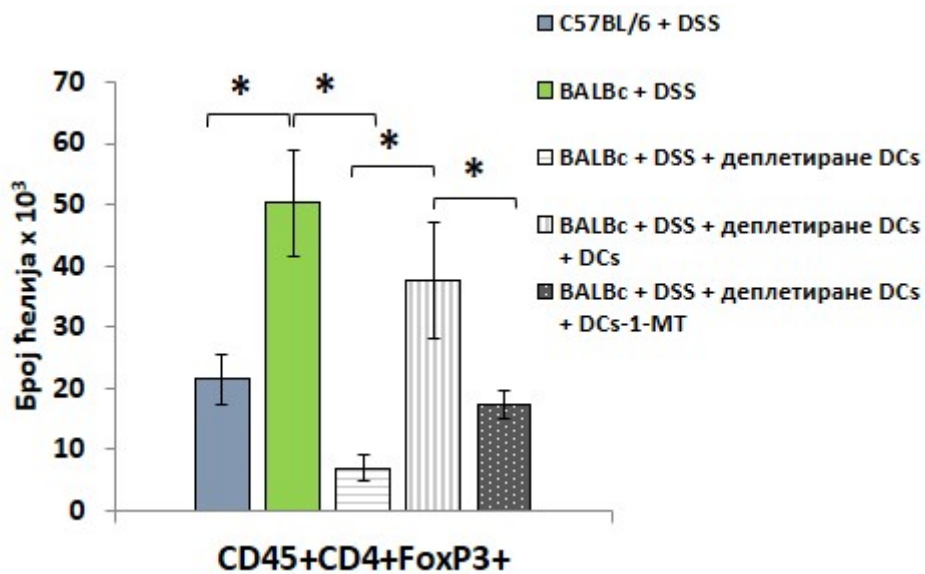
Егзацербацију DSS колитиса код BALB/c мишева третираних сапорином карактеришу сигнификантно смањене концентрације кинуренина у серуму (Графикон 20) и значајно смањење укупног броја Treg лимфоцита у ламини проприји црева, што указује на значај кинуренинског пута у дендритским ћелијама за експанзију T регулаторних лимфоцита и за њихову протективну улогу у колитису (Графикон 21). Након трансфера дендритских ћелија статистички значајно је порастао и клинички (Графикон 18) и хистолошка скор (Слика 4, Графикон 19). Уз то, у серумима ових животиња измерене су значајно веће концентрације кинуренина (Графикон 20), а у ламини проприји црева уочен је значајно већи број Treg лимфоцита (Графикон 21). Код мишева којима су апликоване дендритске ћелије којима је претходно супримирана активност IDO-а није уочено смањење болестини је уочен већи број Treg лимфоцита у цревима што недвосмислено потврђује да дендритске ћелије посредством IDO-а промовишу експанзију Treg лимфоцита чиме омогућују регенерацију слузнице црева (Графикон 18, 19, 20, 21, Слика 5).





Графикон 20

Графикон 20. Серумске концентрације кинуренина код DSS-ом третираних BALBc мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија



Графикон 21

Графикон 21. Број Treg лимфоцита излованих из ламине проприје DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија

#### 4.6. Фази ремисије и регенерације слузнице црева у људи оболелих од улцерозног колитиса карактеришу веће концентрације кинуренина и у серумима и у фецесима

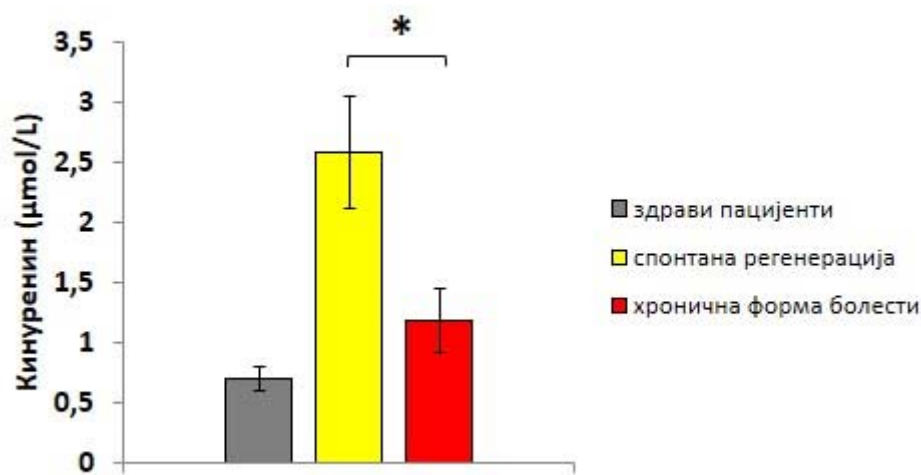
Да би се проверила релевантност резултата добијених у мишијем моделу болести, анализирани су концентрације кинуренина у серуму и фецесу пацијената оболелих од улцерозног колитиса у различитим фазама болести и добијени подаци су поређени са резултатима добијеним код здравих испитаника. Оболели пацијенти су подељени у две експерименталне групе: у прву су сврстани болесници у ремисији са регенерацијом слузнице црева, а у другу пацијенти који пате од хроничног, перзистирајућег колитиса (Табела 7).

	Регенерација слузнице црева	Хронична форма болести
Број пацијената, N=65(%)	39 (60%)	26 (40%)
Пол (мушки/женски), N	19/20	19/7
Старост, медијана, (опсег)	50.28 (23-71)	50.12 (26-79)
Hb, медијана, (интерквartil)	10/23/6	1/14/11
Fe, медијана, (интерквartil)	134 (8)	109 (19)
Феритин, медијана, (интерквartil)	14.5 (6.10)	7.15 (5.53)
Тромбоцити, медијана, (интерквartil)	392 (110)	480 (121.5)
UIBC, медијана, (интерквartil)	44 (13)	32 (19)
TIIC, медијана, (интерквartil)	52 (12)	56 (13.25)
S4, медијана, (интерквartil)	0.21 (0.18)	0.35 (0.31)
S3, медијана, (интерквartil)	1.3 (0.39)	1.75 (1.02)
САЕ, медијана, (интерквartil)	1.8 (1.95)	3.75 (2.54)
Са 19-9, медијана, (интерквartil)	2.9 (2.4)	12.5 (16.50)
Hb-хемоглобин, Fe-гвожђе, UIBC-Слободни капацитет везивања гвожђа, TIIC-Укупан капацитет везивања гвожђа		

Табела 7

Табела 7. Параметри мерени код оболелих од улцерозног колитиса на основу којих су сврставани у експерименталне групе.

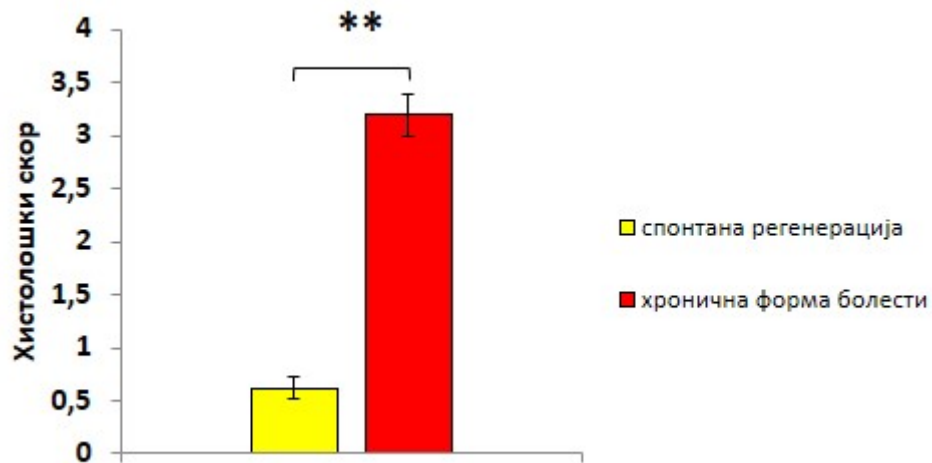
Веће концентрације кинуреина у серуму измерене су у обе групе оболелих у поређењу са здравим испитаницима. Концентрација кинуренина у серуму пацијената код којих је колитис у фази ремисије су биле значајно веће него у групи оболелих од хроничног перзистентног облика колитиса, односно постојала је статистички значајна, средње јака негативна корелација између серумске концентрације кинуреина и клиничког скорa. (Графикон 22).



*Графикон 22*

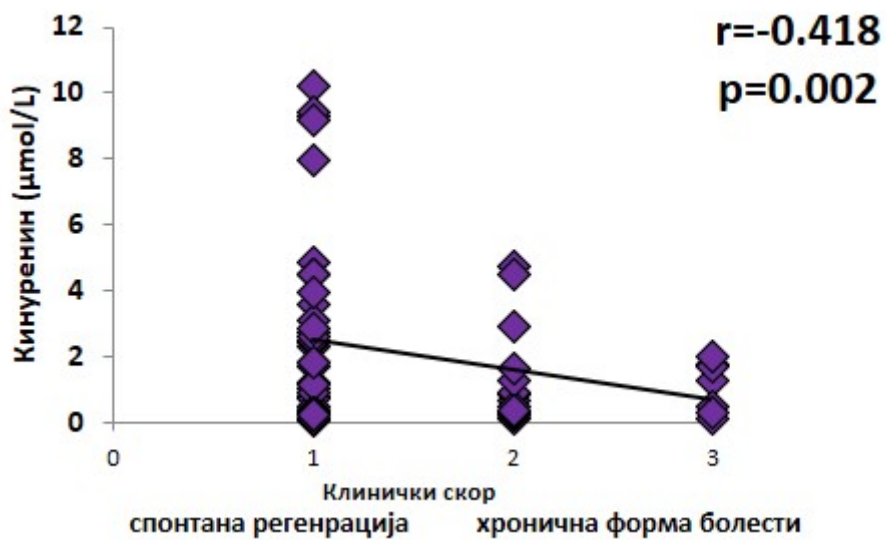
*Графикон 22. Серумске концентрације кинуренина.*

Већим концентрацијама серумског кинуреина (Графикон 24) одговарали су ткивни исечци са јасним знацима очуваних крипти и регенерације слузнице, док је јасна хистолошки регистрована деструкција епитела са збрисаним криптама и израженим ћелијским инфилтратима уочена код пацијената који су имали ниже вредности кинуренина у серуму (Слика 6, Графикон 23).



Графикон 23

Графикон 23. Хистолошки скор пацијената.

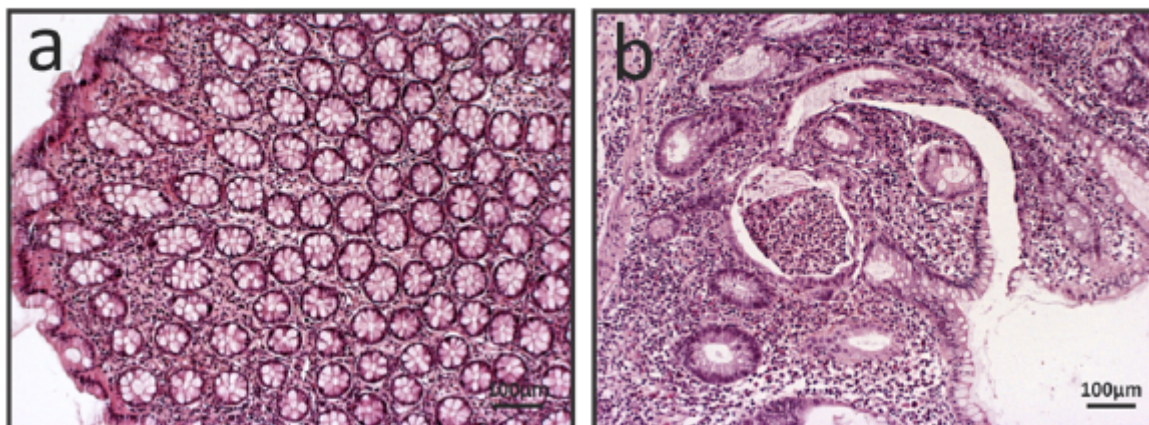


Графикон 24

Графикон 24. Статистички значајна, средње јака негативна корелација између концентрације кинуренина у серуму и клиничког скор

### Спонтана регенераија

### Хронична форма болести



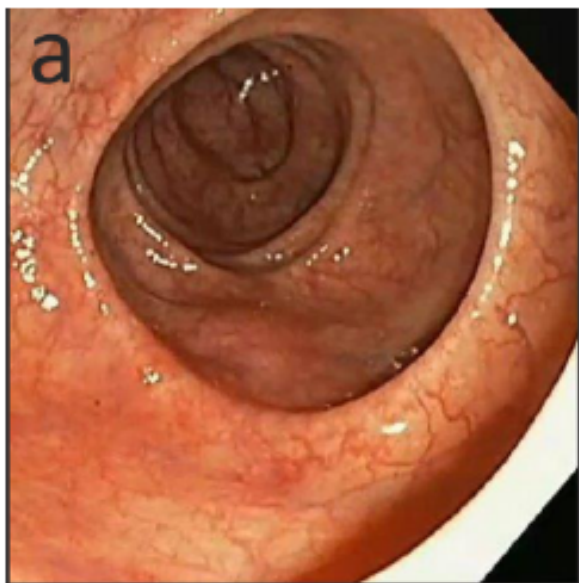
Слика 6

*Слика 6. Репрезентативни исечци ткива колона. На хистолошким препаратима слузнице црева пацијената код којих је колитис у ремисији уочавају се очуване крипте и регенерација слузнице црева наспрам збрисаних крипти и ћелијских инфилтрата код пацијената са прогресивном формом болести.*

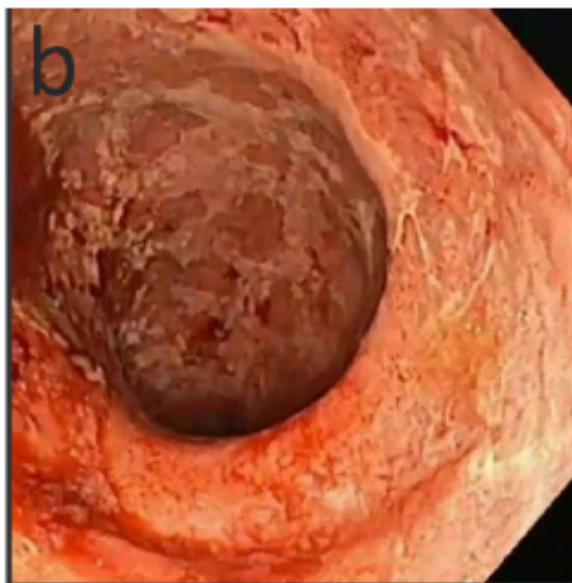
Код пацијената са хроничним презистирајућим обликом колитиса, код којих је већи ендоскопски скор, ендоскопским прегледом уочили су се еритем, ерозије и збрисана васкуларна мрежа (Слика 7), док су вредности кинуренина у серуму биле значајно мање (Графикон 22). у поређењу са пацијентима у ремисији који су имали значајно мањи ендоскопски скор (Графикон 25) .

Веће вредности кинуренина у серуму уочене су код пацијената код којих су биле мање серумске концентрације инфламацијских параметара (CRP-а, TNF- $\alpha$  и CXCL11) (Графикон 26а, б, ц).

**а-спонтана регенерација**

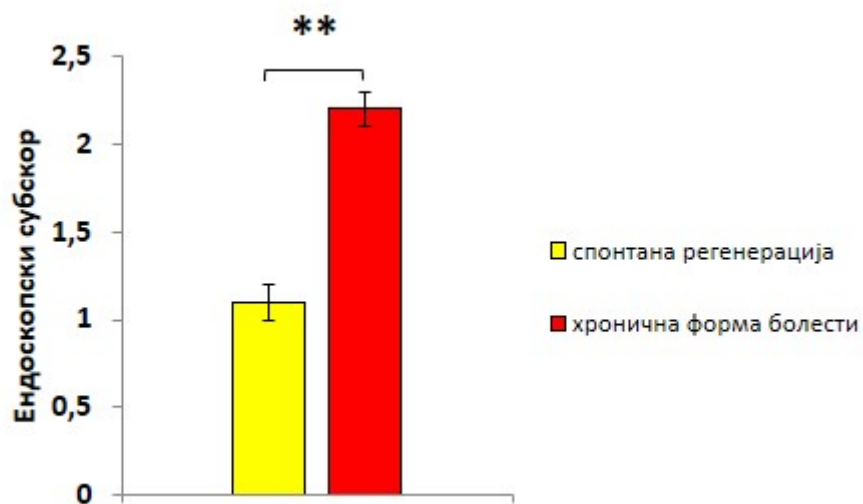


**б-хронична форма болести**



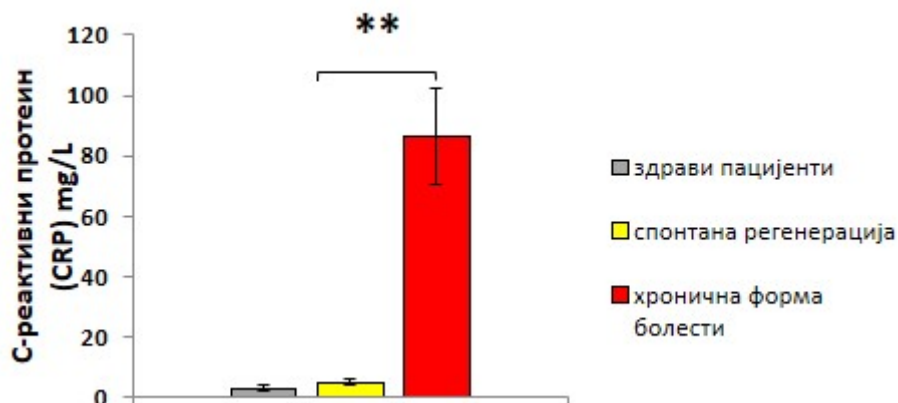
Слика 7

Слика 7. Ендоскопским налазом се уочавају ерозије, збрисана васкуларна мрежа и еритем ко пацијената са хроничним презистирајућим обликом колитиса док ове промене нису уочене код пацијената код којих је колитис у ремисији

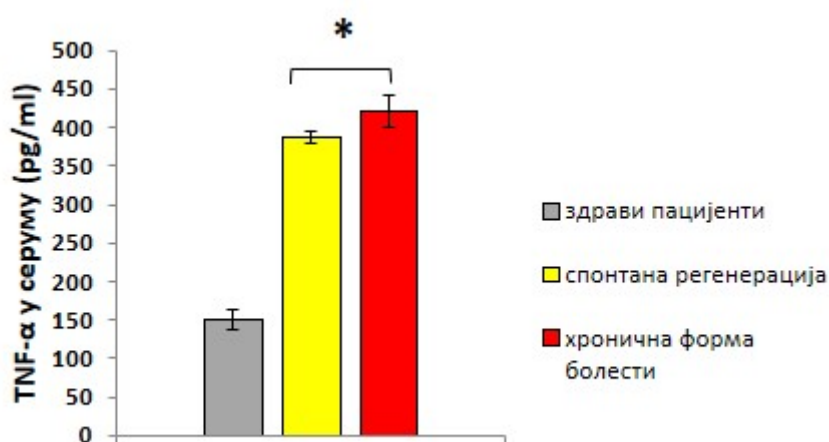


Графикон 25

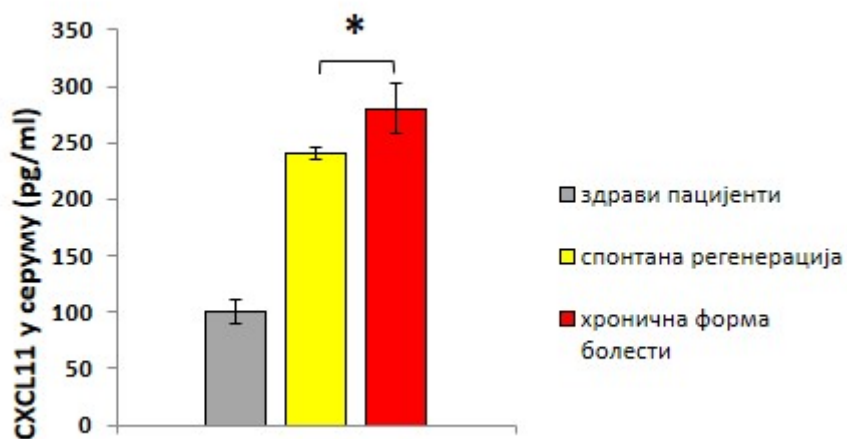
Графикон 25. Мауо ендоскопски субскор.



Графикон 26а



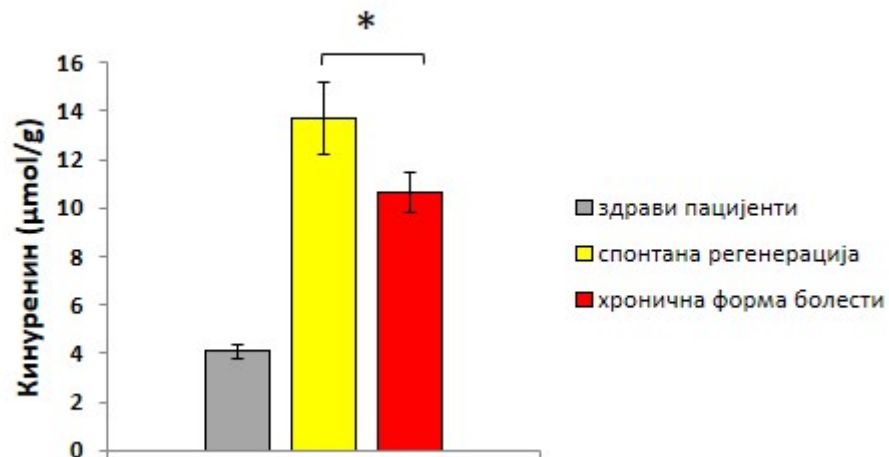
Графикон 26б



Графикон 26в

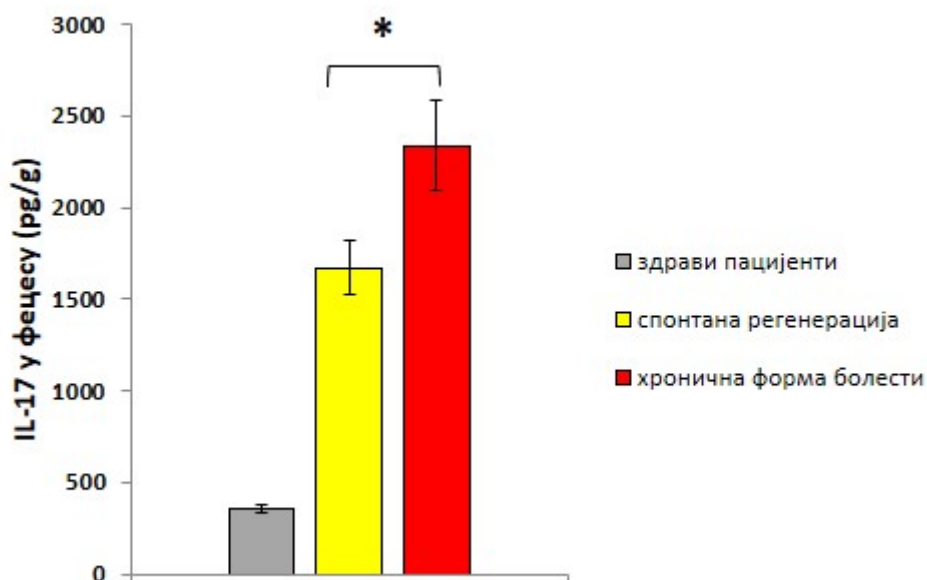
Графикон 26. Серумске концентрације CRP-а(а), TNF-α(б) и CXCL11(в)

У фецесима оболелих од улцерозног колитиса региструју се значајно веће концентрације кинуренина него код здравих испитаника. У групи оболелих са спонтаном регенерацијом слузнице црева измерене су значајно веће концентрације кинуренина у фецесу него у групи са хроничним перзистентним обликом болести (Графикон 27). Такође, веће концентрације кинуренина праћене су значајно мањим концентрацијама IL-17, TNF- $\alpha$ , фекалног калпротектина као и CXCL11 у фецесу (Графикон 28а,б,в,г).



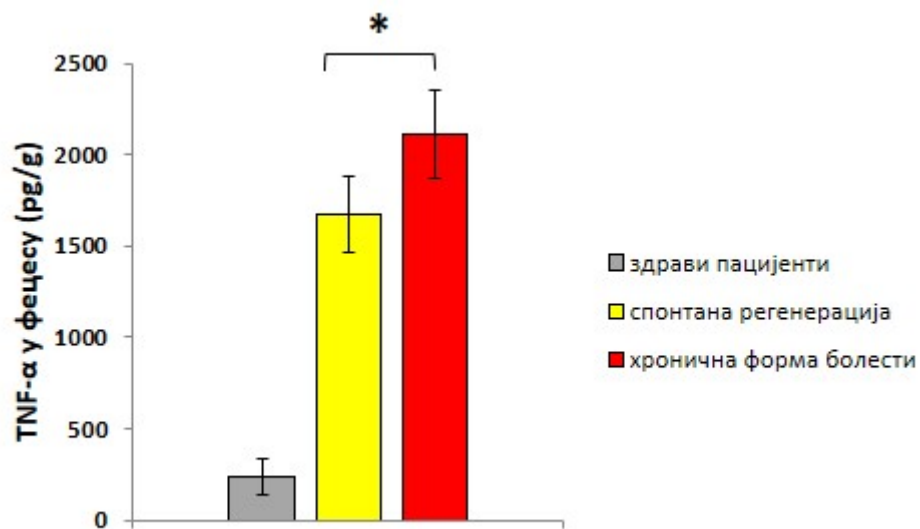
Графикон 27

Графикон 27. Концентрације кинуренина у фецесу.

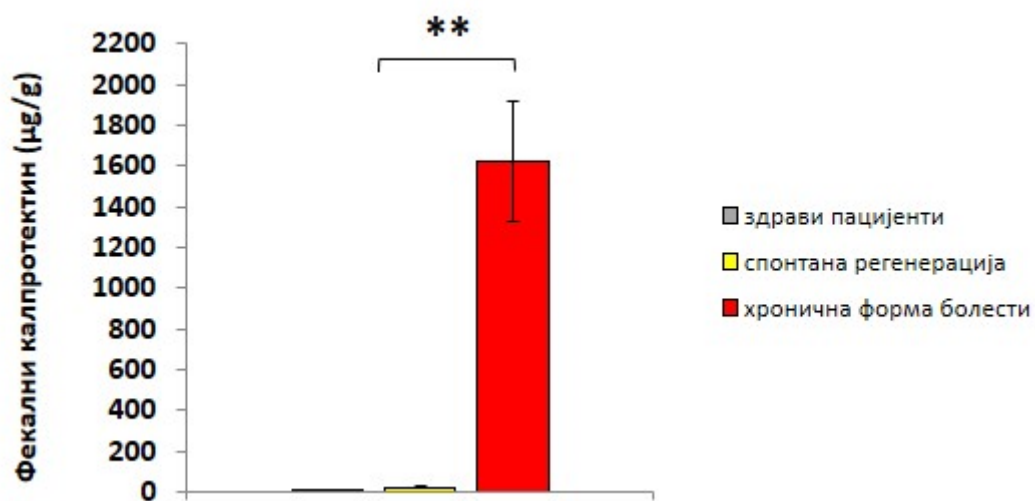


Графикон 28а

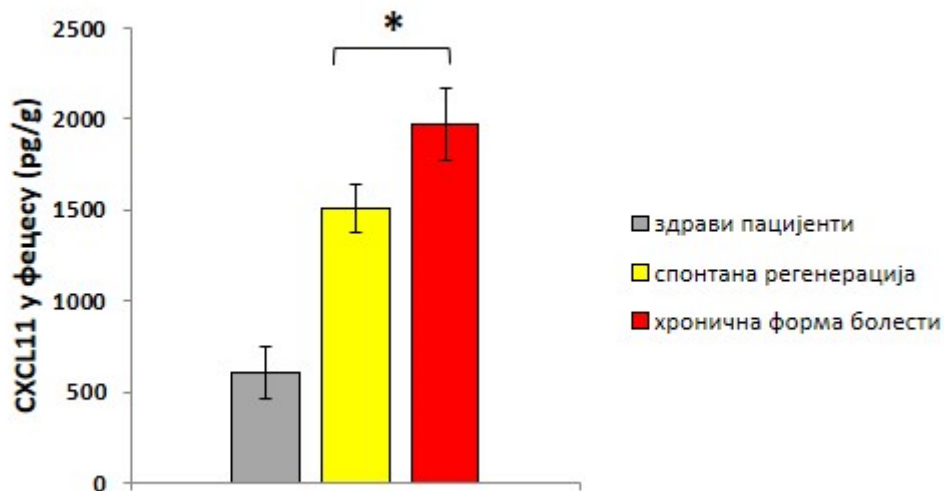




Графикон 28б



Графикон 28в

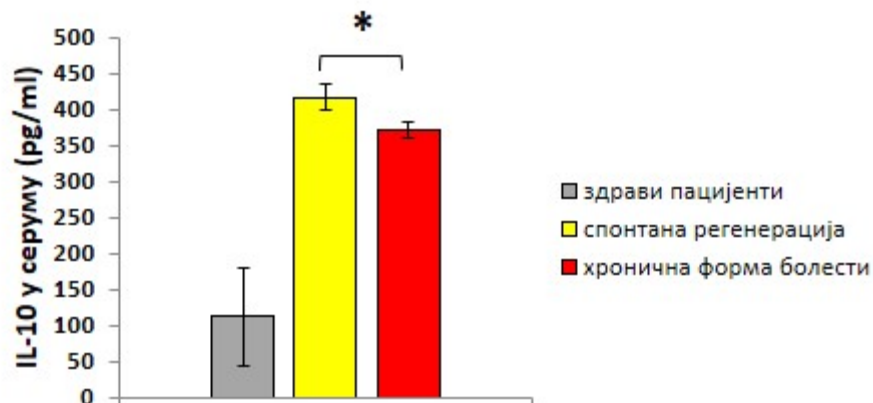


Графикон 28г

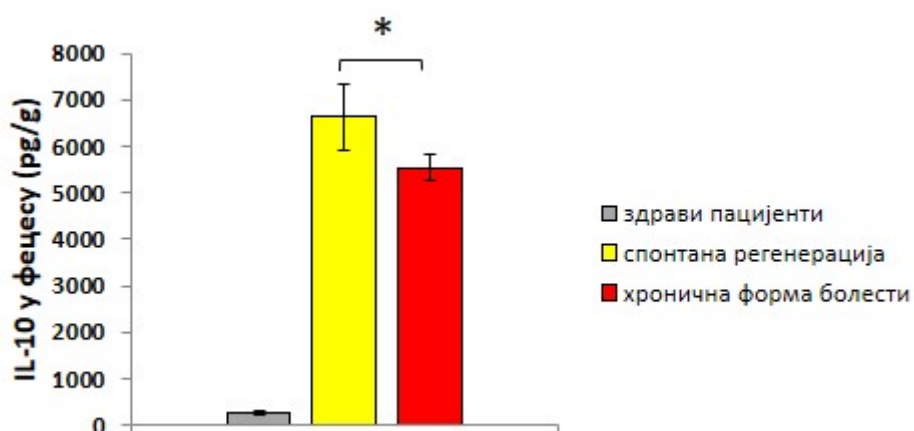
Графикон 28. Концентрације IL-17(а), TNF- $\alpha$ (б), фекални калпротектин(в), CXCL11(г) у фецесу пацијената.

#### 4.7. Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних Treg лимфоцита у сузници колона оболелих од улцерозног колитиса који су у фази ремисије болести

Веће концентрације кинуренина (Графикон 27, 22) праћене су већим концентрацијама IL-10 у серумима и фецесима оболелих (Графикон 29 а,б).



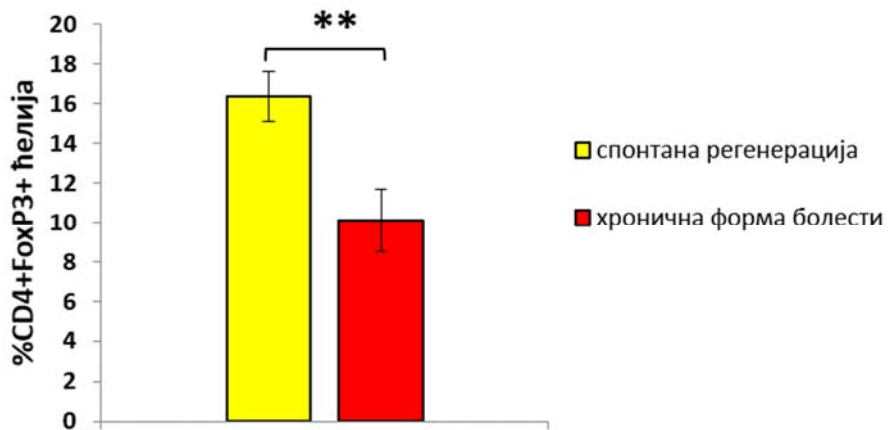
Графикон 29а



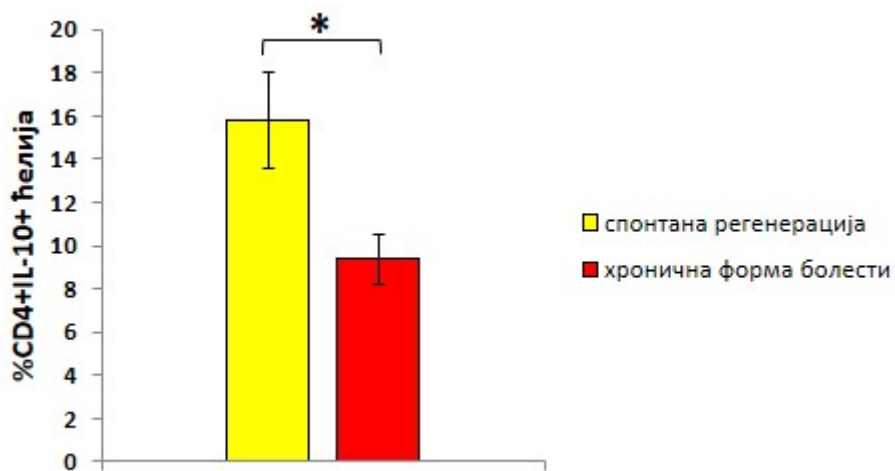
Графикон 29б

Графикон 29. Измерене концентрације IL-10 у серумима (а) и фецесима (б) пацијената.

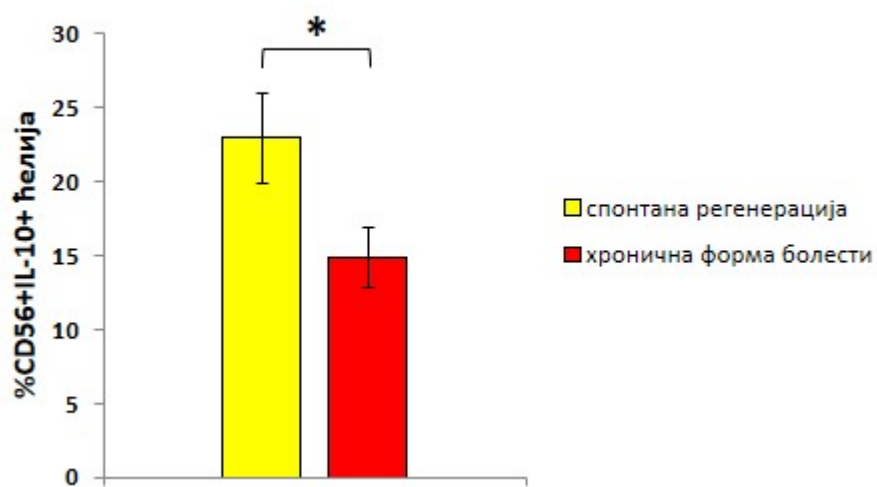
Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних CD4+FoxP3+, CD4+IL-10+ Treg лимфоцита, CD56+IL-10+ NK ћелија и смањење броја инфламацијских CD4+ IFN- $\gamma$ + T и CD56+IL-17+ NK ћелија у ламини проприји црева оболелих у фази ремисије болести (Графикон 30 а, б, в, г, д, њ).



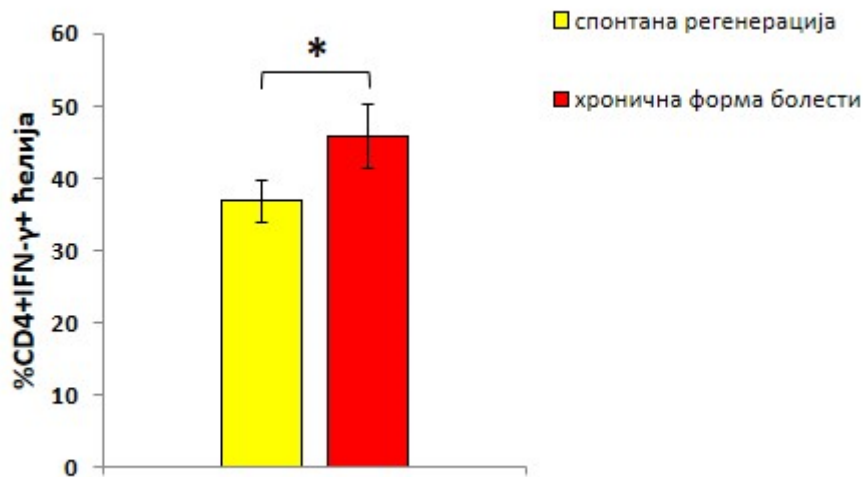
Графикон 30а



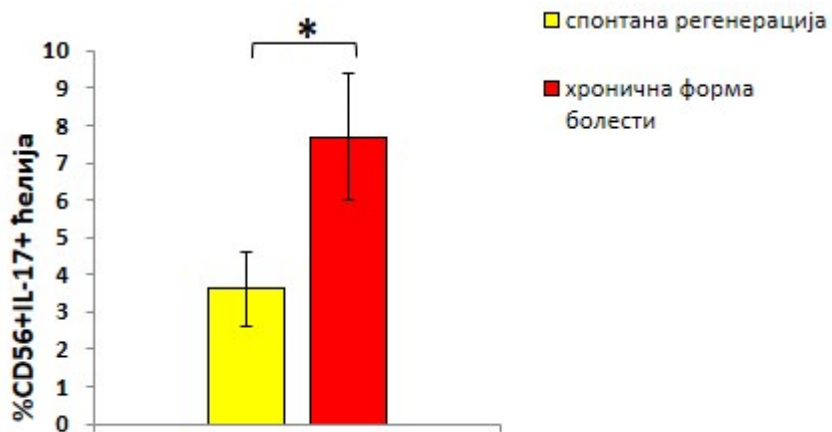
Графикон 30б



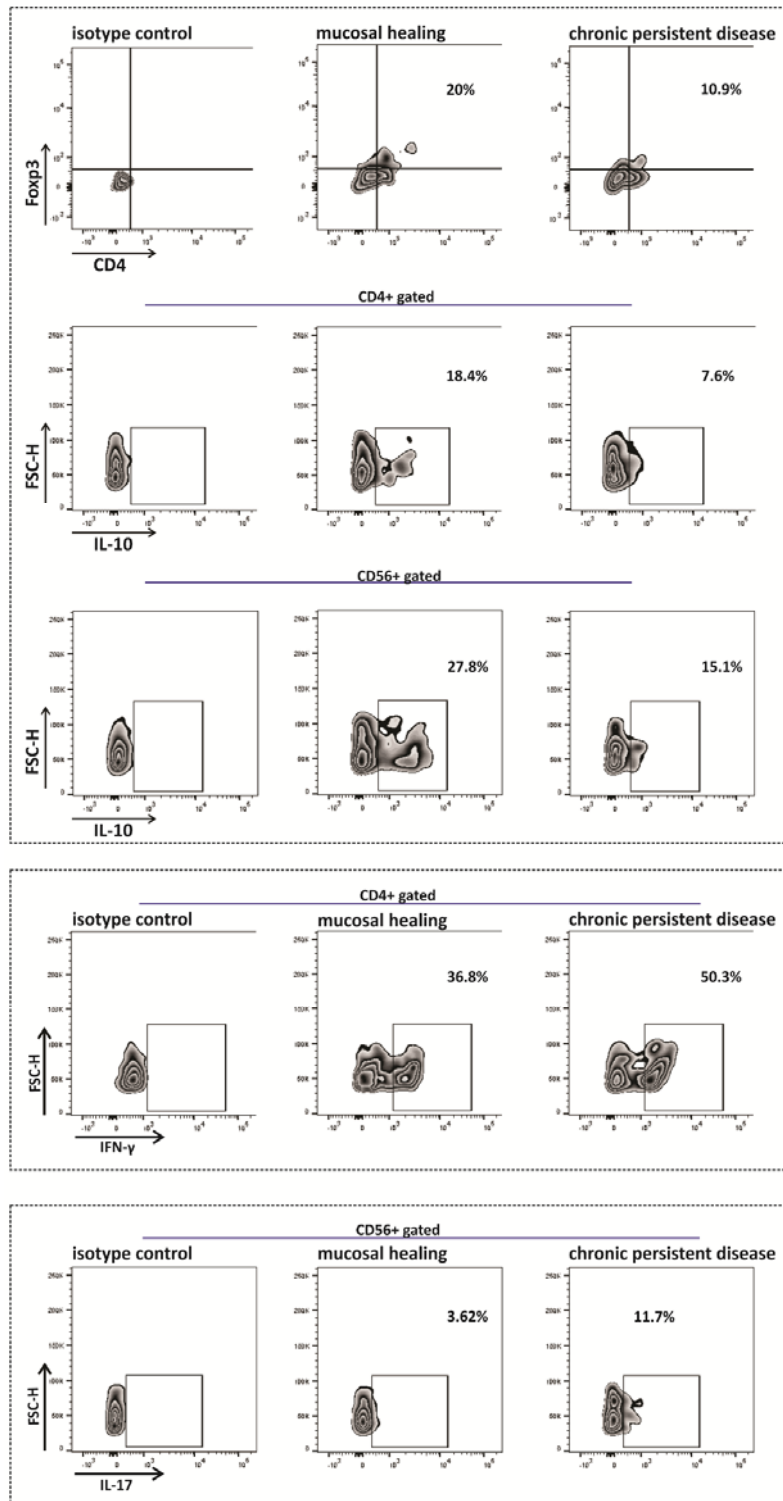
Графикон 30в



Графикон 30г



Графикон 30д

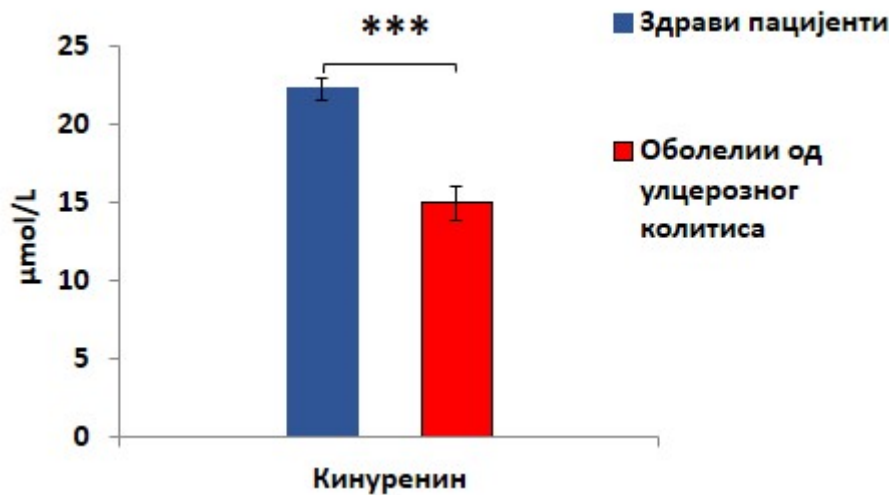


Графикон 30ђ

Графикон 30. Присуство Трег лимфоцита који продукују IL-10(а), Т лимфоцита који продукују IL-10(б), NK ћелије које продукују IL-10(в), Т лимфоцита који продукују IFN-γ(г), NK ћелија које продукују IL-17(д) и репрезентативни дот плотови(ђ) у ламини проприји оболелих.

#### 4.8. Мања концентрација кинуренина и веће концентрације инфламацијских цитокина измерене су у сулкусним течностима оболелих од улцерозног колитиса у поређењу са здравим особама

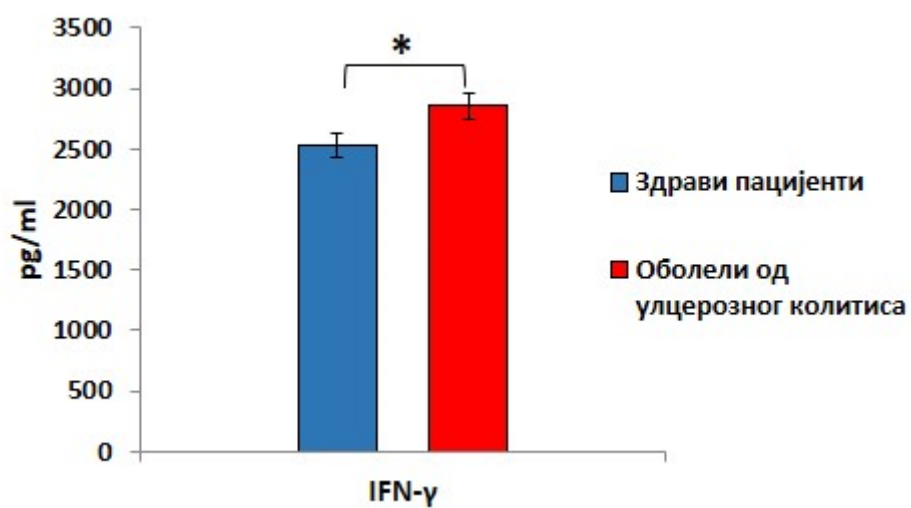
Пораст инфламацијских цитокина и неконтролисан имунски одговор у цревима оболелих од улцерозног колитиса праћен је системском инфламацијом која се може манифестовати и патолошким променама у усној дупљи. Сулкусна течност је лако доступна и њена анализа омогућава праћење параметара локалне и системске инфламације. Сходно томе, испитана је могућност мерења кинуренина у сулкусној течности као потенцијалног дијагностичког параметра за праћење инфламације код оболелих од улцерозног колитиса. Концентрације кинуренина измерене у течностима узоркованих из гингивалних сулкуса оболелих од улцерозног колитиса су биле статистички значајно мање него концентрације кинуренина добијених из сулкусних течности здравих особа. (Графикон 31).



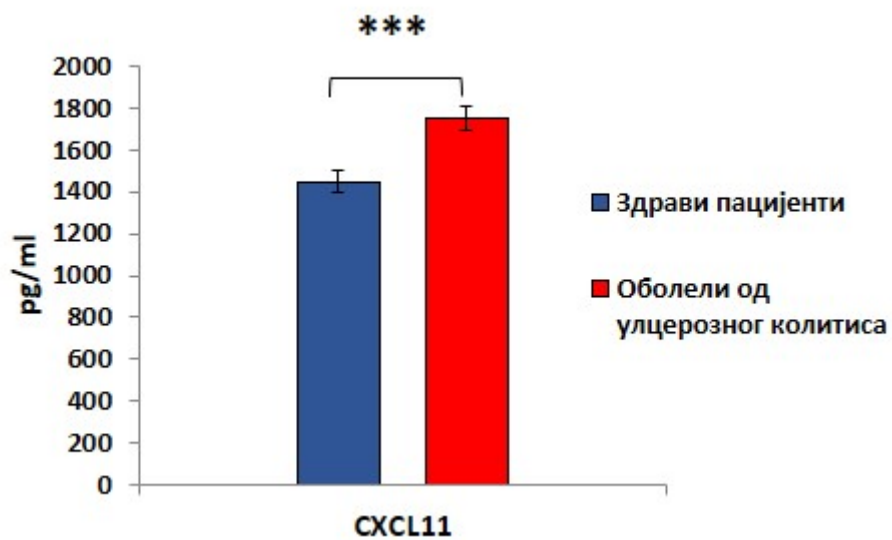
Графикон 31

Графикон 31. Измерене концентрације имуносупресивног кинуренина у сулкусној течности оболелих и здравих пацијената

Мање концентрације кинуренина праћене су и значајно већим концентрацијама инфламацијских цитокина у гингивалној течности: IFN- $\gamma$ , CXCL11, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23, IL-17 (Графикон 32 а, б, в, г, д, њ).

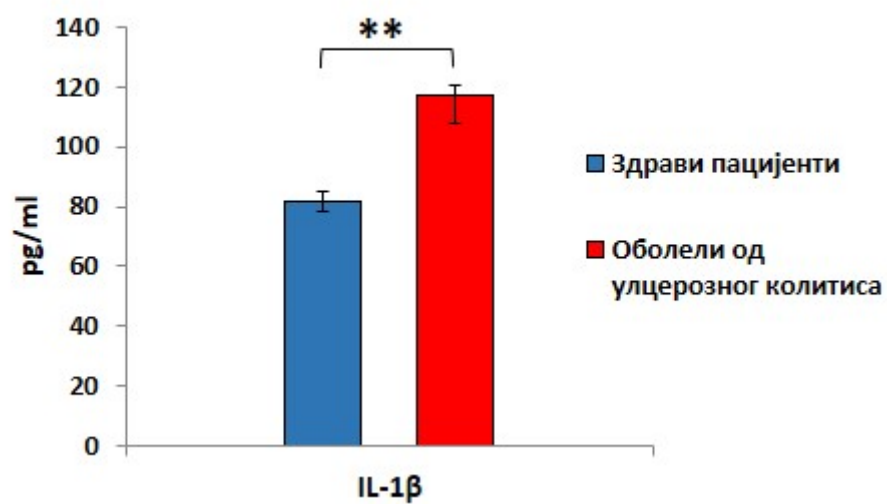


Графикон 32а

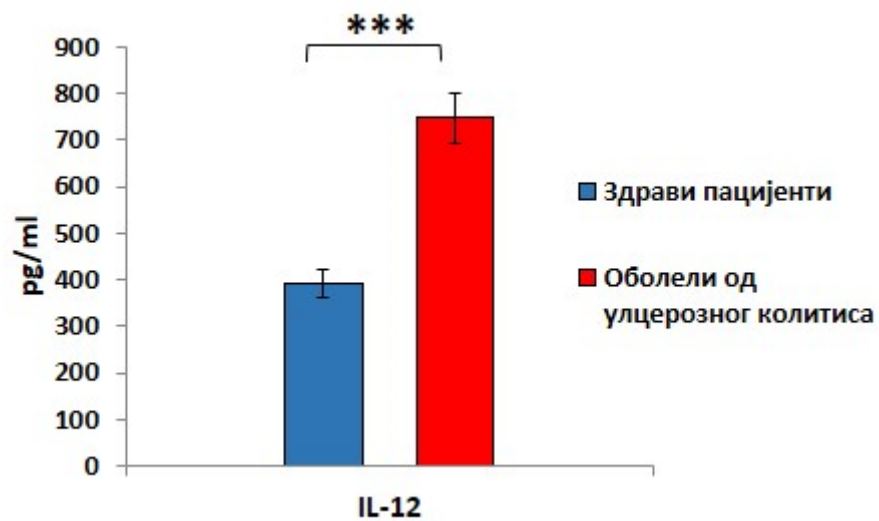


Графикон 32б

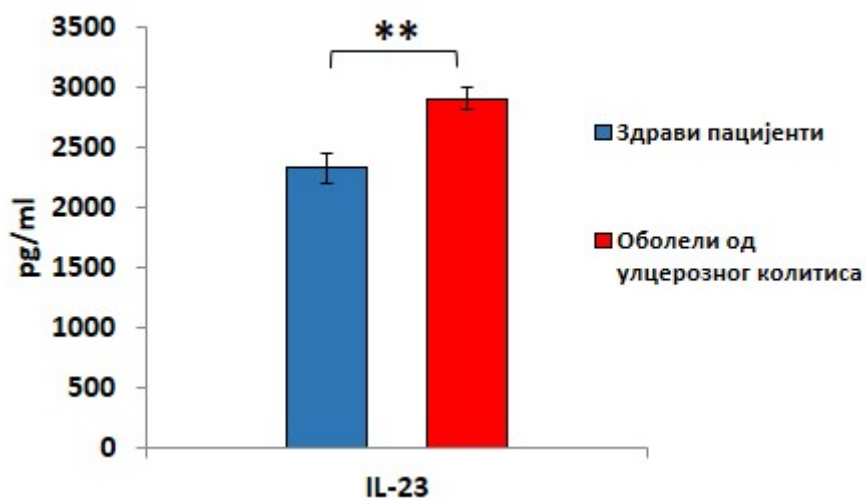




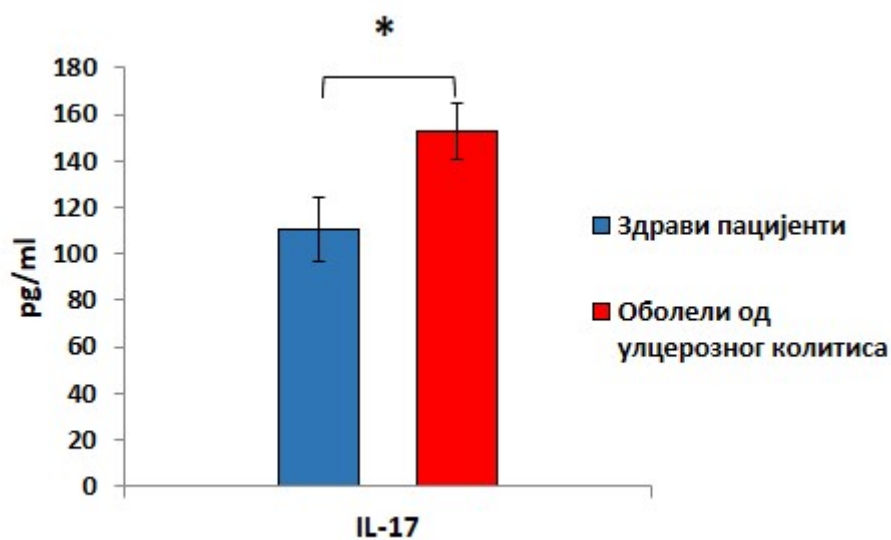
Графикон 32в



Графикон 32г



Графикон 32д



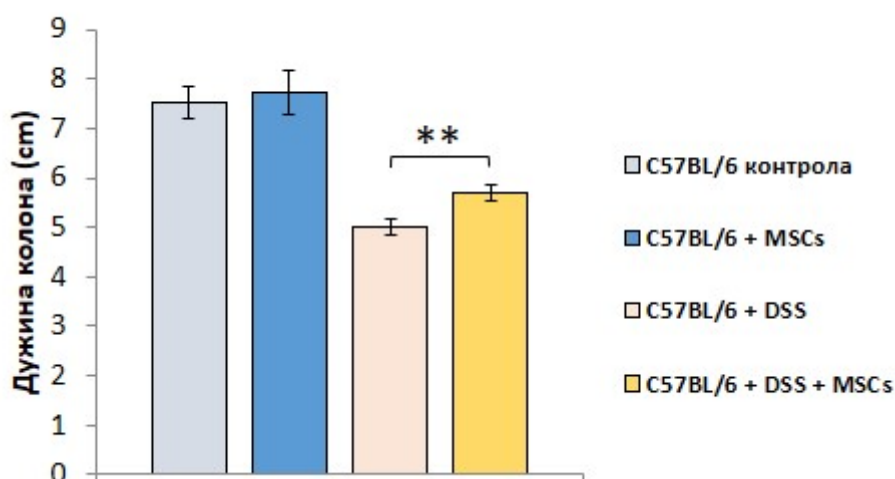
Графикон 32ђ

Графикон 32. Измерене концентрације проинфламацијским цитокина мерених у сулкусној течности: *IFN- $\alpha$* (а), *CXCL11*(б), *IL-1 $\beta$* (в), *IL-12*(з), *IL-23*(д), *IL-17*(ђ).

#### 4.9. Интраперитонеална апликација мезенхималних матичних ћелија мишевима соја C57BL/6 смањује све клиничке, биохемијске и хистолошке параметре колитиса изазваног DSS-ом

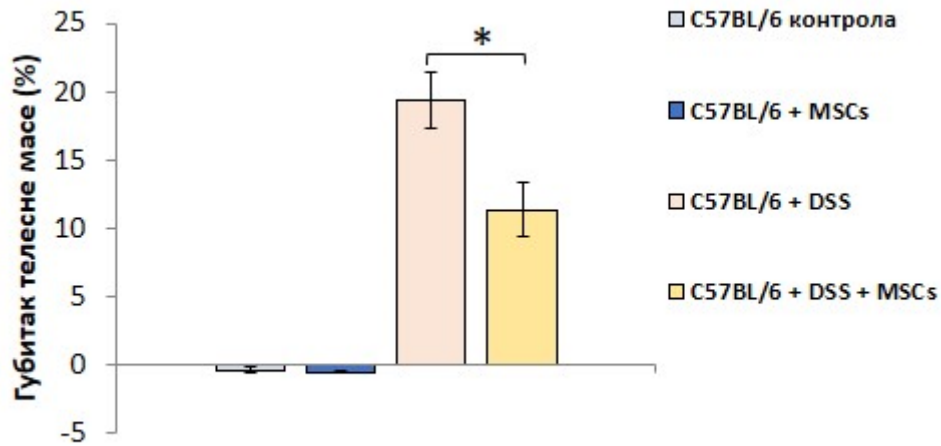
Поред дендритских ћелија, MSCs су главни ћелијски изворIDO-а у цревима (183, 184). Због тога је испитиван терапијски потенцијал MSCs у модулацији колитиса.

Другог и петог дана након индукције колитиса мишевима соја C57BL/6 интраперитонеално је апликовано  $1 \times 10^6$  MSCs изолованих из костне сржи животиња истог соја. Мишеви третирани на овај начин су развили значајно лакши облик болести. Колон мишева којима су апликоване MSCs био је значајно дужи него колон мишева којима нису апликоване ове ћелије (Графикон 33). Такође, код мишева који су примили MSCs се регистровао значајно мањи губитак телесне масе и изостанак ректалног крварења (Графикон 34). што је резултирало мањим клиничким скором (Графикон 34).



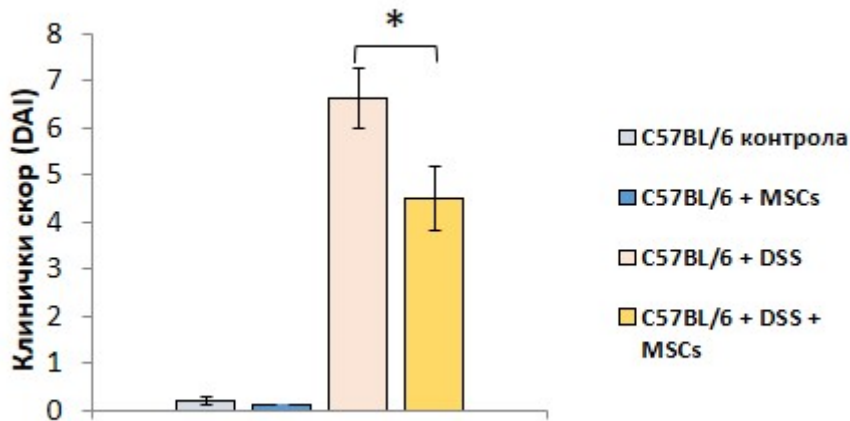
Графикон 33

Графикон 33. Дужина изолованих колоне C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.



Графикон 34

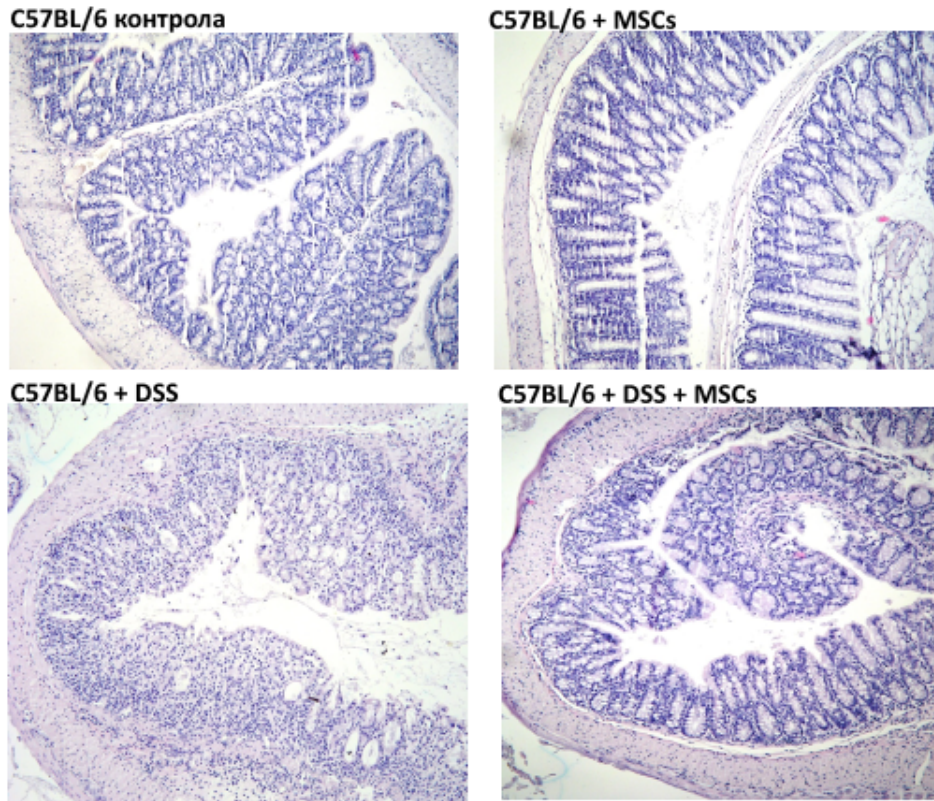
Графикон 34. Губитак телесне масе C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.



Графикон 35

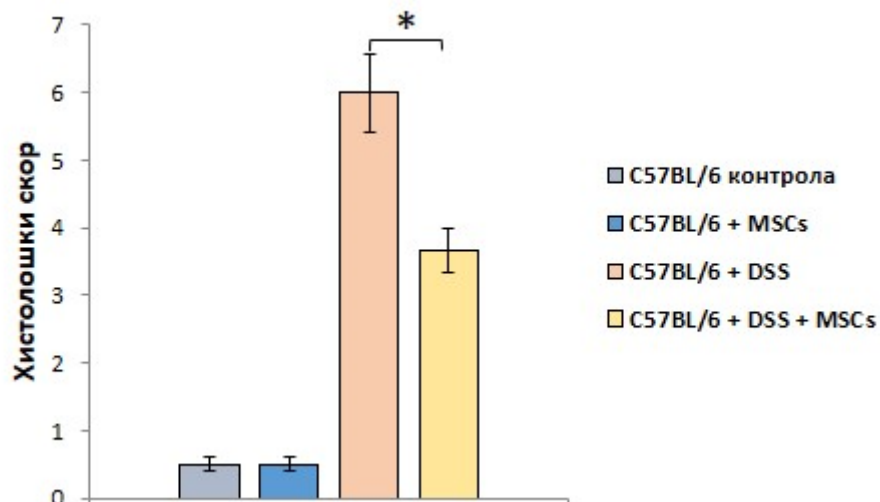
Графикон 35. Клинички (DAI) скор C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.

Лакши облик болести мишева који су примили MSCs потврђен је и значајно мањим хистолошким скором: на хистолошким препаратима DSS-ом третираних C57BL/6 животиња којима су апликоване MSCs је уочавају се значајно мање оштећење ткива колона уз ћелијски инфилтрат који је мање целуларан и углавном ограничен. На посматраним препаратима мишева третираних DSS-ом јасно се уочава деструкција крипти, ерозија епитела праћена истањењем ламине проприје док је ћелијски инфилтрат дифузан, изражен а ћелије прожимају све слојеве зида колона (Слика 8, Графикон 36).



Слика 8

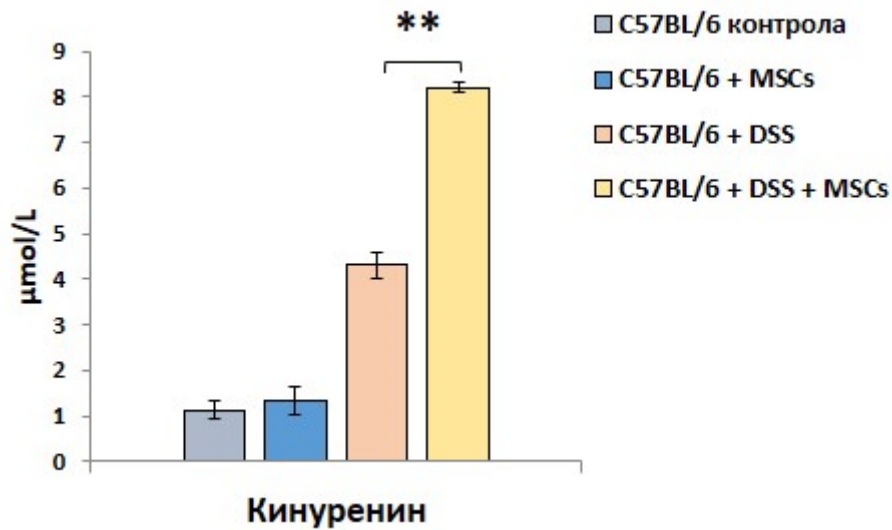
Слика 8. Репрезентативни исечци зида дебелог црева после апликације DSS-а и апликације MSCs. Код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 оштећења епителних ћелија црева су била опсежнија, масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева који су третирани MSCs поред ограниченог ћелијског инфилтрата нису уочена већа оштећења структура



Графикон 36

Графикон 36. Хистолошки скор C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.

Лакши облик болести у групи животиња које су примиле MSCs праћен је повишеним серумским концентрацијама кинуренина (Графикон 37).

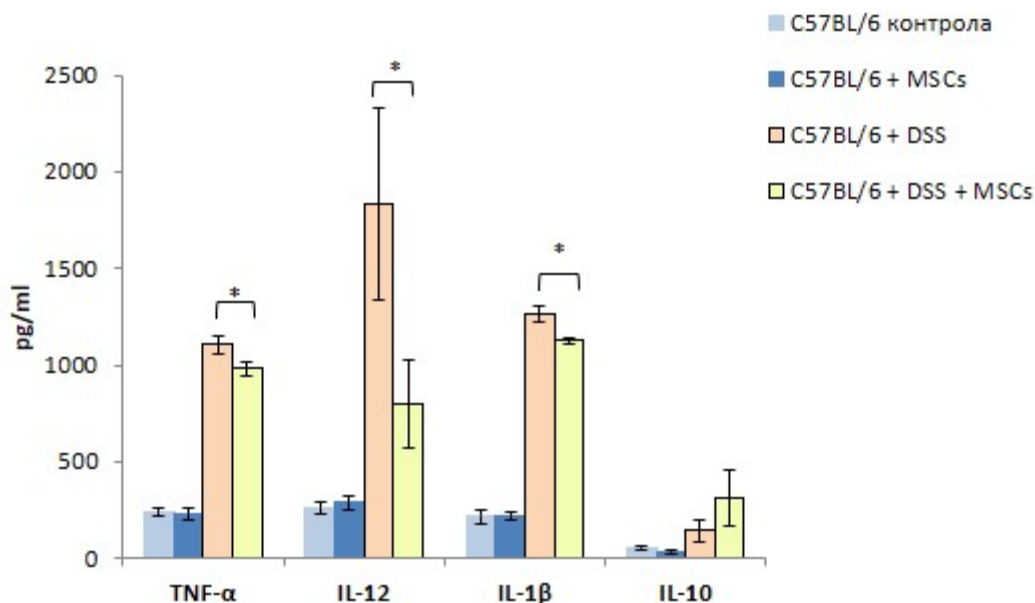


Графикон 37

Графикон 37. Измерене концентрације кинуренина мишевима соја C57BL/6 третираних DSS-ом и након апликације MSCs.

#### 4.10. Примена MSCs код оболелих мишева значајно смањује и концентрацију проинфламацијских цитокина у серуму

У серуму животиња које су примале MSCs измерене су значајно мање концентрације инфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$ ) у поређењу са мишевима којима нису апликоване MSCs (Графикон 39). Уз то, примена MSCs узроковала је пораст концентрације имуносупресивног IL-10 у серуму оболелих животиња (Графикон 38).

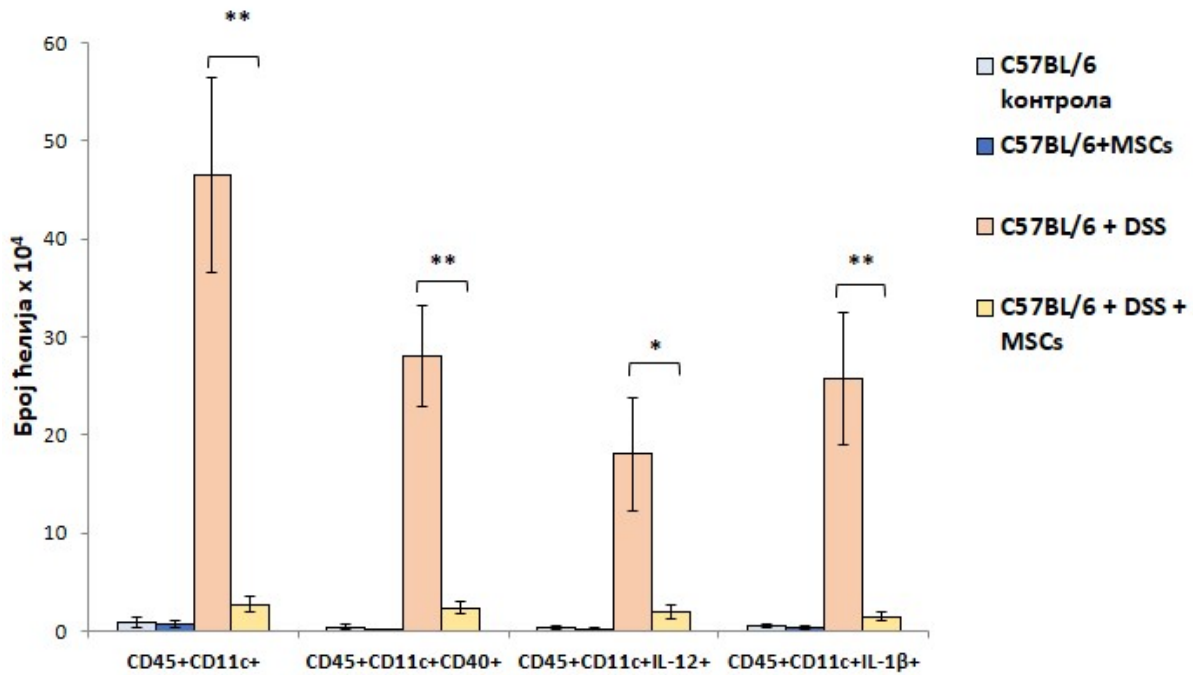


Графикон 38

Графикон 38. Концентрација цитокина (*TNF-α*, *IL-12*, *IL-1β*, *IL-10*) у серумима DSS-ом третираних мишева након апликације MSCs

#### 4.11. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује број инфламацијских дендритских ћелија и макрофага у зиду црева

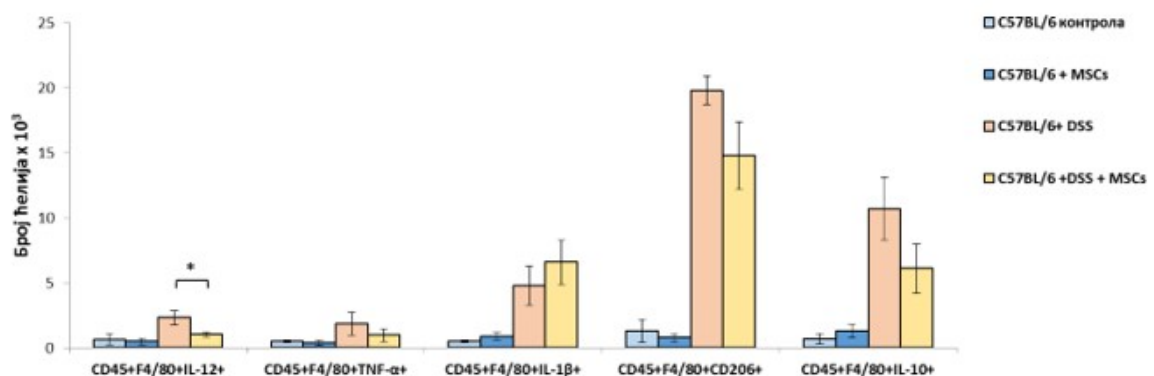
Дванаестог експерименталног дана, из ламине проприје колона C57BL/6 мишева изолован је значајно мањи број проинфламацијских дендритских ћелија (CD45+CD11c+, CD45+CD11c+CD40+, CD45+CD11c+IL-12, CD45+CD11c+IL-1β)(Графикон 39).



Графикон 39

Графикон 39. Изоловане DSs из ламине проприје црева мишева који су примали MSCs.

Примена MSCs значајно смањује и број CD45+F4/80+ макрофага који продукују инфламацијски IL-12. Није регистрована сигнификантна разлика броја CD45+F4/80+TNF $\alpha$ +, CD45+F4/80+IL-1 $\beta$  инфламацијских M1 ни у броју CD45+F4/80+IL-10, CD45+F4/80+CD206+алтернативно активираних M2 макрофага између експерименталних група (Графикон 40) што указује да је ефекат примене MSCs вероватно био последица њиховог утицаја на промену фенотипа и функције дендритских ћелија.



Графикон 40

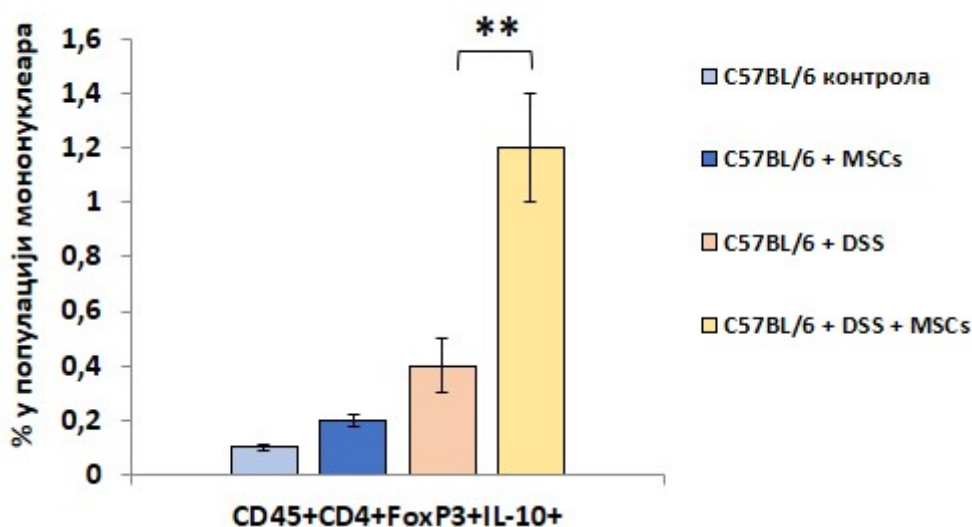
Графикон 40. Изоловани макрофаги из ламине проприје црева мишева који су примали MSCs.



#### 4.12. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује процентуални удео инфламацијских CD4+ ћелија, а повећава проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји

Због чињенице да дендритске ћелије свој утицај на прогресију колитиса остварују и углавном посредно, активацијом Т лимфоцита, анализирано је присуство, фенотип и функција Т лимфоцита у ламинији проприји црева оболелих мишева након апликације MSCs.

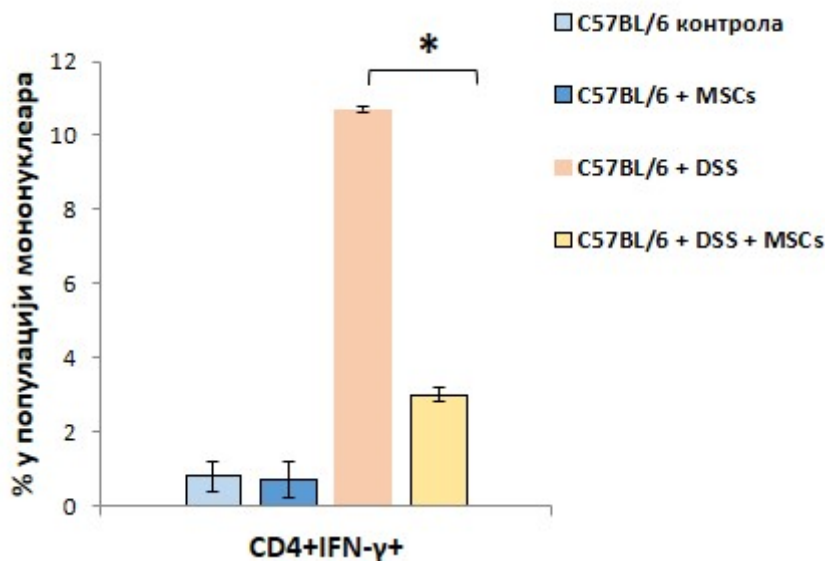
У ћелијским инфилтратима ламине проприје мишева који су примали MSCs био је присутан значајно већи проценат имуносупресивних CD45+CD4+FoxP3+IL-10+ Treg лимфоцита (Графикон 41).



Графикон 41

Графикон 41. Процентуална заступљеност Treg лимфоцита који продукују IL-10 у популацији мононуклеара излованих из ламине проприје мишева након апликације MSCs.

Уз то, у ламини проприји мишева којима су апликоване MSC уочен је знатно мањи проценат инфламацијских CD4+IFN- $\gamma$ + Т лимфоцита (Графикон 42).



Графикон 42

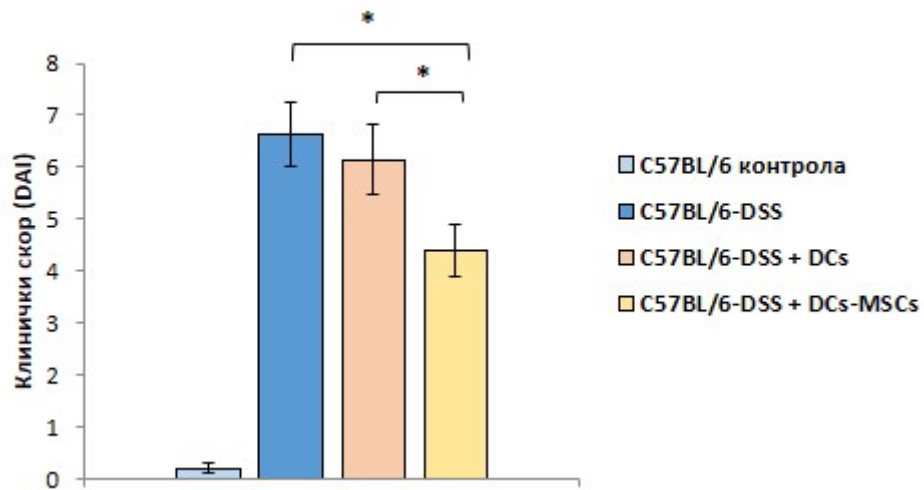
Графикон 42. Процентуална заступљеност T лимфоцита који продукују IFN- $\gamma$  у популацији мононуклеара излованих из ламине проприје мишева након апликације MSCs.

#### 4.13. MSCs повећава имуномодулацијски капацитет аплицираних DCs

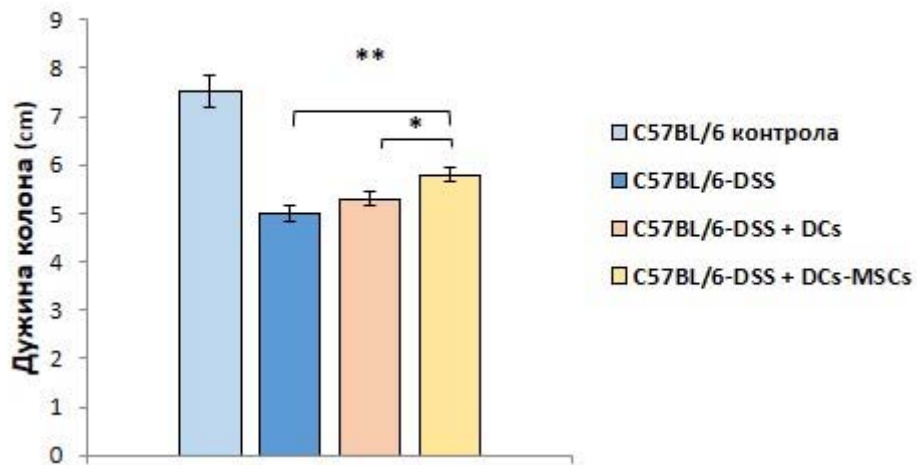
Да би се испитала могућност да се апликацијом MSCs повећају толерогени и имunosупресивни потенцијал дендритских ћелија и на тај начин допринесу смањењу инфламације колоне, оболелим мишевима су апликоване дендритске ћелије претходно изоловане из здравих мишева и кокултивисане са MSCs.

Петог дана експеримента апликовано је интраперитонеално  $20 \times 10^5$  DCs које су кокултивисане са MSCs.

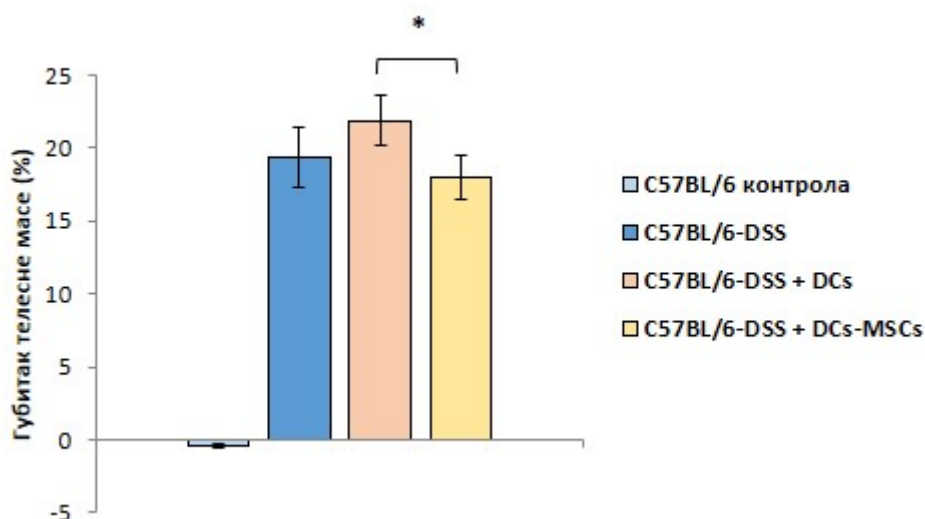
Оболеле животиње које су примиле C57BL/6 дендритске ћелије култивисане у стандардним условима су развиле тежи облик колитиса. Супротно томе, оболели мишеви којима су апликоване C57BL/6 дендритске ћелије претходно култивисане са MSCs, су развиле лакши облик болести, манифестован мањим DAI скором (знатно мањи губитак телесне масе, изостанак ректалног крварења, обилне дијареје и дужи колон) (Графикон 43а, б, в).



Графикон 43а



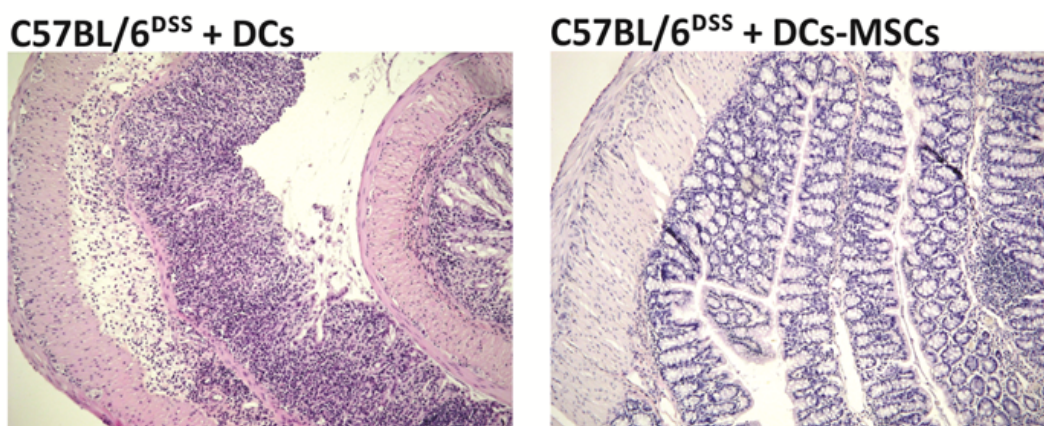
Графикон 43б



Графикон 43в

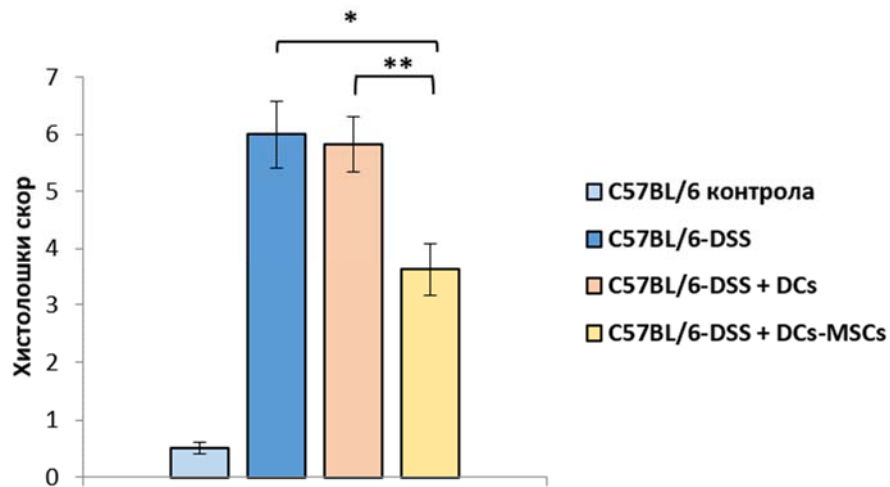
Графикон 43. Клинички (DAI) скор(а), хистолошки скор(б) и губитак телесне масе(в) код животиња којима су апликоване DCs култивисане са MSCs.

На хистолошким препаратима ткивних узорака колона мишева који су адоптивним трансфером примили C57BL/6 дендритске ћелије култивисане у стандардним условима уочава се инфламација и губитак нормалне структуре и архитектонике ткива наспрам ткивних исечака колона животиња којима су апликоване C57BL/6 дендритске ћелије претходно култивисане са MSCs. На хистолошким препаратима животиња из ове експерименталне групе уочавају се минимална оштећења крипти уз мањи број инфламацијских ћелија, што је резултатом статистички значајно мањим хистолошким скором. (Слика9, Графикон 44).



Слика 9

Слика 9. Карактеристични исечци зида дебелог црева после индукције DSS колитиса и апликације DCs као и DCs култивисаних са MSCs.



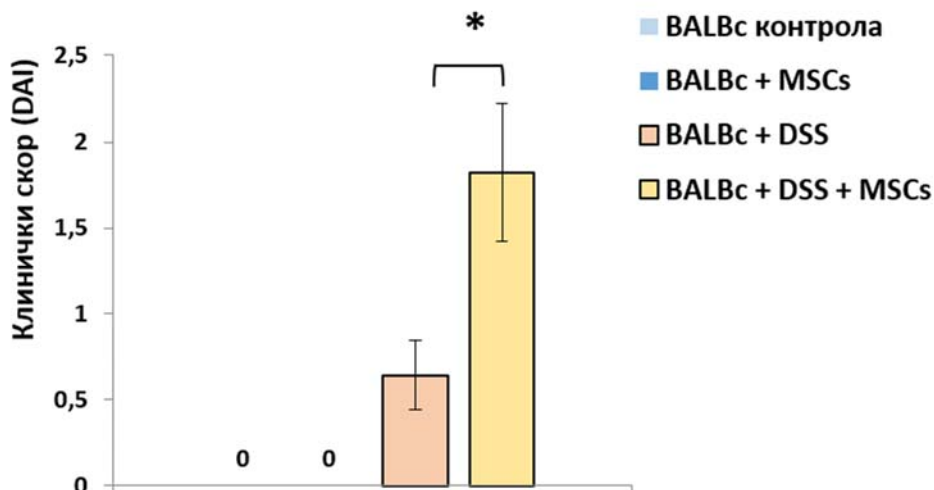
Графикон 44

Графикон 44. Разлике у хистолошком скору између оболелих мишева којима су апликоване C57BL/6 дендритске ћелије култивисане у стандардним условима и C57BL/6 дендритске ћелије претходно култивисане са MSCs.

#### 4.14. Интраперитонеална апликација мезенхимских матичних ћелија BALBc мишева погоршава колитис мишева истог соја

Другог и петог дана болести оболелим мишевима соја BALBc интраперитонеално су апликоване MSCs истог соја.

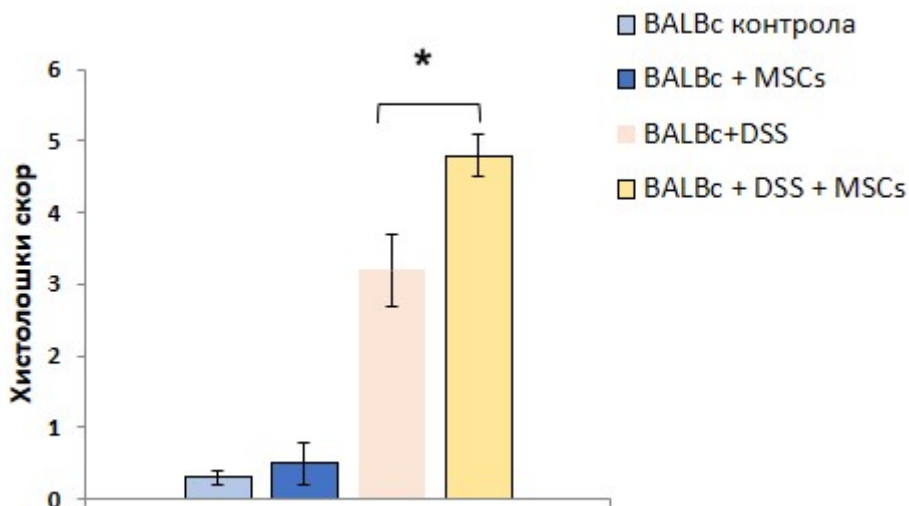
Супротно од ефеката које су C57BL6 MSCs имале у модулацији колитиса мишева истог соја, код оболелих BALBc мишева након примене BALBc MSCs уочава се значајно погоршање клиничке слике: обилне, кржаве столице и значајан губитак телесне масе у поређењу са животињама које су примиле само DSS. (Графикон 45).



Графикон 45

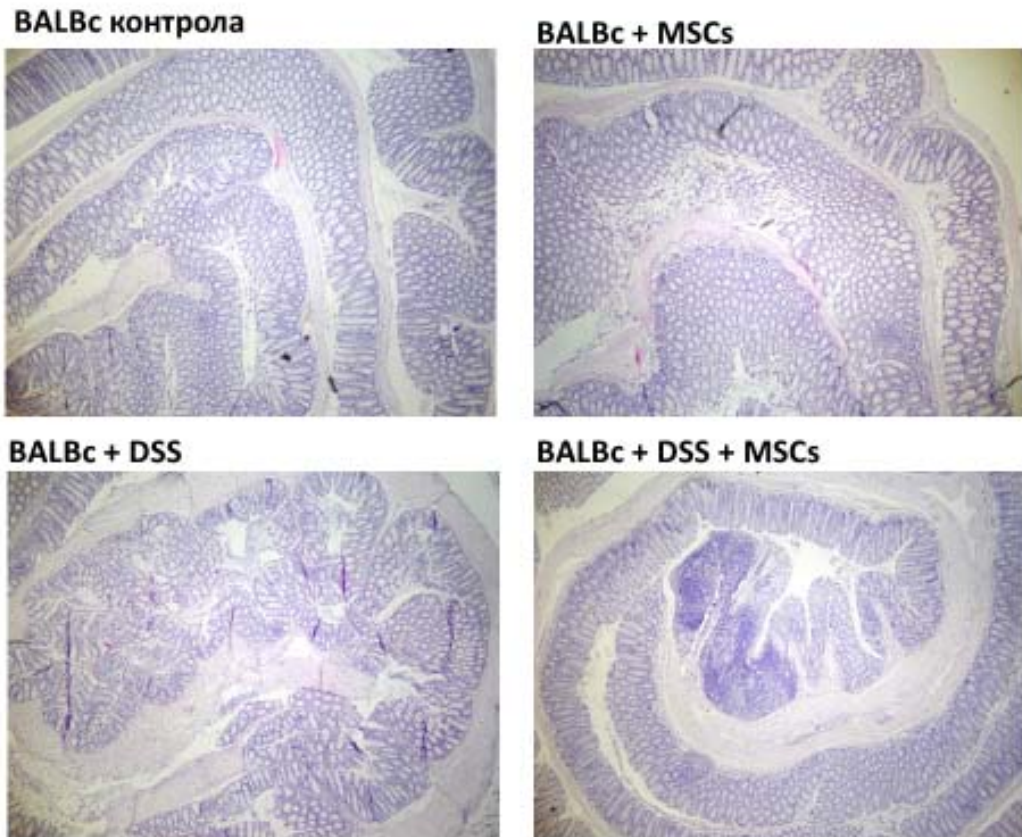
Графикон 45. Клинички (DAI) скор након апликације MSCs мишеви BALBc соја

Хистолошки нису уочене веће разлике измђу поређених група али су ћелијски инфилтрати целуларнији код оболелих животиња које су примиле MSCs. Поред ограниченог ћелијског инфилтрата не уочавају се већа оштећења ткива (Графикон 46, Слика 9).



Графикон 46

Графикон 46. Хистолошки скор DSS-ом третираних мишева соја BALBc након апликације MSCs.

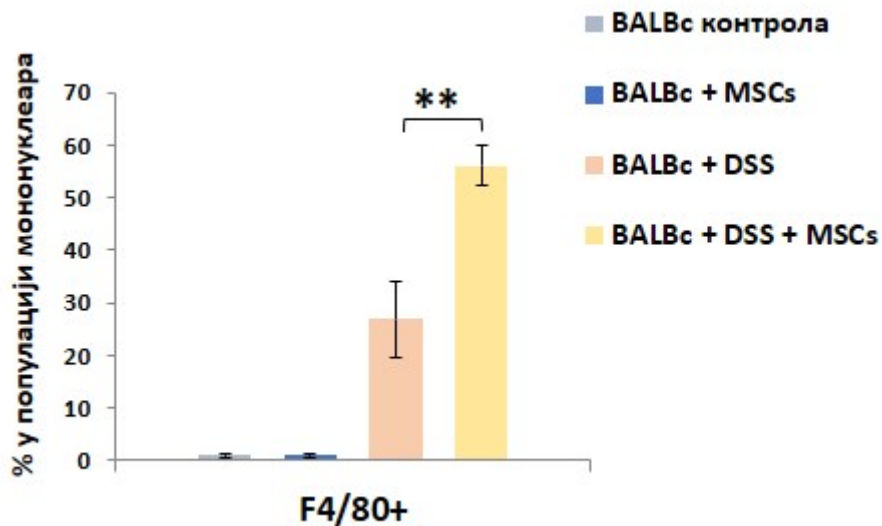


*Слика 10*

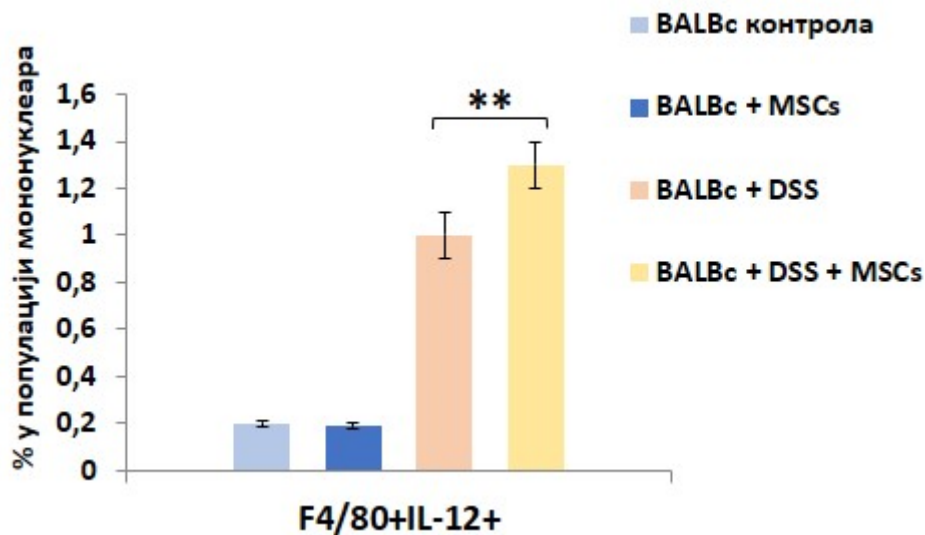
*Слика 10. Карактеристични исечци зида дебелог црева после индукције DSS колитиса и апликације MSCs. Код DSS-ом третираних мишева соја BALBc које су примиле MSCs масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева који су третирани DSS-ом ограниченог ћелијског инфилтрата нису уочена већа оштећења структура.*

#### **4.15. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно повећава процентуални удео инфламацијских макрофага, а смањује проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји**

Из ламине проприје након дванестог дана експеримента уочено је веће присуство макрофага, посебно инфламацијских M1 макрофага који продукују IL-12. (Графикон 47 а, б)



Графикон 47а

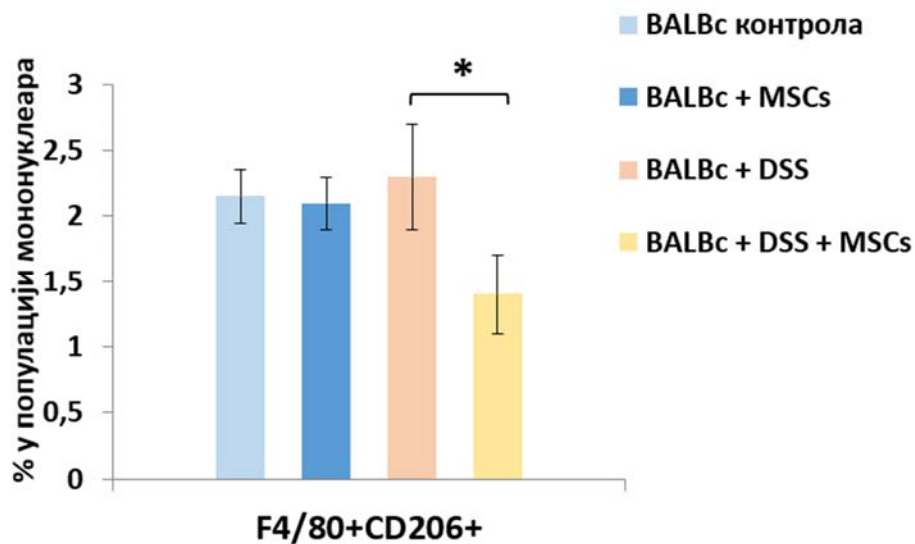


Графикон 47б

Графикон 47. Процентуални удео макрофага(а) у популацији мононуклеара изолованих из ламине propriје BALB/c мишева након апликације MSCs-а где доминирају проинфламацијски макрофаги који продукују IL-12(б).

Процентуална заступљеност алтернативно активираних макрофага је била значајно мања код оболелих животиња које су третиране MSCs (Графикон 48).



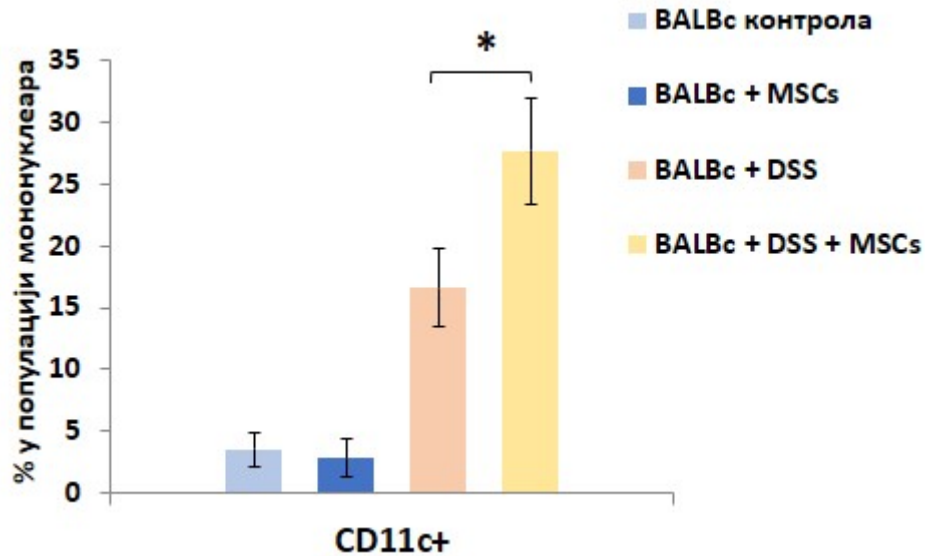


*Графикон 48.*

*Графикон 48. Процентуални удео макрофага у популацији мононуклеара изолованих из ламине проприје BALB/c мишева након апликације MSCs-а где алтернативно активираних макрофага има знатно мање.*

#### **4.16. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALB/c значајно смањује проценат толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10**

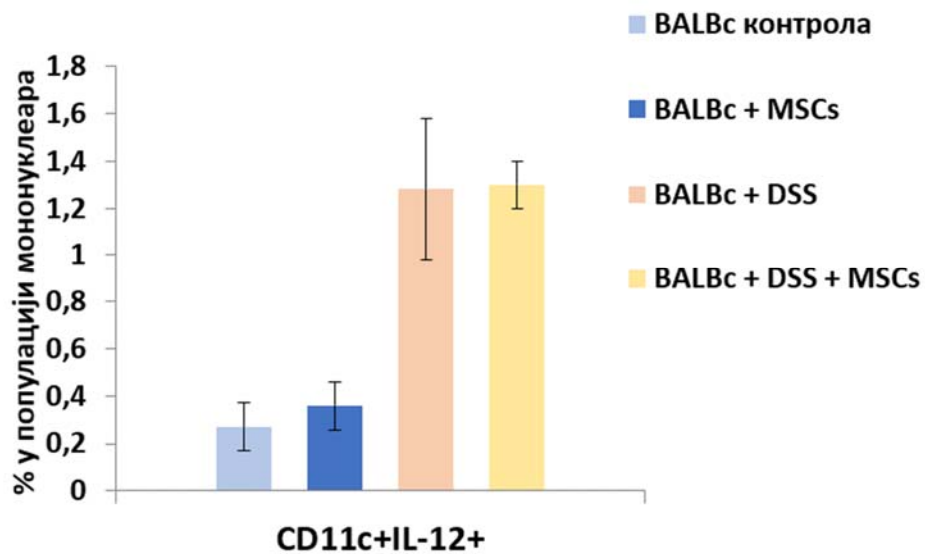
Дванаестог дана експеримента, из ламине проприје BALB/c мишева којима су апликоване BALB/c MSC изолован је знатно већи број CD11c+ дендритских ћелија. (Графикон 49)



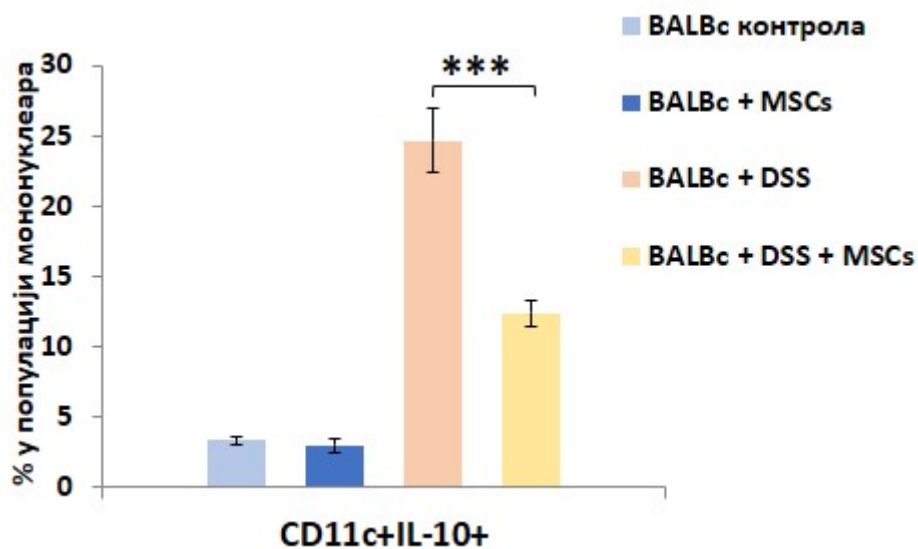
Графикон 49

Графикон 49. Процентуална заступљеност DCs у популацији мононуклеара изолованих из ламине проприје мишева сија BALB/c третираних DSS-ом након апликације MSCs

Уз то, статистички значајно мањи проценат толерогених дендритских које продукују IL-10 су уочене у колону оболелих животиња које су примиле MSCs (Графикон 50. а, б). Чињеница да није уочена разлика у проценту инфламацијских дендритских ћелија које продукују IL-12 (Графикон 50 а), указује да је ефекат BALB/c MSCs на погоршање колитиса последица њиховог супресивног ефекта на толерогене дендритске ћелије BALB/c мишева.



Графикон 50а

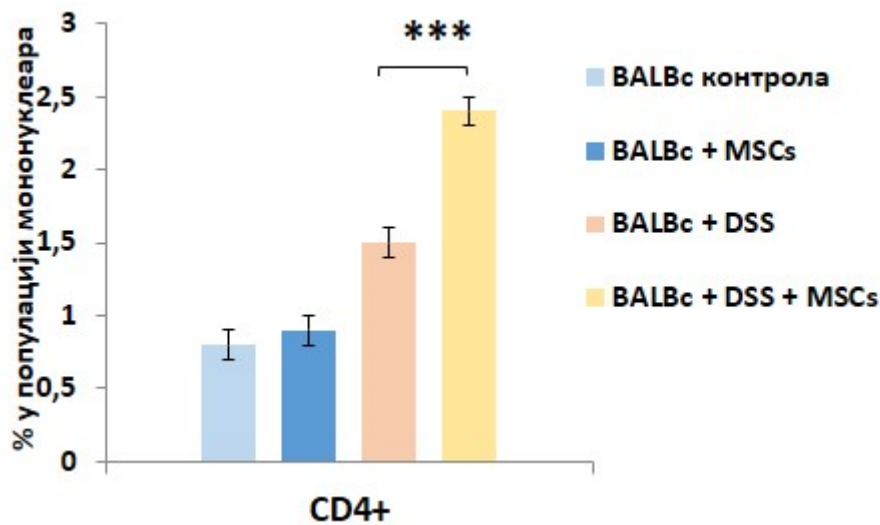


Графикон 50б

Графикон 50. Процентуална заступљеност имунопотенцирајућих DCs(а) и имуносупресивних(б) у популацији мононуклеара изолованих из ламине проприје мишева сија BALB/c третираних DSS-ом након апликације MSCs

#### 4.17. Из ламине пропије оболелих BALBc мишева након третмана MSC детектован је знатно већи проценат инфламацијских CD4+ Т лимфоцита

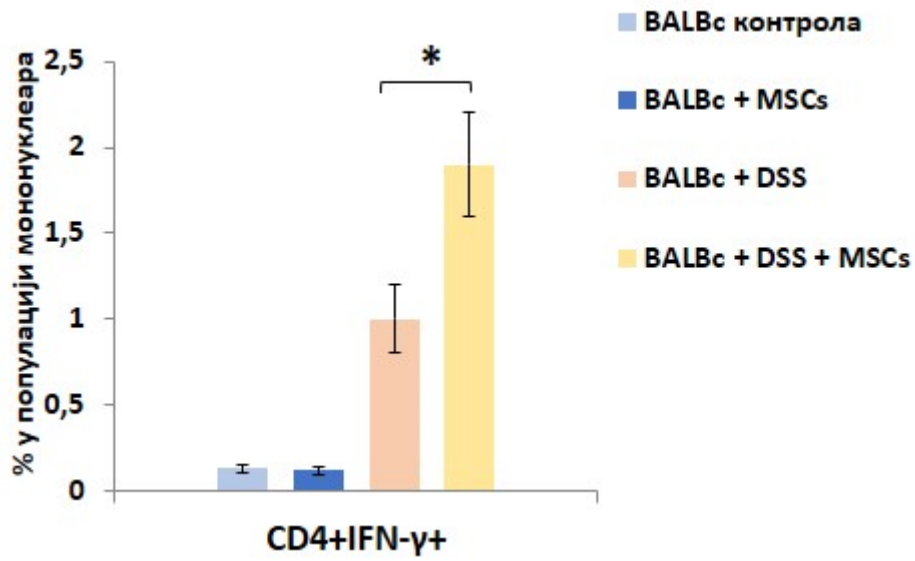
У колону оболелих BALBc мишева којима су апликоване MSC уочен је статистички значајно већи проценат CD4+ Т лимфоцита (Графикон 51).



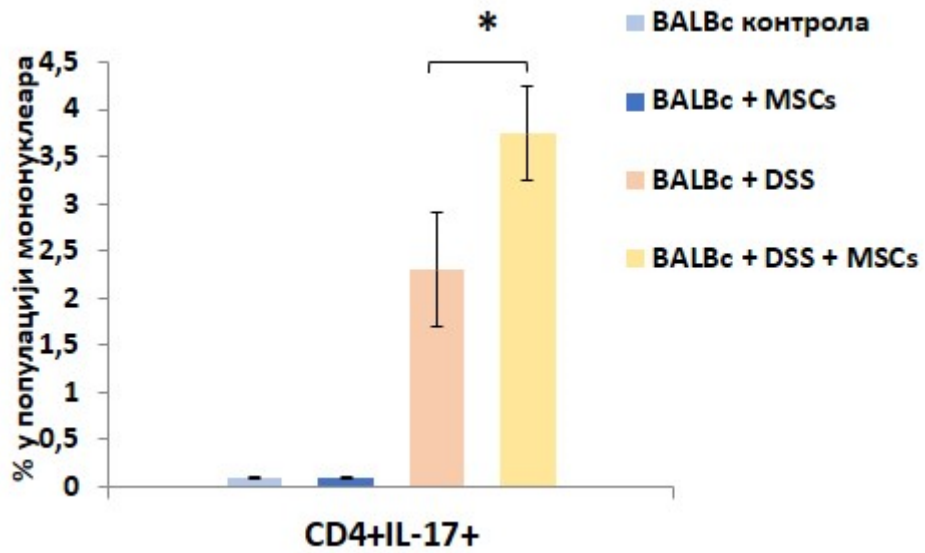
Графикон 51

Графикон 51. Процентуална заступљеност Т лимфоцита у популацији мононуклеара изолованих из ламине проприје мишева сија BALBc третираних DSS-ом након апликације MSCs

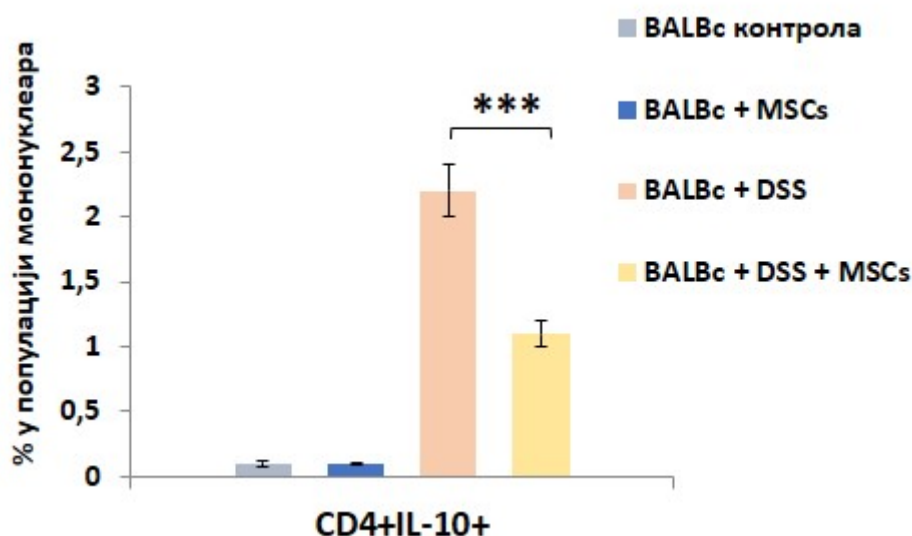
Уз то, статистички сигнификантно повећан % инфламацијских CD4+ Т лимфоцита (IFN- $\gamma$ + и IL-17+), а сигнификантно смањен % имуносупресивних CD4+ лимфоцита (IL-10+) био је присутан у ламини проприји црева BALBc мишева којима су апликоване BALBc MSC (Графикон 52 а, б, в, г).



Графикон 52а



Графикон 52б

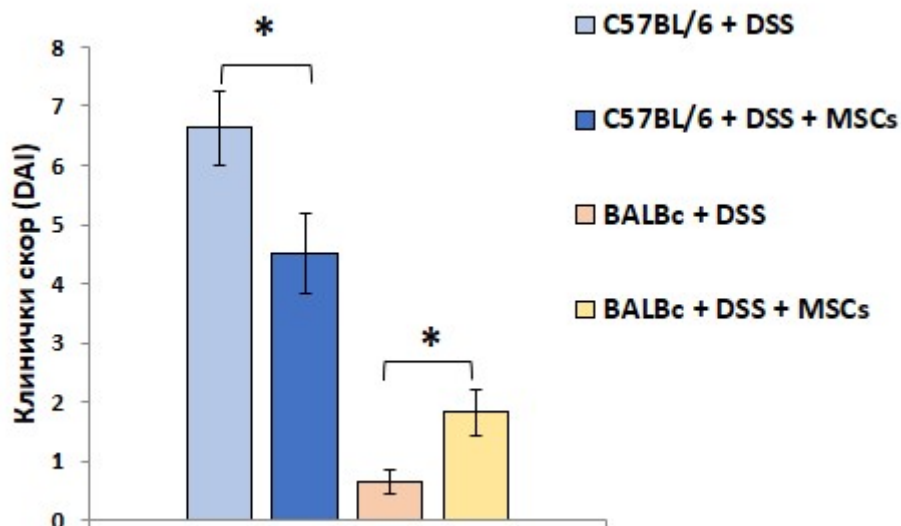


Графикон 52в

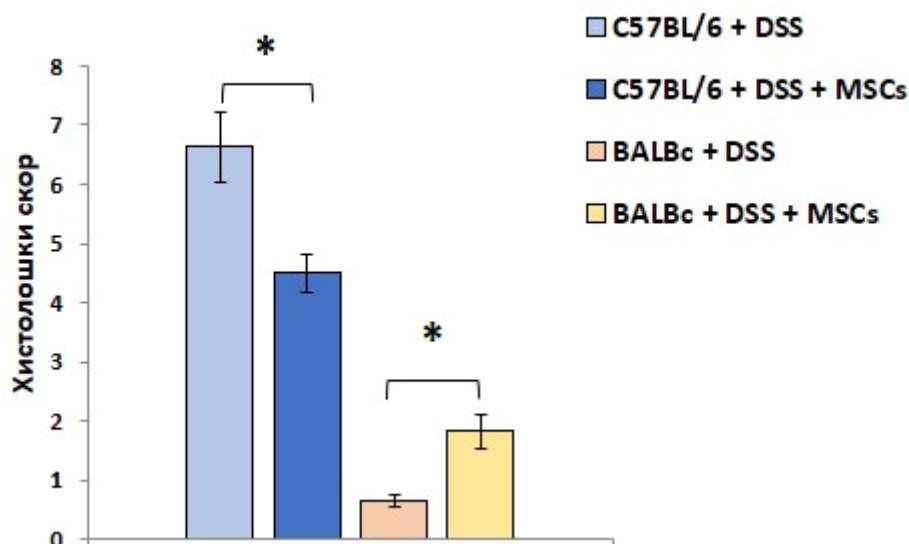
**Графикон 52.** Из колона мишева који су примили MSCs изоловани су Th1 ( $CD4+ IFN-\gamma+$ )(а) и Th17( $CD4+ IL-17+$ )(б) у знатно већем проценту док су  $CD4+$  ћелије које продукују IL-10 (в) биле присутне у знатно мањем проценту

#### 4.18. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике у клиничким и хистолошким скоровима између оболелих C57BL/6 и BALB/c којима су апликоване MSCs

Поредивши добијене резултате између колитиса индукованим DSS-ом код два соја мишева, BALB/c животиње су након апликације BALB/c MSCs развиле тежу форму болести (манифестоване порастом клиничког и хистолошког скорa) наспрам C57BL/6 мишева код којих је примећено значајно побољшање (манифестовано смањењем клиничког и хистолошког скорa) након примене C57BL/6 MSCs (Графикон 53а, б).



Графикон 53а

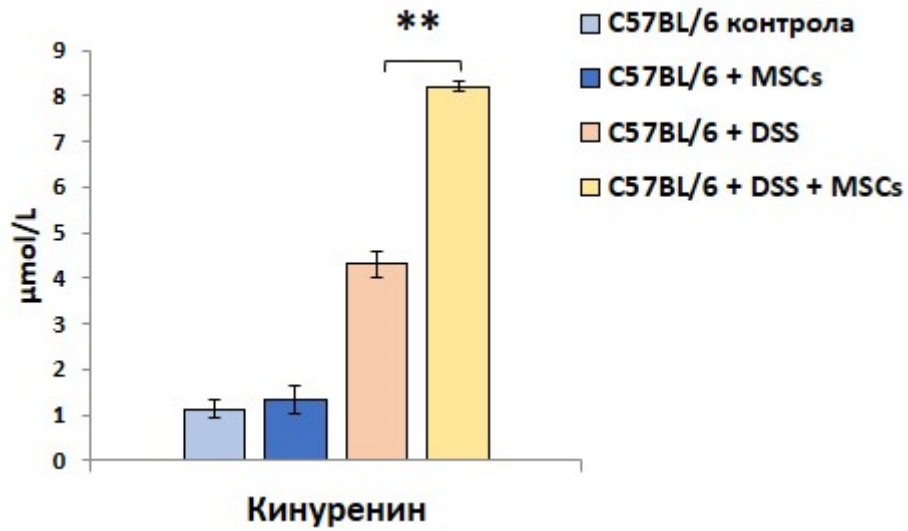


Графикон 53б

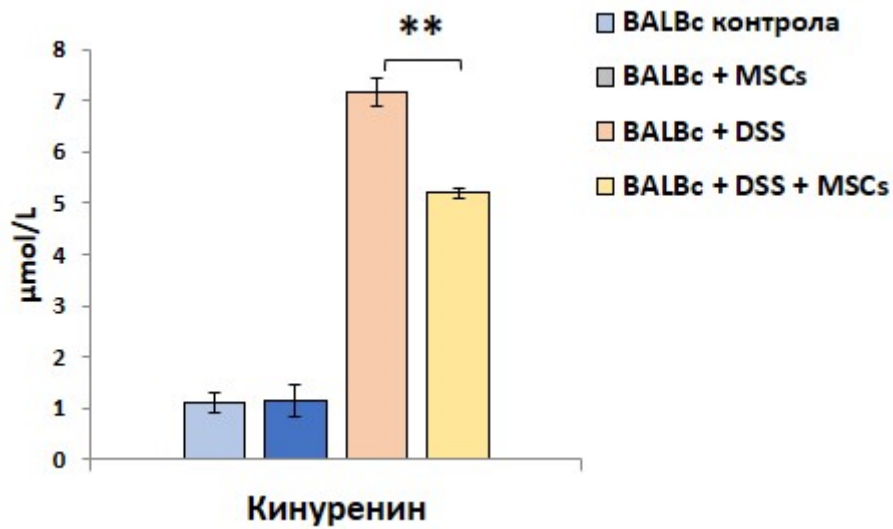
**Графикон 53.** Разлике у клиничком(а) и хистолошком скору(б) између различитих сојева мишева након апликације MSCs

Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике у клиничким и хистолошким скоровима између оболелих C57BL/6 и BALB/c којима су апликоване MSCs (Графикон 54а). Концентрација кинуренина је сигнификантно већа у серуму C57BL/6 животиња којима су апликоване C57BL/6 MSCs, а сигнификантно мања у серуму оболелих BALB/c мишева који су примали BALB/c MSCs (Графикон 54б). Ови резултати указују да је концентрација кинуреина у серуму одражавала разлике у клиничким и хистолошким скоровима између оболелих MSCs-третираних C57BL/6 и BALB/c мишева и потврђују

хипотезу да анализа концентрације кинуренина може послужити као добар параметар за праћење прогресије улцерозног колитиса.



Графикон 54а



Графикон 54б

**Графикон 54.** Концентрације измереног кинуренина у серуму животиња након апликације MSCs су знатно веће код животиња соја C57BL/6(a) док се код мишева BALBc (б) соја детектују знатно ниже концентрације имunosупресивног кинуренина



## 5. ДИСКУСИЈА

### 5.1. У колитису изазваном DSS-ом, IDO регулише интеракцију DCs и Treg ћелија у ламини проприји црева

DCs IDO/кинуренинским путем промовишу експанзију Treg ћелија док Treg лимфоцити посредством имуномодулаторних цитокина супримирају продукцију IL-12 и појачавају секрецију IL-10 у DCs индукујући у њима развој толерогеног фенотипа (216).

DCs BALBc мишева имају знатно већу активност IDO-а и значајно већи капацитет продукције имуносупресивног кинуренина у поређењу са DCs C57BL/6 мишева. У складу са тим, статистички значајно веће серумске концентрација кинуренина и значајно већи број Treg лимфоцита био је присутан у ламини проприји црева DSS-ом третираних BALBc мишева код којих је слузница црева спонтано регенерисала (Графикон 11).

Treg лимфоцити имају важну улогу у супресији инфламације и регенерацији оштећене слузнице црева. Treg супримирају активацију и ефекторске функције ћелија одговорних за оштећење слузнице црева у колитису (макрофаги, DCs, T и B ћелије) (216). Уз то, Treg играју главну улогу у одржавању имунске хомеостазе и толеранције у цревима (216). Деплеција Treg лимфоцита је резултирала значајним погоршањем болести манифестованим обилним, крвавим столицама, порастом DAI и хистолошког скорa (Графикон 12а,б,в).

Treg лимфоцити посредством T-bet транскрипционог фактора потенцирају продукцију TIGIT инхибиторног молекула који подстиче продукцију IL-10 и инхибира стварање IL-12 у DCs, што индукује настанак толерогеног фенотипа у овим ћелијама и води у селективну инхибицију активираних, инфламацијских Th1 ћелија (217, 218). Уз то, Treg ћелије продукцијом имуносупресивних цитокина (IL-10, TGF- $\beta$ ) могу и да директно супримирају активацију и пролиферацију ефекторских T и B лимфоцита (219, 220).

За експанзију Treg лимфоцита посебно је важан ензим IDO чијом активношћу DCs поларизују наивне T лимфоцита ка имуносупресивним Treg лимфоцитима чиме се креира имуносупресивна средина у инфламираном ткиву и одржава имунска толеранција (141, 142). DCs, активношћу IDO-а, стварају кинуренин, као продукт метаболизма триптофана (135, 140, 142). Кинуренин промовише експресију транскрипционог фактора FoxP3 (*Forkhead box P3*, FoxP3) који опредељује наивне CD4<sup>+</sup> T лимфоците ка имуносупресивним CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg лимфоцитима (135, 140, 142).

*Meglar* и сарадници су уочили разлику у степену развитка болести између два соја мишева (2). Наиме, они су код соја C57BL/6 уочили да се развија тежи облик болести који наликује хроничној форми, док код мишева соја BALB/c се након искључивања DSS-а симптоми болести спонтано повлаче. Ток болести је у првих пет дана сличан, праћен губитком тежине, дијарејом и ректалним крварењем, с тим да се код мишева соја C57BL/6 након петог дана овај тренд наставио док код BALB/c мишева након искључивања DSS-а је дошло до спонтане регенерације слузнице црева и повлачења симптома (Графикон 1а,б, 2а,б). Ови резултати су показали да мишеви соја C57BL/6 развијају хроничну форму DSS колитиса док код DSS-ом третираних BALB/c мишева долази до спонтане регенерације слузнице црева (2). Због тога, DSS-ом третирану C57BL/6 мишеви представљају модел за хронични, прогресивни колитис док DSS-ом третирану BALB/c мишеви су погодни за анализу регенерације оболеле слузнице (2). Резултати ове студије указују да различита активација сигналног пута IDO1/Кинуренин има важан утицај на развој сојних разлика између C57BL/6 и BALB/c мишева у DSS колитису.

Након 5. дана модела, код животиња оба соја уочени су дијареја, кржаве столице и губитак телесне масе (Графикон 1а,б). Након 12. дана установљена је статистички значајна разлика у клиничком скору, губитку телесне масе и хистолошком скору у корист C57BL/6 мишева (Графикон 2а,б). Ови резултати праћени су разликама у серумској концентрацији кинуренина. Баланс између проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина детерминише прогресију и манифестације улцерозног колитиса које могу ићи у правцу развитка хроничности болести или ремисији (221). У серуму C57BL/6 мишева измерене су знатно ниже концентрације кинуренина и имуносупресивног цитокина IL-10, а веће концентрације инфламацијских цитокина IL-1 $\beta$  и IL-12 у поређењу са мишевима BALB/c соја (Графикон 6). Уз нижу концентрацију кинуренина у серуму, статистички значајно је био већи број инфламацијских DCs које продукују IL-12 и IL-1 $\beta$ , сигнификантно већи број инфламацијских Th1 и Th17 ћелија и статистички значајно мање присуство имуносупресивних Treg лимфоцита у цревима DSS-ом третираних C57BL/6 мишева (Графикон 5, 10а-д). Статистички значајно већа концентрација кинуренина у серуму (Графикон 5) и следствено већи броју Treg лимфоцита у цревима DSS-ом третираних BALB/c мишева је пратила готово ненарушена архитектура слузнице епитела праћена минималним леукоцитним инфилтратом (Слика 2).

Експериментима у којима су деплетирани DCs или Treg у DSS-ом третираним мишевицама, односно експериментима током којих су трансфероване DC у којима је претходно била супримирана IDO активност, показано је да DCs активношћу IDO/кинурина сигналног пута индукују развој Treg лимфоцита који затим супримирају имунски одговор, сузбијају инфламацију и убрзавају регенерацију и опоравак слузнице црева.

Познато је да кинуренин као и други метаболити катаболизма триптофана под дејством IDO-а (3-НАА, KYNA, QA и 3-НК) директно инхибирају пролиферацију активираних Т и В лимфоцита што спутава стечени имунски одговор (137-139). На апоптозу индуковану IDO/кинурина путем посебно су осетљиви инфламацијски Th1 лимфоцити. Кинуренин уводи у апоптозу Th1 лимфоците активирајући каспазу-8 и индукујући ослобађање цитохрома С из митохондрија (140).

Поред директног имуносупресивног ефекта на активирани Т ћелије, IDO учествује и у интраћелијској сигнализацији када одржава регулацијски фенотип плазмоцитодних DCs (pDCs) (145). Ове ћелије су битан извор IFN-тип 1, који су способни да покрену експресију гена за продукцију IDO-а што као последицу има експанзију Treg лимфоцита (145). Овај процес је делом регулисан активацијом AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) (133, 146). Након што IDO деплетира триптофан, метаболити кинурениног пута се понашају као лиганди за AhR што доводи до његове транслокације у једру. У једру AhR индукује транскрипцију циљаних гена међу којима је и FoxP3 чиме се индукује настанак и експанзија FoxP3+Treg лимфоцита (133, 146, 147).

## **5.2. Концентрација кинуренина у серуму, фецесу и сулкусној течности: потенцијално нов прогностички параметар код оболелих од улцерозног колитиса**

### **5.2.1. Одређивање концентрације кинуренина у серуму и фецесу може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса**

Да би се проверила релевантност добијених резултата у мишијем моделу болести за хумани улцерозни колитис, анализирани су концентрације кинуренина у серуму и фецесу оболелих од улцерозног колитиса у различитим фазама и облицима болести као и код здравих испитаника.

Слични феномен је уочен у анималном моделу као и у људи. Серумске концентрације кинуренина негативно су корелирале са клиничким скором, серумским концентрацијама CRP-а, док су концентрације кинуренина измерене у фецесу негативно корелирале са клиничком сликом и концентрацијама фекалног калпротектина (Графикон 28в). Овакав налаз указује на могућност праћења концентрације серумског и фекалног кинуренина као новог, допунског дијагностичког параметра за праћење успешности терапије и регенерације слузнице црева код оболелих од улцерозног колитиса. У клиничкој пракси, мерење фекалног калпротектина је најбољи неинвазивни параметар за праћење успешности терапије као и за процену степена регенерације мукозе, међутим неутврђена јасне референтне тачке између горње и доње границе концентрације не даје на увид јасну слику стања и степена инфламације у колону (222, 223).

Након сусрета са микроорганизмима који су инвадирани оштећену слузницу црева, DCs се активирају и синтетишу инфламацијске цитокине (IL-1 $\beta$  и IL-12) чиме настаје хронични колитис у мишева соја C57BL/6. Са друге стране, DSS-ом и LPS-ом активирани DCs BALBc мишева доминантно продукују имуносупресивне IL-10 и кинуренин чиме индукују експанзију Treg лимфоцита што је довело до регенерације оболеле слузнице црева. Овај феномен је уочен и код пацијената оболелих од улцерозног колитиса, где су веће концентрације кинуренина измерене у серуму и фецесу пацијената који су у фази ремисије болести и код којих је била евидентна и већа концентрација имуносупресивног IL-10 (Графикон 30а,б), а значајно су биле ниже серумске концентрације инфламацијских цитокина.

Уз то, постојала је статистички значајна, средње јака негативна корелација између серумске концентрације кинуренина и клиничког скорa (Графикон 24). У складу са тим, веће концентрације кинуренина у серуму измерене су у обе групе оболелих од улцерозног колитиса у поређењу са здравим испитаницима (Графикон 22).

И у фецесима оболелих од улцерозног колитиса уочене се значајно веће концентрације кинуренина него код здравих испитаника. У групи оболелих са спонтаном регенерацијом слузнице црева измерене су значајно веће концентрације кинуренина у фецесу него у групи са хроничним перзистентним обликом болести (Графикон 27). Такође, веће концентрације кинуренина праћене су значајно мањим концентрацијама IL-17, TNF- $\alpha$ ,

фекалног калпротекина као и CXCL11 у фецесу (Графикон 28а-г), а већим концентрацијама имуносупресивног IL-10 у серумима и фецесима оболелих (Графикон 30а,б). Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних CD4+FoxP3+, CD4+IL-10+ Treg лимфоцита, CD56+IL-10+ NK ћелија и смањење броја инфламацијских CD4+ IFN- $\gamma$ + T и CD56+IL-17+ NK ћелија у ламини проприји црева оболелих са улцерозним колитисом који су у ремисији болести (Графикон 31а-ђ). Ови резултати указују да уз вредност фекалног калпротекина, концентрација фекалног кинуренина може представљати допунски дијагностичког параметар за праћење успешности терапије и оболелих од улцерозног колитиса.

### **5.2.2. Одређивање концентрације кинуренина у сулкусној течности може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса**

Активација IDO/Кинуренин сигналног пута смањује инфламацију и у усној дупљи (164-169). IDO продукују гингивални фибробласти, мезенхималне матичне ћелије гингиве (G-MSCs), мезенхималне матичне ћелије зубне пулпе (DP-MSCs), мезенхималне матичне ћелије периодонталног лигамента (PDL-MSCs) као и DCs које су инфилтрисане ткиво оралних лезија (170). Матичне ћелије изоловане из периапикалних лезија (PL-MSCs) су способне да, посредством IDO-а, генеришу толерогени фенотип DCs које, затим, због смањене алостимулацијске активности индукују енергију ефекторских Th1 лимфоцита и експанзију имуносупресивних Treg (168).

Сулкусна течност је серумски трансудат изолован из сулкуса зуба који завређује све више пажње истраживача као могући дијагностички параметар како локалних тако и ситемских обољења (224). У сулкусној течности су детектабилни ензими, медијатори инфламације па представља лако доступан и неинвазиван помоћни дијагностички параметар (225).

У складу са резултатима добијеним из серума и фецеса, концентрације кинуренина измереног у сулкусној течности су биле статистички значајно веће код здравих испитаника у односу на пацијенте оболеле од улцерозног колитиса (Графикон 32). Уз то, ниже концентрације кинуренина биле су праћене већим концентрацијама инфламацијских цитокина у сулкусним течностима испитаника, указујући да

одређивање концентрације кинуренина у сулкусној течности може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса.

### **5.3. Утицај IDO/кинуренин сигналног пута на терапијске ефекте MSCs у модулацији колитиса индукованог DSS-ом**

Бројне експерименталне и клиничке студије су показале да терапијска примена MSCs може да супримира инфламацију у цревима и да превенира прогресију колитиса (171). Уз то, због свог потенцијала да се диферентују у ћелије налик епителним ћелијама црева *in vitro* и да индукују неоангиогенезу, сматра се да примена MSCs може да утиче и на бржу регенерацију оштећене слузнице црева(172).

Уз DCs, MSCs представљају главни ћелијски извор IDO-а којим подстичу експанзију Т регулаторних ћелија утичући на стварање имуносупресивне средине у инфламраним ткивима (3). Користећи разлику у прогресији DSS колитиса између мишева соја C57BL/6 и BALBc, анализиран је утицај кинуренина и имуносупресивне средине за терапијске ефекте MSCs.

Након интраперитонеалне апликације MSCs-а, код мишева соја C57BL/6 долази до значајног пораста концентрације кинуренина у серуму што је резултирало ублажавања симптома колитиса (Графикон 44а, 45), смањења серумске коинцентрације инфламацијских медијатора (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$ ) (Графикон 39), као и променама у броју инфламацијских макрофага, DCs и Т лимфоцита који су инфилтрисале ламине проприје црева оболелих мишева (Графикон 40, 41).

MSCs директним контактом као и продукцијом солубилних медијатора, утичу на миграцију, фенотип и ефекторске функције ћелија имунског ситета. MSCs супримирају инфламацијске М1 макрофаге и промовишу њихову конверзију у имуносупресивне М2 ћелије (179). Такође, MSCs супримирају сазревање DCs и мењају њихов цитокински профил тако што инхибирају продукцију проинфламацијских цитокина (IFN- $\gamma$ , IL-12) (180).

IDO/кинуренин сигнални пут има важну улогу за имуносупресивне карактеристике MSCs и за њихов потенцијал да супримирају ефекторске Т лимфоцита и цитотоксичне NK ћелије (183, 184). Након стимулације IFN- $\gamma$ , MSCs продукују IDO, при чему инхибирају Т и В ћелијски одговор и инхибирају цитотоксичност, пролиферацију и продукцију инфламацијских цитокина у NK ћелијама (185-192). Већа активност IDO-а и

следствено пораст концентрације кинуренина у серуму узроковала је веће присуство имуносупресивних CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>IL-10 ћелија у ламини проприји црева оболелих мишева (Графикон 42) што је резултирало смањење инфламације и бржу регенерацију оболеле слузнице.

Концентрација инфламацијских цитокина, посебно IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , утичу на промену фенотипа и ефекторских функција MSCs. Уколико трансплантиране MSCs уђу у ткиво у инфламирано ткиво у којем је висока концентрација ових инфламацијских цитокина, MSCs генеришу имуносупресивни фенотип и стварају већу концентрацију имуносупресивних медијатора којима инхибирају ефекторске функције инфламацијских ћелија и доводе до резолуције инфламације и регенерације оболелог ткива. Ипак, супротно, уколико су MSCs трансплантиране у имуносупресивну микросредину, у којој су концентрације инфламацијских цитокина веома ниске, уместо имуносупресивних цитокина, MSCs продукују инфламацијске цитокине како би одржале хомеостазу (3).

У складу са овим чињеницама, супротно од ефеката које су MSCs имале у модулацији колитиса мишева истог соја, код DSS-ом третираних BALBc мишева код којих су биле веће вредности имуносупресивног кинуренина и IL-10, а мање вредности инфламацијских цитокина, након примене MSCs дошло је до значајног погоршања клиничке слике, значајно смањеног броја алтернативно активираних макрофага, толерогених DCs и Treg, док је број инфламацијских M1 макрофага, DCs, Th1 и Th17 лимфоцита био значајно већи у поређењу са DSS-ом третираним BALBc мишевима којима нису биле апликоване MSCs (Графикон 48-53).

## 6. ЗАКЉУЧАК

Већа активност индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO) и, последично, већа концентрација кинуренина значајно редукују оштећење слузнице колона што резултира ублажавањем симптома улцерозног колитиса. Концентрација кинуренина у сулкусној течности, фецесу и серуму позитивно корелира са нижим клиничким скором пацијената и може се користити као параметар за праћење успешности терапије и мониторинг болести.

DCs и MSCs, као најважнији целуларни извори IDO-а, продукцијом кинуренина узрокују експанзију Т регулаторних ћелија и супримирају пролиферацију и активацију инфламацијских Т лимфоцита што резултира смањењем инфламације у колону и бржом регенерацијом оболеле слузнице.

DCs BALBc мишева имају значајно већу активност IDO-а у поређењу са DCs C57BL/6 мишева. Због тога је концентрација инфламацијских цитокина и прогресија колитиса била значајно израженија у цревима оболелих C57BL/6 мишева, у поређењу са мишевима BALBc соја.

Када се MSCs трансплантирају у имуносупресивну средину, оне доминантно продукују инфламацијске цитокине, док секретују имуносупресивне цитокине након уласка у тива у којима је висока концентрација инфламацијских цитокина. Због тога је системска апликација MSCs мишевима соја C57BL/6 резултирала смањењем колитиса, док је трансплантација MSCs мишевима соја BALBc довела до погоршања DSS-индукованог колитиса.



Закључке смо извели на основу следећих резултата:

1. Дендритске ћелије мишева соја BALBc имају већи капацитет продукције IDO-а, наспрам дендритских ћелија животиња соја C57BL/6. Због тога је уочен значајно већи број имуносупресивних FoxP3+ T регулаторних ћелија и значајно мањи број инфламацијских Th1 и Th17 ћелија у ламини проприји црева BALBc мишева што је довело до њиховог бржег опоравка од DSS-колитиса у поређењу са C57BL/6 мишевима.
2. Инхибиција IDO-а као и деплеција DCs и Treg ћелија, узроковала је значајно погоршање колитиса у BALBc мишевима.
3. Адоптивни трансфер DCs узроковао је значајан пораст концентрације кинуренина у серуму оболелих животиња, што је довело до експанзије имуносупресивних Treg ћелија и бржег опоравка од DSS-колитиса.
4. Веће концентрације кинуренина су измерене у сулкусној течности здравих пацијената наспрам оболелих. Више серумске и фекалне концентрације кинуренина су измерене код пацијената оболелих од улцерозног колитиса који су у фази ремисије болести и код којих је уочена регенерација слузнице црева.
5. Веће концентрације кинуренина удружене су са нижим клиничким и хистолошким скором и већим бројем имуносупресивних Treg ћелија у ламини проприји пацијента оболелих од улцерозног колитиса.
6. Системска апликација MSCs мишевима соја C57BL/6 узроковала је већу концентрације кинуренина у серуму и већи број FoxP3+Treg ћелија у ламини проприји што је довело до смањења инфламације и брже регенерације слузнице црева.
7. Системска апликација MSCs мишевима соја BALBc узрокује знатно погоршање DSS-колитиса које је праћено смањењем концентрације кинуренина у серуму и смањењем броја FoxP3+Treg ћелија у ламини проприји црева

## РЕФЕРЕНЦЕ

1. Wilks S, Moxon W. Lectures on pathological anatomy. Longmans, Green; 1889.
2. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jun;288(6):G1328–38.
3. Gazdic M, Arsenijevic A, Markovic BS, Volarevic A, Dimova I, Djonov V, et al. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases. *Int J Biol Sci*. 2017 Sep 5;13(9):1109–17.
4. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521–33.
5. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol*. 2001;7(2):175.
6. Schembri J. Segmental colitis associated with diverticulosis: is it the coexistence of colonic diverticulosis and inflammatory bowel disease? *Ann Gastroenterol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 13]; Available from: <http://www.annalsgastro.gr/files/journals/1/earlyview/2017/ev-01-2017-07-AG2943-0126.pdf>
7. Román ALS. Comorbidity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011;17(22):2723.
8. Attalla MG, Singh SB, Khalid R, Umair M, Djonga Emmanuel E. Relationship between Ulcerative Colitis and Rheumatoid Arthritis: A Review. *Cureus* [Internet]. 2019 Sep 18 [cited 2020 Feb 13]; Available from: <https://www.cureus.com/articles/21456-relationship-between-ulcerative-colitis-and-rheumatoid-arthritis-a-review>

9. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2017 Apr;389(10080):1756–70.
10. Han YD, Al Bandar MH, Dulskas A, Cho MS, Hur H, Min BS, et al. Prognosis of ulcerative colitis colorectal cancer vs. sporadic colorectal cancer: propensity score matching analysis. *BMC Surg*. 2017 Dec;17(1):28.
11. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019 Dec;68(Suppl 3):s1–106.
12. Cioffi M. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6(1):13.
13. Klinger AL, Kann BR. Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*. 2019 Dec;99(6):1063–82.
14. Jung S-A. Differential Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease: What Is the Role of Colonoscopy? *Clin Endosc*. 2012;45(3):254.
15. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-1794.e4.
16. Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M, Cvalínová D, Štych P, Schwarz J. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018 Jul 7;24(25):2741–63.
17. Shapiro JM, Zoega H, Shah SA, Bright RM, Mallette M, Moniz H, et al. Incidence of Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis in Rhode Island: Report from the Ocean State Crohn’s and Colitis Area Registry. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Jun;22(6):1456–61.
18. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East–West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014 Apr;63(4):588–97.

19. Bianco AM. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12296.
20. Zeng Z, Mukherjee A, Zhang H. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease. *Front Genet*. 2019 Oct 31;10:1017.
21. Antoni L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1165.
22. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan;145(1):16–27.
23. Tatiya-aphiradee N, Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018 Dec 19;30(1):1–10.
24. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(27):6296.
25. Halme L. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(23):3668.
26. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011. *Am J Gastroenterol*. 2015 Apr;110(4):564–71.
27. Nanki K, Fujii M, Shimokawa M, Matano M, Nishikori S, Date S, et al. Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature*. 2020 Jan;577(7789):254–9.
28. Uhlig HH, Muise AM. Clinical Genomics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Genet*. 2017 Sep;33(9):629–41.
29. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;10(6):352–61.
30. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012 Nov;380(9853):1606–19.

31. Abraham C, Dulai PS, Vermeire S, Sandborn WJ. Lessons Learned From Trials Targeting Cytokine Pathways in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Jan;152(2):374-388.e4.
32. Flannigan KL, Geem D, Harusato A, Denning TL. Intestinal Antigen-Presenting Cells. *Am J Pathol*. 2015 Jul;185(7):1809–19.
33. Kmiec Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci*. 2017 Mar;62(1):1–16.
34. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, et al. Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Play a Key Role in Th1-Dominant Chronic Colitis through Excess Production of IL-12 and IL-23 in Response to Bacteria. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6900–8.
35. Reimund J-M, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol*. 1996 May;16(3):144–50.
36. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*. 2007 Feb 1;56(2):293–303.
37. Zhang S, Zhao X, Zhang D. Cellular and Molecular Immunopathogenesis of Ulcerative Colitis. *Mol Immunol*. 2006;3(1):6.
38. Moldoveanu AIC, Diculescu M, Braticevici CF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom J Intern Med*. 2015 Jun 1;53(2):118–27.
39. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4280.
40. Strober, Warren et al. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. Volume 140(Issue 6):1756-1767.e1.

41. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 2008 May 12;205(5):1063–75.
42. Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm*. 2014;2014:1–14.
43. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Castaño L, Carlos Vitoria J, Ramon Bilbao J. T H 17 (and T H 1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity*. 2009 Jan;42(1):69–73.
44. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226(1):87–102.
45. Kaplan, M., Sun, Y., Hoey, T. et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. 382, 174–177 (1996). <https://doi.org/10.1038/382174a0>. *Nature*. 1996;382,:174–177.
46. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. 1996 Jul 11;382(6587):171–4.
47. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547–9.
48. Cominelli F. Cytokine-Based Therapies for Crohn’s Disease — New Paradigms. *N Engl J Med*. 2004 Nov 11;351(20):2045–8.
49. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):121–33.
50. Diny NL, Rose NR, Čiháková D. Eosinophils in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2017 Apr 27;8:484.
51. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):967–74.

52. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):335–43.
53. Muthas D, Reznichenko A, Balendran CA, Böttcher G, Clausen IG, Kärrman Mårdh C, et al. Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand J Gastroenterol*. 2017 Feb;52(2):125–35.
54. Schoultz I, Keita Å. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease—Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells*. 2019 Feb 22;8(2):193.
55. Tan CXW, Brand HS, de Boer NKH, Forouzanfar T. Gastrointestinal diseases and their oro-dental manifestations: Part 2: Ulcerative colitis. *Br Dent J*. 2017 Jan;222(1):53–7.
56. Elahi M, Telkabadi M, Samadi V, Vakili H. Association of oral manifestations with ulcerative colitis. :6.
57. Katz J, Shenkman A, Stavropoulos F, Melzer E. Oral signs and symptoms in relation to disease activity and site of involvement in patients with inflammatory bowel disease. *Oral Dis*. 2003 Jan;9(1):34–40.
58. Field EA, Allan RB. Oral ulceration - aetiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Nov;18(10):949–62.
59. Tan CXW, Brand HS, de Boer NKH, Forouzanfar T. Gastrointestinal diseases and their oro-dental manifestations: Part 1: Crohn's disease. *Br Dent J*. 2016 Dec;221(12):794–9.
60. Patil DT, Moss AC, Odze RD. Role of Histologic Inflammation in the Natural History of Ulcerative Colitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2016 Oct;26(4):629–40.
61. Lankarani KB. Oral manifestation in inflammatory bowel disease: A review. *World J Gastroenterol*. 2013;19(46):8571.

62. Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Perillo L, Dell'Ermo A, Cirillo N. Pyostomatitis vegetans: A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;4.
63. Ruiz-Roca JA, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Pyostomatitis vegetans. Report of two cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2005 Apr;99(4):447–54.
64. Siegel MA, Jacobson JJ. Inflammatory bowel diseases and the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1999 Jan;87(1):12–4.
65. Jurge S, Hegarty AM, Hodgson T. Orofacial manifestations of gastrointestinal disorders. *Br J Hosp Med*. 2014 Sep 2;75(9):497–501.
66. Brito F, Barros FC de, Zaltman C, Pugas Carvalho AT, de Vasconcellos Carneiro AJ, Fischer RG, et al. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Jun;35(6):555–60.
67. Habashneh RA, Khader YS, Alhumouz MK, Jadallah K, Ajlouni Y. The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among Jordanians: a case-control study: Inflammatory bowel disease and periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012 Jun;47(3):293–8.
68. Grossner-Schreiber B, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2006 Jul;33(7):478–84.
69. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol*. 2000;19(1):51–62.
70. Wirtz S, Neurath M. Mouse models of inflammatory bowel disease☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Sep 30;59(11):1073–83.
71. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007 Mar;2(3):541–6.



72. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KRV, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology*. 2014 Aug;22(4):219–33.
73. L. Pasteur. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. (in French). *Bull Soc Chim Paris*. 1861;30-31.
74. Bailey RW, Bourne EJ. Intracellular Glycosidases of Dextran-producing Bacteria. *Nature*. 1961 Jul;191(4785):277–8.
75. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol [Internet]*. 2014 Feb [cited 2020 Feb 13];104(1).
76. Ohkusa T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi Jpn J Gastro-Enterol*. 1985 May;82(5):1327–36.
77. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990 Mar;98(3):694–702.
78. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue Distribution of Dextran Sulfate Sodium(DSS) in the Acute Phase of Murine DSS-Induced Colitis. *J Vet Med Sci*. 1999;61(1):67–70.
79. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Exp Anim*. 2000;49(1):9–15.
80. HIRONO<sup>a</sup> I, GOLBERG<sup>b</sup> L. CARCINOGENICITY OF DEXTBAN SULFATE SODIUM IN RELATION TO ITS MOLECULAR WEIGHT. :6.
81. Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: Some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol*. 1994 Aug;29(4):430–8.

82. Breider MA, Eppinger M, Gough A. Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis in Rats. *Vet Pathol.* 1997 Nov 1;34(6):598–604.
83. Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut.* 1992 Nov 1;33(11):1521–7.
84. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis.* 2000 Apr 1;21(4):757–68.
85. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1993 Aug;69(2):238–49.
86. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible Involvement of Tight Junctions, Extracellular Matrix and Nuclear Receptors in Epithelial Differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–10.
87. Laprise P. Emerging Role for Epithelial Polarity Proteins of the Crumbs Family as Potential Tumor Suppressors. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–9.
88. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J Surg Res.* 2007 Jun;140(1):12–9.
89. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, et al. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. Bereswill S, editor. *PLoS ONE.* 2009 Jun 29;4(6):e6073.
90. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim.* 1999 Jul;48(3):137–43.

91. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*. 1996 Aug;39(2):234–41.
92. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Oct 29;99(22):14338–43.
93. Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar;12(3):267–73.
94. Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Germ-Free IQI/Jic Mice. *Exp Anim*. 2001;50(5):387–95.
95. Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol*. 2001 Dec;1(1):3.
96. Axelsson L-G, Landström E, Goldschmidt TJ, Grönberg A, Bylund-Fellenius A-C. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: Effects in CD4<sup>+</sup>-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res*. 1996 Apr;45(4):181–91.
97. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994 Dec;107(6):1643–52.
98. Perše M, Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–13.
99. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. THE IMMUNOLOGY OF MUCOSAL MODELS OF INFLAMMATION. *Annu Rev Immunol*. 2002 Apr;20(1):495–549.

100. Siegmund B, Lehr H-A, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Nov 6;98(23):13249–54.
101. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1 $\beta$  targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov;337(2):647–54.
102. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*. 2009 Apr;30(4):556–65.
103. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674–7.
104. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 $\beta$  release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci*. 2007 Jul;81(5):362–71.
105. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, et al. Regulation of Murine Intestinal Inflammation by Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: Divergent Roles of Superoxide and Nitric Oxide. :12.
106. Nolan KF, Strong V, Soler D, Fairchild PJ, Cobbold SP, Croxton R, et al. IL-10-Conditioned Dendritic Cells, Decommissioned for Recruitment of Adaptive Immunity, Elicit Innate Inflammatory Gene Products in Response to Danger Signals. *J Immunol*. 2004 Feb 15;172(4):2201–9.
107. Berndt BE, Zhang M, Chen G-H, Huffnagle GB, Kao JY. The Role of Dendritic Cells in the Development of Acute Dextran Sulfate Sodium Colitis. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):6255–62.
108. Boxer LA. Role of neutrophils in genetic disorders of phagocyte function leading to IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008 Apr;46 Suppl 1:E17.

109. D'Odorico A, D'Inca R, Mestriner C, Leo VD, Ferronato A, Sturniolo GC. Influence of Disease Site and Activity on Peripheral Neutrophil Function in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2000;45(8):7.
110. Steinbeck J, Roth JA, Kaeberle L. Activation of Bovine Neutrophils by Recombinant Interferon- $\gamma$ . :8.
111. Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, et al. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol*. 2013 Sep;6(5):1016–26.
112. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002 Feb;24(1):15–8.
113. Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol*. 2009 Jul;31(2):185–205.
114. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, et al. Immunopathogenesis of Experimental Ulcerative Colitis Is Mediated by Eosinophil Peroxidase. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5664–75.
115. Shichijo K. Antibody to eosinophil cationic protein suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11(29):4505.
116. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, et al. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*. 2000 Jul;119(1):119–28.
117. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol*. 2013 Mar;6(2):347–57.
118. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of Acute Murine Dextran Sodium Sulphate Colitis: Cytokine Profile and Dose Dependency. *Digestion*. 2000;62(4):240–8.

119. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 1999 Jan 22;34(1):66–74.
120. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Jul 1;163(1):143–7.
121. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*. 1994 Feb;106(2):533–9.
122. Dieleman, Palmen, Akol, Bloemena, Pena, Meuwissen, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998 Dec;114(3):385–91.
123. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun;23(6):716–24.
124. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol Endocrinol*. 2014 Aug;28(8):1221–38.
125. Palego L, Betti L, Rossi A, Giannaccini G. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J Amino Acids*. 2016;2016:1–13.
126. Keszthelyi d., troost f. j., masclee a. a. m. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil*. 2009 Dec;21(12):1239–49.
127. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol*. 2018 Jan 31;9:151.
128. Keszthelyi D, Troost FJ and Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1239–1249.

129. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, et al. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol* 2018; 9: 151.
130. Bilir C and Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci* 2017; 3: 52–56.
131. Van Baren N and Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol* 2015; 6: 34.
132. Pallotta MT, Fallarino F, Matino D, Macchiarulo A, Orabona C. AhR-Mediated, Non-Genomic Modulation of IDO1 Function. *Front Immunol*. 2014 Oct 15 [cited 2020 Feb 13];5.
133. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2020 Feb 13];6.
134. Pfefferkorn ER. Interferon  $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Med Sci*. :5.
135. Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2004 Nov 23;2004(260):tr8.
136. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol*. 2016 Mar;37(3):193–207.
137. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):447–57.
138. Lee S-M, Lee Y-S, Choi J-H, Park S-G, Choi I-W, Joo Y-D, et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett*. 2010 Aug;132(1–2):53–60.
139. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites

Down-Regulate T Cell Receptor  $\zeta$ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6752–61.

140. Larussa T, Leone I, Suraci E, Nazionale I, Procopio T, Conforti F, et al. Enhanced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa modulates Th1/Th2 pathway and interleukin 17 production. *Helicobacter*. 2015 Feb;20(1):41–8.

141. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*. 2010 May 1;59(5):595–604.

142. Luu M, Steinhoff U, Visekruna A. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clin Transl Immunol*. 2017 Sep 22;6(9):e156.

143. Fougeray S, Mami I, Bertho G, Beaune P, Thervet E, Pallet N. Tryptophan Depletion and the Kinase GCN2 Mediate IFN- $\gamma$ -Induced Autophagy. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2954–64.

144. Metz R, Rust S, DuHadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *OncoImmunology*. 2012 Dec;1(9):1460–8.

145. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: From catalyst to signaling function: HIGHLIGHTS. *Eur J Immunol*. 2012 Aug;42(8):1932–7.

146. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011 Sep;12(9):870–8.

147. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Martino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature*. 2014 Jul;511(7508):184–90.



148. Sharma MD, Hou D-Y, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3<sup>+</sup> Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6102–11.
149. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. 2008;111(3):7.
150. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Hatano Y, Tomita H, et al. IDO1 Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate–Induced Colitis in Mice. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):3057–64.
151. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, et al. Erratum to: Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*. 2012 Sep;47(9):1061–2.
152. Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, et al. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Dec;153(6):1504-1516.e2.
153. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan;11:175628481879355.
154. Wolf A. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol*. 2004 Oct;113(1):47–55.
155. Ito H, Ando T, Arioka Y, Saito K, Seishima M. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity enhances the anti-tumour effects of a Toll-like receptor 7 agonist in an established cancer model. *Immunology*. 2015 Apr;144(4):621–30.

156. Ciorba MA, Bettonville EE, McDonald KG, Metz R, Prendergast GC, Newberry RD, et al. Induction of IDO-1 by Immunostimulatory DNA Limits Severity of Experimental Colitis. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3907–16.
157. Tu L, Chen J, Zhang H, Duan L. Interleukin-4 Inhibits Regulatory T Cell Differentiation through Regulating CD103+ Dendritic Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2020 Feb 13];8
158. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. 2009;22.
159. Ferdinande L, Demetter P, Perez-Novo C, Waeytens A, Taideman J, Rottiers I, et al. Inflamed Intestinal Mucosa Features a Specific Epithelial Expression Pattern of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008 Apr;21(2):289–95.
160. Harrington L, Srikanth CV, Antony R, Rhee SJ, Mellor AL, Shi HN, et al. Deficiency of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Enhances Commensal-Induced Antibody Responses and Protects against *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Infect Immun*. 2008 Jul 1;76(7):3045–53.
161. Zhao L, Suolang Y, Zhou D, Tang Y, Zhang Y. *Bifidobacteria* alleviate experimentally induced colitis by upregulating indoleamine 2, 3-dioxygenase expression: *Bifidobacteria* alleviate colitis. *Microbiol Immunol*. 2018 Feb;62(2):71–9.
162. Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, et al. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother*. 2018 Apr;100:426–32.
163. Markovic BS, Kanjevac T, Harrell CR, et al. Molecular and cellular mechanisms involved in mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory bowel diseases. *Stem Cell Rev* 2018;14: 153–165.

164. Moon JS, Cheong NR, Yang SY, Kim IS, Chung HJ, Jeong YW, et al. Lipopolysaccharide-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2013 Mar;n/a-n/a.
165. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):7787–98.
166. Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, Sarıboyacı AE, Ünal Halbutoğlları ZS, Özel C, et al. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. *Cell Immunol.* 2016 Dec;310:108–15.
167. Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, Le AD. DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF- $\alpha$ /IDO Axis. *J Dent Res.* 2016 Oct;95(11):1274–81.
168. Đokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Čolić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells: Immunomodulation. *Eur J Immunol.* 2013 Jul;43(7):1862–72.
169. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, et al. Dysfunction of CD4+CD25<sup>high</sup> T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis: Regulatory T cells in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2008 Mar 3;37(8):454–61.
170. Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Mahanonda R, Takikawa O. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression and Regulation in Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):114–21.
171. Mao F, Tu Q, Wang L, Chu F, Li X, Li HS, et al. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget.* 2017 Jun 6 [cited 2020 Feb 13];8(23).

172. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 May 9;119(11):2204–13.
173. Nowarski R, Jackson R, Flavell RA. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell.* 2017 Jan;168(3):362–75.
174. Păunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, T?anasie G, Bunu C, et al. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med.* 2007 May;11(3):502–8.
175. Ferrand J, Noël D, Lehours P, Prochazkova-Carlotti M, Chambonnier L, Ménard A, et al. Human Bone Marrow-Derived Stem Cells Acquire Epithelial Characteristics through Fusion with Gastrointestinal Epithelial Cells. Ludgate M, editor. *PLoS ONE.* 2011 May 5;6(5):e19569.
176. Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1–11.
177. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro: Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS.* 2004 May;22(3):377–84.
178. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. Kerkis I, editor. *PLoS ONE.* 2012 Oct 4;7(10):e46842.
179. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity.* 2010 Jun;43(4):255–63.
180. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells.* 2007 Aug;25(8):2025–32.

181. Kong Q, Sun B, Bai S, Zhai D, Wang G, Liu Y, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF- $\beta$ . *J Neuroimmunol*. 2009 Feb;207(1–2):83–91.
182. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction: Immunomodulation. *Eur J Immunol*. 2013 Jan;43(1):182–7.
183. Alipour R, Karimi MM, Hashemi-Beni B. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Dispensable for The Immunomodulatory Function of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *CELL J*. 2017;18(4):12.
184. Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Muraro M, Defedele D, et al. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol*. 2016 Feb;44(2):138-150.e1.
185. Deng Y, Zhang Y, Ye L, Zhang T, Cheng J, Chen G, et al. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep*. 2016 Dec;6(1):37566.
186. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, et al. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol*. 2017 Aug 28;8:1042.
187. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression: Transplantation. 2010 Dec;90(12):1312–20.
188. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
189. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-

dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619–21.

190. Yip H-K, Chang Y-C, Wallace CG, Chang L-T, Tsai T-H, Chen Y-L, et al. Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2013 Mar;54(2):207–21.

191. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):228–34.

192. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. (2008) 111:1327–33.

193. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, Colombel J-F. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jan;7(1):15–29.

194. Kostas A, Siakavellas SI, Kosmidis C, Takou A, Nikou J, Maropoulos G, et al. Fecal calprotectin measurement is a marker of short-term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017 Nov 7;23(41):7387–96.

195. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955 Oct 29;2(4947):1041–8.

196. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut*. 2000 Sep;47(3):404–9.

197. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Oct;24(10):1110–6.

198. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, et al. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:8031328.
199. Kostas A, Siakavellas SI, Kosmidis C, Takou A, Nikou J, Maropoulos G, et al. Fecal calprotectin measurement is a marker of short-term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2017 Nov 7;23(41):7387–96.
200. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, et al. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1998 May;112(2):205–15.
201. Jovanovic M, Simovic Markovic B, Gajovic N, Jurisevic M, Djukic A, Jovanovic I, et al. Metabolic syndrome attenuates ulcerative colitis: Correlation with interleukin-10 and galectin-3 expression. *World J Gastroenterol.* 2019 Nov 21;25(43):6465–82.
202. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, et al. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 $\beta$  in Macrophages. *J Crohns Colitis.* 2016 May;10(5):593–606.
203. Whitem CG, Williams AD and Williams CS. Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium. *J Vis Exp* 2010; 35: 1652.
204. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 1999 May;116(2):238–45.
205. Zhang X, Yang Y, Zhang L, Lu Y, Zhang Q, Fan D, et al. Mesenchymal stromal cells as vehicles of tetravalent bispecific Tandab (CD3/CD19) for the treatment of B cell lymphoma combined with IDO pathway inhibitor D-1-methyl-tryptophan. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2017 23;10(1):56.

206. Gonçalves F da C, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18228–39.
207. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2002 Aug;Chapter 15:Unit 15.19.
208. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1–2):107–24.
209. Ahrens B, Freund T, Rha R-D, Dittrich A-M, Quarcoo D, Hutloff A, et al. Lipopolysaccharide Stimulation of Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Producing Allergen-Specific T Cells in Vitro but Fails to Prevent Allergic Airway Disease. *Exp Lung Res*. 2009 Jan 1;35(4):307–23.
210. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*. 2010 May 1;59(5):595–604.
211. An Anti-CD103 Immunotoxin Promotes Long-Term Survival of Pancreatic Islet Allografts - Zhang - 2009 - *American Journal of Transplantation*
212. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, Mo J-H, Shen C, Shenouda S, et al. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23;104(43):17022–7.
213. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol*. 2015 Feb;45(2):531–43.
214. Setiady YY, Coccia JA, Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):780–6.



215. Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, Shin J-Y, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009 May 31;41(5):315–24.
216. Shevyrev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;10.
217. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):48–57.
218. Kučan Brlić P, Lenac Roviš T, Cinamon G, Tsukerman P, Mandelboim O, Jonjić S. Targeting PVR (CD155) and its receptors in anti-tumor therapy. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(1):40–52.
219. Tsuchida Y, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Tsuchiya H, et al. TGF- $\beta$ 3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLOS ONE*. 2017 Apr 1;12(1):e0169646.
220. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*. 2012;3:51.
221. Florholmen J. Mucosal healing in the era of biologic agents in treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Jan;50(1):43–52.
222. Di Ruscio M, Vernia F, Ciccone A, Frieri G, Latella G. Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? *Inflamm Bowel Dis*. 2017 19;24(1):78–92.
223. Kristensen V, Røseth A, Ahmad T, Skar V, Moum B. Fecal Calprotectin: A Reliable Predictor of Mucosal Healing after Treatment for Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology. Research and Practice*. 2017
224. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098:216–29.

225. Kurdukar DPA, Kurdukar DAA, Mahale DSA, Beldar DAM. Biomarkers in Gingival Crevicular Fluid. :6.

## Биографија

Др Александар Ацовић рођен је 26.09.1990. године у Крушевцу. Основну и средњу школу завршио је у Крагујевцу. Интегрисане академске студије стоматологије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршио је 2016. године и стекао звање доктора стоматологије. Након завршених студија обавио је обавезни стаж у Заводу за стоматологију, Факултета медицинских наука у трајању од шест месеци. Докторске академске студије уписао је 2016. године, изборно подручије Имунологија, инфекција, инфламација на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Од 2016. године у оквиру академског кружења обавља послове фацилитатора, сарадника у настави, а касније и истраживача приправника за ужу научну област Ортопедија вилица.

Кандидат је аутор више научних радова објављених у часописима индексираних на *SCI* листи.

## Библиографија

1. **Acovic A**, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan;11:175628481879355. **M21**
2. **Acovic A**, Gazdic M, Jovicic N, Harrell CR, Fellabaum C, Arsenijevic N, et al. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in pathology of the gastrointestinal tract. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818815334. **M21**
3. Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Jovicic N, **Acovic A**, Harrell CR, et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2018;24(5):687–702. **M21**
4. Stefanovic V, Taso E, Kanjevac T, Abazovic D, Rakic M, Petkovic-Curcin A, **Acovic A**, Vojvodic D. Dental caries and restorative biomaterials affect IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl*. 2019;(00):38–38. **M23**

## ПРИЛОГ

### КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКАУ КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип покументације:**

Монографска публикација

**ТД**

**Тип записа:**

Текстуални штампани материјал

**ТЗ**

**Врста рада:**

Докторска дисертација

**ВР**

**Аутор:**

Александар Ацовић

**АУ**

**Ментор/кометор:**

проф. др Владислав Воларевић

**МН**

доц. др Владимир Ристић

<b>Наслов рада:</b> <b>НР</b>	Улога индоламин 2,3 деоксигеназе у имуномодулацији улцерозног колитиса: параметри инфламације у усној дупљи и колону
<b>Језик публикације:</b> <b>ЈП</b>	српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> <b>ЈИ</b>	српски/енглески
<b>Земља публикавања:</b> <b>ЗП</b>	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> <b>УГП</b>	Србија
<b>Година:</b> <b>ГО</b>	2020.
<b>Издавач:</b> <b>ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> <b>МС</b>	Крагујевац 34000, Светозара Марковића 69
<b>Физички опис рада:</b> <b>ФО</b>	Дисертација има 134 страна, 54 графикана, 10 слика, 7 табеле и 225 референци

**Научна област:**

Медицина

**НО**

**Научне дисциплине:**

Имунологија, стоматологија

**ДИ**

**Предметна одредница/кључне речи:**

*indoleamine 2,3-dioxygenase*”,  
„*kynurenine*”, „*dextran sodium sulphate-*  
*induced colitis*”, „*C57BL/6 mice*”,  
„*BALB/c mice*”, „*mesenchymal stem*  
*cells*”, „*ulcerative colitis*”

**ПО**

**Чува се:**

Библиотеци Факултета медицинских  
наука у Крагујевцу

**ЧУ**

**Важна напомена:**

**ВН**

**Извод:****ИД**

Дендритске ћелије активношћу IDO/кинуруениског пута индукују експанзију Т регулаторних лимфоцита и на тај начин супримирају инфламацију и подстичу регенерацију слузнице црева у мишева оболелих од колитиса инукованим DSS-ом. Мерењем концентрације кинуренина у серумима и фецесу оболелих од улцерозног колитиса, може се пратити ток болести и успешност терапије.

Апликација мезенхимских матичних ћелија у мишеве соја C57BL/6 третираних DSS-ом доводи до ублажања симптома DSS колитиса индукцијом Т регулаторних лимфоцита IDO/кинуруенинским путем, док апликација мезенхимских матичних ћелија у DSS-ом третиране животиње соја BALBc доводи до погоршања колитиса експанзијом проинфламацијских ћелија.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:** 26.02.2020.

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

1. **проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, председник
2. **доц. др Јелена Миловановић**, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан
3. **НС Бојана Симовић-Марковић**, научни сарадник Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан



## KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES  
KRAGUJEVAC

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

Monographic publication

DT

**Type of record:**

Textual printed material

TR

**Contents code:**

PhD thesis

CC

**Author:**

Aleksandar Acovic

AU

**Menthor/co-mentor:**

Prof. Vladislav Volarevic

MN

Ass.prof. Vladimir Ristic

<b>Title:</b> <b>TI</b>	The role of indolamine 2,3 deoxygenase in the immunomodulation of ulcerative colitis: parameters of inflammation in the oral cavity and colon
<b>Language of text:</b> <b>LT</b>	Serbian (Cyrilic)
<b>Language of abstract:</b> <b>Country of publication:</b> <b>CP</b>	Serbian/English Serbia Serbia
<b>Locality of publication:</b> <b>LP</b>	Serbia
<b>Publication year:</b> <b>PY</b>	2020.
<b>Publisher:</b> <b>PU</b>	Author reprint
<b>Publication place:</b> <b>PP</b>	Kragujevac 34000, Svetozara Markovića 69
<b>Physical description</b> <b>PD</b>	Thesis has 134 pages, 54 charts, 10 pictures, 6 table, 225 references
<b>Scientific field:</b> <b>SF</b>	Immunology/dentistry
<b>Subject/key words:</b> <b>SKW</b>	„indoleamine 2,3-dioxygenase”, „kynurenine”, „dextran sodium sulphate- induced colitis”, „C57BL/6 mice”, „BALB/c mice”, „mesenchymal stem cells”, „ulcerative colitis”

**Holding data:**

Library of Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

**Note:**

N

**Abstract:**

**AB**

Dendritic cells, by the activity of the IDO / kynurenine pathway, induce the expansion of T regulatory lymphocytes and thus suppress inflammation and promote bowel mucosal regeneration in DSS-induced colitis mice.

By measuring the concentration of kynurenine in the sera and faeces of patients with ulcerative colitis, the course of the disease and the success of therapy can be monitored.

The administration of mesenchymal stem cells in DSS-treated C57BL / 6 mice results in the alleviation of DSS colitis symptoms by induction of T regulatory lymphocytes by IDO / kynurenine, whereas the application of mesenchymal stem cells in DSS-treated animals of BALBc strain exacerbates colitis by expansion of cells.

**Accepted by the Scientific Board on:**

26.02.2020.

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

1. **Prof. dr Danilo Vojvodić**, Full Professor of Immunology, Medical Faculty, University of Military Academy Belgrade, president

2. **Prof. dr Jelena Milovanovic**, Assistant professor of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

3. **Prof. dr Bojana Simovic-Markovic**, Research Assistant Professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

## **Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације**

1. **Acovic A**, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan;11:175628481879355. **M21**
2. **Acovic A**, Gazdic M, Jovicic N, Harrell CR, Fellabaum C, Arsenijevic N, et al. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in pathology of the gastrointestinal tract. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818815334. **M21**
3. Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Jovicic N, **Acovic A**, Harrell CR, et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2018;24(5):687–702. **M21**
4. Stefanovic V, Taso E, Kanjevac T, Abazovic D, Rakic M, Petkovic-Curcin A, **Acovic A**, Vojvodic D. Dental caries and restorative biomaterials affect IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl*. 2019;(00):38–38. **M23**



# Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis

Aleksandar Acovic, Bojana Simovic Markovic, Marina Gazdic, Aleksandar Arsenijevic, Nemanja Jovicic, Nevena Gajovic, Marina Jovanovic, Natasa Zdravkovic, Tatjana Kanjevac, C. Randall Harrell, Crissy Fellabaum, Zana Dolicanin, Valentin Djonov, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic and Vladislav Volarevic

## Abstract

**Background:** Dendritic cell (DC)-derived indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) degrades tryptophan to kynurenine, which promotes conversion of inflammatory T cells in immunosuppressive regulatory T cells (Tregs). We analyzed the significance of the IDO:Treg axis for inducing and maintaining mucosal healing in ulcerative colitis (UC).

**Methods:** Dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis in BALB/c mice (model for mucosal healing) and C57BL/6 mice (model for persistent disease) was used. Serum, fecal samples and colon-infiltrating immune cells of 65 patients with UC with mucosal healing or persistent colitis were analyzed.

**Results:** Significantly higher serum levels of kynurenine and downregulated inflammatory cytokines were noticed in DSS-treated BALB/c mice compared with C57BL/6 mice. Increased IDO activity and attenuated capacity for antigen presentation and production of inflammatory cytokines, observed in BALB/c DCs, was followed by a significantly lower number of inflammatory T helper 1 (Th1) and Th17 cells and a notably increased number of Tregs in the colons of DSS-treated BALB/c mice. DCs and Tregs were crucially important for the maintenance of mucosal healing since their depletion aggravated colitis. Mucosal healing, followed by an increase in kynurenine and intestinal Tregs, was re-established when BALB/c DCs were transferred into DC-depleted or Treg-depleted DSS-treated BALB/c mice. This phenomenon was completely abrogated by the IDO inhibitor. Significantly higher serum and fecal levels of kynurenine, accompanied by an increased presence of intestinal Tregs, were noticed in patients with UC with mucosal healing and negatively correlated with disease severity, fecal calprotectin, colon-infiltrating interferon  $\gamma$  and interleukin-17-producing cells, serum and fecal levels of inflammatory cytokines.

**Conclusion:** IDO-dependent expansion of endogenous Tregs should be further explored as a new approach for the induction and maintenance of mucosal healing in patients with UC.

**Keywords:** indoleamine 2,3-dioxygenase, kynurenine, mucosal healing, T-regulatory cells, ulcerative colitis

Received: 31 January 2018; accepted in revised form: 21 June 2018.

## Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a chronic, idiopathic and relapsing inflammatory disease of the gut limited to the mucosal layer of the colon and

rectum.<sup>1</sup> Accordingly, mucosal healing, defined as the absence of friability, blood, erosions and ulcers in all visualized segments of the gut mucosa,<sup>2</sup> represents the ultimate therapeutic goal

*Ther Adv Gastroenterol*

2018, Vol. 11: 1–22

DOI: 10.1177/  
1756284818793558

© The Author(s), 2018.  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-  
permissions

Correspondence to:  
**Vladislav Volarevic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem  
Cell Research, Faculty of  
Medical Sciences,  
University of Kragujevac,  
69 Svetozar Markovic  
Street, 34000 Kragujevac,  
Serbia  
[drvolarevic@yahoo.com](mailto:drvolarevic@yahoo.com)

**Aleksandar Acovic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, University of  
Kragujevac, Kragujevac,  
Serbia  
Department of Dentistry,  
University of Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia

**Bojana Simovic Markovic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, University of  
Kragujevac, Kragujevac,  
Serbia

**Marina Gazdic**  
Department of Genetics,  
University of Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia

**Aleksandar Arsenijevic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, University of  
Kragujevac, Kragujevac,  
Serbia

**Nemanja Jovicic**  
Department of Histology  
and Embryology,  
University of Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia

**Nevena Gajovic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, University of  
Kragujevac, Kragujevac,  
Serbia

**Marina Jovanovic**  
**Natasa Zdravkovic**  
Center for  
Gastroenterology, Clinical  
Center Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia

**Tatjana Kanjevac**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, University of

Kragujevac, Kragujevac, Serbia  
Department of Dentistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

**C. Randall Harrell**  
**Crisy Fellabaum**  
Regenerative Processing Plant, LLC, Palm Harbor, FL, USA

**Zana Dolicanin**  
State University of Novi Pazar, Department of Biomedical Sciences, Novi Pazar, Serbia

**Valentin Djonov**  
Institute of Anatomy, University of Bern, Baltzerstrasse, Switzerland

**Nebojsa Arsenijevic**  
**Miodrag L. Lukic**  
Center for Molecular Cell Medicine and Stem Cell Research, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

for the treatment of patients with UC<sup>3</sup> while the failure of mucosal healing is a major predictor of clinical recurrence.<sup>4</sup>

Currently, endoscopy is the best diagnostic approach to monitor mucosal status of patients with UC, but it should not be frequently performed because of the invasiveness and potential risk of disease exacerbation.<sup>5</sup> Additionally, one of the main clinical aims in UC treatment is continuous maintenance of mucosal healing in patients with UC.<sup>6</sup> Nowadays, mucosal healing can be maintained for 12 months with continued application of immunosuppressive drugs and biological agents, but aggravation of colon inflammation is inevitable when treatment stops.<sup>3</sup> Accordingly, new noninvasive markers and therapeutic approaches for monitoring and maintaining mucosal healing in patients with UC should be defined.

The importance of tryptophan and its metabolites for the progression of UC has been recently indicated by Nikolaus and colleagues<sup>7</sup> who noticed significantly lower serum levels of tryptophan in patients with UC than in healthy controls. Several recently published animal studies showed that administration of tryptophan or its metabolites led to the attenuation of experimental colitis, whereas removing tryptophan from the diet increases susceptibility to colitis.<sup>8–10</sup> In the inflammatory microenvironment of the gut, the kynurenin pathway comprises most of tryptophan metabolism.<sup>11</sup> In the presence of inflammatory cytokines, intestinal dendritic cells (DCs) produce indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), a heme-containing enzyme that degrades tryptophan to kynurenine.<sup>12</sup> Gut DCs, in an IDO-dependent manner, promote the conversion of inflammatory T cells into immunosuppressive regulatory T cells (Tregs), enabling induction of immune tolerance in the gut.<sup>12</sup>

Dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis has been mostly used to elucidate the molecular and cellular pathways involved in the pathogenesis of UC and for the evaluation of new diagnostic and therapeutic approaches for UC treatment.<sup>13</sup> Interestingly, as it was recently demonstrated by Melgar and colleagues,<sup>14</sup> DSS induces a different degree of colon injury and inflammation when applied to C57BL/6 and BALB/c mice. The acute disease in C57BL/6 mice progresses to a severe, chronic colitis, while acute DSS-induced colitis in

BALB/c mice is self limited and starts to resolve immediately after DSS removal.<sup>14,15</sup> It is supposed that strain-dependent differences in resolution of DSS-induced inflammation reflect the ability of these strains to mount different healing mechanisms.<sup>16</sup> Accordingly, the acute model of DSS-induced colitis in BALB/c mice is useful to study normal mucosal healing while that for DSS-injured C57BL/6 mice offers a promising animal model for the evaluation of pathological inflammatory changes observed in patients with chronic progressive UC.<sup>14</sup>

Here, we provide the first evidence that higher IDO activity in BALB/c DCs and the consequent IDO-dependent increase in the total number of colon-infiltrating Tregs are responsible for mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice. Similarly, we observed higher serum and fecal levels of kynurenine and an increased presence of colon-infiltrating Tregs in patients with UC and mucosal healing. In contrast, patients with UC that is progressive had lower serum and fecal levels of kynurenine and a reduced number of gut infiltrated Tregs. Taken together, this experimental and clinical data suggest the importance of the IDO:Tregs axis for resolution of colon inflammation and strongly indicate the possible diagnostic and therapeutic potential of kynurenine for achieving and maintaining mucosal healing in patients with UC.

## Material and methods

### Study population

This study recruited a total of 65 patients with UC (38 male and 27 female) with a median age of 50 years (range 23–79). Additionally, 20 healthy subjects (11 male and 9 female) with a median age of 48 years (range 25–75), whose checkups were finished at the Clinical Center of Kragujevac as a routine item, were randomly chosen to represent the general population as healthy controls. Patients with UC were classified into two groups: mucosal healing (19 male and 20 female patients with a median age of 50 years) and chronic persistent disease (19 male and 7 female patients with a median age of 50 years) (Table 1). In each individual case, the diagnosis and assessment of the severity of UC was confirmed by the Mayo endoscopic subscore, histological and clinical scores and by measurement of C-reactive protein (CRP) and fecal calprotectin.<sup>3,17–20</sup> All endoscopies were

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of patients with UC.

Characteristic	Mucosal healing	Chronic persistent disease
Number of patients, <i>N</i> = 65 (%)	39 (60%)	26 (40%)
Sex (male/female), <i>N</i>	19/20	19/7
Age, median (range)	50.28 (23–71)	50.12 (26–79)
Disease location, <i>N</i> Proctitis/left sided distal UC/pancolitis	10/23/6	1/14/11
Hb, median (IQR)	134 (8)	109 (19)
Fe, median (IQR)	14.5 (6.10)	7.15 (5.53)
Ferritin, median (IQR)	239 (109)	44.5 (74.25)
Platelets, median (IQR)	392 (110)	480 (121.5)
UIBC, median (IQR)	44 (13)	32 (19)
TIBC, median (IQR)	52 (12)	56 (13.25)
C4, median (IQR)	0.21 (0.18)	0.35 (0.31)
C3, median (IQR)	1.3 (0.39)	1.75 (1.02)
CEA, median (IQR)	1.8 (1.95)	3.75 (2.54)
CA 19-9, median (IQR)	2.9 (2.4)	12.15 (16.50)

Fe, iron; Hb, hemoglobin; IQR, interquartile range; UC, ulcerative colitis; TIBC, transferrin and iron binding capacity; UIBC, unsaturated iron binding capacity.

performed by the same experienced endoscopist (NZ) and disease severity was independently determined by two gastroenterologists (MJ and NZ). Mucosal healing was defined when Mayo endoscopic subscore had been transitioned from a Mayo grade 2 or 3 to a Mayo grade 0 or 1, while chronic persistent disease was defined when the Mayo endoscopic subscore was 2 or 3.<sup>3</sup> The clinical score was determined by using the Truelove and Witts clinical activity index.<sup>18</sup> The histological score was determined by using Geboes grade.<sup>19</sup> Patients with previously diagnosed colorectal cancer, as well as patients with Crohn's disease, were excluded from the study. The study was conducted at the Center for Gastroenterology, Clinical Center of Kragujevac and Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia and was approved by the Ethics Committees of these institutions. The Principle of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki were adhered to at all times. All patients gave their informed consent for

blood and tissue analysis. Patients were under continuous medical supervision at the Clinical Center of Kragujevac.

#### *Measurements of IDO activity, concentration of cytokines, fecal calprotectin and CRP levels in serum and fecal samples of patients with UC and healthy controls*

Blood and fecal samples were prepared as previously described.<sup>21</sup> The serums and supernatant fluids were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IDO activity was determined by spectrophotometric assay for kynurenine in the serum and fecal samples of patients with UC and healthy controls.<sup>22</sup> Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-10, CXCL11 and IL-17, fecal calprotectin and CRP were measured in serum and fecal samples of patients with UC and healthy subjects by using commercially available ELISA tests, according to the manufacturer's instructions.<sup>17</sup>

### *Flow cytometry analysis of colon-infiltrating cells in patients with UC*

The phenotype of colon-infiltrating cells was determined by flow cytometry. Immune cells were isolated from the colons of patients with UC, as previously described.<sup>23</sup> Biopsies were washed three times in calcium-magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The specimens were incubated twice in calcium-magnesium-free HBSS with 1 mM ethylenediamine tetraacetic Acid (EDTA) for 10 min at 37°C under gentle shaking to remove intestinal epithelial cells. Specimens were washed with HBSS and incubated for 20–30 min in 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland) with 1 mg/ml collagenase type I (336 U/ml) (Sigma-Aldrich), 0.1 mg/ml DNase (Sigma-Aldrich) and 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich) without fetal bovine serum (FBS) at 37°C. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich) and finally submitted to Ficoll density gradient centrifugation for 20 min at 2000 rev/min (~690 g, without brake). The interphase was carefully removed and washed with PBS. Single-cell suspensions of colon-infiltrating cells were obtained and the cells were then washed twice with a buffer assigned for flow cytometry containing 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.1% bovine serum albumin (BSA), and 0.4% trisodium citrate dehydrate in PBS. About 1 × 10<sup>6</sup> cells per sample were incubated with antihuman CD4, CD56, IL-10, interferon (IFN)- $\gamma$  and IL-17 antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), phycoerythrin (PE; BD Biosciences), peridinin chlorophyll A protein (PerCP; BD Biosciences) or allophycocyanin (APC; BD Biosciences). For the intracellular staining, cells were previously stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin for 4 h at 37°C with the addition of 1  $\mu$ g/ml Golgi plug. Intracellular staining for Foxp3 was performed using the BD Bioscience fixation/permeabilization buffer kit. Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACSCalibur and analyzed by using the Flowing software analysis program.

### *Animals*

For animal studies, 6–8-week-old male C57BL/6 and BALB/c mice were used. Mice were maintained in animal facilities of the Faculty of Medical

Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All animals received humane care and all experiments were approved by and conducted in accordance with the Guidelines of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. Mice were housed in a temperature-controlled environment with a 12 h light–dark cycle and were administered standard laboratory chow and DSS or water *ad libitum*.

### *Induction of experimental colitis*

DSS (3%, molecular weight 40 kDa; TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) was given to mice in place of normal drinking water for up to 5 days, followed by a recovery period of 7 days.<sup>24</sup> Control mice had access to DSS-free water.

### *Evaluation of DSS-induced colitis*

Disease Activity Index (DAI) was used to assess the clinical signs of colitis.<sup>25</sup> Body weight measurements, analysis of stool consistency, and fecal occult blood tests were performed daily.<sup>25</sup>

For histological analysis, colons were removed from euthanized mice, rinsed with PBS, and cut longitudinally before being rolled into a 'Swiss roll'.<sup>26</sup> The length of each colon was measured starting from the end of the cecum to the rectum. The exact same areas (distal anorectal regions) were analyzed in all samples. The histology scores for each mouse were calculated as the sum of 'damage of epithelium' and 'infiltration' subscores. 'Damage of epithelium' subscore was scored as follows: 0, normal morphology; 1, loss of goblet cells; 2, loss of goblet cells in large areas; 3, loss of crypts; 4, loss of crypts in large areas. 'Infiltration' subscore was scored as follows: 0, no infiltrate; 1, infiltrate around crypt basis; 2, infiltrate reaching to lamina muscularis mucosae; 3, extensive infiltration reaching the lamina muscularis mucosae and thickening of the mucosa with abundant edema; 4, infiltration of the lamina submucosa.<sup>27</sup>

### *Pharmacological inhibition of IDO activity in vivo*

For inhibition of IDO activity *in vivo*, BALB/c DSS-treated mice received IDO inhibitor, 1-methyltryptophan (1-MT, Sigma-Aldrich) dissolved in drinking water (2 mg/ml). DSS-treated BALB/c mice received 1-MT continuously during the first 5 days of the experiment (during DSS administration).<sup>28</sup>

### *Flow cytometry analysis of colon-infiltrating cells in DSS-treated mice*

Isolation of immune cells from lamina propria of experimental animals was conducted as previously described.<sup>29</sup> Each colon was dissected away from the caecum. The colons were cut into pieces 3 cm long and then cut longitudinally, so that 3 × 3 cm flaps of colonic tissue were made. The flaps were placed in a 50 ml conical tube and washed three to five times with 30 ml cold HBSS, calcium and magnesium free. The pieces were incubated in 20 ml HBSS/EDTA for 30 min in a 37°C water bath. Each tube was shaken regularly during the incubation to ensure that epithelial cells were disrupted from the mucosa. The pieces were sedimented and the supernatant was decanted. The remaining EDTA were washed out with 40 ml HBSS, calcium and magnesium free. The fragments of colonic tissue were placed in a 10 cm Petri dish and cut into smaller pieces with a scalpel. The pieces were aspirated with a pipette, transferred to a fresh 50 ml conical tube and filled to 20 ml with DMEM supplemented with 10% FBS. Then, 1 ml of 4000 Mandl units/ml collagenase D (Sigma-Aldrich) and 200 µl of 1 mg/ml DNase (Sigma-Aldrich) were added to the tube and incubated for 1 h in a 37°C water bath. The supernatant was filtered through a 100 µm nylon cell strainer into a clean 50 ml conical tube. Cold HBSS, calcium and magnesium free, was added to 50 ml. Cells were pelleted by centrifuging 10 min at 450 g, at 4°C. The pellet was disrupted and cells were resuspended in 50 ml HBSS, calcium and magnesium free, and filtered through a 40 µm nylon cell strainer into a clean 50 ml conical tube. Cells were again pelleted by centrifuging for 10 min at 450 g, at 4°C. The pellet was disrupted and cells were resuspended in 20 ml of 30% Percoll. Afterwards, the cell suspension was layered over 25 ml of 70% Percoll in a 50 ml conical tube and centrifuged for 20 min at 1100 g, room temperature, with as low an acceleration rate as possible and with the brake off. Clumping of cells was prevented by the addition of 1 mM EDTA to the solution. Epithelial cells floated on the 30% Percoll layer, and immune cells were found between the 30% and 70% layers. Debris and dead cells were pelleted at the bottom of the conical tube. For flow cytometry analysis, about 1 × 10<sup>6</sup> cells per sample were incubated with antimouse CD45, CD4, CD11c and CD40, conjugated with FITC, PE, PerCP or APC. For the intracellular staining, cells were previously stimulated with PMA and ionomycin for 4 h at 37°C with the addition of 1 µg/ml Golgi plug. Following extracellular staining, cells

were fixed, permeabilized and stained for IFN-γ, IL-4, IL-17, IL-12, IL-1β and IL-10, conjugated with FITC, PE, PerCP or APC. Intracellular staining for Foxp3 was performed using the BD Bioscience fixation/ permeabilization buffer kit, following the manufacturer's instructions. Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACSCalibur and analyzed by using the Flowing Software analysis program.

### *Determination of cytokines in serum samples of experimental animals*

The commercial ELISA sets (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were used to determine the concentration of IL-12, IL-1β and IL-10 in serum samples of control and DSS-treated animals.<sup>25</sup>

### *Isolation of DCs and analysis of their phenotype and function*

DCs were isolated from spleens of DSS-treated C57BL/6 and BALBc mice 2 days after administration of DSS by magnetic cell sorting. Single-cell suspensions of mononuclear cells derived from the spleen were labelled with CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and positively selected using MACS Column and MACS Separator. Isolated DCs were stimulated with lipopolysaccharides (LPS, 10 ng/ml) for 48 h, harvested and analyzed by flow cytometry.<sup>25</sup>

### *Determination of IDO activity in DCs*

Expression of IDO in DCs was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR). The fold change of mRNA gene expression for IDO and β actin, used as a housekeeping gene (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), was calculated.<sup>30</sup> IDO activity was determined by spectrophotometric measurement of kynurenine in the supernatants of LPS (10 ng/ml) stimulated spleen DCs previously isolated from untreated or DSS-treated mice, 2 days after DSS administration.<sup>22</sup>

### *Depletion of DCs and adoptive transfer of DCs in DC-depleted DSS-treated mice*

Since gut CD103+ DCs express IDO responsible for expansion of colon-infiltrating Tregs,<sup>12</sup> these DCs were selectively depleted in DSS-treated BALB/c mice by using immunotoxin-saporin capable of selectively depleting DCs (Advanced

Targeting Systems, San Diego, CA, USA).<sup>31</sup> Since this immunotoxin significantly reduces the frequencies and absolute numbers of DCs within 1 week of treatment,<sup>31</sup> DSS-treated BALB/c mice were, at day 5, injected with saporin (2 mg/kg, intraperitoneally) while clinical and histological manifestation of DC depletion were analyzed 1 week later.

IDO activity was inhibited in BALB/c DCs (DCs<sup>1-MT</sup>) by culturing DCs, previously isolated from healthy BALB/c mice, in culture medium containing 1 mM 1-MT.<sup>32</sup> Immunotoxin-saporin used for depletion of DCs is cleared from the circulation by day 3 post injection.<sup>31</sup> Accordingly, for adoptive transfer experiments, DCs with normal or suppressed IDO activity (DCs<sup>1-MT</sup>), previously isolated from healthy BALB/c mice, were transferred (intraperitoneally;  $2 \times 10^5$  DCs/mouse) into DC-depleted DSS-treated BALB/c mice 72 h after saporin injection.

#### *Depletion of Treg cells and adoptive transfer of DCs in Treg-depleted DSS-treated mice*

For Treg depletion, mice were injected intraperitoneally with cyclophosphamide (CY, Galenika A.D., Belgrade, Serbia) at a dose of 10 mg/kg or anti-CD25 antibody (PC61 mAb, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), at a dose of 250 mg/mouse, 3 days before DSS administration.<sup>33,34</sup>

For adoptive transfer experiments, isolated DCs ( $2 \times 10^5$  cells per mouse) were transferred intraperitoneally into CY+DSS-treated and anti-CD25-antibody-treated BALB/c mice at day 5.<sup>35</sup>

#### *Statistical analysis*

Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Results were analyzed by Student's *t* test, Pearson's or Spearman's correlation coefficient and SPSS 22.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The difference was considered significant when *p* was less than 0.05.

## **Results**

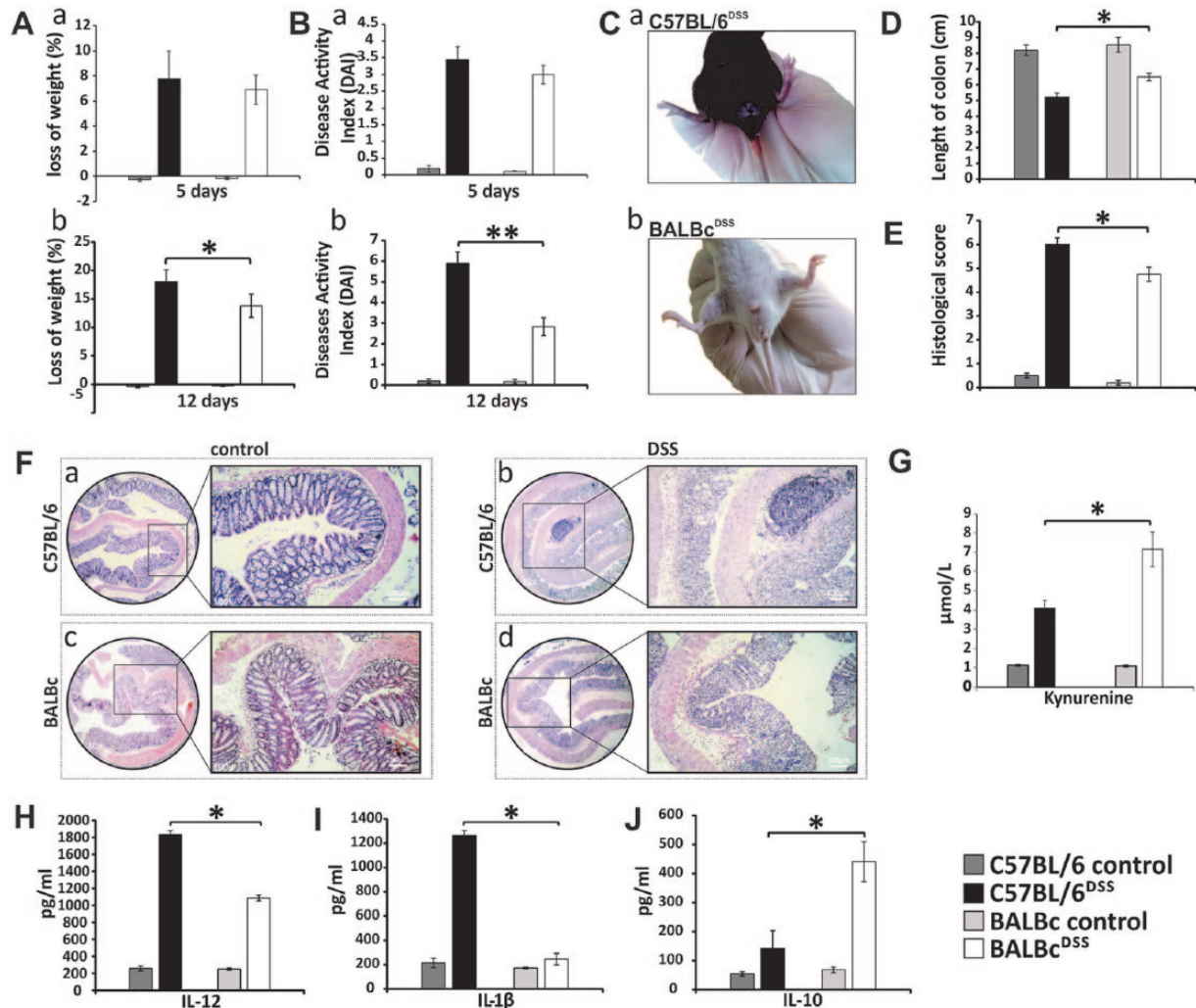
#### *Serum concentration of kynurenine reflected the strain-dependent difference in mucosal healing of DSS-treated C57BL/6 and BALB/c mice*

As previously reported by Melgar and colleagues,<sup>14</sup> a similar degree of DSS-induced colitis

was noticed in C57BL/6 and BALB/c mice during the first 5 days of DSS treatment [Figure 1(Aa, Ba)]. However, at day 12, there was a striking difference in weight loss, clinical and histological manifestations of DSS colitis between C57BL/6 and BALB/c mice [Figure 1(Ab, Bb, D, E, Fb, Fd)], indicating faster mucosal healing in BALB/c mice. Accordingly, molecular and cellular mechanisms responsible for strain-dependent differences in mucosal healing 12 days after initial administration of DSS were analyzed.

There were significant differences in the clinical manifestation of disease [Figure 1(A–D)]. DSS-treated C57BL/6 mice developed severe colitis manifested by watery diarrhea, rectal bleeding and significant body weight loss (>5%) [Figure 1(Ab)]. The presence of blood in the feces was detected 1–2 days after the start of DSS treatment, whereas gross bleeding and diarrhea were initially observed from day 4 [Figure 1(Ca)]. Additionally, DSS-treated mice exhibited visible signs of illness, including a hunched back, raised fur and reduced mobility. Severe colitis observed in DSS-treated C57BL/6 mice was accompanied by noticeable decrease in colon length [Figure 1(D)]. DSS-treated BALB/c mice recovered from DSS-induced colitis faster than C57BL/6 mice [Figure 1(A–D)]. Bloody diarrhea, gross rectal bleeding [Figure 1(Cb)], hunched back, raised fur and reduced mobility were not observed in DSS-treated BALB/c mice at day 12. At the same time point, body weight loss [*p* < 0.05; Figure 1(Ab)], DAI [*p* < 0.01; Figure 1(Bb)] and colon shortening [*p* < 0.05; Figure 1(D)] were significantly lower in DSS-treated BALB/c animals compared with C57BL/6 mice.

The difference in recovery from DSS-induced colitis between C57BL/6 and BALB/c mice was confirmed by the statistical difference in histological score [*p* < 0.05; Figure 1(E)]. Destruction of the entire epithelium, decreased number of goblet cells and loss of crypts, accompanied by severe submucosal edema and massive infiltration of inflammatory cells in the lamina propria and submucosa were observed in the colons of C57BL/6 DSS-treated mice [Figure 1(Fb)]. In contrast, microscopic examination of the distal colon sections of DSS-treated BALB/c mice revealed almost normal architecture of the colon, minimal changes in the surface epithelium and mild infiltration of inflammatory cells to the mucosa [Figure 1(Fd)].



**Figure 1.** Serum concentration of kynurenine reflected the severity of dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis. Weight loss (A), Disease Activity Index (DAI) (B), rectal bleeding (C), length of colon (D) and histological score (E) revealed strain-specific difference in recovery from DSS at day 12. Destruction of the entire epithelium, decreased number of goblet cells and loss of crypts, accompanied by severe submucosal edema and massive infiltration of inflammatory cells in the lamina propria and submucosa were observed in the colons of C57BL/6 DSS-treated mice (Fb, 10×/100×). In contrast, distal colon sections of DSS-treated BALB/c mice revealed almost normal architecture of the colon, minimal changes in the surface epithelium and mild infiltration of inflammatory cells to the mucosa (Fd, 10×/100×). Significantly higher serum levels of kynurenine were noticed in DSS-treated BALB/c mice (G). Serum levels of inflammatory interleukin (IL)-12 (H) and IL-1β (I) were significantly lower ( $p < 0.05$ ), while the concentration of anti-inflammatory IL-10 (J) was significantly higher in the sera of DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-treated C57BL/6 mice. Data presented as mean  $\pm$  standard error of the mean;  $n = 10$ /group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Importantly, the serum concentration of kynurenine reflected the strain-dependent difference in mucosal healing. Significantly higher serum levels of kynurenine were noticed in DSS-treated BALB/c mice that recover faster from DSS-induced colon injury than C57BL/6 mice [ $p < 0.05$ ; Figure 1(G)].

To investigate whether a difference in serum concentration of kynurenine was accompanied by a

different cytokine profile, concentrations of inflammatory cytokines (IL-12 and IL-1β) and immunosuppressive IL-10 were analyzed in the serum samples of DSS-treated C57BL/6 and BALB/c mice. Serum levels of inflammatory IL-12 and IL-1β were significantly lower [ $p < 0.05$ ; Figure 1(H, I)], while the concentration of anti-inflammatory IL-10 was significantly higher in the sera of DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-treated C57BL/6 mice

[ $p < 0.05$ ; Figure 1(J)], indicating that increased serum levels of immunosuppressive kynurenine were accompanied by a notable decrease in inflammatory cytokines and a significant increase in anti-inflammatory IL-10.

*Activated BALB/c DCs have higher capacity to express IDO and produce immunosuppressive kynurenine and IL-10 than activated C57BL/6 DCs*

To delineate the cellular base of observed strain-dependent differences in mucosal healing, we first analyzed the effects of LPS on phenotype and function of DCs [Figure 2(A)], which are known to regulate colon inflammation in an IDO-dependent manner.<sup>12</sup> Significantly higher expression of IDO was noticed in LPS- and DSS-activated BALB/c DCs compared with similarly treated C57BL/6 DCs [ $p < 0.05$ ; Figure 2(B)]. The difference in IDO expression was corroborated by measurement of kynurenine in supernatants of LPS- and DSS-activated BALB/c and C57BL/6 DCs. A significantly higher concentration of kynurenine was detected in the supernatants of activated BALB/c DCs than in activated C57BL/6 DCs [ $p < 0.05$ ; Figure 2(C)], confirming the higher IDO activity in activated BALB/c DCs.

In line with these findings, compared with activated C57BL/6 DCs, a significantly higher percentage of LPS- and DSS-activated BALB/c DCs produced immunosuppressive IL-10 while a lower percentage of these cells produced inflammatory IL-12 and expressed CD40, a well known marker of DC activation<sup>36</sup> [ $p < 0.05$ ; Figure 2(D)], suggesting that BALB/c DCs respond to specific (DSS) and general (LPS) stimuli mainly through the production of immunosuppressive factors. These findings were correlated with the cytokine production of gut-infiltrated DCs *in vivo* [Figure 2(E–G)]. A remarkably lower number of colon-infiltrating inflammatory (IL-12- and IL-1 $\beta$ -producing) DCs [ $p < 0.05$ ; Figure 2(E, F)] and a significantly higher number of immunosuppressive IL-10-producing DCs [ $p < 0.05$ ; Figure 2(G)] were noticed in the lamina propria of DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-treated C57BL/6 mice, confirming the importance of strain-dependent differences for phenotype and function of colon-infiltrating DCs.

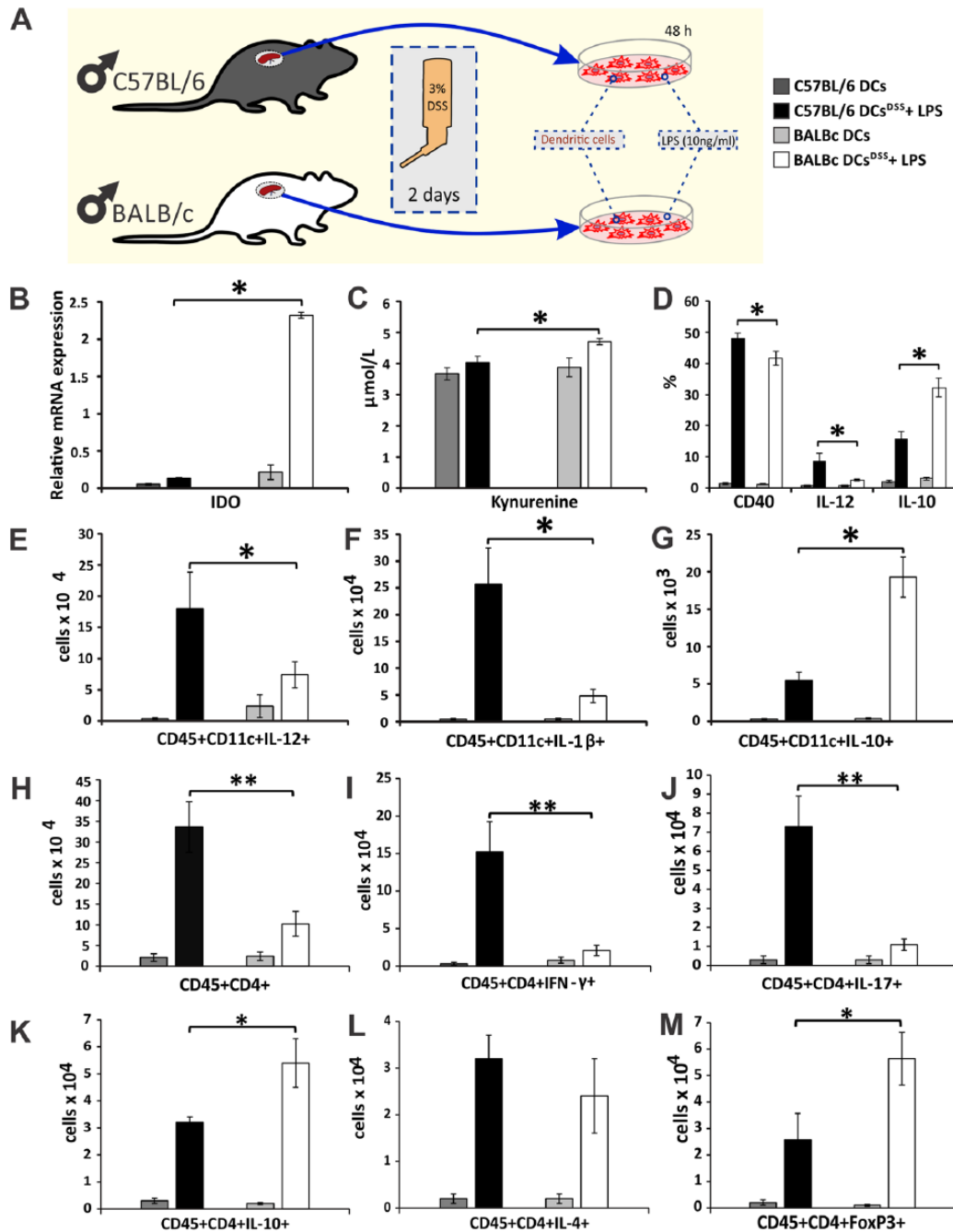
*Recovery from DSS-induced colitis of BALB/c mice was a consequence of DC-driven polarization of T cells towards immunosuppressive Tregs*

To determine whether colon-infiltrated DCs influenced the recovery from DSS-induced colitis by affecting polarization of CD4+ Th cells, the total number of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-17 producing Th1, Th2 and Th17 cells in the colons of DSS-treated C57BL/6 and BALB/c mice was analyzed [Figure 2(H–M)]. The cellular makeup of the colons revealed a significantly lower number of CD45+CD4+ Th cells [ $p < 0.01$ ; Figure 2(H)], IFN- $\gamma$ -producing Th1 [ $p < 0.05$ ; Figure 2(I)] and IL-17-producing Th17 cells [ $p < 0.01$ ; Figure 2(J)] and a significantly higher number of IL-10-producing CD4+ T cells [ $p < 0.01$ ; Figure 2(K)] in the lamina propria of DSS-treated BALB/c animals compared with DSS-injured C57BL/6 mice. There was no difference in the total number of colon-infiltrating IL-4-producing Th2 cells between experimental groups [Figure 2(L)]. Importantly, a remarkably higher presence of CD45+CD4+FoxP3+ Tregs, which are crucially involved in the suppression of DSS-induced inflammation,<sup>37</sup> was observed in the colons of DSS-treated BALB/c mice [ $p < 0.05$ ; Figure 2(M)], suggesting that the strain-dependent recovery from DSS-induced colitis of BALB/c mice was a consequence of DC-driven polarization of T cells towards immunosuppressive Tregs.

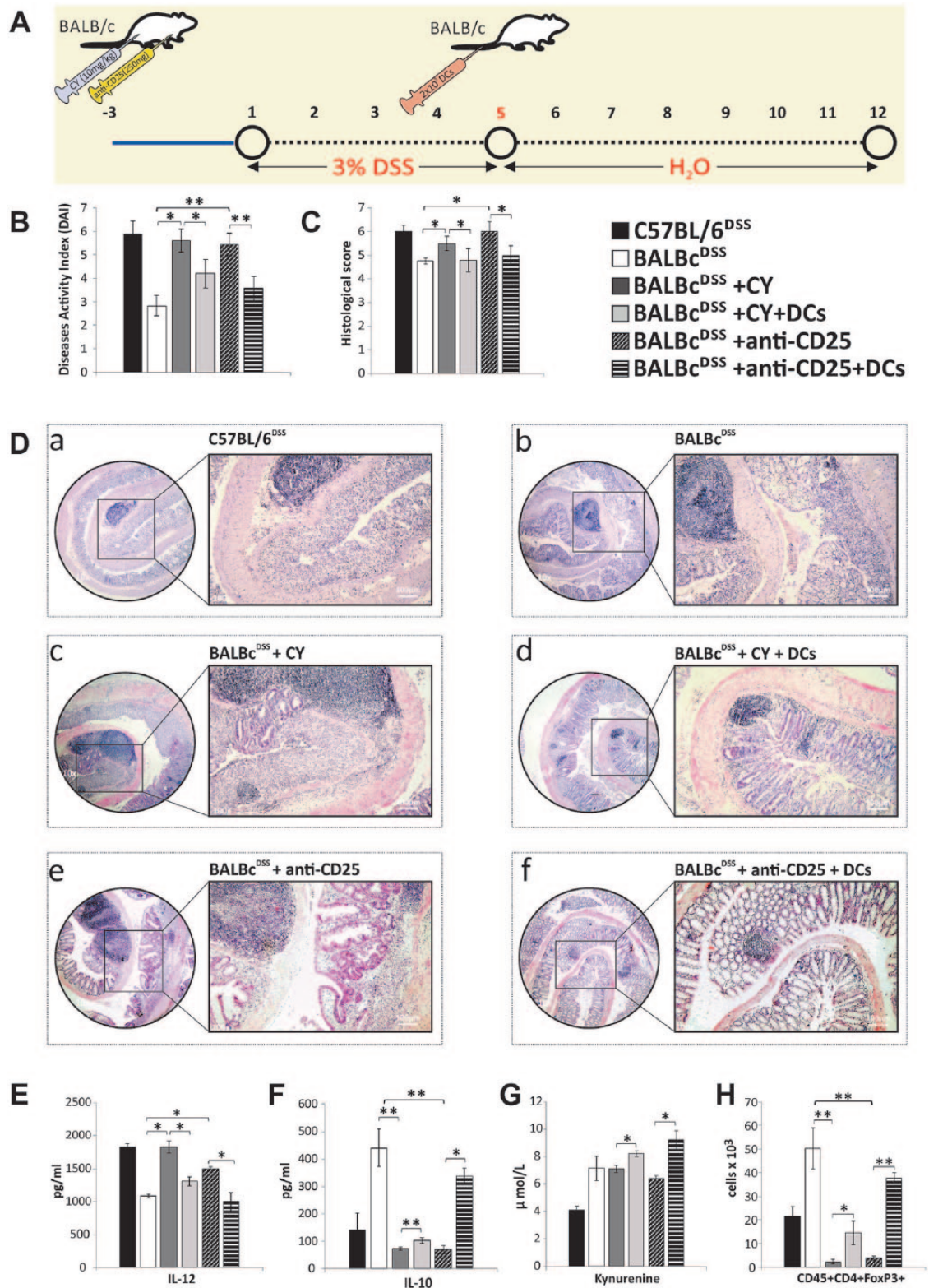
*DC-dependent expansion of Tregs and elevated serum levels of immunosuppressive kynurenine had a crucial role in the induction of mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice*

In order to confirm this hypothesis, DCs, isolated from healthy BALB/c mice, were transferred into DSS-treated BALB/c mice which were previously depleted of Tregs by CY or anti-CD25 antibody [Figure 3(A)]. Depletion of Tregs completely abrogated mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice [Figure 3(B–D)], indicating the crucial importance of Tregs for the recovery from DSS-induced colon injury. CY as well as anti-CD25 antibody-treated BALB/c mice reacted to DSS challenge with severe colonic mucosal injury manifested by substantial, bloody diarrhea and considerable weight loss resulting in increased DAI [ $p < 0.05$ ; Figure 3(B)]. Similar to that observed in DSS-susceptible C57BL/6 mice [Figure 3(Da)] notable mucosal damage and epithelial necrosis, focal crypt lesions, goblet cell loss





**Figure 2.** Activated BALB/c dendritic cells (DCs) have a higher capacity to express indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) and produce immunosuppressive kynurenine and interleukin (IL)-10 than activated C57BL/6 DCs. DCs were isolated from the spleens of dextran sodium sulphate (DSS)-treated mice 2 days after administration of DSS and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for 48 h (A). Significantly higher expression of IDO was noticed in LPS- and DSS-activated BALB/c DCs compared with C57BL/6 DCs (B). A significantly higher concentration of kynurenine was detected in the supernatants of activated BALB/c DCs than in activated C57BL/6 DCs (C). A significantly higher percentage of LPS- and DSS-activated BALB/c DCs produced immunosuppressive IL-10 while a lower percentage of these cells produced inflammatory IL-12 and expressed CD40 (D). Remarkably, a lower number of IL-12-producing DCs (E) and IL-1 $\beta$ -producing DCs (F) and a significantly higher number of immunosuppressive IL-10-producing DCs (G) were noticed in the lamina propria of DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-treated C57BL/6 mice. A significantly lower number of CD4+ T helper (Th) cells (H), interferon (IFN)- $\gamma$ -producing Th1 cells (I), IL-17-producing Th17 cells (J) and a significantly higher number of IL-10-producing CD4+ T cells (K) and T-regulatory cells (Tregs) (M) were observed in the lamina propria of DSS-treated BALB/c animals compared with DSS-injured C57BL/6 mice. There was no significant difference in the total number of IL-4-producing CD4+ Th2 cells between experimental groups (L). Mean  $\pm$  standard error of the mean;  $n = 10/\text{group}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 3.** Dendritic cell (DC)-dependent expansion of T-regulatory cells (Tregs) and elevated serum levels of immunosuppressive kynurenine had a crucial role for mucosal healing of dextran sodium sulphate (DSS)-treated BALB/c mice. CY or anti-CD25 antibody were injected in BALB/c mice 3 days before DSS administration. DCs were transferred into CY+DSS-treated BALB/c mice at day 5 (A). CY-treated as well as anti-CD25-treated BALB/c mice reacted to DSS challenge with severe colonic mucosal injury manifested by substantial, bloody diarrhea and considerable weight loss, resulting in increased Disease Activity Index (DAI) (B).

**Figure 3.** [Continued]

Similar to that observed in DSS-susceptible C57BL/6 mice (Da, 10×/100×), notable mucosal damage and epithelial necrosis, focal crypt lesions, goblet cell loss and inflammatory cell infiltration were noticed in the colons of CY+DSS-treated (Dc, 10×/100×) and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice (De, 10×/100×). These pathological changes in colon architecture were manifested by a significant increase in the histological score of CY+DSS-treated and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice (C). A significant increase in the serum levels of interleukin (IL)-12 (E), a decrease in the serum levels of IL-10 (F) and a significantly lower number of colon-infiltrating Tregs (H) were noticed in CY+DSS-treated and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice. Adaptive transfer of BALB/c DCs significantly attenuated DAI (B), histological score (C), colon injury and inflammation (Dd, Df), the serum levels of IL-12 (E) and significantly increased the serum concentrations of IL-10 (F) and kynurenine (G) as well as the total number of colon-infiltrating CD45+CD4+FoxP3+ Tregs (H) in CY+DSS-treated BALB/c mice that received DCs as well as in anti-CD25+DSS-treated BALB/c animals that were injected with DCs. Mean ± standard error of the mean;  $n = 10/\text{group}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

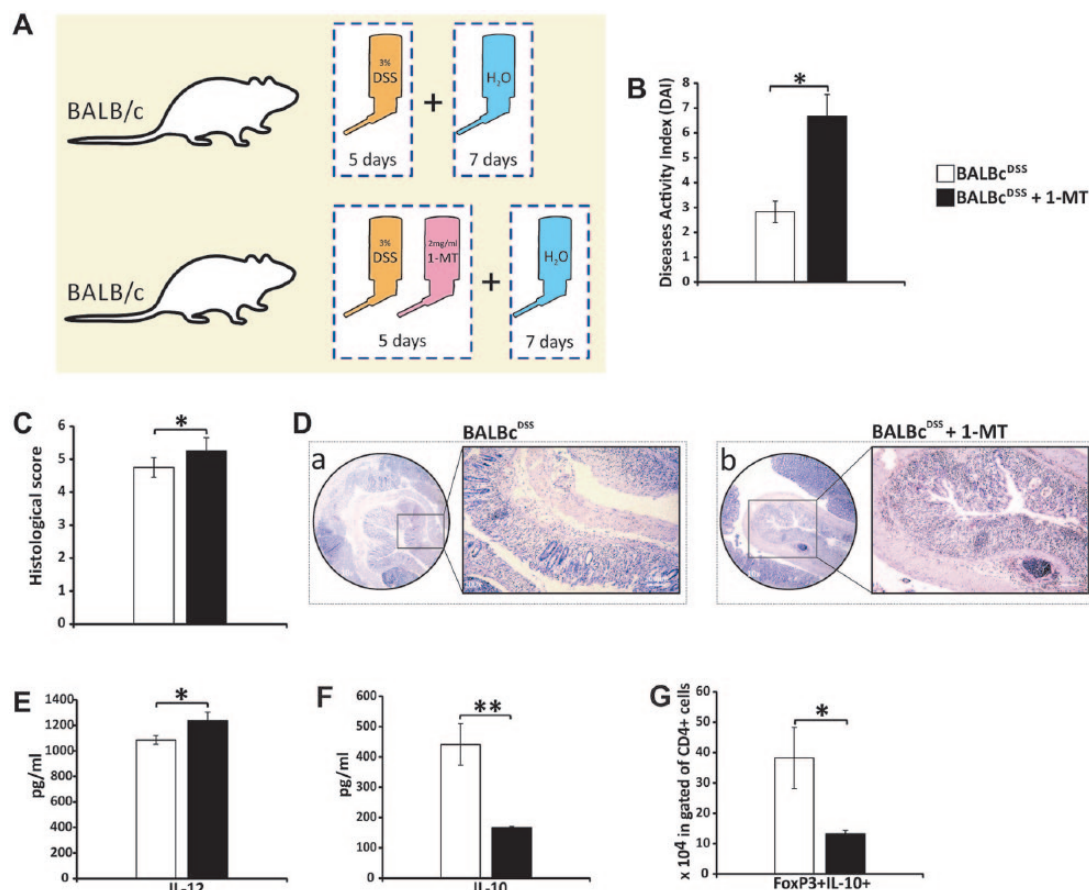
and inflammatory cell infiltration were noticed in the colons of CY+DSS-treated [Figure 3(Dc)] and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice [Figure 3(De)]. These pathological changes in colon architecture of Treg-depleted DSS-treated BALB/c mice were manifested by a significant increase in histological scores [ $p < 0.05$ ; Figure 3(C)]. Additionally, a significant increase in the serum levels of IL-12 [ $p < 0.01$ ; Figure 3(E)] and a decrease in the serum levels of IL-10 [ $p < 0.01$ ; Figure 3(F)] were noticed in CY+DSS-treated and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice, indicating that augmented colon injuries in these animals were accompanied by enhanced systemic inflammatory responses.

Importantly, transfer of BALB/c DCs managed to significantly increase the serum levels of kynurenine in CY and anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice [ $p < 0.05$ ; Figure 3(G)] that resulted in a remarkably higher number of colon-infiltrated Tregs ( $p < 0.05$ ; Figure 3H) and led to the attenuation of DSS-induced colitis in CY+DSS-treated and anti-CD25+DSS-treated BALB/c animals [ $p < 0.05$ ; Figure 3(B–D)]. Compared with CY+DSS-treated and anti-CD25+DSS-treated BALB/c animals, clinically observed alleviation of intestinal inflammation [manifested by improved stool consistency, diminished fecal occult blood and reduced DAI;  $p < 0.05$ ; Figure 3(B)] was verified by significantly decreased histological scores [ $p < 0.05$ ; Figure 3(C)] that featured reduced numbers of mucosal erosions and ulcerations, lower hyperplasia and decreased colon infiltration of inflammatory cells in CY+DSS-treated BALB/c mice that received DCs [Figure 3(Dd)] as well as in anti-CD25+DSS-treated BALB/c mice that were injected with DCs [Figure 3(Df)]. Additionally, attenuated colon inflammation in these animals

was accompanied by downregulated serum concentrations of inflammatory IL-12 [ $p < 0.05$ ; Figure 3(E)] and upregulated serum levels of immunosuppressive IL-10 [ $p < 0.01$ ; Figure 3(F)].

*IDO inhibition completely abrogated Treg-dependent recovery from DSS-induced colitis in BALB/c mice*

We next investigate whether IDO inhibition affects Treg-dependent recovery of BALB/c mice with DSS-induced colitis [Figure 4(A)]. As shown in Figure 4, 1-MT aggravated DSS-induced colon injury and inflammation in BALB/c mice. Loss of fecal consistency, bloody diarrhea and notable weight loss resulted in significantly increased DAI in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice [ $p < 0.05$ ; Figure 4(B)]. Consistent with the exacerbated clinical signs, greater severity in histological damage, evidenced by a widely disrupted tissue architecture, the disappearance of intestinal crypts and goblet cells, marked mucosal hypertrophy and massive infiltration of inflammatory cells was observed in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice [Figure 4(Db)]. Significantly higher DAI [ $p < 0.05$ ; Figure 4(B)] and histological score [ $p < 0.05$ ; Figure 4(C)], accompanied by an increased serum level of IL-12 [ $p < 0.05$ ; Figure 4(E)], a decreased serum level of IL-10 [ $p < 0.01$ ; Figure 4(F)] and a significantly lower number of colon-infiltrating, IL-10-producing Tregs [ $p < 0.05$ ; Figure 4(G)] were noticed in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-only treated animals. These findings strongly suggest the crucial importance of IDO activity in Treg-dependent recovery from DSS-induced colon injury and inflammation, and induction of mucosal healing in BALB/c mice.



**Figure 4.** Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibition completely abrogated T-regulatory cell (Treg)-dependent recovery from dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis in BALB/c mice. BALB/c DSS-treated mice continuously, during DSS administration, received 1-methyltryptophan (1-MT) dissolved in drinking water (A). A significantly increased Disease Activity Index (DAI) (B) and histological score (C) were observed in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-only treated animals. Representative images of H&E stained colon tissues demonstrate widely disrupted tissue architecture, the disappearance of intestinal crypts and goblet cells, marked mucosal hypertrophy and massive infiltration of inflammatory cells in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice (Db, 10 $\times$ /100 $\times$ ). An increased serum level of interleukin (IL)-12 (E), a decreased serum level of IL-10 (F) and a significantly lower number of colon-infiltrating, IL-10-producing Tregs (G) were noticed in 1-MT+DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-only treated animals. Mean  $\pm$  standard error of the mean;  $n = 10$ /group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

*DCs, in IDO-dependent manner, promoted expansion of immunosuppressive Tregs enabling mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice*

To confirm that activity of IDO in DCs is mainly responsible for kynurenine-dependent expansion of immunosuppressive Tregs and consequent maintenance of mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice, DCs with normal or suppressed IDO activity (DCs<sup>1-MT</sup>) were transferred into DSS-treated BALB/c animals that were previously depleted of DCs (Figure 5). DSS-induced colitis in BALB/c mice was shown to be significantly more severe when DCs were selectively depleted, manifested by an increased

DAI [Figure 5(A)] and histological score [Figure 5(B)]. Similar to that observed in DSS-treated C57BL/6 mice with progressive disease [Figure 5(Ca)], the abnormal structure of crypt glands, disrupted epithelium and severe edema accompanied by massive infiltration of inflammatory cells were noticed in the colonic mucosa of DC-depleted DSS-treated BALB/c mice [Figure 5(Cb)]. Exacerbated colitis observed in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice was accompanied by a significant decrease in serum levels of kynurenine [ $p < 0.05$ ; Figure 5(D)] and a significant reduction in the total number of colon-infiltrating Tregs [ $p < 0.05$ ; Figure 5(E)], indicating the importance of DC-derived

kynurenine for the expansion of Tregs and consequent attenuation of DSS-induced colitis.

Interestingly, all criteria used for clinical (weight loss, stool consistency and rectal bleeding) and histological evaluation of DSS-induced colitis (damage of epithelium, infiltration of inflammatory cells) were notably attenuated in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice that received DCs, resulting in a significant decrease in DAI [ $p < 0.01$ ; Figure 5(A)] and histological score [ $p < 0.05$ ; Figure 5(B)]. Moreover, significantly higher serum levels of kynurenine [ $p < 0.05$ ; Figure 5(D)] accompanied by a remarkable increase in the total number of colon-infiltrating Tregs [ $p < 0.05$ ; Figure 5(E)] were noticed in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice that received DCs.

Most importantly, suppression of IDO activity in DCs completely abrogated their capacity to promote expansion of immunosuppressive Tregs and to induce mucosal healing in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice. Transfer of DCs<sup>1-MT</sup> neither attenuated colitis nor altered the total number of Tregs in the colons of DC-depleted DSS-treated BALB/c mice [Figure 5(E)], confirming that DCs, in an IDO-dependent manner, promoted the expansion of colon-infiltrating Tregs, enabling mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice.

#### *Increased serum and fecal levels of kynurenine are noticed in patients with UC and mucosal healing*

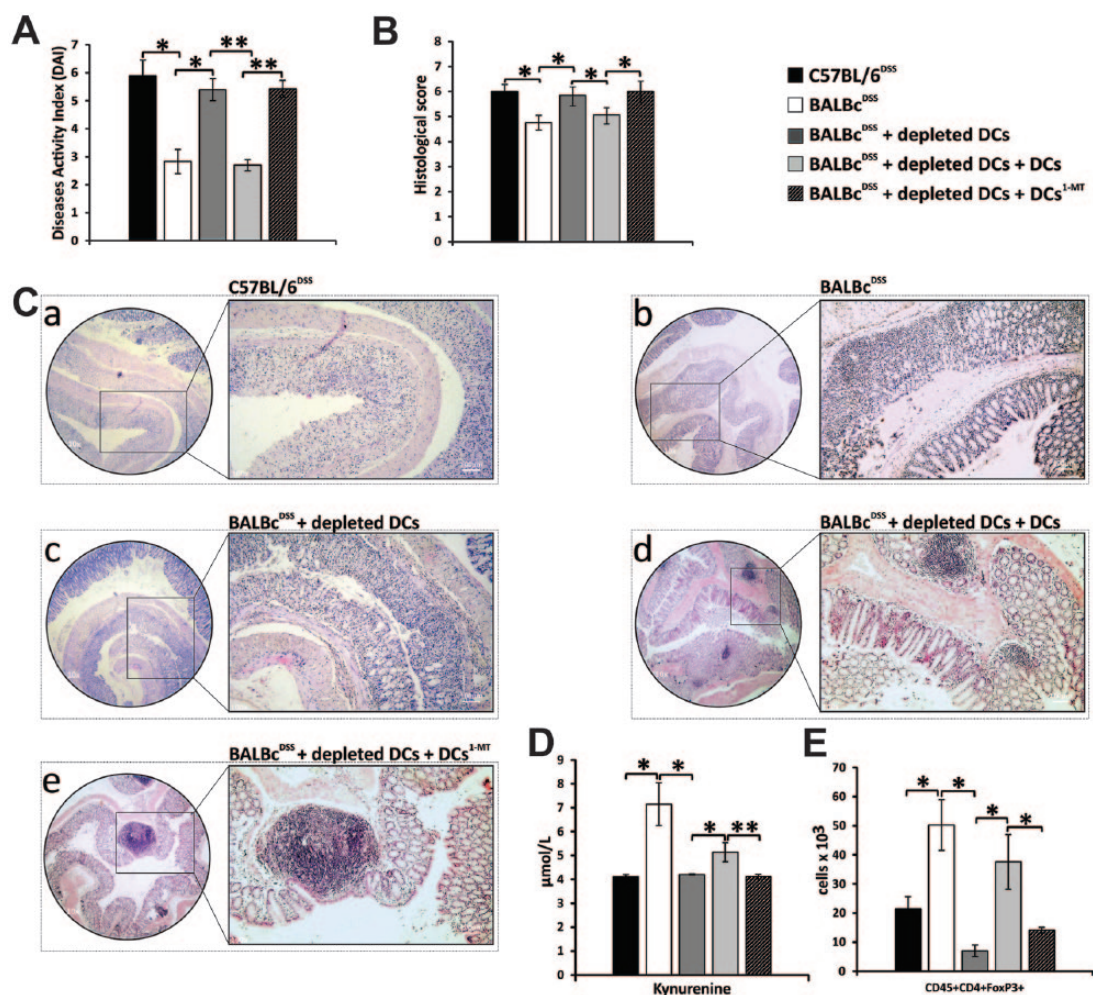
To investigate the relevance of experimental findings for corresponding human pathology, we analyzed the concentration of kynurenine in serum and stool samples of healthy controls and patients with UC who were divided into two groups based on the presence or absence of mucosal healing (Table 1). The serum level of kynurenine was higher in patients with UC compared with healthy controls [Figure 6(A)]. Interestingly, significantly higher serum levels of kynurenine were observed in patients with UC and mucosal healing than in patients with UC and chronic persistent disease [ $p < 0.05$ ; Figure 6(A)]. Clinical score which was significantly lower in patients with mucosal healing [ $p < 0.01$ ; Figure 6(B)] negatively correlated with serum concentrations of kynurenine [ $r = -0.418$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 6(C)]. These findings were in line with differences in histological score between

these two groups of patients with UC [ $p < 0.01$ ; Figure 6(D)]. Histological analysis revealed that higher serum levels of kynurenine were noticed in patients with UC and mucosal healing manifested by increased regeneration of epithelium and the disappearance of crypt abscesses in the colon [Figure 6(Ea)]. By contrast, lower serum levels of kynurenine were noticed in patients with UC and chronic persistent disease manifested by the presence of large abscesses and increased infiltration of inflammatory cells in the injured colons [Figure 6(Eb)].

In line with these results, serum levels of kynurenine negatively correlated ( $r = -0.290$ ,  $p < 0.05$ ) with endoscopic subscore, which was significantly lower in patients with UC and mucosal healing [ $p < 0.01$ ; Figure 6(F)]. Lower serum levels of kynurenine were noticed in patients with UC and chronic persistent disease manifested by marked erythema, friability, erosions and absent vascular patterns on endoscopy [Figure 6(Gb)], while all endoscopic parameters were in remission [Figure 6(Ga)] in patients with UC and mucosal healing that had higher serum levels of kynurenine.

Additionally, a significantly higher concentration of kynurenine in the serum samples of patients with UC and mucosal healing corresponded with significantly lower serum levels of inflammatory mediators: CRP [ $p < 0.01$ ; Figure 6(H)], TNF- $\alpha$  [ $p < 0.05$ ; Figure 6(I)] and CXCL11 [ $p < 0.05$ ; Figure 6(J)].

Similar to that observed in serum samples [Figure 6(A)], the concentration of kynurenine was higher in patients with UC compared with healthy controls [Figure 6(K)]. Importantly, the concentration of kynurenine in stool samples was significantly higher in patients with UC and mucosal healing [ $p < 0.05$ ; Figure 6(K)] and it negatively correlated ( $r = -0.335$ ,  $p < 0.05$ ) with concentration of fecal calprotectin, which was significantly lower in patients with mucosal healing [ $p < 0.01$ ; Figure 6(L)]. A significantly higher concentration of kynurenine in the stool samples of patients with UC and mucosal healing [Figure 6(K)] corresponded with significantly lower fecal levels of inflammatory mediators: TNF- $\alpha$  [ $p < 0.05$ ; Figure 6(M)], IL-17 [ $p < 0.05$ ; Figure 6(N)] and CXCL11 [ $p < 0.05$ ; Figure 6(O)], indicating that both serum and fecal levels of kynurenine negatively correlated with colon injury and inflammation.

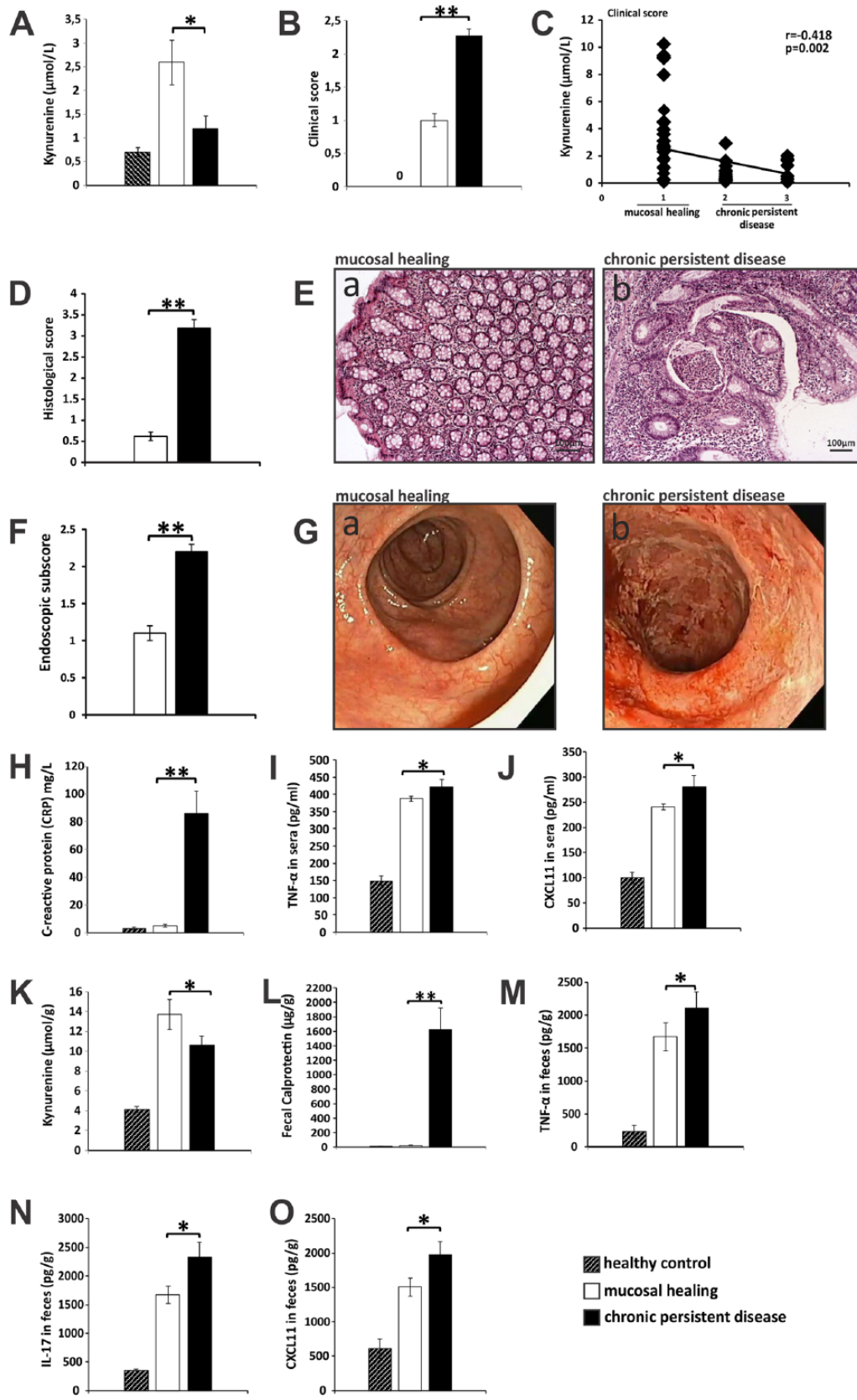


**Figure 5.** Dendritic cells (DCs), in an indolamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent manner, promoted expansion of immunosuppressive T-regulatory cells (Tregs) enabling mucosal healing in dextran sodium sulphate (DSS)-treated BALB/c mice. A significantly increased Disease Activity Index (DAI) (A) and histological score (B) were observed in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice compared with DSS-only treated BALB/c animals. Representative images of H&E stained colon tissues demonstrate the abnormal structure of crypt glands, disrupted epithelium and severe edema accompanied by massive infiltration of inflammatory cells in the samples of DC-depleted DSS-treated BALB/c mice (Cb), which were similar to those obtained from DSS-treated C57BL/6 mice with progressive disease (Ca). Depletion of DCs resulted in a significant decrease in the serum levels of kynurenine (D) and a significant reduction in the total number of colon-infiltrating Tregs (E). A remarkably lower DAI (A) and histological score (B), attenuated colon injury and inflammation (Cd), significantly higher serum levels of kynurenine (D) accompanied by a remarkable increase in the total number of colon-infiltrating Tregs (E) were noticed in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice that received DCs. Transfer of DCs<sup>1-MT</sup> did not attenuate DAI (A), histological score (B), colon injury (Ce), serum level of kynurenine (D) and total number of colon-infiltrating Tregs in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice. Mean  $\pm$  standard error of the mean;  $n = 6$ /group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . 1-MT, 1-methyltryptophan.

*Increased serum and fecal levels of kynurenine were accompanied by increased presence of immunosuppressive Tregs in colons of patients with UC and mucosal healing*

Similar to that observed in animal models, increased serum levels of kynurenine [Figure 6(A)] were accompanied by a significantly higher serum level of immunosuppressive IL-10 [ $p < 0.05$ ; Figure 7(A)]. Additionally, there was

a positive correlation between the fecal level of kynurenine [Figure 6(K)] and the fecal level of IL-10 ( $r = 0.467$ ,  $p < 0.01$ ), which was significantly higher in the stool samples of patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and persistent inflammation [ $p < 0.05$ ; Figure 7(B)]. These findings corresponded with a remarkably increased presence of immunosuppressive cells [Tregs:  $p < 0.01$ ; Figure 7(C);



**Figure 6.** Increased serum and fecal levels of kynurenine are noticed in patients with ulcerative colitis (UC) and mucosal healing. The serum levels of kynurenine were significantly higher in patients with UC compared with healthy controls and were significantly

**Figure 6.** (Continued)

higher in patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and chronic persistent disease (A). Clinical score (B) and histological score (D) were significantly lower in patients with mucosal healing. Clinical score negatively correlated with serum concentrations of kynurenine (C). Mucosal healing was manifested by resolution of acute inflammation, regeneration of epithelium and disappearance of crypt abscesses in the colon (Ea, 100 $\times$ ). By contrast, chronic persistent disease was manifested by the presence of large abscesses and increased infiltration of inflammatory cells in the injured colons (Eb, 100 $\times$ ). The endoscopic subscore was significantly lower in patients with UC and mucosal healing (F). On endoscopy, chronic persistent disease was manifested by marked erythema, friability, erosions and absent vascular patterns (Gb), while all endoscopic parameters were in remission in patients with UC and mucosal healing (Ga). Significantly lower serum levels of inflammatory mediators, C-reactive protein (CRP) (H), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (I) and CXCL11 (J) were noticed in patients with UC and mucosal healing. The concentration of kynurenine in stool samples was significantly higher in patients with UC compared with healthy controls (K). Also, the concentration of kynurenine in stool samples was significantly higher in patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and chronic persistent disease (K) and it corresponded with significantly lower stool levels of fecal calprotectin (L), TNF- $\alpha$  (M), interleukin (IL)-17 (N) and CXCL11 (O). Mean  $\pm$  standard error of the mean; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

IL-10-producing CD4+ T cells:  $p < 0.05$ ; Figure 7(D); and IL-10-producing CD56+ natural killer (NK) cells:  $p < 0.05$ ; Figure 7(E)] and with significantly reduced infiltration of inflammatory cells [IFN- $\gamma$ -producing CD4+ T cells:  $p < 0.05$ ; Figure 7(F); and IL-17-producing CD56+ NK cells:  $p < 0.05$ ; Figure 7(G)] in the gut of patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and chronic persistent disease.

**Discussion**

In this paper, by using an experimental model and clinical data, we demonstrated that measurement of serum and fecal levels of kynurenine could be used as a new diagnostic approach that can complement endoscopy, CRP and fecal calprotectin for monitoring or predicting mucosal healing in patients with UC. Additionally, our results indicate the therapeutic potential of IDO-dependent expansion of endogenous Tregs as a possible new therapeutic approach for the induction of mucosal healing in patients with UC.

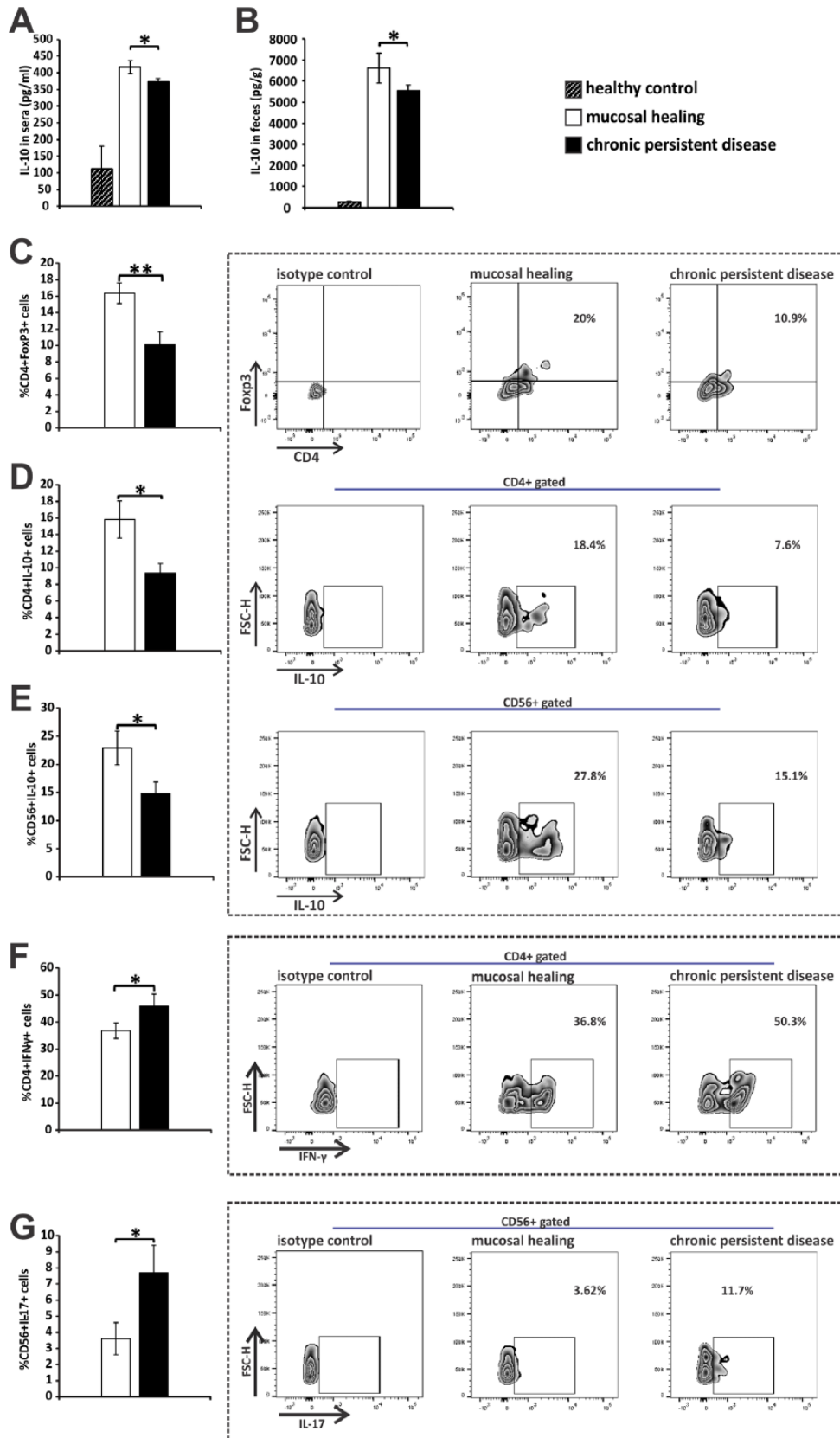
Diverse IDO activity manifested by different serum levels of kynurenine in DSS-treated BALB/c and C57BL/6 mice [Figure 1(G)], which were used as animal models for mucosal healing or chronic, persistent colitis,<sup>14</sup> indicated the importance of the IDO and kynurenine pathway for mucosal healing in UC. As shown in Figure 4, *in vivo* IDO inhibition completely abrogated mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice. Opposite to our findings are the recently published results by Shon and colleagues,<sup>38</sup> who investigated acute DSS-induced colitis in IDO-deficient mice on a C57BL/6 background. They reported that genetic deletion of IDO protected

against DSS-induced colitis. We believe that strain-dependent differences in DSS-induced colitis between C57BL/6 and BALB/c mice<sup>14</sup> might be responsible for the contrasting results obtained by us and Shon and colleagues. Additionally, Shon and coworkers investigated the impact of IDO deficiency on acute DSS-induced colitis, which is a T-cell-independent disease,<sup>39</sup> while we evaluated the effects of IDO inhibition 12 days after DSS administration when T cells play an important role in the pathogenesis of colitis.<sup>40</sup> Similar to our results, several experimental studies demonstrated that inhibition of IDO activity worsens colitis while induction of IDO expression limits disease progression,<sup>12,41–43</sup> indicating the importance of IDO activity in attenuation of colon inflammation. In line with these findings, we assume that striking differences in clinical and histological manifestations of DSS colitis in C57BL/6 mice with persistent disease and BALB/c mice with mucosal healing were consequences of IDO- and kynurenine-dependent effects on colon-infiltrating Tregs.

Similar to that observed in animal models, serum and fecal levels of kynurenine were increased in patients with UC and mucosal healing, and both negatively correlated with disease severity, serum levels of CRP and concentration of fecal calprotectin (Figure 6). These findings indicate that measurement of kynurenine in the serum and fecal samples of patients with UC could be used as a new diagnostic approach for the prediction or monitoring of mucosal healing in patients with UC.

Currently, measurement of fecal calprotectin is the most commonly used stool-based test for assessing





**Figure 7.** Increased serum and fecal levels of immunosuppressive kynurenine and interleukin (IL)-10 were accompanied by increased presence of T-regulatory cells (Tregs) in the colons of patients with UC and mucosal

**Figure 7.** (Continued)

healing. Increased serum (A) and fecal levels of IL-10 (B), significantly higher percentage of immunosuppressive Tregs (C), IL-10-producing CD4+ T cells (D) and IL-10-producing CD56+ natural killer (NK) cells (E) and a notably lower percentage of inflammatory interferon (IFN)- $\gamma$ -producing CD4+ T cells (F) and IL-17-producing CD56+ NK cells (G) were noticed in patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and persistent disease. Representative dot plots are shown. Mean  $\pm$  standard error of the mean; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . FSC-H, forward scatter height.

progression of UC.<sup>44</sup> Reduction in the concentration of fecal calprotectin represents the most reliable predictor of mucosal healing in patients with UC.<sup>45</sup> Nevertheless, the fecal calprotectin test lacks a validated cutoff, optimal specificity and accuracy, indicating the need for other stool-based biomarkers to complement fecal calprotectin in monitoring mucosal healing.<sup>44</sup> Correlation between increased fecal levels of kynurenine [Figure 6(K)] and decreased concentration of fecal calprotectin [Figure 6(L)] noticed in patients with UC and mucosal healing indicates that measurement of kynurenine in the fecal samples of patients with UC could become a useful diagnostic tool that can complement fecal calprotectin in monitoring or predicting mucosal healing.

In the inflammatory microenvironment of the gut, the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines regulates progression of UC towards mucosal healing or chronic inflammation.<sup>46</sup> Upregulation of DC-derived inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-12) in injured colons and their elevated concentration in serum samples follow the development of chronic colitis in C57BL/6 mice, while increased serum levels of immunosuppressive IL-10 is accompanied by restoration of the mucosal barrier in BALB/c mice.<sup>14</sup> In line with these findings, BALB/c DCs, compared with C57BL/6 DCs, had reduced capacity for antigen presentation [Figure 2(D)] and respond to specific (DSS) and general (LPS) stimuli, mainly by producing immunosuppressive kynurenine and IL-10 [Figure 2(D–G)]. Accordingly, mucosal healing noticed in BALB/c mice was accompanied by increased serum levels of kynurenine [Figure 1(G)], elevated serum levels of IL-10 [Figure 1(J)], an increased number of colon-infiltrating, IL-10-producing DCs [Figure 2(G)], decreased serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-12 [Figure 2(D)] and a decreased number of IL-1 $\beta$  and IL-12-producing DCs in the gut [Figure 2(E, F)], indicating a negative correlation between the serum levels of kynurenine and inflammatory cytokines in DSS-treated mice.

Similar to that observed in DSS-induced colitis, an increased concentration of kynurenine in the serum and fecal samples of patients with UC and mucosal healing was accompanied by decreased serum and fecal levels of inflammatory cytokines and elevation of anti-inflammatory IL-10 (Figure 6). In human pathology, among inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-17 are the most important for progression of UC towards chronic inflammation.<sup>1,47</sup> Reduction of serum levels of TNF- $\alpha$  predicts long-term remission of UC<sup>48</sup> and the use of anti-TNF- $\alpha$  biological agents represents the most effective therapeutic approach for inducing mucosal healing in patients with UC.<sup>49</sup> Accordingly, downregulation of serum and fecal levels of TNF- $\alpha$ , followed by decreased levels of IL-17, are associated with achievement of mucosal healing in patients with UC who receive anti-TNF- $\alpha$  biologics.<sup>50</sup> Additionally, elevated serum and fecal levels of TNF- $\alpha$  and IL-17 in patients with UC are always accompanied by increased production of CXCL11, which is important for recruitment of activated IFN- $\gamma$ - and IL-17-producing T lymphocytes and NK cells in the inflamed gut.<sup>51,52</sup> Through the production of IFN- $\gamma$ , gut-infiltrated T cells induce activation of IDO, resulting in the conversion of tryptophan in kynurenine that, in turn, increases expression of the IL-10 receptor on intestinal epithelial cells, enabling IL-10-dependent mucosal healing<sup>53</sup> mediated by IL-10-producing T cells which rapidly migrate to the injured colons where they attenuate Th1- and Th17-driven inflammation.<sup>54</sup> Accordingly, induction of mucosal healing is manifested by downregulation of CXCL11, reduced influx of inflammatory cells and increased presence of IL-10-producing anti-inflammatory T and NK cells in the injured colons.<sup>52</sup> In line with these findings, increased serum and fecal levels of kynurenine, observed in patients with UC and mucosal healing [Figure 6(A, K)], correlated with elevated serum and fecal levels of immunosuppressive IL-10 [Figure 7(A, B)] and were accompanied by downregulated serum and fecal levels of CXCL11 [Figure 6(J, O)], reduced

presence of colon-infiltrating IFN- $\gamma$ -producing T lymphocytes [Figure 7(F)] and IL-17-producing NK cells [Figure 7(G)] and increased presence of immunosuppressive IL-10-producing T lymphocytes, NK cells and Tregs [Figure 7(C–E)].

Tregs accumulate in the injured colons of DSS-treated mice and are present at increased density in the colon samples of patients with UC, where, through the production of immunosuppressive IL-10, they suppress IFN- $\gamma$ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cells, resolving ongoing inflammation.<sup>54</sup> Here, we have demonstrated that Tregs are crucially important for the maintenance of mucosal healing and recovery of BALB/c mice from DSS-induced colitis, since their depletion led to the significant aggravation of colitis (Figure 3). Importantly, adoptive transfer of BALB/c DCs managed to increase the serum levels of kynurenine [Figure 3(G)] in Treg-depleted DSS-treated BALB/c mice which was accompanied by the generation and enhanced presence of Tregs in the colons of CY+DSS- and anti-CD25+DSS-treated mice [Figure 3(H)], resulting in the attenuation of colon inflammation [Figure 3(B–D)]. These results strongly indicate that DCs promoted expansion of colon-infiltrating Tregs in DSS-treated BALB/c animals and induced mucosal healing. It is well known that kynurenine, the product of DC-derived IDO, promotes the expression of Treg lineage-defining transcription factor FoxP3 in CD4+ T cells and enables generation of Tregs.<sup>12</sup> Indeed, increased IDO activity, noticed in BALB/c DCs [Figure 2(B, C)], was followed by significantly lower numbers of Th1 and Th17 cells [Figure 2(I, J)] and a notably increased number of Tregs in the colons of DSS-treated BALB/c mice [Figure 2(M)]. This indicated that, in the injured gut, DCs in an IDO-dependent manner promote conversion of inflammatory T cells in immunosuppressive Tregs, enabling mucosal healing. Although macrophages (particularly alternatively activated) and B cells may express enhanced IDO activity,<sup>55</sup> the highest expression of IDO is, in the inflamed gut, noticed in colon-infiltrating tolerogenic DCs.<sup>12</sup> In line with these findings, depletion of DCs completely abrogated Treg-dependent mucosal healing in DSS-treated BALB/c mice (Figure 5). Attenuation of DSS-induced colitis in DC-depleted BALB/c mice was observed when these animals received DCs. Transfer of DCs was accompanied by a significant increase in the serum levels of kynurenine [Figure 5(D)] followed by a significantly higher

presence of colon-infiltrating Tregs in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice [Figure 5(E)]. Most importantly, suppression of IDO activity in DCs completely abrogated their capacity to promote expansion of immunosuppressive Tregs and to induce mucosal healing in DC-depleted DSS-treated BALB/c mice (Figure 5), confirming the crucial importance of DC-derived IDO for expansion of Tregs and the consequent induction and maintenance of mucosal healing.

Interestingly, several studies have shown that immunosuppressive Tregs are present in significantly higher numbers in the intestines of patients with UC than in healthy subjects.<sup>56–58</sup> Our findings are in line with these results [Figure 6(A)], as are data obtained by Nikolaus and colleagues,<sup>7</sup> who noticed elevated serum levels of kynurenine in patients with UC compared with healthy controls. It is well known that immunosuppressive Tregs represent a great fraction of lamina propria CD4+ T cells in the colons of patients with UC and that their number is increased during the remission of disease.<sup>57</sup> In line with these findings were significantly increased serum and fecal levels of kynurenine [Figure 6(A, K)], followed by an increased presence of colon-infiltrating Tregs [Figure 7(C)] that we noticed in patients with UC and mucosal healing compared with patients with UC and chronic persistent disease. This confirms the importance of the IDO/kynurenine pathway for the expansion of endogenous Tregs during mucosal healing. Since the clinical application of Tregs in patients with UC is not easy to perform given their rarity in peripheral blood,<sup>58</sup> IDO-dependent expansion of endogenous Tregs should be further explored as a potentially new approach for the induction and maintenance of mucosal healing in patients with UC. Since colon epithelial cells exhibit an IDO-activity-dependent proliferation phenotype, careful monitoring will be important in clinical trials which are going to investigate the therapeutic potential of agents that will induce IDO expression in patients with UC.<sup>59</sup>

### Acknowledgements

Aleksandar Acovic and Bojana Simovic Markovic contributed equally to this work.

### Funding

This work was supported by a grant from the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO): 'The role of galectin 3 in acute colitis',

Swiss National Science Foundation project (SCOPE5 IZ73Z0\_152454/1), Novartis foundation for medical-biological research (grant no. 16C197), Serbian Ministry of Science (ON175069, ON175103) and Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac (JP02/09).

### Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

### References

1. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, *et al.* Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017; 389: 1756–1770.
2. D’Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, *et al.* A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 763–786.
3. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, *et al.* Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 15–29.
4. Neurath MF and Travis SP. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* 2012; 61: 1619–1635.
5. Shinzaki S, Matsuoka K, Iijima H, *et al.* Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a serum biomarker of mucosal healing in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2017; 11: 84–91.
6. Römkens TEH, Kranenburg P, van Tilburg A, *et al.* Assessment of histological remission in ulcerative colitis: discrepancies between daily practice and expert opinion. *J Crohns Colitis* 2018; 12: 425–431.
7. Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, *et al.* Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2017; 153: 1504–1516.e2.
8. Etienne-Mesmin L, Chassaing B and Gewirtz AT. Tryptophan: A gut microbiota-derived metabolites regulating inflammation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017; 8: 7–9.
9. Islam J, Sato S, Watanabe K, *et al.* Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice. *J Nutr Biochem* 2017; 42: 43–50.
10. Shizuma T, Mori H and Fukuyama N. Protective effect of tryptophan against dextran sulfate sodium- induced experimental colitis. *Turk J Gastroenterol* 2013; 24: 30–35.
11. Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, *et al.* Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2007; 81: 11593–11603.
12. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, *et al.* Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59: 595–604.
13. Perše M and Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 718617.
14. Melgar S, Karlsson A and Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1328–G1338.
15. Yang F, Wang D, Li Y, *et al.* Th1/Th2 balance and Th17/Treg-mediated immunity in relation to murine resistance to dextran sulfate-induced colitis. *J Immunol Res* 2017; 2017: 7047201.
16. Taghipour N, Molaei M, Mosaffa N, *et al.* An experimental model of colitis induced by dextran sulfate sodium from acute progresses to chronicity in C57BL/6: correlation between conditions of mice and the environment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: 45–52.
17. Kostas A, Siakavellas SI, Kosmidis C, *et al.* Fecal calprotectin measurement is a marker of short-term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 7387–7396.
18. Truelove SC and Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041–1048.
19. Geboes K, Riddell R, Ost A, *et al.* A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 404–409.
20. Rosenberg L, Nanda KS, Zenlea T, *et al.* Histologic markers of inflammation in patients with ulcerative colitis in clinical remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 991–996.
21. Prakash N, Stumbles P and Mansfield C. Initial validation of cytokine measurement by ELISA in canine feces. *Open J Vet Med* 2013; 3: 282–288.

22. Ling W, Zhang J, Yuan Z, *et al.* Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014; 74: 1576–1587.
23. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, *et al.* Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 205–215.
24. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98: 694–702.
25. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, *et al.* Galectin-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 $\beta$  in macrophages. *J Crohns Colitis* 2016; 10: 593–606.
26. Whitem CG, Williams AD and Williams CS. Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium. *J Vis Exp* 2010; 35: 1652.
27. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, *et al.* Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 238–245.
28. Zhang X, Yang Y, Zhang L, *et al.* Mesenchymal stromal cells as vehicles of tetravalent bispecific Tandab (CD3/CD19) for the treatment of B cell lymphoma combined with IDO pathway inhibitor D-1-methyl-tryptophan. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 56.
29. Scheiffele F and Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* 2002; Chapter 15: Unit 15.19.
30. Saksida T, Nikolic I, Vujicic M, *et al.* Galectin-3 deficiency protects pancreatic islet cells from cytokine-triggered apoptosis in vitro. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1568–1576.
31. Zhang L, Moffatt-Bruce SD, Gaughan AA, *et al.* An anti-CD103 immunotoxin promotes long-term survival of pancreatic islet allografts. *Am J Transplant* 2009; 9: 2012–2023.
32. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, *et al.* Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009; 41: 315–324.
33. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, *et al.* Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45: 531–543.
34. Setiady YY, Coccia JA and Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fc $\gamma$ RIII+ phagocytes. *Eur J Immunol* 2010; 40: 780–786.
35. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, *et al.* Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17022–17027.
36. Ma DY and Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* 2009; 21: 265–272.
37. Yao X, Zhang C, Xing Y, *et al.* Remodelling of the gut microbiota by hyperactive NLRP3 induces regulatory T cells to maintain homeostasis. *Nat Commun* 2017; 8: 1896.
38. Shon WJ, Lee YK, Shin JH, *et al.* Severity of DSS-induced colitis is reduced in Ido1-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF-K $\beta$  transcriptional networks. *Sci Rep* 2015; 5: 17305.
39. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, *et al.* Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107: 1643–1652.
40. Hall LJ, Faivre E, Quinlan A, *et al.* Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 79–89.
41. Iskandar HN and Ciorba MA. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res* 2012; 159: 313–325.
42. Ciorba MA, Bettonville EE, McDonald KG, *et al.* Induction of IDO-1 by immunostimulatory DNA limits severity of experimental colitis. *J Immunol* 2010; 184: 3907–3916.
43. Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1762–1773.
44. Di Ruscio M, Vernia F, Ciccone A, *et al.* Surrogate fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: rivals or complementary tools of fecal calprotectin? *Inflamm Bowel Dis* 2017; 24: 78–92.
45. Kristensen V, Røseth A, Ahmad T, *et al.* Fecal calprotectin: a reliable predictor of mucosal healing after treatment for active ulcerative colitis. *Gastroenterol Res Pract* 2017; 2017: 2098293.
46. Florholmen J. Mucosal healing in the era of biologic agents in treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 43–52.

47. Gyires K, Tóth ÉV and Zádori SZ. Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 1063–1081.
48. Olsen T, Rismo R, Gundersen MD, *et al.* Normalization of mucosal tumor necrosis factor- $\alpha$ : a new criterion for discontinuing infliximab therapy in ulcerative colitis. *Cytokine* 2016; 79: 90–95.
49. Cholapranee A, Hazlewood GS, Kaplan GG, *et al.* Systematic review with meta-analysis: comparative efficacy of biologics for induction and maintenance of mucosal healing in Crohn's disease and ulcerative colitis controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 45: 1291–1302.
50. Caprioli F, Bosè F, Rossi RL, *et al.* Reduction of CD68+ macrophages and decreased IL-17 expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease strongly correlate with endoscopic response and mucosal healing following infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 729–739.
51. Liu Z, Chen X, Wang X, *et al.* Chemokine CXCL11 links microbial stimuli to intestinal inflammation. *Clin Exp Immunol* 2011; 164: 396–406.
52. Egesten A, Eliasson M, Olin AI, *et al.* The proinflammatory CXC-chemokines GRO- $\alpha$ /CXCL1 and MIG/CXCL9 are concomitantly expressed in ulcerative colitis and decrease during treatment with topical corticosteroids. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 1421–1427.
53. Lanis JM, Alexeev EE, Curtis VF, *et al.* Tryptophan metabolite activation of the aryl hydrocarbon receptor regulates IL-10 receptor expression on intestinal epithelia. *Mucosal Immunol* 2017; 10: 1133–1144.
54. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, *et al.* Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177: 5852–5860.
55. Hwu P, Du MX, Lapointe R, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000; 164: 3596–3599.
56. Lord JD, Shows DM, Chen J, *et al.* Human blood and mucosal regulatory T cells express activation markers and inhibitory receptors in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2015; 10: e0136485.
57. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868–1878.
58. Lord JD. Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 11236–11245.
59. Thaker AI, Rao MS, Bishnupuri KS, *et al.* IDO1 metabolites activate  $\beta$ -catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*. 2013; 145: 416–425.

# Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in pathology of the gastrointestinal tract

Aleksandar Acovic, Marina Gazdic, Nemanja Jovicic, C. Randall Harrell, Crissy Fellabaum, Nebojsa Arsenijevic and Vladislav Volarevic

*Ther Adv Gastroenterol*

2018, Vol. 11: 1–16

DOI: 10.1177/  
1756284818815334

© The Author(s), 2018.  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-  
permissions

**Abstract:** Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) has the most important role in modulation of tryptophan-dependent effects in the gastrointestinal tract, including modulation of intestinal immune response. An increased IDO activity maintains immune tolerance and attenuates ongoing inflammation but allows immune escape and uncontrolled growth of gastrointestinal tumors. Accordingly, IDO represents a novel therapeutic target for the treatment of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal tract. In this review article, we summarize current knowledge about molecular and cellular mechanisms that are involved in IDO-dependent effects. We provide a brief outline of experimental and clinical studies that increased our understanding of how enhanced IDO activity: controls host-microbiota interactions in the gut; regulates detrimental immune response in inflammatory disorders of the gastrointestinal system; and allows immune escape and uncontrolled growth of gastrointestinal tumors. Additionally, we present future perspectives regarding modulation of IDO activity in the gut as possible new therapeutic approaches for the treatment of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal system.

**Keywords:** antitumor immunity, gastrointestinal system, indoleamine 2,3-dioxygenase, inflammation, tryptophan

Received: 30 June 2018; revised manuscript accepted: 31 October 2018.

## Introduction

Tryptophan (TRP) is an essential amino acid playing several important structural and functional roles in the gastrointestinal tract.<sup>1</sup> TRP functions as a biochemical precursor for serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), melatonin and niacin. Additionally, since TRP is abundant in transmembrane domains of membrane-bound proteins, it is essential for protein stability/assembly to the phospholipid bilayer, playing an important ‘anchoring’ role.<sup>2</sup> TRP is essential nutrient, mammals are not able to synthesize it, and it has to be obtained from the TRP-rich foods (oats, milk, yogurt, cottage cheese, red meat, eggs, fish, chocolate, etc.).<sup>3</sup> After food digestion, TRP is absorbed by the gut epithelium and then transported *via* the bloodstream to the cells to be used for the synthesis and turn-over of proteins.<sup>4</sup> Depending on their function and metabolism, different cells require diverse, but strictly defined amounts of TRP and, accordingly,

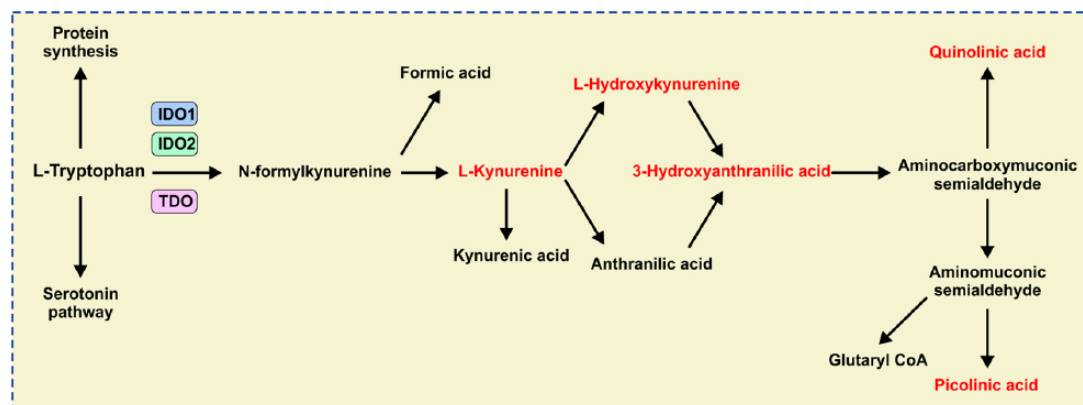
TRP absorption in the gut is a strictly controlled process. Since, among all amino acids, TRP has the lowest affinity for Na<sup>+</sup>-dependent transmembrane protein, expressed on the apical membrane of intestinal enterocytes, this carrier molecule regulates TRP absorption in the gut and controls its subsequent transport and biotransformation.<sup>4,5</sup>

TRP metabolism follows three major pathways: (a) gut microbiota-dependent transformation of TRP into several molecules, including ligands of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) that are able to alter function of epithelial barrier and immune homeostasis in the intestine; (b) TRP hydroxylase-1-dependent regulation of 5-HT production in enterochromaffin cells; (c) indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-mediated kynurenine (KYN) pathway which plays a critical role in several fundamental biological processes in the gut, including regulation of epithelial cell viability and modulation of immune response.<sup>1</sup>

Correspondence to:  
**Vladislav Volarevic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, Department  
of Microbiology and  
Immunology, Faculty  
of Medical Sciences  
University of Kragujevac,  
69 Svetozar Markovic  
Street, 34000 Kragujevac,  
Serbia  
[drvolarevic@yahoo.com](mailto:drvolarevic@yahoo.com)

**Aleksandar Acovic**  
**Marina Gazdic**  
**Nemanja Jovicic**  
**Nebojsa Arsenijevic**  
Center for Molecular  
Medicine and Stem Cell  
Research, Department  
of Microbiology and  
Immunology, Faculty  
of Medical Sciences  
University of Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia  
**C. Randall Harrell**  
**Crissy Fellabaum**  
Regenerative Processing  
Plant-RPP, LLC, Palm  
Harbor, Florida, USA





**Figure 1.** The kynurenine [KYN] pathway of tryptophan [TRP] metabolism.

L-TRP is metabolized in three separate biochemical pathways enabling protein and serotonin synthesis. The KYN-dependent pathway begins when IDO1/IDO2/TDO catalyze L-TRP into N-formylkynurenine. N-formylkynurenine is then transformed into L-KYN and formic acid by kynurenine formamidase. L-KYN is converted to anthranilic acid by kynureninase or L-hydroxykynurenine by kynurenine hydroxylase. Hydroxylation of anthranilic acid results in generation of L-hydroxykynurenine. Kynureninase converts L-hydroxykynurenine to 3-hydroxyanthranilic acid that is further metabolized by hydroxyanthranilate dioxygenase to aminocarboxymuconic semialdehyde. Quinolinic acid and aminomuconic semialdehyde are generated from the semialdehyde. Aminomuconic semialdehyde is then converted to picolinic acid or glutaryl-coenzyme A (CoA) that is metabolized in the tricarboxylic acid cycle and terminal oxidation. IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan-2,3-dioxygenase.

In this review article, we summarize current knowledge about molecular and cellular mechanisms that are involved in IDO/KYN-dependent modulation of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal tract. We provide a brief outline of experimental and clinical studies that increased our understanding of how IDO/KYN pathway: controls host-microbiota interactions in the gut; regulates detrimental immune response in inflammatory disorders of gastrointestinal system; and allows immune escape and uncontrolled growth of gastrointestinal tumors. Additionally, we present future perspectives regarding modulation of IDO activity in the gut as a possible new therapeutic approach for the treatment of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal system.

### The biochemical function and regulation of IDO activity

Since TRP is found at very low concentrations in the body, it plays a rate-limiting role in protein synthesis and intracellular signaling.<sup>1</sup> Accordingly, enzymes that regulate TRP metabolism and signaling have a crucial role in regulation of its effects.<sup>1</sup> Among them, IDO1 has the most important role in modulation of TRP-dependent effects in the gastrointestinal tract.<sup>6</sup>

IDO1, a cytosolic and heme-containing enzyme, converts TRP to KYN by cleaving the 2,3-double bond of the indole ring while a molecular oxygen merges into the unsealed molecule.<sup>6</sup> The obtained product, N-formylkynurenine, becomes rapidly and spontaneously transformed into KYN. In the next steps, KYN is further converted to other active metabolites, such as 3-hydroxykynurenine (3-HK), anthranilic acid, kynurenic acid (KYNA), 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA), picolinic acid and quinolinic acid (QA), which is a precursor of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>; Figure 1). Since two main end products of the KYN pathway [NAD<sup>+</sup> and adenosine triphosphate (ATP)] are energy-carrying molecules that fuel cellular metabolism, the IDO1/KYN pathway has an important role in regulation of cell viability and proliferation.<sup>6</sup>

In humans, IDO1 has an evolutionary paralog (indolamine-2,3-dioxygenase 2; IDO2) and a functional ortholog (tryptophan-2,3-dioxygenase; TDO). Both IDO2 and TDO catalyze the same biochemical reaction as IDO1 (Figure 1), but these two enzymes have strict tissue specificity: TDO is expressed only in the liver, where it controls and regulates blood concentration of TRP, while IDO2 is expressed at low levels in the placenta and liver.<sup>6-8</sup> On the contrary, IDO1 is expressed in a broad number of peripheral



tissues, including the gastrointestinal tract. Within the gastrointestinal system, IDO1 activity has been observed in epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, mesenchymal stem cells (MSCs), as well as immune cells, including professional antigen-presenting cells [dendritic cells (DCs), macrophages, B lymphocytes], natural killer (NK) cells, activated monocytes and granulocytes, while lymphoid cells rarely express IDO1.<sup>9</sup>

In addition to TRP catabolic activity, IDO1 protein is an important signal-transducing molecule.<sup>10</sup> IDO1 has two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) which, after phosphorylation, act as docking sites for different molecules, which either activate positive (transcriptional) or induce negative (post-translational) modulation of IDO1 protein.<sup>10</sup> Molecular patterns that prolong IDO1's half-life maintain IDO1-mediated immunosuppression while molecules that shorten IDO1's half-life, reduce IDO1-dependent immunoregulatory effects and promote inflammation.<sup>10</sup>

The first discovery of IDO-dependent immunoregulatory effects was made in 1984 when Pfefferkorn found that recombinant interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) successfully inhibited growth of *Toxoplasma gondii* in fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan.<sup>11</sup> Consequent accumulation of toxic KYN metabolites (3-HK, QA, 3-HAA) restricted the growth of this obligate intracellular parasite, suggesting the importance of IFN- $\gamma$  for activation of the IDO1/KYN pathway.<sup>11</sup> Binding of IFN- $\gamma$  to its receptor activate Janus kinases (Jak1 and 2) resulting in phosphorylation and dimerization of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) that enters the nucleus to induce transcription of IFN- $\gamma$ -stimulated genes. Mammalian IDO1 gene promoters possess IFN- $\gamma$ -stimulated-response elements and IFN- $\gamma$ -activated sites, enabling IFN- $\gamma$ -mediated induction of IDO1 expression.<sup>12,13</sup> The transcriptional factor DAP12 regulates IFN- $\gamma$ -induced IDO1 transcription, while suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 targets IDO1 protein for proteasomal degradation.<sup>13–15</sup> A broad number of *in vitro* and *in vivo* studies confirmed that IFN- $\gamma$  is the most potent activator of IDO1 activity, although IFN types I [IFN alpha/beta (IFN- $\alpha/\beta$ )], tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), lipopolysaccharide (LPS), toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR9 ligands or even

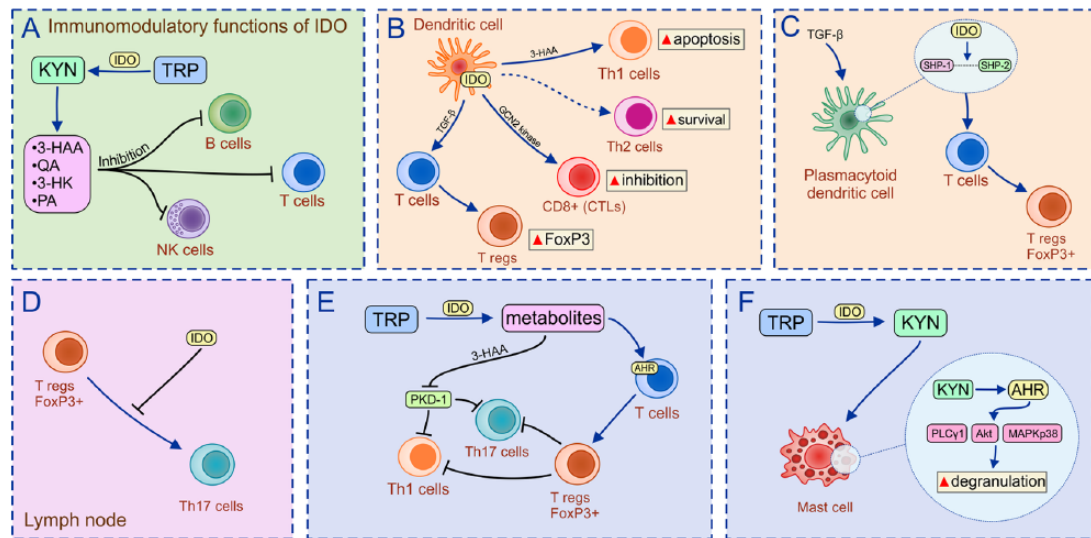
anti-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-10 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )] may induce enhanced IDO1 expression.<sup>16–19</sup>

### **IDO1/KYN-dependent modulation of immune cells**

Initially, increased IDO1 activity and consequent accumulation of KYN metabolites were considered only an important mechanism for the regulation of cellular metabolism due to their effect on generation of NAD<sup>+</sup> and ATP.<sup>20</sup> Nevertheless, results obtained in a large number of preclinical studies demonstrated that IDO1-dependent TRP starvation and accumulation of 3-HAA, KYNA, QA and 3-HK directly inhibit proliferation of activated T and B lymphocytes, contributing to attenuation of the adaptive immune response [Figure 2(a)].<sup>21–23</sup> Interestingly, IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells were more susceptible to IDO1-induced apoptosis compared with IL-4-producing Th2 cells.<sup>24</sup> This, KYN-dependent selective apoptosis of Th1 cells involves a Fas-independent mechanism: activation of caspase-8 and the release of cytochrome c from mitochondria.<sup>24</sup> Since IFN- $\gamma$  is the main activator of IDO1, IDO1/KYN-induced selective apoptosis of IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells could represent a compensatory mechanism responsible for the maintenance of Th1/Th2 balance and peripheral lymphocyte homeostasis.

IDO1 is crucially important for the crosstalk between DCs and immunosuppressive T-regulatory cells (Tregs).<sup>25,26</sup> Through the increased IDO1 activity, DCs promote generation and expansion of Tregs, enabling induction and maintenance of immune tolerance [Figure 2(b)].<sup>24,26</sup> During the interaction with naïve T cells, DCs, in an IDO1-dependent manner, generate KYN, which promotes expression of Treg lineage-defining transcription factor (forkhead box P3, FoxP3) in cluster of differentiation 4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>)T cells, enabling generation of immunosuppressive CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Tregs.<sup>13</sup>

During initial TCR-mediated activation of resting Tregs, signals *via* the protein kinase B (PKB/Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways can potentially destabilize the immunoregulatory phenotype of Tregs and cause their reprogramming into a pro-inflammatory helper-like phenotype ('ex-Tregs'), characterized by enhanced production of inflammatory cytokines. A low level of TRP in the local microenvironment



**Figure 2.** IDO1/KYN-dependent modulation of immune cells.

(a) IDO1-dependent TRP starvation and accumulation of 3-HAA, KYNA, QA and 3-HK directly inhibits proliferation of activated T and B lymphocytes; (b) through the increased IDO1 activity, DCs promote generation and expansion of Tregs, enabling induction and maintenance of immune tolerance; (c) an increased IDO1 activity in TGF- $\beta$ -stimulated murine pDCs results in formation of an intracellular scaffold that binds SHP-1 and SHP-2 enabling conversion of CD4+ T cells into immunosuppressive Tregs; (d) IDO1 prevents conversion of FoxP3+ Tregs in the inflammatory process and Th17 cells in the lymph nodes; (e) Tregs suppress IFN- $\gamma$ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cells, and attenuate inflammation; and (f) through the activation of AhR, IDO1-derived KYN activates Akt and MAPK p38 signaling pathways in mast cells resulting in massive degranulation and release of leukotrienes and prostaglandins.

IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase; KYN, kynurenine; TRP, tryptophan; 3-HAA, 3-hydroxyanthranilic acid; KYNA, kynurenic acid; GCN2, general control nonderepressible 2; QA, quinolinic acid; PA, ; 3-HK, 3-hydroxykynurenine; DCs, dendritic cells; Tregs, T-regulatory cells; TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta; pDC, plasmacytoid DC; SHP, Src-homology-region-2-domain-containing phosphatase; CD4+, cluster of differentiation 4+; FoxP3, forkhead box P3; Th17, T-helper cell 17; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; AhR, aryl hydrocarbon receptor; Akt, protein kinase B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKD-1, ; PLC $\gamma$ 1, ; CTLs, cytotoxic T cells.

activates stress-response pathways, including activation of general control nonderepressible 2 (GCN2) kinase and suppression of Akt/mTOR2 signaling.<sup>27,28</sup> Accordingly, in order to prevent transdifferentiation of Tregs in inflammatory CD4+ T cells in the inflamed gut, intestinal regulatory DCs produce IDO1 that induces low TRP levels, enabling activation of GCN2 kinase and consequent inhibition of Akt/mTORC2 signaling in Tregs.<sup>13</sup> In a similar manner, an increased IDO1 activity and activation of GCN2 kinase is responsible for the downregulation of the TCR zeta-chain in activated CD8+ cytotoxic T cells (CTLs) resulting in inappropriate antigen recognition and reduced cytotoxicity of CTLs.<sup>23</sup>

In addition to direct immunosuppressive effects on activated T cells, IDO1 was involved in intracellular signaling events responsible for the self-amplification and maintenance of a stably regulatory phenotype in plasmacytoid DCs (pDCs). These pDCs are an important cellular

source of IFN type I that are able to induce enhanced expression of IDO1 and promote expansion of Tregs.<sup>29</sup> This process is, at least partially, regulated through the activation of the AhR.<sup>10,30</sup> IDO1-mediated degradation of TRP yields a series of KYN catabolites that act as ligands for AhR.<sup>10,30</sup> Binding of KYN catabolites to AhR induces conformational changes of AhR that promotes its nuclear translocation.<sup>10</sup> In the nucleus, AhR induces enhanced transcription of target genes, including FoxP3.<sup>31</sup> Accordingly, IDO1/KYN-dependent activation of AhR results in increased generation of FoxP3+ Tregs, contributing to creation of the immunosuppressive microenvironment.<sup>10,30–32</sup> Additionally, an increased IDO1 activity in TGF- $\beta$ -stimulated murine pDCs resulted in formation of an intracellular scaffold that binds Src-homology-region-2-domain-containing phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, enabling conversion of CD4+ T cells into immunosuppressive Tregs [Figure 2(c)].<sup>33</sup> In the lymph nodes, IDO1 prevents conversion of FoxP3+ Tregs

in the inflammatory process, IL-17-producing Th17 cells [Figure 2(d)], resulting in the increased accumulation of immunosuppressive Tregs in peripheral tissues.<sup>30</sup> In the inflamed tissues, Tregs, through the production of immunosuppressive IL-10 and TGF- $\beta$ , suppress IFN- $\gamma$ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cells and resolve ongoing inflammation [(Figure 2(e)).<sup>25</sup>

In addition to the modulation of adaptive immunity, IDO1/KYN pathways regulate function of innate immune cells. IDO1 promoted conversion of inflammatory M1 macrophages into alternatively activated IL-10 and TGF- $\beta$ -producing M2 macrophages resulting in creation of the immunosuppressive microenvironment.<sup>34</sup> Through the activation of AhR, IDO1-derived KYN activates Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 signaling pathways in mast cells, resulting in massive degranulation and release of leukotrienes and prostaglandins (PG) [Figure 2(f)].<sup>35</sup> Among them, PGE2 was particularly important for IDO1-based suppression of cytotoxic NK cells.<sup>36</sup>

### **IDO1-dependent modulation of inflammatory diseases of the gastrointestinal tract**

Since the IDO1/KYN pathway regulates immune response, its role in the pathogenesis of inflammatory diseases of the gastrointestinal tract has been explored in a large number of experimental and clinical studies.

Several research groups demonstrated IDO-mediated attenuation of inflammation in the oral cavity.<sup>37-42</sup> Increased IDO1 expression was detected in gingival fibroblasts, gingiva-derived MSCs (G-MSCs), dental-pulp-derived MSCs (DP-MSCs), periodontal-ligament stem cells (PDL-SCs) and DCs that infiltrated inflammatory lesions in the oral cavity. IDO1 is constitutively expressed in human gingiva, and its expression was upregulated in chronic periodontitis.<sup>43</sup> As first indicated by Nisapakultorn and coworkers<sup>43</sup> and later confirmed by several other groups,<sup>37-40</sup> bacterial products and inflammatory cytokines were mainly responsible for an increased IDO1 expression in periodontitis lesions. LPS and IFN- $\gamma$ -activated gingival fibroblasts, G-MSCs, DP-MSCs, PDL-SCs and DCs produce IDO1 that, in a KYN-dependent manner, suppressed expansion of inflammatory CD4+T-bet+IFN- $\gamma$ -producing Th1 and CD4+ ROR $\gamma$ T+IL-17-producing Th17

cells by promoting their conversion to Tregs, creating an immunosuppressive microenvironment in the oral cavity that resulted in attenuation of ongoing inflammation.<sup>37-40</sup> Similarly, in an IDO1-dependent manner, MSCs obtained from periapical lesions (PL-MSCs) were able to induce a generation of tolerogenic phenotype in DCs which, due to the poor allostimulatory activity, induced anergy of effector Th1 cells and promoted generation of Tregs.<sup>41</sup> In line with these findings are results obtained by Lewkowicz and colleagues, who investigated molecular mechanisms responsible for Treg-based attenuation of recurrent aphthous stomatitis (RAS) and concluded that IDO was crucially important for the maintenance of immune tolerance in this chronic T-cell-driven inflammatory disease.<sup>42</sup> Decreased constitutive expression of IDO in oral mucosa of RAS patients resulted in impaired generation and function of Tregs. The total number of immunosuppressive Tregs in peripheral blood of RAS patients was significantly lower compared with healthy subjects. Additionally, Tregs from RAS patients were not able to optimally suppress production of inflammatory, pro-Th1 cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) in effector T cells. Thus, reduced IDO activity resulted in the loss of Treg-dependent immune tolerance, enabling T cell-mediated damage of the epithelium and the development of oral ulcers in RAS patients.<sup>42</sup>

Results recently obtained by Larussa and colleagues,<sup>44</sup> suggest an important role of the IDO1/KYN signaling pathway in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection and *H. pylori*-associated gastritis. The analysis of gastric biopsy samples obtained from 42 patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy revealed significantly enhanced IDO1 expression in *H. pylori*-infected patients compared with uninfected subjects. It is well known that activation of IFN- $\gamma$ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cells contribute to the efficient eradication of *H. pylori* infection.<sup>45,46</sup> Accordingly, *H. pylori* enhances its own survival in human gastric mucosa by downregulating expression of T-bet, resulting in attenuated Th1 immune response.<sup>44,45</sup> Since IDO1 inhibition notably increases the expression of T-bet, IFN- $\gamma$  and IL-17 messenger ribonucleic acid (mRNA) in gastric samples of *H. pylori*-infected patients, Larussa and colleagues concluded that immunological escape implemented by *H. pylori* involves the increased IDO1 activity that downregulates Th1/Th17 immune

response and induces immune tolerance, enabling long-term colonization of *H. pylori* in gastric mucosa and consecutive development of *H. pylori*-associated gastritis.<sup>44</sup>

#### *IDO1-dependent modulation of inflammatory bowel diseases*

IDO1 is expressed in the normal colon and is upregulated in the setting of colitis.<sup>47</sup> An increased IDO1 expression has been observed in inflamed colons of experimental animals and in patients suffering from inflammatory bowel diseases (IBDs).<sup>25,47–49</sup> Pharmacological inhibition or genetic deletion of IDO1 resulted in increased mortality of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)- or dextran sodium sulfate (DSS)-treated experimental animals.<sup>25,47,48</sup> Conversely, increased IDO1 activity and elevated serum levels of KYN were accompanied with increased presence of immunosuppressive Tregs in the injured gut, resulting in the attenuation of colon inflammation.<sup>50</sup> Enhanced IDO1 activity was noticed in colon-infiltrating immune cells and in colon epithelial cells of IBD patients and significantly decreased after treatment with steroids and salicylates.<sup>51</sup> Wolf and colleagues were first to show increased production of IDO1 in CD123(+) mononuclear cells infiltrating the submucosal areas of the inflamed lesions.<sup>52</sup> Furuzawa-Carballeda and coworkers further analyzed IDO1 expression in colonic biopsies of IBD patients and confirmed that the main producer of IDO1 in inflamed gut was CD123+pDCs that counterbalance the tissue-damaging effects of activated T cells.<sup>9</sup> Increased IDO1 activity was also observed in regulatory CD8 $\alpha$ -positive pDCs. Additionally, several other subpopulations of CD16+/CD56+/CD80+IDO1-producing regulatory DCs were noticed in the colons of IBD patients,<sup>9</sup> while CD103+DCs were considered as the main cellular source of IDO in mice.<sup>25</sup> Human CD123+/IDO+ pDCs constitute only 0.2–0.8% of peripheral blood cells and are recruited from the peripheral blood in the inflamed gut in order to induce tolerance.<sup>9</sup> IDO1-producing DCs possess an exclusive TLR repertoire, characterized by high expression of TLR7 and TLR9. TLR7 agonist simultaneously activates IDO1/KYN signaling pathway in colon-infiltrating DCs,<sup>53</sup> while induction of IDO1 by a TLR-9 agonist, immunostimulatory DNA, led to the attenuation of experimental colitis in mice.<sup>54</sup> Importantly, IFN- $\gamma$ /STAT-1 signaling was crucially important

for enhanced IDO1 activity in DCs since IDO1 could not be induced in colon-infiltrating DCs of STAT-1 deficient mice.<sup>54</sup> Enhanced Th1 immune response and elevated concentration of IFN- $\gamma$  in the gut promoted IDO1 expression in CD103+DCs, while enhanced Th2 immune response and high concentration of IL-4 inhibited IDO1 activity in gut DCs.<sup>55</sup> Human CD123+/IDO+ pDCs and murine CD103+DCs produce large amounts of IDO1 which promote conversion of effector Th1 and Th17 cells in Tregs, enabling creation of the immunosuppressive microenvironment in the gut.<sup>25,56</sup> Tregs, in a CTLA-4 and IL-10-dependent manner, suppress activation of gut-infiltrated Th1 and Th17 cells, contributing to the attenuation of colitis.<sup>57</sup> We<sup>50</sup> and others<sup>49,58</sup> noticed significantly higher serum and fecal levels of KYN and higher presence of IDO-producing DCs and Tregs in the *lamina propria* of IBD patients compared with healthy subjects that might represent a compensatory mechanism for functional induction of tolerance in active IBD, due to the increase in absolute number of colon-infiltrating, IFN- $\gamma$ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 inflammatory cells.

In inflamed mucosa of IBD patients, increased IDO1 activity was observed in colon epithelial cells, particularly at borders of crypt abscesses or at sites where epithelial cells flanked ulcers, suggesting involvement of the IDO1/KYN pathway in the repair process of mucosal healing.<sup>59</sup> In line with these observations are our recently published results<sup>50</sup> that indicate the importance of IDO1-dependent expansion of endogenous Tregs as a possible new therapeutic approach for the induction of mucosal healing. We demonstrated that colon-infiltrating DCs, through the production of KYN, induced expansion of Tregs that promote mucosal healing in the injured colons.<sup>50</sup> Both IDO1-producing DCs and immunosuppressive Tregs were crucially important for the maintenance of mucosal healing and recovery from DSS-induced colitis, since depletion of each cell population led to the significant aggravation of disease.<sup>50</sup> Keeping in mind that clinical application of Tregs in IBD patients is not easy to perform given their rarity in peripheral blood,<sup>60</sup> we propose that IDO1-dependent expansion of endogenous Tregs should be further explored as a potentially new approach for the induction and maintenance of mucosal healing in IBD patients.

In addition to the potential therapeutic application, measurement of IDO1 activity can be used for the monitoring of mucosal healing in IBD patients. Currently, measurement of fecal calprotectin is the most commonly used stool-based test for assessing progression of ulcerative colitis (UC),<sup>61</sup> and reduction in concentration of fecal calprotectin represents the most reliable predictor of mucosal healing in UC patients.<sup>62</sup> Nevertheless, the fecal calprotectin test lacks a validated cutoff, optimal specificity and accuracy, indicating the need for other stool-based biomarkers to complement fecal calprotectin in monitoring mucosal healing.<sup>61</sup> Our recently obtained results<sup>50</sup> demonstrated increased serum and fecal levels of KYN in UC patients with mucosal healing compared with UC patients who had chronic, persistent disease. Both serum and fecal levels of KYN negatively correlated with disease severity and concentration of fecal calprotectin, indicating that measurement of KYN in serum and fecal samples of UC patients could be considered as a useful diagnostic tool that can complement fecal calprotectin in monitoring or predicting mucosal healing.<sup>50</sup>

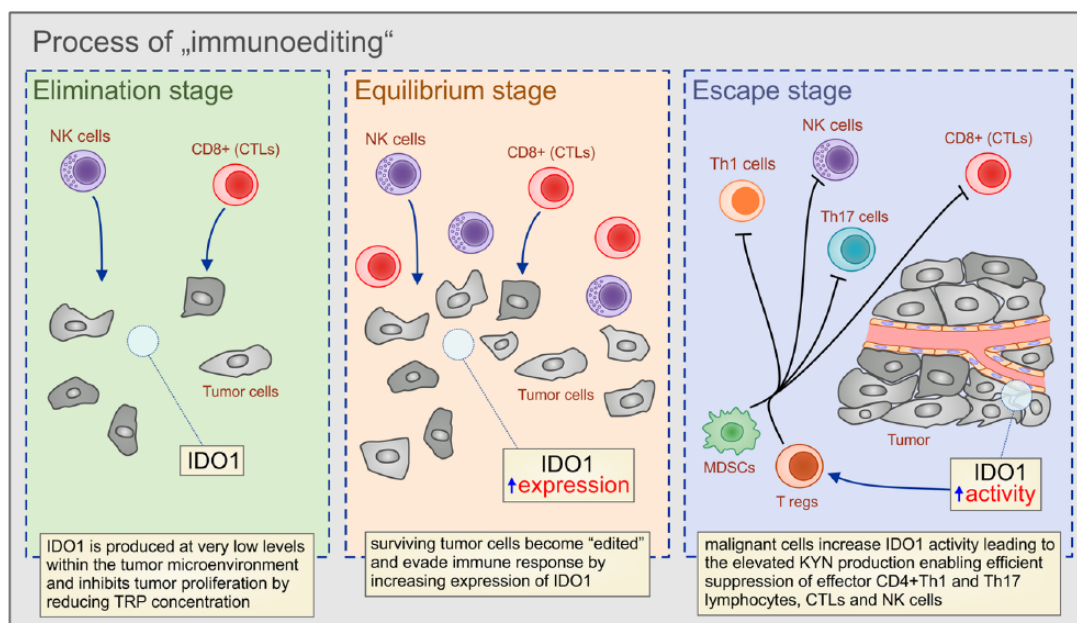
In addition to its effect on DCs and Tregs' cross-talk, IDO1 exerts antimicrobial effects in colon epithelium, as well. Since increased IDO1 expression was mainly observed in the vicinity of interruptions of the epithelial barrier where bacterial invasion is more pronounced, IDO1-mediated depletion of TRP might be an important mechanism for the elimination of TRP-dependent microorganisms.<sup>59</sup> Additionally, IDO1 regulates immune response to the gut commensal microbiota<sup>63</sup> and plays an important role in the interaction between probiotics and the intestinal immune system.<sup>64</sup> Zhao and colleagues recently demonstrated that Bifidobacteria induced enhanced IDO1 expression in colon-infiltrating DCs resulting in expansion of Tregs and attenuation of TNBS-induced colitis.<sup>64</sup>

It is well known that MSCs are, due to their immunomodulatory characteristics, considered as new therapeutic agents in the cell-based therapy of IBD.<sup>65,66</sup> Several recently published studies emphasized the crucial importance of MSC-derived IDO1 for the expansion of colon-infiltrating Tregs and the attenuation of colon inflammation,<sup>38,67</sup> further indicating therapeutic potential of IDO1 in the therapy of IBD.

### **The role of IDO1 in the development and progression of gastrointestinal tumors**

Since increased IDO1 activity in tumor-infiltrating immune cells reduces availability of essential amino acid TRP for tumor cells, IDO1 has been originally considered an enzyme with strong anti-cancer potential.<sup>6</sup> Nevertheless, with the discovery of IDO1-based immunosuppression, the pro-cancer activity of this enzyme has been documented in a large number of preclinical and clinical studies and nowadays, IDO1 is considered one of the main therapeutic targets in cancer diagnostics and therapy.<sup>6,68</sup>

IDO1 is overexpressed in primary and metastatic gastrointestinal tumors that use IDO1-dependent immunosuppression to attenuate antitumor immunity and to promote tumor growth and progression.<sup>69</sup> Paradoxically, the activity of the anti-tumor immune response in the gut, which is elicited to eliminate malignant cells and to prevent tumor growth and progression, promotes the formation of the highly aggressive IDO1-expressing gastrointestinal tumors.<sup>70</sup> The immunosuppressive properties of the developing tumor are established during the process of 'immunoediting' that involves changes in the genetic background of malignant cells during the three consecutive phases called the 'elimination,' 'equilibrium,' and 'escape' stages (Figure 3).<sup>6</sup> During the first phase of tumor surveillance ('elimination stage'), when most malignant cells are efficiently recognized and destroyed by the cytotoxic effects of NK and CD8+T cells, IDO1 is produced at very low levels within the tumor microenvironment and inhibits tumor proliferation by reducing TRP concentration. During the 'equilibrium stage,' surviving tumor cells become 'edited' by the continuous attack of the immune cells, accumulate mutations and enhance their capacity to evade immune response, mainly by increasing expression and activity of immunosuppressive enzymes, including IDO1.<sup>71</sup> Finally, during the last 'escape stage' of 'immunoediting', malignant cells increase IDO1 activity, leading to the elevated KYN production, enabling efficient suppression of effector CD4+Th1 and Th17 lymphocytes, CTLs and NK cells. Additionally, the IDO1/KYN pathway induces expansion of Tregs and myeloid-derived suppressor cells, creating an immunosuppressive tumor microenvironment that supports tumor growth and progression.<sup>6,71</sup> Accordingly, IDO1 positivity is



**Figure 3.** The role of IDO1 in the 'immunoediting' of tumor cells.

During the first phase of tumor surveillance ('elimination stage'), when most malignant cells are efficiently recognized and destroyed by the cytotoxic effects of NK and CD8+ T cells, IDO1 is produced at very low levels within the tumor microenvironment and inhibits tumor proliferation by reducing TRP concentration. During the 'equilibrium stage', surviving tumor cells become 'edited' by the continuous attack of the immune cells, accumulate mutations, and enhance their capacity to evade immune response, mainly by increasing expression of IDO1. Finally, during the last 'escape stage' of 'immunoediting', malignant cells increase IDO1 activity, leading to the elevated KYN production, enabling efficient suppression of effector CD4+Th1 and Th17 lymphocytes, CTLs and NK cells.

NK, natural killer cells; CD, cluster of differentiation; IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase; TRP, tryptophan; KYN, kynurenine; CTLs, cytotoxic T cells; Th, T-helper cells.

strongly associated with multidrug resistance of gastrointestinal tumors and inversely correlates with patient survival.<sup>72-81</sup>

An increased IDO1 expression was detected in malignant tumors of the oral cavity.<sup>72-74</sup> IDO1 expression positively correlated with progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and negatively correlated with overall survival rate of patients who suffered from OSCC.<sup>72</sup> Seppälä and coworkers showed that IDO1 promotes growth of tongue squamous cell carcinoma (TSCC) cells by enabling their escape from the immune surveillance.<sup>73</sup> Similar conclusions were made by Kuales and colleagues who showed that DCs, located in the border between the squamous cell carcinoma of the lower lip (SCC-LL) and the inflammatory infiltrate, through the production of IDO1, create immunosuppressive microenvironment enabling immune escape and uncontrolled growth of malignant cells.<sup>74</sup> An increased IDO1 activity correlated with poor survival of patients with malignant diseases of the oral

cavity<sup>73</sup> suggesting IDO1 as potential therapeutic target for enhancement of antitumor immune response in the oral cavity.

An increased IDO1 expression was observed in esophageal tumors, as well.<sup>75-77</sup> Sakurai and colleagues<sup>75</sup> have reported increased expression of IDO1 at the mRNA level in the peripheral blood and in tumor samples of patients suffering from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). In line with these findings, Jia and associates found a negative correlation between IDO1 expression and clinical outcome of ESCC patients.<sup>76</sup> Most recently, by analyzing tumor samples obtained from 50 ESCC patients, Cui and coworkers noticed enhanced IDO1 activity in tumor-associated fibroblasts and endothelial cells,<sup>77</sup> supporting the hypothesis that in addition to tumor cells, stromal and endothelial cells are also able, in an IDO1-dependant manner, to create an immunosuppressive environment in esophageal tumors, contributing to the poor prognosis of IDO1-positive ESCC patients.

IDO1 plays an important role in suppression of CTLs in gastric cancer and, accordingly, it was recently proposed as a new, negative prognostic biomarker for overall survival of gastric cancer patients.<sup>78–82</sup> Cytotoxicity and capacity for proliferation of CTLs, obtained from gastric cancer patients, were significantly attenuated when these cells were cocultured with IDO1 overexpressing human gastric cancer BGC-823 cells.<sup>78</sup> An addition of 1-methyl-tryptophan, a competitive inhibitor of IDO1, to the CTLs (BGC-823 culture) completely restored antitumor properties of CTLs, confirming the importance of IDO1 for suppression of CTLs.<sup>78</sup> Additionally, several lines of evidence indicate that gastric-cell-derived IDO1 reduces the capacity of DCs to promote generation of memory CD4+ and CD8+ T cells. Significantly lower number of activated DCs, CD4+ and CD8+ memory T cells were noticed in tumor tissues obtained from gastric cancer patients with increased IDO1 activity.<sup>79,80</sup> This phenomenon was associated with deeper tumor invasion, massive lymph-node metastasis and poor clinical prognosis.<sup>79,80</sup> In order to analyze the prognostic value of IDO1 expression in gastric cancer, Nishi and colleagues analyzed IDO1 expression in 60 patients who underwent curative gastrectomy for stage III gastric cancer and confirmed that overall survival rate was significantly lower in the IDO1 positive group of patients. This finding correlated with massive infiltration of immunosuppressive Tregs within the tumors, confirming that enhanced IDO1 expression resulted with the creation of an immunosuppressive microenvironment, leading to poor prognosis.<sup>82</sup> In line with these findings are results obtained by Liu and coworkers who examined correlation between overall survival rate and intratumoral IDO1 expression in 357 patients with gastric adenocarcinoma who underwent gastrectomy.<sup>81</sup> An increased expression of IDO1 was associated with poor postoperative clinical outcome, confirming that IDO1 could be considered as a new, valuable, negative prognostic biomarker for estimation of overall survival of patients with gastric cancer who underwent gastrectomy.<sup>81</sup>

Several lines of evidence demonstrated the crucial importance of IDO1/KYN signaling for the development of colon cancer.<sup>83–89</sup> IDO1 regulates viability and proliferation of colon cancer cells, promotes progression of preneoplastic cells in neoplastic lesions and plays an important immunomodulatory role in antitumor immunity in the

colon.<sup>83–85</sup> Inhibition of IDO1 activity in colon cancer cells decreased the transcription of CDC20, resulting in G2/M cycle arrest<sup>83</sup> and reduced nuclear, activated  $\beta$ -catenin and transcription of its target genes (cyclin D1 and Axin2).<sup>84</sup> Importantly, mitosis of IDO1-suppressed colon cancer cells was completely restored by KYN, suggesting IDO1-derived KYN as a crucially important mediator for the proliferation of colon cancer cells.<sup>83,84</sup> In addition to mitotic cell death, long-term exposure to IDO1 inhibitor induced mitochondrial injury and caspase-dependent apoptosis of colon cancer cells, confirming the significance of IDO1 for viability of colon cancer cells.<sup>83</sup> These data were confirmed *in vivo*, as well.<sup>83–85</sup> Upregulation of IDO1 activity was observed in the azoxymethane (AOM)-induced colonic preneoplastic lesions, while use of IDO1 inhibitor significantly decreased the total number of aberrant crypt foci and  $\beta$ -catenin-accumulated crypts that overexpressed IDO1.<sup>85</sup> By using IDO1-deficient mice and an animal model of AOM/DSS-induced colon cancer, Liu and colleagues<sup>83</sup> and Thaker and coworkers<sup>84</sup> confirmed the crucial importance of IDO1 in colon carcinogenesis. IDO1-deficient mice harbored fewer tumors that had a higher number of tumor-infiltrating CTLs and a lower number of immunosuppressive Tregs in comparison with wild-type tumor-bearing animals. Interestingly, IDO1 inhibitor managed to prevent the development of colon cancer in Rag1-deficient mice (who lacked T cells), indicating that IDO1 inhibition could suppress cancer development by inducing cell-cycle arrest of colon cancer cells, independent of affecting T-cell-based antitumor immunity.<sup>83</sup> In addition to these findings, Takamatsu and colleagues investigated the effects of genetic deletion of IDO1 on adaptive immune response to colon cancer and noticed that IDO1 deficiency significantly altered cellular make up and cytokine network in the colon tumor microenvironment in a similar manner as in all other gastrointestinal tumors.<sup>86</sup> A remarkable decrease in the total number of tumor-infiltrating Tregs and significantly increased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) was observed in the colon tumor microenvironment of IDO1-deficient tumor-bearing mice,<sup>86</sup> leading to the conclusion that IDO1 activation in colon cancer has two complementary functions: acceleration of colon cancer cell proliferation and induction of Treg-mediated immune tolerance. In line with these conclusions are findings recently

reported by Ito and colleagues, who demonstrated that inhibition of IDO1 activity could enhance the therapeutic efficacy of TLR7 agonist, which has already been approved for clinical use. Intratumoral injection of TLR7 agonist and simultaneous inhibition of IDO1 activity significantly increased presence of tumor-infiltrating activated DCs, CTLs and enhanced mRNA expression of pro-Th1 cytokines (IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2) in colon cancers, leading to the suppression of established colon cancer growth *in vivo*.<sup>53</sup> Crucial importance of DC-derived IDO1 for attenuation of antitumor immune response against colon cancer cells was also confirmed in a study conducted by Yen and colleagues, who silenced IDO1 expression in the skin DCs of tumor-bearing mice and elicited an effective CD4+ and CD8+ T-cell-based antitumor immunity, resulting in inhibited colon cancer growth and prolonged survival of experimental animals.<sup>87</sup> Additionally, Brandacher and coworkers showed significant correlation between increased IDO1 expression in colon cancer cells and poor prognosis of patients suffering from this disease.<sup>88</sup> In order to evaluate whether monitoring of IDO1 activity in colon cancer patients could be used in diagnosis and therapy, Cavia-Saiz and coworkers measured the plasma concentration of L-KYN in 78 colon cancer patients (stage I–IV) and compared it with that in a control group of 70 healthy subjects.<sup>89</sup> Overall survival analysis after 45 months of follow up revealed an increased survival rate of colon cancer patients who had low plasma levels of L-KYN,<sup>89</sup> suggesting that elevated concentration of L-KYN in plasma could be used as a biomarker to differentiate individuals with colorectal cancer from healthy individuals.

*Anticancer therapy with IDO1 inhibitors: opportunity or additional risk for patients with gastrointestinal tumors?*

Several pharmacological IDO1 inhibitors (epacadostat, indoximod, navoximod) are currently being explored as anticancer agents in the therapy of solid tumors with the aim of reducing IDO1-dependent immunosuppression in the tumor microenvironment and enabling improved tumor surveillance and enhanced antitumor immune response (Table 1).<sup>90–94</sup> Antineoplastic effects of IDO1 inhibitors were based on inhibition of IDO1 transcription and translation and on suppression of TRP transport across the cell

membrane.<sup>90–93</sup> As expected, IDO1 inhibitors significantly decreased the serum level of KYN, followed by alterations of immune response.<sup>91</sup> Accordingly, preliminary results obtained in several clinical trials indicated severe side effects of indoximod treatment, such as immunosuppression, accompanied by an increased risk for recurrent infections, gastrointestinal hemorrhage, decreased appetite, nausea, vomiting, cough, anemia, fatigue and hyperglycemia.<sup>91–93</sup> Similar adverse effects were noticed in patients receiving navoximod or epacadostat.<sup>94,95</sup> Importantly, the only observed beneficial effect of single-agent IDO1 inhibition was prolonged stable disease.<sup>94,95</sup> Accordingly, many clinical trials have been initiated with the aim of exploring whether combined therapy of IDO1 inhibitors and chemotherapeutic agents, checkpoint inhibitors or immunostimulatory drugs will manage to reduce growth and progression of solid tumors (Table 1).

It should be kept in mind that no IDO1 inhibitors have been tested in patients with gastrointestinal tumors. IDO1 is crucially important for the regulation of immune tolerance in the gut. Accordingly, pharmacologic inhibition of IDO1 may affect intestinal immune response and it is highly expected that suppression of IDO1 activity in the gut will increase sensitivity of cancer patients to colitis.<sup>96</sup> These safety concerns must be explored in detail in experimental studies before IDO1 inhibitors can be approved in the therapy of gastrointestinal tumors.

## Conclusion

IDO1-dependent control of TRP metabolism is a highly versatile regulator of innate and adaptive immune responses, playing an important role in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal tract. The IDO1/KYN pathway has an important immunoregulatory role in the gut, providing homeostatic balance between immunity and tolerance. An increased IDO1 activity maintains immune tolerance and attenuates ongoing inflammation but allows immune escape and uncontrolled growth of gastrointestinal tumors. Accordingly, the IDO1/KYN pathway represents a novel therapeutic target for the treatment of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal tract, and consequences of its activation and inhibition should be further explored in future experimental and clinical studies.



**Table 1.** Pharmacological IDO1 inhibitors currently explored as anticancer agents in the therapy of solid tumors.

Type of tumor	Therapy	ClinicalTrials.gov identifier/status of the study	Beneficial effects	Side effects
Recurrent or advanced solid tumors	IDO1 inhibitor navoximod (GDC-0919, NLG-919)	NCT 02048709/ completed	Prolonged stable disease <sup>33</sup>	Gastrointestinal hemorrhage; decreased appetite; nausea; vomiting; cough; pruritus; fatigue
Treatment-refractory advanced solid tumors	Epacadostat	NCT 01195311/ completed	Prolonged stable disease <sup>34</sup>	Nausea, fatigue; decreased appetite; vomiting; constipation, abdominal pain; diarrhea, dyspnea; cough
Metastatic or locally advanced sarcoma	Combination of epacadostat, and anti-PD1 monoclonal antibody (pembrolizumab)	NCT 03414229/ recruiting	Not applicable	Not applicable
Pediatric brain tumors; glioblastoma multiforme; glioma; gliosarcoma; ependymoma; medulloblastoma	Combination of indoximod and temozolomide	NCT 02502708/ recruiting	Not applicable	Not applicable
Solid tumors; lung cancer; urothelial cancer; head and neck cancer	Combination of epacadostat and pembrolizumab with standard chemotherapy	NCT 03085914/ recruiting	Not applicable	Not applicable
Advanced or metastatic solid tumors	Combination of epacadostat and nivolumab with ipilimumab, or lirilumab	NCT 03347123/ recruiting	Not applicable	Not applicable
Solid tumors; non-small cell lung cancer; squamous cell carcinoma of the head and neck; urothelial carcinoma; brain metastasis	Anti-IDO1 agent (LY3381916) alone or in combination with anti-PD-L1 checkpoint antibody (LY3300054)	NCT 03343613/ recruiting	Not applicable	Not applicable
Unresectable stage III or stage IV melanoma	Combination of indoximod with immune checkpoint inhibitors	NCT 02073123/ active, not recruiting	Not applicable	Not applicable
Glioblastoma multiforme; glioma; gliosarcoma	Combination of indoximod and temozolomide	NCT 02052648/ active, not recruiting	Not applicable	Not applicable
Metastatic pancreatic cancer	Combination of indoximod and the standard of care chemotherapy gemcitabine and nab-paclitaxel	NCT 02077881/ active, not recruiting	Not applicable	Not applicable
IDO1, indoleamine 2,3-dioxygenase; PD1, programmed cell-death 1; PD-L1, programmed cell-death ligand 1.				

## Funding

This study was supported by the Serbian Ministry of Science (ON175069, ON175103), and the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP01/18).

## Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References


1. Agus A, Planchais J and Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 2018; 23: 716–724.
2. De Jesus AJ and Allen TW. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828: 864–876.
3. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, *et al.* Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 2014; 28: 1221–1238.
4. Palego L, Betti L, Rossi A, *et al.* Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. *J Amino Acids* 2016; 2016: 8952520.
5. Keszthelyi D, Troost FJ and Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1239–1249.
6. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, *et al.* The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol* 2018; 9: 151.
7. Bilir C and Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci* 2017; 3: 52–56.
8. Van Baren N and Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol* 2015; 6: 34.
9. Furuzawa-Carballeda J, Fonseca-Camarillo G, Lima G, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing cells in inflammatory bowel disease—a cross-sectional study. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 278035.
10. Pallotta MT, Fallarino F, Martino D, *et al.* AhR-mediated, non-genomic modulation of IDO1 function. *Front Immunol* 2014; 5: 497.
11. Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 908–912.
12. Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma. *Sci STKE* 2004; 2004: tr8.
13. Munn DH and Mellor AL. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol* 2016; 37: 193–207.
14. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, *et al.* SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20828–20833.
15. Orabona C, Puccetti P, Vacca C, *et al.* Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 2006; 107: 2846–2854.
16. Chen Y and Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res* 2009; 2: 1–19.
17. Yoshida R, Imanishi J, Oku T, *et al.* Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 129–132.
18. Fujigaki S, Saito K, Takemura M, *et al.* Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1998; 358: 329–335.
19. Takikawa O, Yoshida R, Kido R, *et al.* Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 1986; 261: 3648–3653.
20. Selvan SR, Dowling JP, Kelly WK, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): biology and target in cancer immunotherapies. *Curr Cancer Drug Targets* 2016; 16: 755–764.
21. Terness P, Bauer TM, Röse L, *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447–457.
22. Lee SM, Lee YS, Choi JH, *et al.* Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett* 2010; 132: 53–60.
23. Fallarino F, Grohmann U, You S, *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell

- receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176: 6752–6761.
24. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069–1077.
  25. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, *et al.* Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59: 595–604.
  26. Luu M, Steinhoff U and Visekruna A. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clin Transl Immunology* 2017; 6: e156.
  27. Fougeray S, Mami I, Bertho G, *et al.* Tryptophan depletion and the kinase GCN2 mediate IFN- $\gamma$ -induced autophagy. *J Immunol* 2012; 189: 2954–2964.
  28. Metz R, Rust S, Duhadaway JB, *et al.* IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: a novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncimmunology* 2012; 1: 1460–1468.
  29. Fallarino F, Grohmann U and Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol* 2012; 42: 1932–1937.
  30. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 2011; 12: 870–878.
  31. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, *et al.* An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 2010; 185: 3190–3198.
  32. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 2014; 511: 184–190.
  33. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 2009; 113: 6102–6111.
  34. François M, Romieu-Mourez R, Li M, *et al.* Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20: 187–195.
  35. Kawasaki H, Chang HW, Tseng HC, *et al.* A tryptophan metabolite, kynurenine, promotes mast cell activation through aryl hydrocarbon receptor. *Allergy* 2014; 69: 445–452.
  36. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111: 1327–1333.
  37. Moon JS, Cheong NR, Yang SY, *et al.* Lipopolysaccharide-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the periodontal ligament. *J Periodontol Res* 2013; 48: 733–739.
  38. Zhang Q, Shi S, Liu Y, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009; 183: 7787–7798.
  39. Özdemir AT, ÖzgülÖzdemir RB, Kırmaz C, *et al.* The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. *Cell Immunol* 2016; 310: 108–115.
  40. Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, *et al.* DPSCs from inflamed pulp modulate macrophage function via the TNF- $\alpha$ /IDO axis. *J Dent Res* 2016; 95: 1274–1281.
  41. Dokić J, Tomić S, Marković M, *et al.* Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2013; 43: 1862–1872.
  42. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, *et al.* Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 454–461.
  43. Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-Iam N, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80: 114–121.
  44. Larussa T, Leone I, Suraci E, *et al.* Enhanced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa modulates Th1/Th2 pathway and interleukin 17 production. *Helicobacter* 2015; 20: 41–48.
  45. Bagheri N, Salimzadeh L and Shirzad H. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. *Microb Pathog* 2018; 123: 1–8.
  46. Kabir S. The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter* 2011; 16: 1–8.
  47. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, *et al.* IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *J Immunol* 2013; 191: 3057–3064.

48. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, *et al.* Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1368–1381.
49. Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, *et al.* Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2017; 153: 1504.e2–1516.e2.
50. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase dependent expansion of T regulatory cells is crucially important for maintenance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Therap Adv Gastroenterol* 2018; 11: 1756284818793558.
51. Zhou L, Chen H, Wen Q, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 695–701.
52. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, *et al.* Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004; 113: 47–55.
53. Ito H, Ando T, Arioka Y, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity enhances the anti-tumour effects of a toll-like receptor 7 agonist in an established cancer model. *Immunology* 2015; 144: 621–630.
54. Ciorba MA, Bettonville EE, McDonald KG, *et al.* Induction of IDO-1 by immunostimulatory DNA limits severity of experimental colitis. *J Immunol* 2010; 184: 3907–3916.
55. Tu L, Chen J, Zhang H, *et al.* Interleukin-4 inhibits regulatory T cell differentiation through regulating CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Front Immunol* 2017; 8: 214.
56. Chen W, Liang X, Peterson AJ, *et al.* The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008; 181: 5396–5404.
57. Coquerelle C, Oldenhove G, Acolty V, *et al.* Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS<sup>+</sup> regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. *Gut* 2009; 58: 1363–1373.
58. Sznurkowska K, Żawrocki A, Sznurkowski J, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory T cells in intestinal mucosa in children with inflammatory bowel disease. *J Biol Regul Homeost Agents* 2017; 31: 125–131.
59. Ferdinande L, Demetter P, Perez-Novo C, *et al.* Inflamed intestinal mucosa features a specific epithelial expression pattern of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21: 289–295.
60. Lord JD. Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 11236–11245.
61. Di Ruscio M, Vernia F, Ciccone A, *et al.* Surrogate fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: rivals or complementary tools of fecal calprotectin? *Inflamm Bowel Dis* 2017; 24: 78–92.
62. Kristensen V, Røseth A, Ahmad T, *et al.* Fecal calprotectin: a reliable predictor of mucosal healing after treatment for active ulcerative colitis. *Gastroenterol Res Pract* 2017; 2017: 2098293.
63. Harrington L, Srikanth CV, Antony R, *et al.* Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect Immun* 2008; 76: 3045–3053.
64. Zhao L, Suolang Y, Zhou D, *et al.* Bifidobacteria alleviate experimentally induced colitis by upregulating indoleamine 2, 3-dioxygenase expression. *Microbiol Immunol* 2018; 62: 71–79.
65. Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, *et al.* Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 100: 426–432.
66. Markovic BS, Kanjevac T, Harrell CR, *et al.* Molecular and cellular mechanisms involved in mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory bowel diseases. *Stem Cell Rev* 2018; 14: 153–165.
67. Ryu DB, Lim JY, Lee SE, *et al.* Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by pre-treatment with poly(I:C) may enhance the efficacy of MSC treatment in DSS-induced colitis. *Immune Netw* 2016; 16: 358–365.
68. Amobi A, Qian F, Lugade AA, *et al.* Tryptophan catabolism and cancer immunotherapy targeting IDO mediated immune suppression. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1036: 129–144.
69. Prendergast GC, Smith C, Thomas S, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 721–735.
70. Iversen TZ, Andersen MH and Svane IM. The targeting of indoleamine 2,3 dioxygenase-mediated immune escape in cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015; 116: 19–24.

71. Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329–360.
72. Laimer K, Troester B, Kloss F, *et al.* Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2011; 47: 352–357.
73. Seppälä M, Halme E, Tiilikainen L, *et al.* The expression and prognostic relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2016; 136: 729–735.
74. Kuales MA, Wenzel J, Schmid-Wendtner MH, *et al.* Myeloid CD11c+ S100+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase at the inflammatory border to invasive lower lip squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2011; 26: 997–1006.
75. Sakurai K, Enomoto K, Amano S, *et al.* Study of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients of esophageal squamous cell carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31: 1780–1782.
76. Jia Y, Wang H, Wang Y, *et al.* Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients. *Int J Cancer* 2015; 137: 1095–1106.
77. Cui G, Li C, Xu G, *et al.* Tumor-associated fibroblasts and microvessels contribute to the expression of immunosuppressive factor indoleamine 2, 3-dioxygenase in human esophageal cancers. *Pathol Oncol Res* 2018; 24: 269–275.
78. Zhang R, Li H, Yu J, *et al.* Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in gastric cancer cells in vitro. *Mol Med Rep* 2011; 4: 169–173.
79. Zhang R, Liu H, Li F, *et al.* The correlation between the subsets of tumor infiltrating memory T cells and the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 3494–3502.
80. Li F, Huang J, Li S, *et al.* The subsets of dendritic cells and memory T cells correspond to indoleamine 2,3-dioxygenase in stomach tumor microenvironment. *Tumour Biol* 2014; 35: 8691–8698.
81. Liu H, Shen Z, Wang Z, *et al.* Increased expression of IDO associates with poor postoperative clinical outcome of patients with gastric adenocarcinoma. *Sci Rep* 2016; 6: 21319.
82. Nishi M, Yoshikawa K, Higashijima J, *et al.* The impact of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression on stage III gastric cancer. *Anticancer Res* 2018; 38: 3387–3392.
83. Liu X, Zhou W, Zhang X, *et al.* 1-L-MT, an IDO inhibitor, prevented colitis-associated cancer by inducing CDC20 inhibition-mediated mitotic death of colon cancer cells. *Int J Cancer*. Epub ahead of print 1 April 2018. DOI: 10.1002/ijc.31417.
84. Thaker AI, Rao MS, Bishnupuri KS, *et al.* IDO1 metabolites activate  $\beta$ -catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 2013; 145: 416–425.e1–e4.
85. Ogawa K, Hara T, Shimizu M, *et al.* Suppression of azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by 1-methyltryptophan, an inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cancer Sci* 2012; 103: 951–958.
86. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice. *Cancer Sci* 2015; 106: 1008–1015.
87. Yen MC, Lin CC, Chen YL, *et al.* A novel cancer therapy by skin delivery of indoleamine 2,3-dioxygenase siRNA. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 641–649.
88. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, *et al.* Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1144–1151.
89. Cavia-Saiz M, Muñiz Rodríguez P, Llorente Ayala B, *et al.* The role of plasma IDO activity as a diagnostic marker of patients with colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2275–2279.
90. Kozłowska A, Mackiewicz J and Mackiewicz A. Therapeutic gene modified cell based cancer vaccines. *Gene* 2013; 525: 200–207.
91. Brochez L, Chevolet I and Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer* 2017; 76: 167–182.
92. Soliman HH, Jackson E, Neuger T, *et al.* A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* 2014; 5: 8136–8146.
93. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, *et al.* Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014; 3: e957994.

Visit SAGE journals online  
[journals.sagepub.com/  
home/tag](http://journals.sagepub.com/home/tag)

 SAGE journals

94. Nayak-Kapoor A, Hao Z, Sadek R, *et al.* Phase Ia study of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor navoximod (GDC-0919) in patients with recurrent advanced solid tumors. *J Immunother Cancer* 2018; 6: 61.
95. Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, *et al.* First-in-human phase I study of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 epacadostat (INCB024360) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 3269–3276.
96. Chang MY, Smith C, DuHadaway JB, *et al.* Cardiac and gastrointestinal liabilities caused by deficiency in the immune modulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cancer Biol Ther* 2011; 12: 1050–1058.

# Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and T Regulatory Cells Is Crucially Important for the Attenuation of Acute Liver Injury

Marina Gazdic,<sup>1</sup> Bojana Simovic Markovic,<sup>2</sup> Aleksandar Arsenijevic,<sup>2</sup> Nemanja Jovicic,<sup>3</sup> Aleksandar Acovic,<sup>4</sup> C. Randall Harrell,<sup>5</sup> Crissy Fellabaum,<sup>5</sup> Valentin Djonov,<sup>6</sup> Nebojsa Arsenijevic,<sup>2</sup> Miodrag L. Lukic,<sup>2</sup> and Vladislav Volarevic<sup>2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Genetics, <sup>2</sup>Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, <sup>3</sup>Histology and Embryology, and <sup>4</sup>Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>5</sup>Regenerative Processing Plant, LLC, Palm Harbor, FL; and <sup>6</sup>Institute of Anatomy, University of Bern, Bern, Switzerland

One of the therapeutic options for the treatment of fulminant hepatitis is repopulation of intrahepatic regulatory cells because their pool is significantly reduced during acute liver failure. Although it is known that mesenchymal stem cells (MSCs), which have beneficent effects in the therapy of fulminant hepatitis, may promote expansion of regulatory T cells (Tregs) and regulatory B cells (Bregs), the role of these regulatory cells in MSC-mediated attenuation of acute liver injury is unknown. Herewith, we described the molecular mechanisms involved in the crosstalk between MSCs and liver regulatory cells and analyzed the potential of MSC-based therapy for the expansion of intrahepatic regulatory cells in mouse model of acute liver failure. MSC-dependent attenuation of  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)-induced acute liver injury in mice was accompanied with an increased presence of interleukin (IL) 10-producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> forkhead box P3<sup>+</sup> Tregs and IL10- and transforming growth factor  $\beta$ -producing marginal zone-like Bregs in the liver. Depletion of Bregs did not alter MSC-based alleviation of acute liver failure, whereas depletion of Tregs completely abrogated hepatoprotective effects of MSCs and inhibited their capacity to attenuate hepatotoxicity of liver natural killer T cells (NKTs), indicating that Tregs, and not Bregs, were critically involved in MSC-based modulation of acute liver inflammation. MSCs, in a paracrine, indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner, significantly increased the capacity of Tregs to produce immunosuppressive IL10 and to suppress hepatotoxicity of liver NKTs. Accordingly, adoptive transfer of MSC-primed Tregs resulted in the complete attenuation of  $\alpha$ -GalCer-induced acute liver failure. In conclusion, our findings highlighted the crucial importance of Tregs for MSC-based attenuation of acute liver failure and indicated the significance of MSC-mediated priming of Tregs as a new therapeutic approach in Treg-based therapy of acute liver injury.

*Liver Transplantation* 24 687–702 2018 AASLD.

Received November 9, 2017; accepted February 12, 2018.

Liver transplantation is the most effective therapy for patients suffering from acute liver failure, a life-threatening clinical condition characterized by progressive and extensive multilobular necrosis of hepatocytes

and massive intrahepatic infiltration of inflammatory cells.<sup>(1)</sup> The increasing demand for liver transplantation and the decline in donor organs has highlighted the need for alternative therapies for the treatment of acute liver failure.

The liver contains different subsets of effector lymphocytes that are kept in check by a subpopulation of T cells known as regulatory T cells (Tregs). Because an increased Treg/T helper 17 ratio was associated with the better survival of acute-on-chronic liver failure patients,<sup>(2)</sup> an option for the therapy of acute liver injury is to enrich Tregs in the damaged livers and to alter the balance of effector and regulatory lymphocytes toward immunosuppressive Tregs.

*Abbreviations:* 1-MT, 1-methyltryptophan;  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; ALT, alanine aminotransferase; APC, allophycocyanin; AST, aspartate aminotransferase; Breg, regulatory B cell; CCR7, chemokine (C-C motif) receptor 7; CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CY, cyclophosphamide; DC, dendritic cell; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DP, dual-plate; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; FOXP3, forkhead box P3; FSC-H, forward scatter height; H & E, hematoxylin-eosin; HGF,

Even though passive transfer of Tregs showed beneficial effects in an animal model of acute liver failure,<sup>(3)</sup> Treg-based therapy has not yet been tested in patients suffering from this life-threatening clinical condition. Most recently, a new concept of Treg-based therapy was brought to the table of operational tolerance in living donor liver transplantation.<sup>(3)</sup> However, it is still not verified whether administered Tregs actually reach the liver and maintain a stable phenotype over time.

In order to be present in an adequate number for therapeutic use, Tregs first have to be isolated from the peripheral blood of the patient, and then they have to be expanded *in vitro*.<sup>(4)</sup> This can represent a serious problem bearing in mind that in hyperacute cases of liver failure, encephalopathy and fatal outcome usually develop within a few days or a week after the onset of symptoms.<sup>(5)</sup> Thus, new approaches should be established with an aim to increase proliferation and activation of liver-resident Tregs in an optimal amount of time.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a heme-containing enzyme critically involved in the induction of immune tolerance in the liver.<sup>(6)</sup> It converts tryptophan to kynurenine, which inhibits the proliferation of

effector T cells and promotes generation of Tregs.<sup>(7)</sup> Most recently, by using  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)-induced hepatitis, well-established mice model of natural killer T cell (NKT)-dependent acute liver damage,<sup>(6)</sup> we highlighted the importance of mesenchymal stem cell (MSC)-derived IDO for the attenuation of acute liver failure.<sup>(8,9)</sup> MSCs protect from acute liver injury by reducing hepatotoxicity of liver NKT cells in IDO-dependent manner.<sup>(8,9)</sup>

Herewith, we describe an additional mechanism involved in MSC-mediated attenuation of acute liver failure that relies on the interaction between MSCs and Tregs in the injured livers. We showed that in the absence of Tregs, MSCs were not able to efficiently alleviate acute liver injury indicating the necessity and crucial importance of Tregs for the MSC-based attenuation of acute liver failure. Additionally, we described an additional, IDO-dependent mechanism by which MSCs promote expansion of Tregs and increased their capacity to produce interleukin (IL) 10, resulting in the suppression of NKT hepatotoxicity. Our data presented here indicate that MSC-based therapy could be used as a new therapeutic approach for the expansion of liver Tregs in the acute liver failure.

## Materials and Methods

### CELLS

Murine MSCs, isolated from bone marrow of C57BL/6 mice, were purchased from Gibco (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA) (catalog number S1502-100). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL of penicillin G, and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), at 37° in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. MSCs in passage 4 were used throughout the experiments.

### MOUSE HEPATOCYTE ISOLATION

Mouse hepatocytes were isolated as previously described.<sup>(10)</sup> Briefly, a cannula was inserted in the portal vein, and the liver was perfused for 15–20 minutes with T1 solution (0.9% NaCl, 0.05% KCl, 0.2% 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine ethanesulfonic acid, 0.08 mg/mL ethylene glycol tetraacetic acid, pH 7.4; all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As soon as the perfusion was started, the hepatic vein was immediately cut to allow the perfusate to run as a

*hepatocyte growth factor; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IgM, immunoglobulin M; IL, interleukin; IP, intraperitoneally; MNC, mononuclear cell; MSC, mesenchymal stem cell; MSC-CM, mesenchymal stem cell-conditioned medium; MZ, marginal zone; NKT, natural killer T cell; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein; RPMI-1640 medium, Roswell Park Memorial Institute 1640 medium; RTCA, real-time cell analyzer; SEM, standard error of the mean; SSC-H, side scatter height; TCR, T-cell receptor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Treg, regulatory T cell.*

*Address reprint requests to Vladislav Volarevic, M.D., Ph.D., Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica Street, 34000 Kragujevac, Serbia. Telephone: +38134306800; FAX: +3813430600, ext. 112; E-mail: drvolarevic@yahoo.com*

*This study was supported by Phillip Morris and Center for Leadership Development (grant "Start Up for Science"), Swiss National Science Foundation (SCOPE IZ73Z0\_152454/1), Novartis foundation for medical-biological research (grant number 16C197), Serbian Ministry of Science (ON175069, ON175103), and Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac (JP02/09, MP01/14).*

*Additional supporting information may be found in the online version of this article.*

*Copyright © 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.*

*View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).*

*DOI 10.1002/lt.25049*



waste. Then, the liver was perfused with T2 solution (0.6% NaCl, 0.05% KCl, 1.2% 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazine ethanesulfonic acid, 0.07% CaCl<sub>2</sub>, 3 g/mL collagenase Type I, pH 7.4; all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The disaggregated liver tissue was collected with a curved spatula and transferred into a plate where the tissue was mechanically disrupted with a scalpel. Minced tissue was collected with 2 mL of DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), filtered through a 70- $\mu$ m cell strainer, and centrifuged at 600 rpm for 4 minutes. The supernatant was removed; the pellet was resuspended in 3 mL of DMEM; and the cells were passed on 37.5% Percoll cushion (30 mL), centrifuged at 1050 rpm for 3 minutes, and resuspended in 2 mL of DMEM. Viable hepatocytes were counted.

## GENERATION OF MSC-CONDITIONED MEDIUM

MSCs seeded at a density of 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in a T75 flask<sup>(11)</sup> were cultured until reaching 80% confluence, and the culture medium was changed every 48 hours. After the last change of the medium, the 80% confluent cells were further cultured for 48 hours, and the medium designated as mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM) was collected.<sup>(12)</sup>

## PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF IDO

MSCs were cultured for 48 hours in culture medium containing 1 mM of 1-methyltryptophan (1-MT; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), an inhibitor of IDO enzymatic activity.<sup>(13)</sup>

## ANIMALS

Male 6-8-week-old C57BL/6 mice were used. All animals received humane care according to the criteria outlined in Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health publication 86-23, 1985 revision), and all experiments were approved by and conducted in accordance with the Guidelines of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac, Serbia. Mice were housed in a temperature-controlled environment with a 12-hour light-dark cycle and were administered standard laboratory chow and water ad libitum.

## MOUSE MODEL OF ACUTE LIVER FAILURE

C57BL/6 mice were given a single intravenous injection of  $\alpha$ -GalCer (50  $\mu$ g/kg) dissolved in 200  $\mu$ L of saline.<sup>(14)</sup> MSCs ( $5 \times 10^5$ ) were intravenously injected, via tail vein,<sup>(15)</sup> into C57BL/6 mice immediately after  $\alpha$ -GalCer administration ( $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice), while control animals received the appropriate amount of MSCs only or saline only. To demonstrate that soluble factors were responsible for the MSC-mediated inhibition of NKT function, mice were injected intravenously with 0.2 mL of MSC-CM or 0.2 mL MSC-CM+1-MT, immediately after  $\alpha$ -GalCer administration. Control animals received 0.2 mL of saline only.

Serum levels of alanine aminotransaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured before and 16 hours after  $\alpha$ -GalCer administration, by a standard photometric method using the automated biochemistry analyzer Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Germany) and Olympus AU reagents, according to the manufacturer's instructions.

## HISTOLOGICAL ANALYSES AND SEMIQUANTITATIVE ASSESSMENT OF LIVER INJURY

Histological analysis and semiquantitative determination of liver injury were performed as previously described.<sup>(16)</sup> Briefly, the isolated livers were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and consecutive 4- $\mu$ m tissue sections were cut at various depths and mounted on slides. Sections were stained with hematoxylin-eosin (H & E) and examined under low-power (100 $\times$ ) light microscopy (Zeiss Axioskop 40, Jena, Germany) equipped with a digital camera. The area of necrosis was quantified in H & E-stained liver section using ImageJ Software and was shown as a percentage of the total section area.<sup>(17)</sup> Sections were examined and scored by 2 independent investigators in a blind manner.

## DEPLETION OF REGULATORY CELLS

For Treg depletion, mice were injected intraperitoneally (IP) with cyclophosphamide (CY; Galenika A.D., Belgrade, Serbia) at a dose of 10 mg/kg or anti-CD25 antibody (PC61 mitochondrial antibody, Sigma-Aldrich,

Munich, Germany) at a dose of 250 mg/mouse at 3 days before  $\alpha$ -GalCer injection.<sup>(14,18)</sup> B cell depletion was accomplished by a single IP injection of anti-mouse CD20 antibody (Clone 5D2, Genentech, Inc., San Francisco, CA) at a dose of 10 mg/kg, and the same isotype immunoglobulin was used for control.<sup>(19)</sup>

## ISOLATION OF HEPATIC MONONUCLEAR CELLS AND ANALYSIS WITH FLOW CYTOMETRY

The isolation of liver-infiltrating mononuclear cells (MNCs) was conducted as previously described.<sup>(16)</sup> Hepatic MNCs were screened for various cell surface and intracellular markers with flow cytometry 2 hours after  $\alpha$ -GalCer injection. Briefly,  $1 \times 10^6$  MNCs were incubated with anti-mouse CD4, CD25, CD49b, CD23, CD21, immunoglobulin M (IgM), CD5, B220, CD19, CD11c, CD11b, and CD8 monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCP), or allophycocyanin (APC; all from BD Biosciences, San Jose, CA) following the manufacturer's instructions. MNCs derived from the liver were concomitantly stained for the intracellular content of forkhead box P3 (FOXP3), IL10, transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by using the BD fixation/permeabilization kit and anti-mouse monoclonal antibodies conjugated with FITC, PE, PerCP, and APC (BD Bioscience). For intracellular cytokine staining, cells were stimulated with 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate and 500 ng/mL ionomycin for 5 hours, and GolgiStop (BD Biosciences) was added. Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACSCalibur and analyzed by using the Flowing software analysis program (Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finland).

## ISOLATION OF NKTS

NKTS were isolated from hepatic MNCs by magnetic cell sorting according to the manufacturer's instructions. Single-cell suspensions of liver MNCs were labeled with a cocktail of biotin-conjugated monoclonal anti-mouse antibodies against NKp46, CD45R, CD8a, CD115, and TCR $\gamma\delta$  and MicroBeads conjugated to monoclonal anti-biotin antibody (Miltenyi Biotec). The labeled cells were subsequently depleted by separation over a MACS Column (Miltenyi Biotec), which was placed in the

magnetic field of a MACS Separator (Miltenyi Biotec). In the second step, the NK1.1+ NKTs were labeled with monoclonal anti-mouse NK1.1 antibody conjugated to APC and microBeads conjugated to monoclonal anti-mouse anti-APC antibody and positively selected using MACS Column (Miltenyi Biotec) and MACS Separator (Miltenyi Biotec). Isolated NKTs were then used in the coculture experiments and cytotoxicity assay as purified NKTs.

## ISOLATION OF TREGS

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs were isolated from mouse splenocytes by magnetic cell sorting according to the manufacturer's instructions. First, the spleens were minced in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI-1640 medium; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and forced gently through a 40-mm cell-strainer nylon mesh using a sterile syringe plunger and centrifuged at 400g for 5 minutes. Pelleted spleen cells were incubated in 2 mL of NH<sub>4</sub>Cl/Tris-Cl (pH 7.2) for 5 minutes, supplemented with 1 mL FBS, centrifuged at 400g for 5 minutes, and then resuspended in RPMI-1640 medium with 10% FBS.<sup>(10)</sup> Non-CD4<sup>+</sup> were indirectly magnetically labeled with a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD8, CD11b, CD45R, CD49b, Ter-119, and Anti-Biotin MicroBeads. The labeled cells were subsequently depleted over a MACS column. The enriched CD4<sup>+</sup> T cells were labeled with CD25 MicroBeads for subsequent positive selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Cell viability was determined by trypan blue staining.

## CYTOTOXICITY ASSAY

The dual-plate (DP) version of the xCELLigence system (Roche, Basel, Switzerland) was used as previously described.<sup>(8)</sup> Briefly, 100  $\mu$ L of complete medium was added to each well, and background impedance on the plates was measured on the xCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) DP instrument at 37° and 5% CO<sub>2</sub>. Effector (NKTs) to target (hepatocytes) ratio 10:1 was used.<sup>(20)</sup> Hepatocytes were resuspended in DMEM with 10% FBS at  $4 \times 10^5$  cells/mL. A total of 100  $\mu$ L hepatocytes were added to each well of the E16 plate, which was then placed in the xCELLigence RTCA DP. NKTs, isolated by magnetic separation, were counted and resuspended at a concentration of  $4 \times 10^6$  cells/mL in DMEM+10% FBS media. Then 100  $\mu$ L of NKTs or media alone was added to the respective wells. The E16 plates were placed in the

xCELLigence RTCA DP, and impedance measurements were recorded every 15 minutes for 24 hours at 37° and 5% CO<sub>2</sub>. NKT-mediated death of tumor cells was monitored in real time and was indicated by a decrease in cell index. Data were analyzed with RTCA Software 1.2 (ACEA Biosciences, San Diego, CA).

## IN VITRO EXPERIMENTS

For contact-independent cocultures, cells were cultured and physically separated using a 0.4- $\mu$ m porous transwell system (Corning Incorporated, Life Sciences, France).

Tregs, isolated from the untreated mice and in vitro stimulated with concanavalin A (2.5  $\mu$ g/mL) and IL2 (50 ng/mL),<sup>(21)</sup> were placed in the lower chamber (24-well transwell plate) and cultured in the presence (TregsMSCs) or in the absence of MSCs (Tregs). MSCs were seeded in the transwell inserts, and the ratio between MSCs and Tregs was 1:10.<sup>(22)</sup> After 48 hours of culture, expression of CD62L and chemokine (C-C motif) receptor 7 (CCR7) on Tregs and Tregs<sup>MSCs</sup> were analyzed by flow cytometry. Capacity of Tregs and Tregs<sup>MSCs</sup> to produce IL10 and TGF- $\beta$  was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In order to evaluate the importance of IDO inhibition for MSC-mediated priming of Tregs, contact-independent cocultures of Tregs and MSCs were grown in the presence (Tregs<sup>MSCs+1-MT</sup>) or in the absence of 1-MT (Tregs<sup>MSCs</sup>).<sup>(23)</sup> After 48 hours of culture, regulatory cells were harvested for adoptive transfer experiments. Immunoregulatory effects of Tregs<sup>MSCs</sup> and Tregs<sup>MSCs+1-MT</sup> on NKTs were examined in a direct coculture, at ratio 1:1. Precisely,  $1 \times 10^5$  Tregs<sup>MSCs</sup> or Tregs<sup>MSCs+1-MT</sup> were added to each well that contained  $1 \times 10^5$  NKTs.<sup>(24)</sup> Cytotoxicity of NKTs ( $4 \times 10^5$ /well) against hepatocytes ( $4 \times 10^4$ /well) were evaluated after 48 hours of culture.<sup>(20)</sup>

## TRANSFER OF TREGS

Tregs or Tregs<sup>MSCs</sup> were intravenously injected ( $1 \times 10^6$  cells resuspended in 0.2 mL of saline) into CY-treated animals 24 hours before  $\alpha$ -GalCer administration.<sup>(25)</sup>

## INTRAHEPATIC DETECTION OF TREGS

Tregs or Tregs<sup>MSCs</sup> were fluorescence-labeled using preincubation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR) according

to the manufacturer's instructions.<sup>(26)</sup> For homing assays,  $1 \times 10^6$  CFSE-labeled Tregs or Tregs<sup>MSCs</sup> were injected into the tail veins of CY-treated mice 24 hours before  $\alpha$ -GalCer administration. MNC suspensions were prepared from liver tissues 2 hours after  $\alpha$ -GalCer injection and analyzed by flow cytometry.

## MEASUREMENT OF CYTOKINES

Levels of TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL10, TGF- $\beta$ , and hepatocyte growth factor (HGF) in the mouse serum and cell supernatants were measured using ELISA kits specific for the mouse cytokines (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.<sup>(8)</sup>

## DETECTION OF KYNURENINE

IDO activity was determined by spectrophotometric assay for kynurenine in the MSC-CM and MSC-CM+1-MT.<sup>(27)</sup>

## RNA ISOLATION AND REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ANALYSIS

Total RNA from mice livers were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The fold change of messenger RNA gene expression for IDO, IFN $\gamma$ , and  $\beta$ -actin as a housekeeping gene (Invitrogen, Carlsbad, CA) was calculated as described.<sup>(28)</sup>

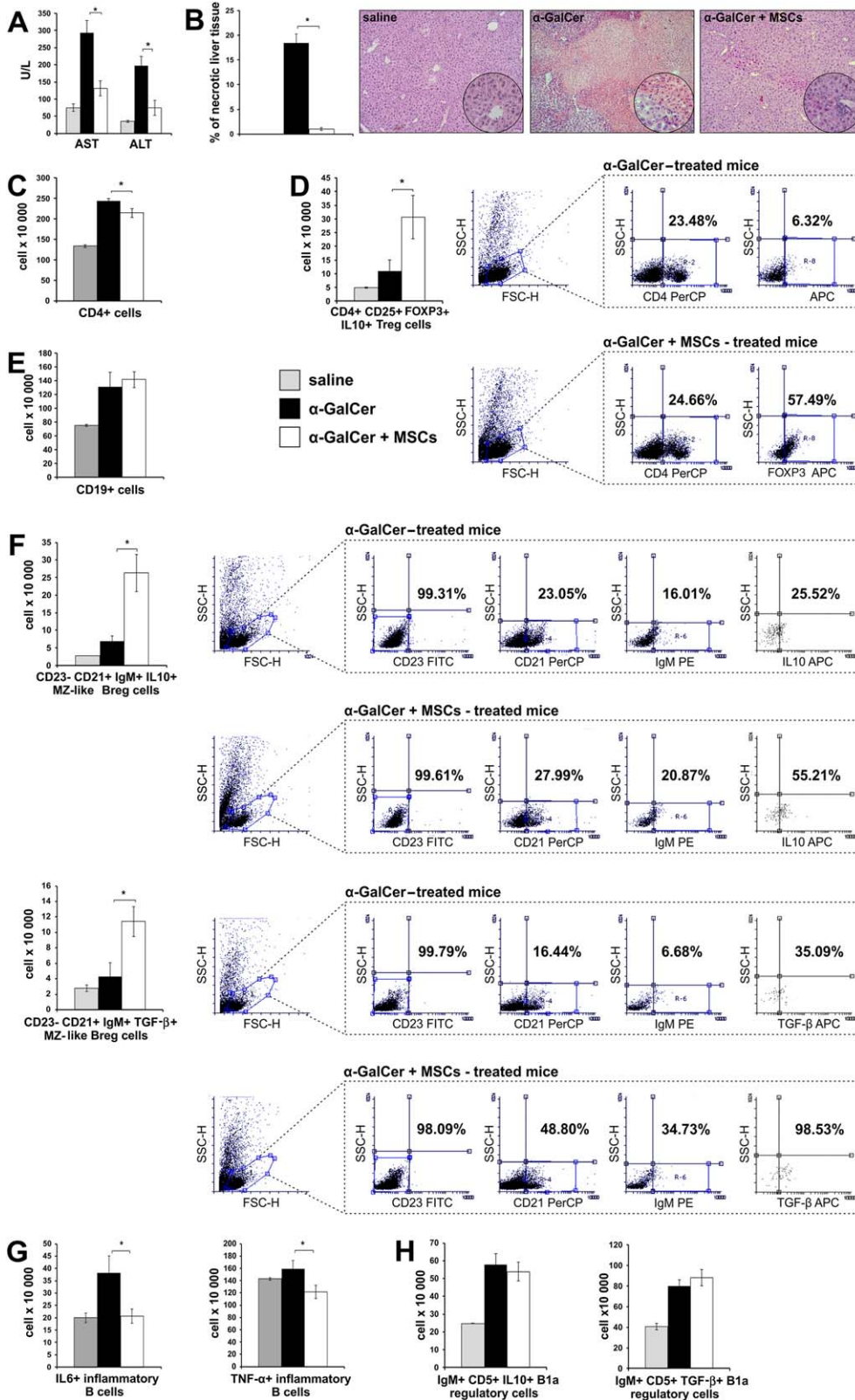
## STATISTICAL ANALYSIS

Results were analyzed using the Student *t* test. All data in this study were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Values of *P* < 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

### MSC-DEPENDENT ATTENUATION OF ACUTE LIVER FAILURE IS ACCOMPANIED WITH AN INCREASED PRESENCE OF TREGS AND REGULATORY B CELLS IN THE LIVER

Single intravenous injection of MSCs efficiently attenuated acute liver failure in mice (Fig. 1). Serum



**FIG. 1.** MSC-dependent attenuation of  $\alpha$ -GalCer-induced hepatitis is accompanied with an increased presence of Tregs and Bregs in the liver. (A) Serum AST and ALT levels; (B) histological examination was performed with H & E staining. Semiquantitative determination of liver injury estimated by ImageJ software. Total numbers of liver-infiltrating (C) CD4+ cells, (D) IL10-producing CD4+ CD25+ FOXP3+ Tregs with representative flow cytometry dot plots, (E) CD19+ cells (F) IL10-producing CD23- CD21+ IgM+ MZ-like Bregs with representative flow cytometry dot plots and (G) IL6-producing and TNF- $\alpha$ -producing inflammatory B220+ cells in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated and  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice are shown. (H) Total numbers of peritoneal B1a (IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) and B1b (IgM<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) regulatory cells. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 10 per group). \*P < 0.05.

AST and ALT levels 16 hours after  $\alpha$ -GalCer injection were significantly decreased in  $\alpha$ -GalCer+MSCs-treated mice, compared with mice that received  $\alpha$ -GalCer only ( $P < 0.05$ ; Fig. 1A). Histopathological analysis of the liver confirmed these findings (Fig. 1B). Liver tissue sections in  $\alpha$ -GalCer-treated mice showed widespread areas of massive coagulative necrosis with extensive infiltration of MNCs, within liver lobules and around the central veins and portal tracts, indicating the ongoing inflammatory process (Fig. 1B). In contrast, there were only several solitary areas of necrotic tissue in  $\alpha$ -GalCer-treated mice that received MSCs resulting in significantly reduced total size of the hepatic necrotic areas (Fig. 1B).

The decrease in liver damage by MSCs was associated with the extensive infiltration of hepatoprotective regulatory cells within the liver (Fig. 1D,F). The flow cytometric analysis revealed a significant decrease in total number of CD4<sup>+</sup> cells ( $P < 0.05$ ; Fig. 1C) and significant increase in the total number of IL10-producing Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) in the livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice compared with animals treated with  $\alpha$ -GalCer only ( $P < 0.05$ ; Fig. 1D). Although there was no significant difference in the total number of liver-infiltrated CD19<sup>+</sup> B cells between experimental groups ( $P > 0.05$ ; Fig. 1E), MSC treatment expanded regulatory and attenuated inflammatory B cells in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated mice (Fig. 1F,G). The total number of IL10-producing and TGF- $\beta$ -producing marginal zone (MZ)-like regulatory B cells (Bregs) (CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>) was significantly higher ( $P < 0.05$ ; Fig. 1F), whereas the total number of IL6 and TNF- $\alpha$ -producing inflammatory B cells was notably lower in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated mice that received MSCs ( $P < 0.05$ ; Fig. 1G). There was no significant difference in the total number of liver-infiltrating IL10-producing and TGF- $\beta$ -producing peritoneal B1a (IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) and B1b regulatory cells (IgM<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) between the experimental groups ( $P > 0.05$ ; Fig. 1H), suggesting that MSC-mediated attenuation of  $\alpha$ -GalCer-induced liver damage may be a consequence of an increased presence of MZ-like Bregs and Tregs in the injured liver. Because both regulatory cell populations were notably lower in the spleens of  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice (Supporting Fig. 1), we assumed that MSCs promoted migration of these regulatory cells from the spleen into the injured livers where they suppress inflammation.<sup>(19)</sup>

## B CELL DEPLETION DID NOT AFFECT MSC-MEDIATED SUPPRESSION OF $\alpha$ -GALCER-INDUCED HEPATITIS

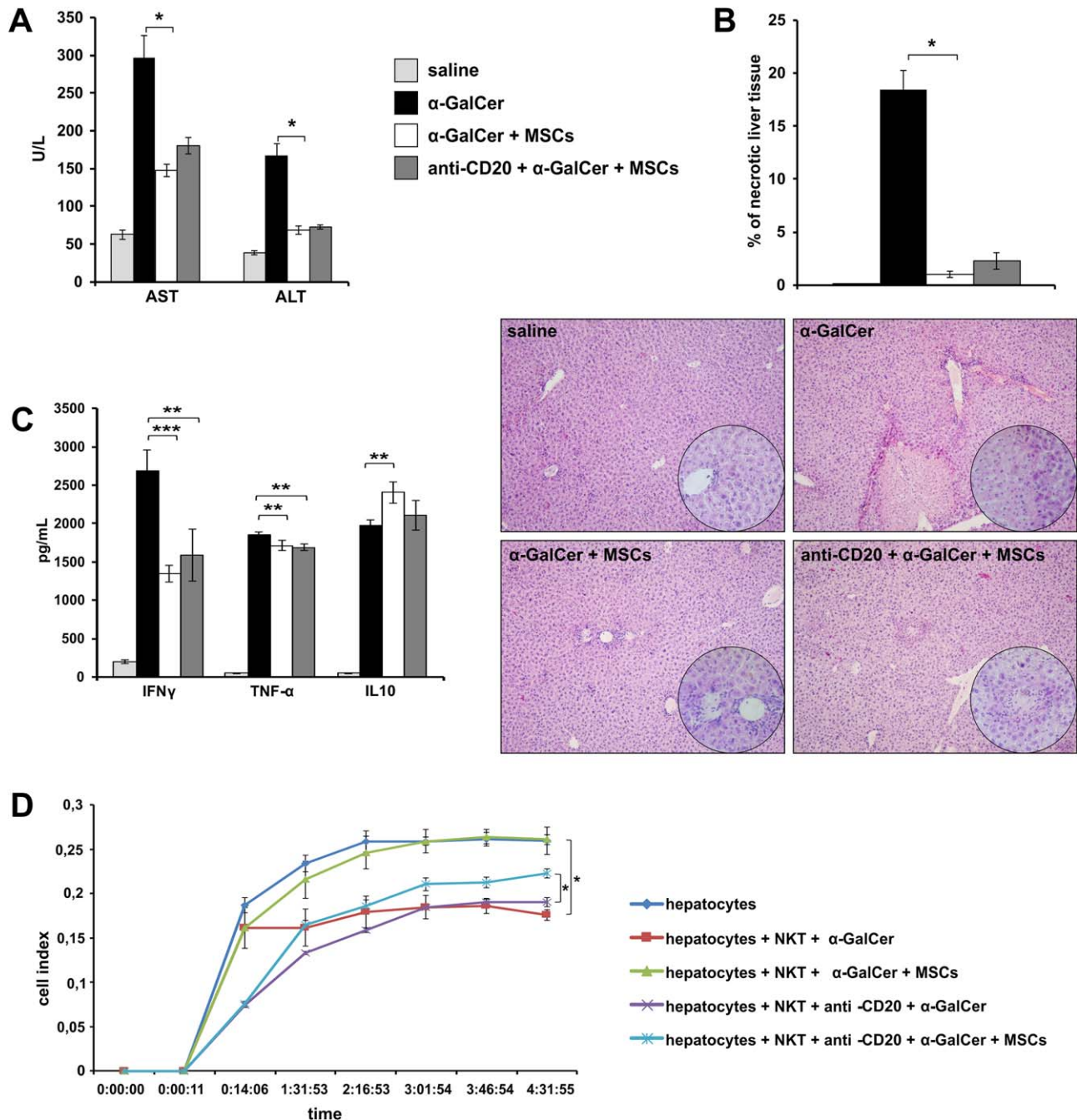
In the presence of MSCs, plasmablast formation is reduced and development of IL10-producing Bregs is induced.<sup>(19,29)</sup> In order to delineate the importance of Bregs in MSC-mediated attenuation of acute liver injury, we analyzed the effects of B cell depletion in  $\alpha$ -GalCer-treated animals. Anti-CD20 antibody treatment efficiently depleted B cells in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated animals (Supporting Fig. 2A, left panel). Depletion of Bregs (Supporting Fig. 2A, right panel) significantly aggravated liver failure in anti-CD20+ $\alpha$ -GalCer-treated mice (Supporting Fig. 2B,C), indicating the importance of Bregs in attenuation of NKT-mediated acute liver injury. However, depletion of Bregs did not affect the capacity of MSCs to ameliorate acute liver failure, as determined by liver enzyme tests (Fig. 2A) and histological analysis (Fig. 2B). As shown in Fig. 2A, MSCs decreased serum levels of AST ( $P < 0.05$ ) and ALT ( $P < 0.05$ ) in anti-CD20+ $\alpha$ -GalCer-treated mice in a similar manner as in  $\alpha$ -GalCer-treated animals. Histopathological analysis confirmed these findings (Fig. 2B). Liver damage was reduced in a similar manner in the livers of anti-CD20+ $\alpha$ -GalCer+MSC- and  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice (Fig. 2B).

In line with these findings, there was no significant difference in the serum levels of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) and anti-inflammatory IL10 between anti-CD20+ $\alpha$ -GalCer+MSC-treated and  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice ( $P > 0.05$ ; Fig. 2C), indicating that Bregs were not directly involved in MSC-mediated attenuation of acute liver inflammation.

Additionally, NKTs isolated from the livers of anti-CD20+ $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice were as hepatotoxic as liver NKTs derived from  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated animals (Fig. 2D), confirming that depletion of Bregs did not affect MSC-mediated suppression of NKT hepatotoxicity.

## TREGS ARE CRITICALLY INVOLVED IN MSC-MEDIATED SUPPRESSION OF $\alpha$ -GALCER-INDUCED LIVER INJURY

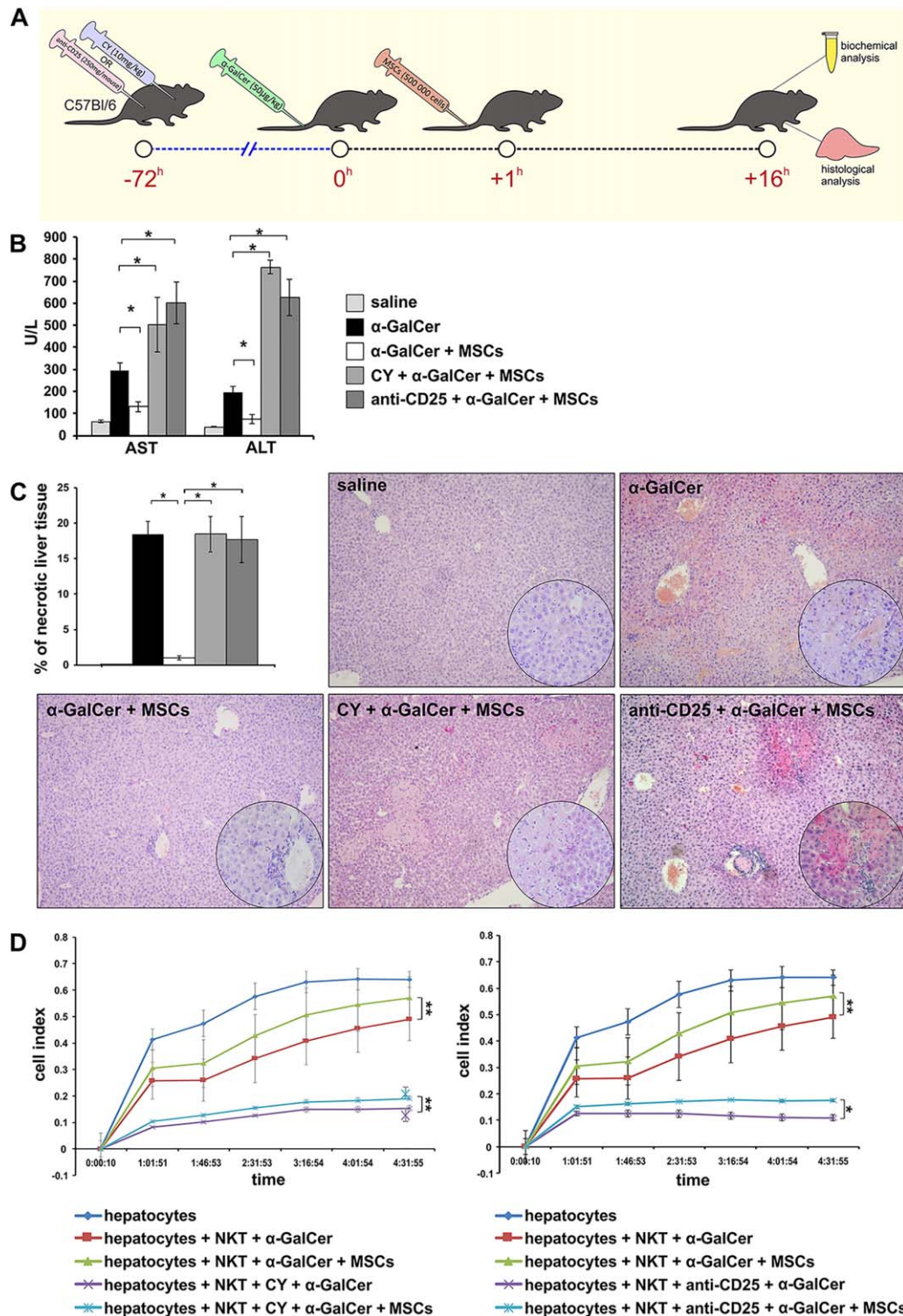
In order to determine whether Tregs had a crucial role in MSC-dependent attenuation of acute liver failure,



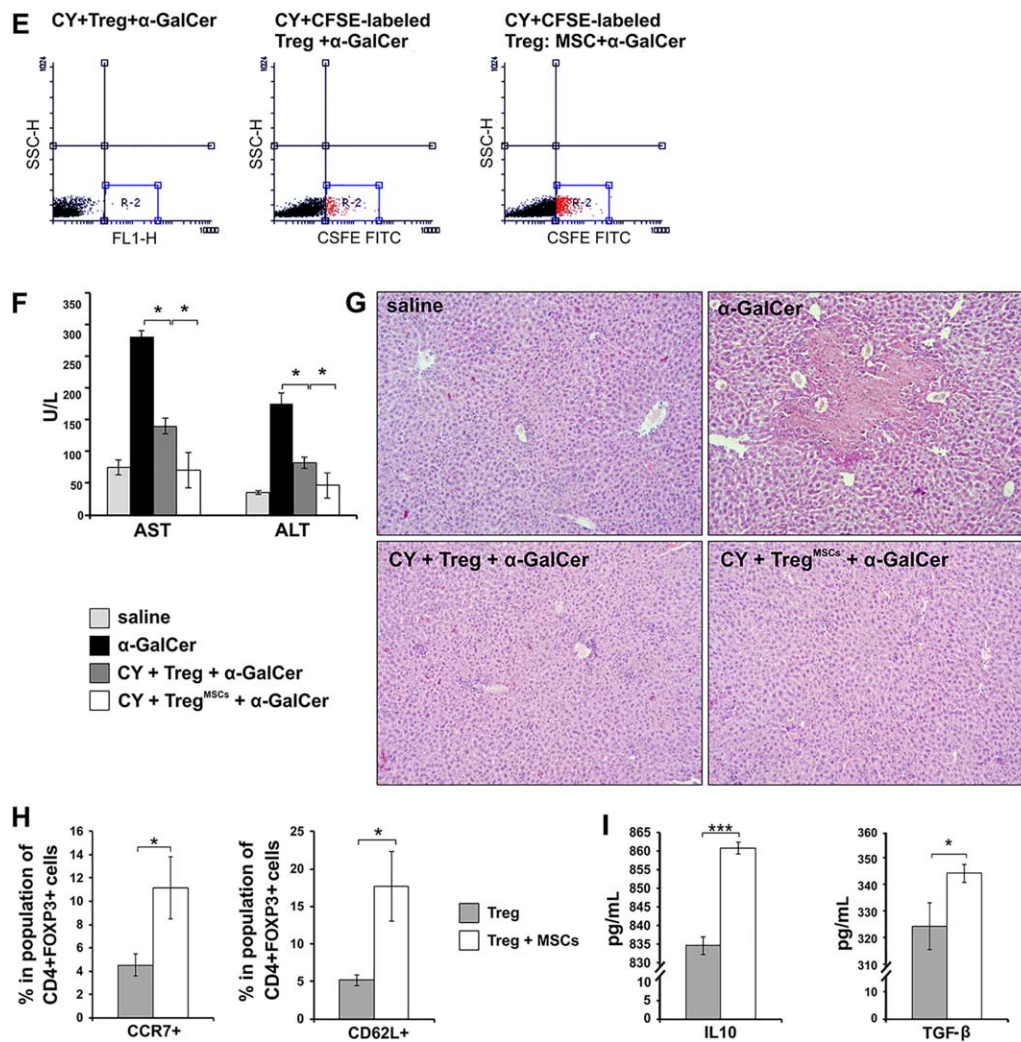
**FIG. 2.** B cell depletion did not affect MSC-mediated attenuation of acute liver inflammation. (A) Serum AST and ALT levels; (B) representative H & E-stained mouse livers. Semiquantitative determination of liver injury estimated by ImageJ software. (C) The level of cytokines in serum; (D) cytotoxic potential of NKTs against the hepatocytes in vitro as determined by the xCELLigence system. Values are mean  $\pm$  SEM (n = 10 per group). \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001.

the effects of CY and anti-CD25 antibody-induced depletion of Tregs were analyzed in  $\alpha$ -GalCer+MSCs-treated mice (Fig. 3A). CY selectively depleted Tregs (Supporting Fig. 3A) without affecting

immunosuppressive (CD11c+CD11b-CD8+IL10+) and inflammatory (CD11c+CD11b+CD8-) subpopulations of liver-infiltrated CD11c+ dendritic cell (DCs) (Supporting Fig. 3B). CY as well as anti-CD25



**FIG. 3.** Tregs are critically involved in MSC-mediated suppression of  $\alpha$ -GalCer-induced liver injury. (A) C57BL/6 mice were given an IP injection of CY (10 mg/kg) or anti-CD25 monoclonal antibody (250 mg/mouse), 72 hours before  $\alpha$ -GalCer administration (50  $\mu$ g/kg). MSCs ( $5 \times 10^5$ ) were intravenously injected into the tail vein of C57BL/6 mice 1 hour after  $\alpha$ -GalCer application. Biochemical and histological analyses were performed 16 hours after treatment. (B) Serum AST and ALT levels, (C) representative H & E-stained mouse livers. Percentage of necrotic liver tissue, estimated by ImageJ software. (D) The results obtained by the xCELLigence system showed less hepatotoxicity of liver NKTs isolated from  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice than NKTs isolated from the livers of CY+ $\alpha$ -GalCer+MSC-treated (left panel) and anti-CD25+ $\alpha$ -GalCer+MSC-treated animals (right panel).



**FIG. 3.** (E) Detection of CFSE-labeled Tregs and Tregs<sup>MSCs</sup> in the liver; (F) passive transfer of MSC-primed Tregs significantly decreased serum level of transaminases in CY+α-GalCer-treated mice; and (G) H & E staining showing reduced liver damage in CY+Tregs<sup>MSCs</sup>+α-GalCer-treated animals. (H) The percentage of CCR7 and CD62L expressing cells in a population of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs, (I) The level of IL10 and TGF-β cytokines in supernatants. Values are mean ± SEM (n = 10 per group). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

antibody-induced depletion of Tregs significantly aggravated acute liver failure in α-GalCer-treated animals indicating the importance of Tregs for the suppression of acute liver injury (Fig. 3B,C). Importantly, depletion of Tregs completely abrogated the hepatoprotective activity of MSCs in α-GalCer-induced acute liver failure (Fig. 3B,C). A significantly higher serum levels of AST and ALT (*P* < 0.05; Fig. 3B) and a significantly higher percentage of liver parenchyma with necrotic damage (*P* < 0.05; Fig. 3C) accompanied with an

extensive infiltration of MNCs were noticed in the livers of CY+α-GalCer+MSC-treated and anti-CD25+α-GalCer+MSC-treated mice compared with α-GalCer+MSC-treated animals.

Depletion of Tregs significantly reduced MSC-mediated attenuation of NKT hepatotoxicity (Fig. 3D). NKTs isolated from the livers of α-GalCer+MSC-treated mice were significantly less cytotoxic against hepatocytes than NKTs isolated from the livers of CY+α-GalCer+MSC-treated (*P* < 0.05;



Fig. 3D, left panel) and anti-CD25+ $\alpha$ -GalCer+ MSC-treated animals ( $P < 0.05$ ; Fig. 3D, right panel).

In order to confirm that MSC-Treg interplay is directly responsible for MSC-mediated modulation of  $\alpha$ -GalCer-induced liver injury, CY+ $\alpha$ -GalCer-treated animals received either Tregs or Tregs cocultured in a transwell system with MSCs (Tregs<sup>MSCs</sup>).

Intravenously injected Tregs and Tregs<sup>MSCs</sup> migrated in the livers of CY+ $\alpha$ -GalCer-treated mice (Fig. 3E) and managed to attenuate acute liver injury (Fig. 3F,G). Importantly, this phenomenon was remarkably intensified in CY+ $\alpha$ -GalCer-treated animals that received Tregs<sup>MSCs</sup> (Fig. 3F,G), indicating that MSCs increased the capacity of Tregs to migrate in the injured liver and to attenuate acute liver failure. In line with these findings, a significantly higher expression of CD62L and CCR7, involved in MSC-regulated migration of Tregs,<sup>(30)</sup> was noticed on Tregs<sup>MSCs</sup> when compared with Tregs ( $P < 0.05$ ; Fig. 3H). Similarly, MSCs notably increased the capacity of Tregs to produce immunosuppressive IL10 ( $P < 0.001$ ) and TGF- $\beta$  ( $P < 0.05$ ; Fig. 3I).

## IN ACUTE LIVER FAILURE, MSCS PROMOTE EXPANSION OF TREGS IN A PARACRINE IDO-DEPENDENT MANNER

In order to explore whether MSCs are able to induce expansion of Tregs in vivo, in the same paracrine manner as in vitro, the therapeutic effects of MSC-CM were analyzed in  $\alpha$ -GalCer-treated mice (Fig. 4). MSC-CM treatment managed to significantly attenuate  $\alpha$ -GalCer-induced hepatocyte damage as evaluated by biochemical parameters (Fig. 4A) and histological analysis (Fig. 4B). A diminished inflammatory injury in  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated mice correlated with the significantly higher presence of IL10-producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Tregs in the livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated mice when compared with  $\alpha$ -GalCer-treated animals ( $P < 0.05$ ; Fig. 4C), confirming that MSC-derived soluble factors are responsible for an increased number of Tregs in injured livers.

It is well-known that, among all MSC-derived immunosuppressive factors, IDO, IL10, HGF, and TGF- $\beta$  are mainly responsible for MSC-based attenuation of acute liver injury.<sup>(31)</sup> Because IDO has been identified as a critical molecular switch that simultaneously blocks reprogramming of Tregs into effector T cells,<sup>(32)</sup> we examined the expression of IDO in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated animals and evaluated the

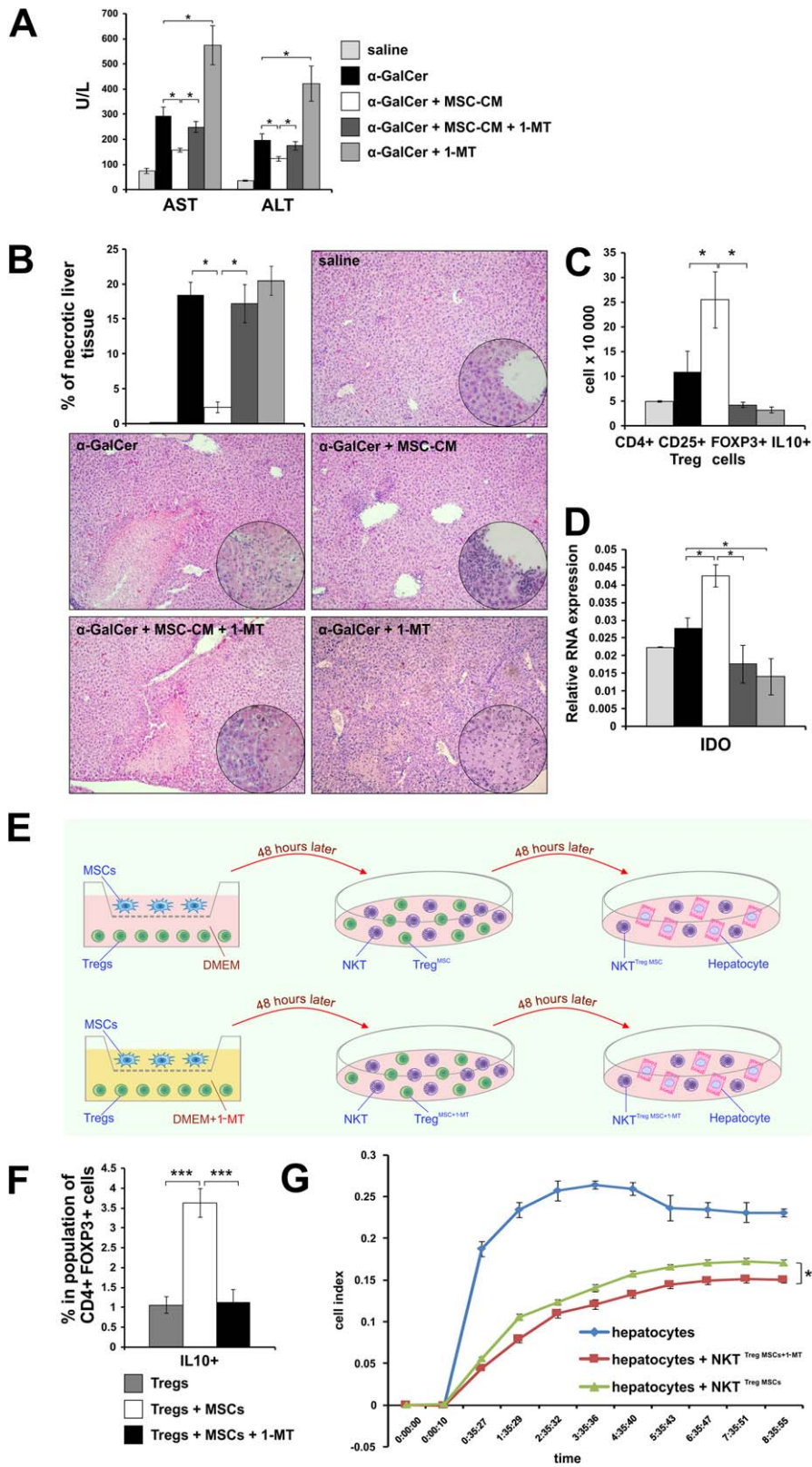
effects of IDO inhibitor (1-MT) in MSC-dependent modulation of acute liver failure.

Expression of IDO in the livers of  $\alpha$ -GalCer-treated mice (Fig. 4D) negatively corresponded with the extent of liver injury (Fig. 4A,B), but positively correlated with the total number of liver-infiltrated Tregs (Fig. 4C). Application of 1-MT significantly down-regulated expression of IDO in the injured livers ( $P < 0.05$ ; Fig. 4D), exacerbated  $\alpha$ -GalCer-induced acute liver injury (Fig. 4A,B) and remarkably attenuated the total number of liver Tregs ( $P < 0.05$ ; Fig. 4C), indicating the importance of IDO for Treg-mediated attenuation of acute liver failure.

Accordingly, we further analyzed effects of 1-MT on the immunosuppressive potential of MSC-CM and on MSC-CM-dependent expansion of Tregs and attenuation of  $\alpha$ -GalCer-induced liver injury; 1-MT significantly attenuated concentration of kynurenine ( $P < 0.05$ ; Supporting Fig. 4A), but it did not alter concentration of other immunosuppressive factors (IL10, HGF, and TGF- $\beta$ ) in MSC-CM ( $P > 0.05$ ; Supporting Fig. 4B). Importantly, 1-MT completely abrogated the therapeutic effects of MSC-CM in vivo, as evaluated by remarkably higher serum levels of AST and ALT in  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM+1-MT-treated mice compared with  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated animals ( $P < 0.05$ ; Fig. 4A). Histological analysis confirmed these findings (Fig. 4B). H & E staining showed destruction of the hepatic architecture, massive infiltration of inflammatory cells, and extensive hepatocellular necrosis in the  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM+1-MT-treated group that was opposite to the attenuated liver injury and inflammation noticed in  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated animals (Fig. 4B).

The total number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> Tregs was significantly attenuated in the livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM+1-MT-treated mice compared with  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated animals ( $P < 0.05$ ; Fig. 4C), indicating the crucial importance of IDO for MSC-CM-dependent expansion of Tregs in injured livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-treated animals.

In order to confirm the importance of MSC-derived IDO for Treg-dependent suppression of NKT hepatotoxicity, in vitro experiments were performed (Fig. 4E). MSCs, in paracrine manner, significantly increased capacity of Tregs to produce immunosuppressive IL10 ( $P < 0.001$ ; Fig. 4F), and this phenomenon was completely abrogated in the presence of 1-MT ( $P < 0.001$ ; Fig. 4F). Accordingly, an addition of 1-MT in MSC-Tregs culture attenuated the capacity of Tregs to suppress hepatotoxicity of NKTs,



**FIG. 4.** In acute liver failure, MSCs promote expansion of Tregs in paracrine, IDO dependent manner. (A) Serum AST and ALT levels; (B) representative H & E-stained mouse livers. Percentage of necrotic liver tissue, estimated by ImageJ software, (C) total number of liver-infiltrating IL10-producing  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Tregs; (D) expression of IDO in the livers. (E) Scheme of experimental design. (F) The percentage of IL10-producing cells in a population of  $CD4^+FOXP3^+$  Tregs cocultured with MSCs in transwell systems in the presence or in the absence of IDO inhibitor; (G) hepatotoxicity of NKTs against hepatocytes in vitro determined by the xCELLigence system.

indicating that MSC-mediated priming of Tregs is IDO dependent ( $P < 0.05$ ; Fig. 4G).

## Discussion

Therapeutic potential of MSCs in the treatment of acute liver failure has already been well described by us and others.<sup>(1,8,9)</sup> It is well-known that MSCs promote induction and expansion of Tregs and Bregs,<sup>(33-39)</sup> but the impact of these regulatory cells in MSC-mediated attenuation of acute liver failure was unknown. Accordingly, herewith, we described the molecular mechanisms involved in the crosstalk between MSCs and liver regulatory cells during acute liver inflammation.

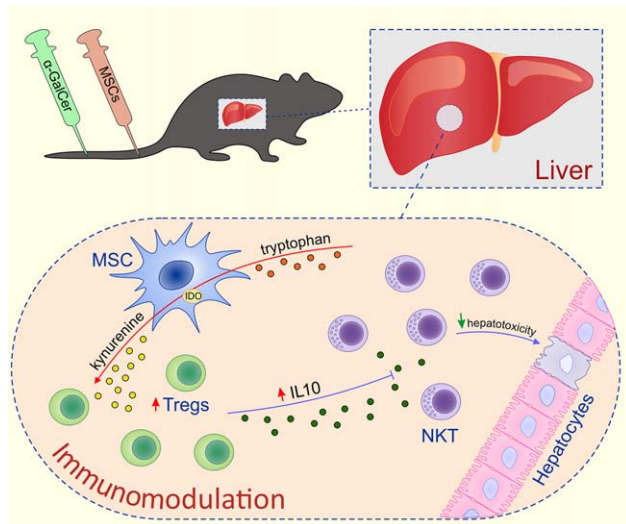
Since it was recently shown that Bregs play an important role in the attenuation of fulminant hepatitis<sup>(19)</sup> and that, under inflammatory conditions, MSCs reduce plasmablast formation and promote development of IL10-producing Bregs,<sup>(29,40)</sup> we first analyzed the interaction between MSCs and Bregs in the injured livers. Although a significantly higher number of MZ-like IL10-producing and TGF- $\beta$ -producing Bregs was noticed in the livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice when compared with  $\alpha$ -GalCer-treated animals (Fig. 1F), the increased presence of Bregs was not essential for MSC-mediated suppression of acute liver failure, because their depletion did not alter the capacity of MSCs to attenuate acute liver failure (Fig. 2). However, depletion of Tregs completely abrogated beneficial effects of MSCs (Fig. 3), indicating the necessity and importance of Tregs for MSC-mediated alleviation of acute liver failure.

Tregs are residing in the liver where they have a crucial role in the maintenance of immunologic tolerance.<sup>(41)</sup> As a result of the decreased number of intrahepatic Tregs, the liver rapidly switches from an immune privilege organ into the organ enriched with the inflammatory and hepatotoxic cells.<sup>(42)</sup> Because liver Tregs are mainly responsible for the suppression of immune cell-mediated damage of hepatocytes during acute liver injury,<sup>(43,44)</sup> their depletion resulted in the aggravation of acute liver failure (Supporting Fig. 3C,D). Accordingly, repopulation of intrahepatic Tregs is a crucially important step for the attenuation of acute liver inflammation.<sup>(41)</sup> MSCs are able to promote induction and expansion of Tregs *in vitro*.<sup>(45)</sup> In line with these findings, we demonstrated that a single intravenous injection of MSCs or MSC-CM managed to rapidly increase the total number of Tregs in the

injured livers (Figs. 1D and 4C), resulting with the attenuation of acute liver failure. Importantly, depletion of Tregs completely abrogated hepatoprotective effects of MSCs (Fig. 3A-C) and inhibited their capacity to attenuate hepatotoxicity of liver NKTs (Fig. 3D), indicating that Tregs were critically involved in MSC-based modulation of acute liver inflammation.

It has already been shown by us and others that adoptive transfer of Tregs reduce hepatic damage in mice.<sup>(44,46)</sup> Herewith, we demonstrated that MSCs significantly enhanced immunosuppressive and hepatoprotective potential of Tregs (Fig. 3F-I). When Tregs were cocultured with MSCs, their capacity to migrate in the injured livers and suppress acute liver inflammation was significantly intensified (Fig. 3H,I). An increased expression of CD62L and CCR7 (Fig. 3H) and increased production of immunosuppressive IL10 and TGF- $\beta$  were noticed in MSC-primed Tregs (Fig. 3I). Because CD62L and CCR7 are involved in MSC-regulated migration of Tregs<sup>(30)</sup> and IL10 and TGF- $\beta$  are mainly responsible for Treg-dependent attenuation of acute liver injury,<sup>(25)</sup> adoptive transfer of MSC-primed Tregs resulted in the complete attenuation of acute liver failure (Fig. 3F,G).

Previously published studies showed that MSCs can promote generation and expansion of Tregs in a paracrine manner through the production of prostaglandin E2 and TGF- $\beta$ .<sup>(37)</sup> Because we did not find any differences in the serum levels of prostaglandin E2 and TGF- $\beta$  between  $\alpha$ -GalCer and  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated animals (Supporting Fig. 5A,B), but we noticed increased levels of IDO and kynurenine in  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice (Supporting Fig. 5C,D), we focused our attention on IDO, an important MSC-derived immunomodulatory factor. MSC-derived IDO inhibits the generation of cytotoxic T lymphocytes and attenuates cytotoxicity of natural killer cells.<sup>(47,48)</sup> Most recently, we described the importance of IDO for MSC-mediated suppression of NKTs, major effector cells in acute liver failure.<sup>(8,9)</sup> It is well-known that intravenously injected  $\alpha$ -GalCer induces production of IFN $\gamma$  in liver NKTs.<sup>(8)</sup> Herewith, we showed that MSCs, under the influence of increased levels of IFN $\gamma$  (Supporting Fig. 5E), increased IDO activity (Supporting Fig. 5C,D) and in an IDO-dependent manner reduce hepatotoxicity of NKTs (Fig. 3) resulting with the attenuation of acute liver injury and inflammation (Fig. 1). MSC-derived IDO was crucially important for the expansion of Tregs in the livers of MSCs and MSC-CM-treated



**FIG. 5.** Schematic diagram describing the mechanism responsible for MSC-mediated induction of Treg cells and attenuation of acute liver failure. MSCs, in paracrine manner, through the production of IDO, induced increased production of IL10 in Tregs, which in turn, in IL10-dependent manner, attenuated hepatotoxicity of liver NKTs, resulting with the attenuation of fulminant hepatitis.

mice with acute liver failure (Fig. 4). IDO-mediated regulation of tryptophan metabolism is a highly versatile modulator of cellular immunity.<sup>(6)</sup> IDO converts tryptophan to kynurenine, which inhibits the proliferation of effector T cells,<sup>(49)</sup> but promotes expression of Treg lineage-defining transcription factor FOXP3.<sup>(41)</sup> In line with these findings, injection of MSCs or MSC-CM significantly increased the total number of liver Tregs (Fig. 1D and 4C), a phenomenon that was completely abrogated when MSCs were cultured in the presence of IDO inhibitor (Fig. 4C). Moreover, an addition of 1-MT in MSC-Tregs coculture significantly attenuated the capacity of MSC-primed Tregs to suppress hepatotoxicity of NKTs (Fig. 4G).

Tregs suppress activation of liver NKTs in an IL10-dependent manner.<sup>(50)</sup> Intravenously injected IDO induces the production of immunosuppressive IL10 in activated lymphocytes, whereas 1-MT significantly reduces capacity of stimulated lymphocytes to secrete IL10.<sup>(51)</sup> Because MSCs, in a paracrine manner, significantly increased the capacity of Tregs to produce immunosuppressive IL10 and that this phenomenon was abrogated by 1-MT (Fig. 4F), we propose that MSCs, through the production of IDO, induced increased production of IL10 in Tregs, which in turn,

in an IL10-dependent manner, attenuated hepatotoxicity of liver NKTs, resulting in the attenuation of acute liver failure (Fig. 5).

In conclusion, our data highlighted the crucial importance of Tregs for MSC-based attenuation of acute liver failure and indicated the significance of MSC-mediated priming of Tregs as a new therapeutic approach in Tregs-based therapy of acute liver failure.

## REFERENCES

- 1) Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* 2014;32:2818-2823.
- 2) Liang XS, Li CZ, Zhou Y, Yin W, Liu YY, Fan WH. Changes in circulating Foxp3(+) regulatory T cells and interleukin-17-producing T helper cells during HBV-related acute-on-chronic liver failure. *World J Gastroenterol* 2014;20:8558-8571.
- 3) Wang X, Sun L, Zhang L, Jiang Z. Effect of adoptive transfer or depletion of regulatory T cells on triptolide-induced liver injury. *Front Pharmacol* 2016;7:99.
- 4) Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 2009;30:656-665.
- 5) Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med* 2013;369:2525-2534.
- 6) Ito H, Hoshi M, Ohtaki H, Taguchi A, Ando K, Ishikawa T, et al. Ability of IDO to attenuate liver injury in alpha-galactosylceramide-induced hepatitis model. *J Immunol* 2010;185:4554-4560.
- 7) Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010;59:595-604.
- 8) Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, et al. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver natural killer T cells in an inducible nitric oxide synthase- and indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12:e1173-e1185.
- 9) Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, et al. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transpl* 2017;23:1040-1050.
- 10) Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, et al. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol* 2015;89:437-450.
- 11) Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep* 2015;12:20-30.
- 12) Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014;9:e107001.
- 13) Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009;41:315-324.

- 14) Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015;45:531-543.
- 15) Truong NH, Nguyen NH, Le TV, Vu NB, Huynh N, Nguyen TV, et al. Comparison of the treatment efficiency of bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation via tail and portal veins in CCL4-induced mouse liver fibrosis. *Stem Cells Int* 2016;2016:5720413.
- 16) Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol* 2012;56:26-33.
- 17) Mochizuki A, Pace A, Rockwell CE, Roth KJ, Chow A, O'Brien KM, et al. Hepatic stellate cells orchestrate clearance of necrotic cells in a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -dependent manner by modulating macrophage phenotype in mice. *J Immunol* 2014;192:3847-3857.
- 18) Setiady YY, Coccia JA, Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fc $\gamma$ RIII+ phagocytes. *Eur J Immunol* 2010;40:780-786.
- 19) Almishri W, Deans J, Swain MG. Rapid activation and hepatic recruitment of innate-like regulatory B cells after invariant NKT cell stimulation in mice. *J Hepatol* 2015;63:943-951.
- 20) Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2013;191:293-301.
- 21) Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, et al. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells - an experimental study. *Transpl Int* 2018;31:102-115.
- 22) Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegría J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:65.
- 23) Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L; for MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytherapy* 2013;15:1054-1061.
- 24) Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63:4516-4520.
- 25) Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007;45:475-485.
- 26) Parish CR, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol* 2002;Chapter 4:Unit 4.9.
- 27) Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014;74:1576-1587.
- 28) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402-408.
- 29) Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, Strini T, Boon L, Lombardo E, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* 2015;33:880-891.
- 30) Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2008;26:2531-2541.
- 31) Gazdic M, Arsenijevic A, Markovic BS, Volarevic A, Dimova I, Djonov V, et al. Mesenchymal stem cell-dependent modulation of liver diseases. *Int J Biol Sci* 2017;13:1109-1117.
- 32) Volarevic V, Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors* 2017;43:633-644.
- 33) Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010;185:302-312.
- 34) Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol* 2013;43:182-187.
- 35) Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516-525.
- 36) Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008;26:212-222.
- 37) English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009;156:149-160.
- 38) Cho KA, Lee JK, Kim YH, Park M, Woo SY, Ryu KH. Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner. *Cell Mol Immunol* 2017;doi:10.1038/cmi.2016.59.
- 39) Fan L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between mesenchymal stem cells and B-cells. *Int J Mol Sci* 2016;17:E650.
- 40) Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, et al. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Front Immunol* 2017;8:1042.
- 41) Jeffery HC, Braitch MK, Brown S, Oo YH. Clinical potential of regulatory T cell therapy in liver diseases: an overview and current perspectives. *Front Immunol* 2016;7:334.
- 42) Lu L, Feng M, Gu J, Xia Z, Zhang H, Zheng S, et al. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- $\beta$  is critical for immune homeostasis following acute liver injury. *J Mol Cell Biol* 2013;5:369-379.
- 43) Stross L, Günther J, Gasteiger G, Asen T, Graf S, Aichler M, et al. Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental hepatitis B virus infection in mice. *Hepatology* 2012;56:873-883.
- 44) Wei HX, Chuang YH, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against

- T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF- $\beta$ -dependent manner in mice. *J Immunol* 2008;181:7221-7229.
- 45) Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 2015;11:280-287.
  - 46) Czaja AJ. Adoptive cell transfer in autoimmune hepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;9:821-836.
  - 47) Li M, Sun X, Kuang X, Liao Y, Li H, Luo D. Mesenchymal stem cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- $\beta$ . *Clin Exp Immunol* 2014;178:516-524.
  - 48) Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327-1333.
  - 49) Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 2011;12:870-878.
  - 50) Hua J, Liang S, Ma X, Webb TJ, Potter JP, Li Z. The interaction between regulatory T cells and NKT cells in the liver: a CD1d bridge links innate and adaptive immunity. *PLoS One* 2011;6:e27038.
  - 51) Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Liakopoulos V, Dafopoulou K, et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor 1-methyl-tryptophan suppresses mitochondrial function, induces aerobic glycolysis and decreases interleukin-10 production in human lymphocytes. *Immunol Invest* 2012;41:507-520.



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**  
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA  
Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**  
Tel/faks: +381 11 2669689  
vsp@vma.mod.gov.rs

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **DENTAL CARIES AND RESTORATIVE BIOMATERIALS AFFECT IL-1 B AND TNF-A LEVELS IN THE GINGIVAL CREVICULAR FLUID**

**KARIJES I ZUBNI ISPUNI UTIČU NA NIVOE IL-1 B I TNF-A U GINGIVALNOJ TEČNOSTI**

**Authors Vladimir Stefanovic<sup>1</sup>, Ervin Taso<sup>1</sup>, Tatjana Kanjevac<sup>2</sup>, Abazovic Dzihan<sup>3</sup>, Mia Rakic<sup>4</sup>, Aleksandra Petkovic-Curcin<sup>5</sup>, Aleksandar Acovic<sup>2</sup>, Danilo Vojvodic<sup>5,6</sup>, Vojnosanitetski pregled (2019); Online First March, 2019.**

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP181116038S>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

**DENTAL CARIES AND RESTORATIVE BIOMATERIALS AFFECT IL-1 B AND TNF-A LEVELS IN THE GINGIVAL CREVICULAR FLUID**

**KARIJES I ZUBNI ISPUNI UTIČU NA NIVOE IL-1 B I TNF-A U GINGIVALNOJ TEČNOSTI**

**Vladimir Stefanovic<sup>1</sup>, Ervin Taso<sup>1</sup>, Tatjana Kanjevac<sup>2</sup>, Abazovic Dzihan<sup>3</sup>, Mia Rakic<sup>4</sup>, Aleksandra Petkovic-Curcin<sup>5</sup>, Aleksandar Acovic<sup>2</sup>, Danilo Vojvodic<sup>5,6</sup>**

<sup>1</sup>Clinic for Stomatology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia.

<sup>2</sup>Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

<sup>3</sup>Emergency Medicine Center Montenegro, Clinical Center, Podgorica, Montenegro.

<sup>4</sup>Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

<sup>5</sup>Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia.

<sup>6</sup>Faculty of Medicine, Military Medical Academy, University of Defense, Belgrade, Serbia.



## Abstract

**Background/Aim.** To estimate the concentrations of the proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$ ) in the gingival crevicular fluid (GCF) samples from caries affected teeth and intact teeth, and to correlate them with caries extension, tooth position, and different restorative biomaterials. **Methods.** GCF samples were collected from the 90 periodontally healthy patients demonstrating at least one tooth with proximal caries and one intact tooth, at the baseline, 7 and 30 days post-treatment. The biomarkers profile was investigated in relation to the different level of caries extension (superficial, pulpitis, gangrenous, root affection), defect size and restorative biomaterial. **Results.** Before therapy, caries level was significantly associated with GCF IL-1 $\beta$  concentration, demonstrating lowest level in gangrenous (C4) and superficial caries (C2). 30d after therapy, root affection (C5) was characterized by the highest IL-1 $\beta$  concentration. Different dental fillings showed various GCF cytokine change. CPC induced a significant IL-1 $\beta$  increase in more than 70% of treated patients. Caries lesion size was insignificantly associated with GCF levels of these proinflammatory cytokines, where larger defects were followed with average cytokine increase. Considering tooth position, before therapy, IL-1 $\beta$  had the highest level in GCF samples from caries affected canines and second molars while TNF- $\alpha$  showed highest levels from canines GCF. Dental restoration induced cytokine increase in canines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), 1st and 2nd molars GCF (IL-1 $\beta$ ). **Conclusion.** Before inflammation intensity of tooth structures was directly reflected with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentration. Dental restoration significantly affects IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  depending on the used dental filling-type material. Profile of these cytokines varied in GCF samples of the tooth with different anatomical position, where canines and molars demonstrated the highest level. An increase of these proinflammatory cytokines in the absence of any symptomatic manifestation of inflammatory response has to be reconsidered as a possible tooth reparation parameter.

**Clinical relevance.** The concentration of GCF cytokines is illustrative in depicting processes in tooth structures. Their relevance must be inspected with aspects of tooth position and caries lesion level. Different impact of dental restoration materials on GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  could be used as parameter for estimating local inflammation.

**Key words:**

**dental caries, gingival crevicular fluid, il-1 $\beta$ ,tnf- $\alpha$  restorative biomaterial dental restoration.**

**Abstrakt**

**Uvod/ Cilj.** Određivanje koncentracije proinflammatoryh citokina IL-1  $\beta$  i TNF- $\alpha$  u gingivalnoj tečnosti (GCF) poreklom od karijesom zahvaćenih i intaktnih zuba i njihovo korelisanje sa obimom karijesa, položajem zuba i različitim zubnim ispunima. **Metode.** Uzorci GCF su sakupljeni od 90 parodontološki zdravih pacijenata koji su imali najmanje jedan zub sa proksimalnim karijesom i jedan intaktni zub, na pre početka, 7 i 30 dana nakon terapije. Profil biomarkera je ispitivan u odnosu na obim karijesnih lezija: površne (C2) pulpitis, gangrena (C4) and karijes korena(C5), veličinu defekta i vrstu biomaterijala.

**Rezultati** Obim karijesnih lezija je značajno udružen sa IL-1 $\beta$ , čije su koncentracije bile najniže u grupi gangrenoznih (C4) i površnog karijesa (C2). 30dana nakon terapije grupa C5 je pokazala najviše vrednosti IL-1 $\beta$ . Različiti materijali za zubne ispune su pokazali različiti profil citokina u GCF. CPC je uzrokovao porast IL-1 $\beta$  kod više od 70% pacijenata. Obim karijesne lezije nije pokazao značajnu korelaciju sa merenim citokinima, dok su veći defekti bili udruženi sa povećanjem srednjih vrednosti citokina. U pogledu položaja zuba IL-1 $\beta$  je pokazivao najviše vrednosti kod karijesom zahvaćenih očnjaka i drugih molara, dok je TNF- $\alpha$  imao najveće vrednosti kod očnjaka. Nakon terapije, povećanje koncentracije citokina je utvrđeno kod očnjaka (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ), prvog i drugog molara (IL-1 $\beta$ ). **Zaključak** Intenzitet zapaljenja zubnih struktura se direktno reflektovao na koncentraciju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Zubni ispuni su značajno uticali na nivoe IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u odnosu na vrstu korišćenog biomaterijala. Profil merenih citokina je varirao u odnosu na različiti položaj zuba, pri čemu su očnjaci i molari pokazali najviše vrednosti. Uočeni porast merenih pro-inflamatornih citokina u odsustvu klinički manifestne patologije može ukazivati na reparatorne efekte. **Klinički značaj** Koncentracija citokina u GCF reflektuje procese u zubnim strukturama. U smislu interpretacije njihovih koncentracija, treba uzeti u obzir uticaj položaja zuba i obim karijesne destrukcije. Nivoi IL-1 $\beta$  I TNF- $\alpha$  u GCF mogu koristiti kao indikator zapaljenskog odgovora na biomaterijale koji se koriste za zubne ispune.

## **Ključne reči:**

**karijes, gingivalna tečnost, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  , biomaterijali za zubne ispune.**

## **Introduction**

Dental caries is the most frequent health condition in the population.<sup>1,2</sup> It is caused by bacterial biofilms whose maturation is associated with an anaerobic shift in microflora<sup>3</sup> while the subsequent acidification leads to demineralization of the dental enamel representing the pathognomonic sign of the disease. Despite outstanding prophylactic strategies, dental caries and related complications are still highly prevalent in the population and provide a negative impact on oral and systemic health<sup>4</sup>. Therefore, many efforts are invested in a better understanding of caries pathogenesis in order to improve respective preventive strategy, diagnostic approach and predictive treatment protocols with decreased complication rate. In the spirit of personalized medicine, the search for caries biomarkers in the saliva and gingival crevicular fluid (GCF) attracts great attention in the current dental research.

The cariogenic microorganisms and their byproducts following the initial invasion of tooth enamel reach the dental tubules and get in contact with dental odontoblasts cellular extensions. Odontoblasts are specialized cells that apart from producing the dentin express many metabolically functions and plays in local immune response against infective threats.<sup>5,6</sup> They express numerous pathogen recognition receptors that bind di and/or tri-acetylated lipoproteins, lipopolysaccharides (LPS), flagellin, viral dsRNA and unmethylated CpG motif-containing DNA<sup>7,8,9,10</sup>. As a response to toll-like receptors (TLR) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) stimulation odontoblasts secrete numerous mediators, such as cytokines and chemokines IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL20, CXCL10<sup>11,12,6,13,14</sup> and defensins<sup>6,15,16</sup>. This inflammatory reaction is directed to eliminate/attenuate cariogenic pathogens in odontoblasts proximity. In the case of low-intensity inflammation, this reaction is usually sufficient to control tooth infection and to induce the regenerative process that finally results in the formation of reactionary dentin. Indeed, more intensive or prolonged inflammation interrupts regeneration processes and result in intensive mediator response from odontoblasts, dental pulp resident cells and

infiltrating immune cells<sup>17,18</sup>. Further progression of bacterial invasion through the odontoblast barrier generate an immune response in dental pulp complex, resulting in pulpitis and progression of the inflammatory process toward periodontium<sup>19,20</sup>. Moreover, in vitro stimulation of tooth crown odontoblasts with TLR2 or TLR4 agonists resulted in a completely different profile of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 CCL20 and  $\beta$ -defensin 2 production indicating differential response to aerobic or anaerobic bacteria. The inflamed dental pulp is a significant source of IL-1 $\beta$  and IL-8<sup>21</sup>. On the other hand, locally produced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  exert significant influence on odontoblasts functions, inducing further  $\beta$ -defensin production<sup>22</sup>, production of dental matrix protein – 1 and inducing proliferation of odontoblast-like cells derived from stem cells.<sup>23</sup> Moreover, the studies investigated the cytokine profile in the GCF samples following dental restoration and reported controversial data<sup>24,25,26,27,28,29,30</sup>

The hypothesis of the present study was that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  profile in the GCF from caries affected and intact teeth are different, while the caries extension, tooth position, and different restorative biomaterials alters the biomarker profile as well.

The aim of the study was to investigate GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  profile between caries affected and healthy teeth, and estimate the effect of caries destruction, restorative material and tooth position on their respective concentrations.

## **Methods**

### *Study design*

The study was designed as a short controlled prospective study longitudinally assessing the effect of caries and its respective treatment on the local levels of the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the split mouth-design.

### *Study population and inclusion criteria*

The study population comprised of 90 outpatients attending the Clinic for Stomatology at the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia in the period between January 2015 until June 2018. The population consisted of younger participants (mean age of 31  $\pm$  6.15 years)

with similar distribution in sex. The study was conducted in accordance with the International Ethical Guidelines and Declaration of Helsinki (1964/1975) and was approved by the institutional ethics committee (reference number VMA/10-12/A.1). The participants were informed about study characteristics and scheduled procedures and accepted to participate by signing an informed concept.

Participants were enrolled if being systemically healthy non-smokers and presenting at least one caries affected and one intact tooth from the same morphological group of teeth, with intact periodontal tissues and lacking the following exclusion criteria: 1) active periodontal disease 2) subgingival periodontal treatment in less than 6 months 3) antibiotic and anti-inflammatory intake in last 3 months 4) health conditions and chronic diseases affecting the inflammatory status and/or bone metabolism 5) unsatisfying oral hygiene.

Caries lesions were diagnosed using visual-tactile technique combined with the radiological exam and according to the Black's Classification<sup>31</sup>, while the periodontal condition was assessed using a combination of clinical parameters and panoramic radiographs according to the recent Classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions<sup>32,33</sup>. Based on the progression levels, caries lesions were classified: superficial (C2), pulp involvement (C3), gangrene (C4) and root involvement (C5).

### *Restorative biomaterials*

Six different restorative materials were used for dental filling: two temporary materials: zinc-phosphate cement (ZPhC-Cegal NV, Galenika, R Serbia) and carboxylate cement (ZPoC-Harvard, USA); two permanent restorations: amalgam (Amg-Extracap D caps, Galenika, R Serbia); nanohybrid composites: BF (the mixture of bisphenol- A-diglycidyl-dimethacrylate (BisGMA) 15–25%, triethyleneglycol- dimethacrylate (TEGDMA) 12–14%, aluminofluoroborosilicate glass 50–60%, aluminium trioxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 1-2%, and DL-Camphorquinone) (Shofu, Japan)) and TEC (*Tetric EvoCeram*, Ivoclar Vivadent, USA) (the mixture of 2.5–10% of BisGMA and 2.5–10% of urethane-dimethacrylate (UEDMA) and nonhazardous additions (Ivoclar Vivadent, USA)); GIC (glass ionomer cement GIC Fuji PLUS®, Green Circle, USA) was used for both settings, standalone restorations and the base for nanohybrid composites (BF and TEC). Dental fillings (temporary and permanent) were sealed in one session while the placed mass counted between 0.07–2.03 g (Table 3).

### *Biomarker measurement*

The GCF sampling was performed using filter paper technique as previously described<sup>34</sup>. Strips contaminated with blood or saliva were discarded. The GCF volume was measured using Periotron 6000 (Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA), calibrated prior to each set of measurements. Following that, the paper strips were placed into microcentrifuge plastic tubes and elution was performed with 500  $\mu$ L phosphate-buffered saline by vortexing for 10 seconds and centrifugation at 3000 g for 5 min, in order to remove plaque and cellular detritus. The supernatants were stored in plastic tubes at  $-70^{\circ}\text{C}$  till further analyzing. The biomarker estimation was performed using flow cytometry (Beckman FC500; Beckman, USA) with commercial assays BioLegend's LEGENDplex™, Human Inflammation Panel (Cat No 740118, USA). Detection limits: TNF- $\alpha$  (1.0 pg/mL), IL1- $\beta$  (1.0 pg/mL).

### *Statistical analysis*

Inter-group comparisons of the parameters were tested with the ANOVA test, with Bonferroni post hoc test comparison of selected groups. 0 day time point, before therapy, was the control value for every individual investigated tooth, with 7th day and 30th-day values compared to the initial level. The differences between the two selected groups were evaluated using the Mann-Whitney test. Thereafter, the p-values lower than 0.05 were considered significant. The correlations between the variables were tested with the Spearman's rank correlation test. The average concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were expressed as pg of biomarker / $\mu$ L of GCF,  $x \pm \text{SD}$ . The statistical analysis was performed using commercial software (GraphPad Prism, USA).

## **Results**

*The average concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in GCF samples of patients according to different time points*

The IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentrations between caries affected and healthy teeth are depicted in the table 2. At the baseline, IL-1 $\beta$  showed significantly increase levels when compared to the healthy controls (HC), while at the 30-days post-treatment, TNF $\alpha$  levels were significantly higher in treated sites than in HC.

#### *Biomarker levels between sites with different restorative materials*

Analysis of average GCF IL-1 $\beta$  level before dental restoration demonstrated significant variation, with the lowest values in patient samples later treated with BEA and CFC fillings. After restoration, all materials except BEA demonstrated GCF IL-1 $\beta$  increase, with the maximal level at 30 day time interval (Table 2.). Temporary dental filling materials (CFC, GIC, CPC) demonstrated much more intensive local IL-1 $\beta$  increase (from +75 to 210 %) comparing to materials for permanent (TEC, AMA, BEA) dental filling (from -37 to +42 %).

As showed for IL-1 $\beta$  concentration, GCF TNF- $\alpha$  level before dental restoration was the lowest in patient samples later treated with BEA and CFC fillings. Again, used dental filling materials induced increase of GCF TNF- $\alpha$ . The highest average GCF TNF- $\alpha$  were recorded in samples of GIC and CPC treated patients, 30 days after. Temporary dental filling materials (CFC, GIC, CPC) again demonstrated much more intensive local TNF- $\alpha$  increase (from +12 to 78 %) comparing to materials for permanent (TEC, AMA, BEA) dental filling (from -23 to +17 %).

#### *Association of caries destruction extension with GCF IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ concentration*

In our study, caries lesion is associated with significant GCF IL-1 $\beta$  concentration even in the initial stage, as a superficial dental change (C2) (Table 2.). Before therapy, patients with the gangrenous process (C4) demonstrated the lowest average GCF IL-1 $\beta$  value, while those with pulpitis (C3) had the highest recorded GCF IL-1 $\beta$  concentration. At 30 day after therapy, all patients demonstrated an increase in average GCF IL-1 $\beta$  concentration. This increase was minimal for patients with pulpitis, due to the high initial concentration, but was maximal for patients with the process in the root canal.

Before therapy GCF TNF- $\alpha$  showed the lowest concentration in the C4 group. But, after dental restoration, the highest average TNF- $\alpha$  concentration was demonstrated in pulpitis group (C3).

#### *Size of the caries lesion*

Size of the caries lesion was determined indirectly, according to the volume of dental filling material needed for restoration. Before therapy, the concentration of GCF IL-1 $\beta$  was the highest in the group with the largest tooth defect caused by caries (>1.0g). Interestingly, 30 days after dental restoration, average concentration increased in samples of groups with small and very large caries defects, while decreased in a group with intermediate fillings (0.5 – 1.0g) (Table 1.). Before therapy, GCF TNF- $\alpha$  demonstrated almost similar value in all groups divided according to caries tooth defect. Contrary to IL-1 $\beta$  findings, dental restoration induced decrement at day 30 in all groups.

#### *Association of tooth position with GCF IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ concentration*

Tooth position was significantly associated with GCF IL-1 $\beta$  concentration (Table 2.). Before therapy, average concentration was the highest in samples from canine, second premolar, and second molar. After therapy, GCF IL-1 $\beta$  concentration increased in samples from all teeth except the second molar. The highest average concentration at day 30 was demonstrated in GCF of a canine and second molar.

The concentration of TNF- $\alpha$  before therapy was the highest in samples from canine and second premolar. Dental restoration therapy at day 30 demonstrated an increase of TNF- $\alpha$  in GCF of the first incisor and I and II molars, and contrary to IL-1 $\beta$  showed unchanged / decreased value in GCF of the second incisor, canine and both molars.

#### *Level of GCF IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ after dental restoration varies according to caries extensity, type and volume of dental restoration filling and tooth position*

Seven days after therapy GCF IL-1 $\beta$  showed increased value in samples of more than half patients treated with both temporary and permanent filling materials, except for those



treated with amalgam (AMA)(Table 3.). But after 30 days GCF IL-1 $\beta$  concentration demonstrated a further decrease in all patients treated with a permanent type of filling (TEC, AMA, BEA), while all treated with a temporary type of filling demonstrated increase. This was especially evident for CPC, where almost 75% of treated demonstrated significant GCF IL-1 $\beta$  rise comparing to before therapy level.

At 7th day GCF IL-1 $\beta$  was increased in more than half of patients with superficial caries (C2) or those with affected root canal (C5). At day 30, a further increase was evident in above 50% of patients from more profound caries lesion (C3, C4, C5), with documented decrease only in the C2 group.

Interestingly, filling volume less than 1g was associated with an increase in 44-50%, while larger filling volume was associated with a decrease of GCF IL-1 $\beta$  in 75% of treated. Conversely, at 30 th day, smaller filling volume was associated with a local IL-1 $\beta$  increase in minor frequency (14-37%).

According to tooth position, at 7th day GCF IL-1 $\beta$  was increased in more than 50% of patients in both incisors, canines, first premolar, and first molar. The 30th day was associated with an IL-1 $\beta$  decrement in GCF of all treated teeth, except the second premolar.

Seven days after dental restoration GCF TNF- $\alpha$  value increased in less than half patients, both treated with temporary and permanent filling materials. After 30 days we documented a further decrease of patients percent with documented TNF- $\alpha$  increase, in all groups except those treated with tetric evoceram (TEC).

As for IL-1 $\beta$ , at 7th day GCF TNF- $\alpha$  was increased in more than 50% of C2 and C5 groups. Identically, at day 30, a further increase was evident in above 50% of patients from more profound caries lesion (C3, C4, C5), with documented decrease only in the C2 group.

Again identically as IL-1 $\beta$ , although in smaller frequency, at 7th day GCF TNF- $\alpha$  demonstrated the increase in samples where filling volume was less than 1g, and decrease in more than 85% of those treated with larger filling volume. Conversely, at 30 th day, smaller filling volume was associated with local TNF- $\alpha$  increase in minor frequency (14-35%).

Seven days after therapy GCF TNF- $\alpha$  demonstrated an increase in 57-66% of samples from canines and second incisors. At day 30, there was TNF- $\alpha$  decrement in GCF of all investigated teeth except the first incisor.

*Dental restoration is associated with correlated IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  values in GCF of teeth with superficial caries, small caries extensivity, and specific tooth position*

After therapy coordinated local secretion/liberation of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was demonstrated in teeth treated with amalgam (7th day), BEA and CFC (30th day)(Table 4.).

According to a caries level, before therapy, only patients with the gangrenous process (C4) did not show the significant correlation of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . After dental restoration, the significant correlation of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was demonstrated only in the group with superficial caries lesion, both 7th and 30th day.

Caries lesion that needed fillings less than 1g were characterized by a significant correlation of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  both before and after dental restoration.

The specific position of caries tooth is associated with the correlated production of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  both before and after dental restoration. Significant correlation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was demonstrated before and after restoration in GCF of second incisors (7th day), second premolar (7th day) and second molar (7th and 30th day).

## **Discussion**

Inflammation in the tooth structures is unequivocally associated with the presence of inflammatory mediators, especially inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Concentration of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were extensively studied in local inflammatory conditions as periodontitis<sup>35,36,37,38</sup> and perimplantitis<sup>39,40,41,42,43,44</sup> or even as a systemic inflammatory condition like diabetes<sup>45,46</sup> or connective tissue disease<sup>47,48,49,50</sup>. Comparing to these inflammatory conditions, cytokines were infrequently investigated in dental caries, especially in GCF of caries teeth<sup>51,52,53</sup>.

Caries is associated with increased local IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels. Cogulu et al demonstrated that children with high streptococcus mutans number had high salivary IL-1 $\beta$  concentration and low IL1RA. They found that IL-1 $\beta$  was slightly elevated in saliva and serum of children with caries, but was not significantly associated with the caries lesion severity<sup>54</sup>. They also showed that IL-1 $\beta$ , IL1RA, and IL-10 gene polymorphism were not significantly associated with dental caries. Eslami et al demonstrated higher average IL-6

and IL-1 $\beta$  concentrations locally, in the inflamed pulpal tissues of subjects with dental caries compared with intact pulpal tissue samples<sup>55</sup>. This increase was significantly associated with *S. mutans* infection. McLachlan et al documented significant expression of genes for S100A8, S100A9, S100A10, S100A12, S100A13, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, and ENA-78 in the pulp of caries teeth, close to the lesion<sup>56</sup>. Pulp inflammation resulting from carious lesions is characterized by a strong increase in the production of proinflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8, and IL-18<sup>57</sup>. So, pulpitis intensity is significantly associated with intensive local inflammatory mediators production and our patients with pulpitis (C3 group) and largest caries defect demonstrated the highest average IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels before therapy.

IL-1 seems to be of extreme importance in the pathophysiology of caries lesion. Horst and colleagues<sup>58</sup> investigated gene expression of inflammatory mediators in the odontoblast layer of extirpated caries teeth. Both the pulp and the odontoblast layer demonstrated significant mRNA increase of CCR2, CCR4, CCR5, CCR9, CCL3, CCL23, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . More importantly, they showed that TNF- $\alpha$  and especially IL-1 $\beta$  induced in vitro increase of a human b-defensin 2 (HBD2) mRNA expression in odontoblasts, up to 100 time more intensive than LPS/TLR4 agonist. The only limitation of their study is a selection of teeth, because all 32 samples were third molars, with caries lesion reaching 50 to 75% of dentin thickness. Additionally, the authors did not provide data whether these teeth were previously treated or not. We have demonstrated that GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentration dramatically vary according to a tooth position, caries lesion extensivity and that dental restoration material further significantly alters its level. Different groups of teeth are exposed to the different intensity of occlusal forces depending of their anatomical position and primary function, that is subsequently followed by different profile of biochemical markers around different teeth. In brief, stimulation of periodontal mechanoreceptors is followed by the local release of neuropeptides, growth factors and cytokines that accordingly regulates remodeling of periodontal tissues<sup>59,60</sup>.

He et al investigated pulpitis in the experimental model of pulp exposure to oral cavity microorganisms<sup>57</sup>. They succeeded to document all the stages of pulpitis, from initial inflammatory cells recruitment to the exposed pulp and initial secretion of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , to chronic-like inflammation, the disappearance of dental odontoblasts and pulpal necrosis. This elegant study was performed with micro CT analysis, pathohistological

description of the local cell population as well as RT PCR verification of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  local presence in the time interval from 0h to 72h after pulp exposure. Although in their experimental model caries progressed from initial lesion to pulpal necrosis in less than 3 days, some parallels could be drawn to caries lesions of the different level seen in patients. Before therapy, IL-1 $\beta$  GCF increased from initial C2 caries (enamel + dentin lesion) to pulpitis (C3) and root inflammation (C5), with a modest increase in gangrenous pulp (C4)(Table 1.). Similarly, He group demonstrated local pulp IL1- $\beta$  increase from initial inflammation to maximal presence in irreversible pulpitis, until the beginning of the necrosis process after which the value decreased. In our study, markedly only the C2 group had the smallest increase rate compared to before therapy level (Table 1).

Surprisingly, at both control points, 7th and 30th day, the average concentration of GCF IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were increased compared to level before dental restoration practically in all investigated samples. Conclusively, Ilday also demonstrated that silorane composite dental restoration after dental caries is associated with significant increase of average TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8<sup>27</sup>, while Geraldeli found that amalgam dental restoration induced increase of local TNF- $\alpha$  but the slight decrease of IL-1 $\beta$  in coronal occlusal dentine of trimmed molars<sup>58</sup>. Since restored teeth were without any clinical and/or radiological signs this increase could not be attributed to further progression of caries lesion or any other inflammatory process.

According to one group of studies, proinflammatory cytokines are just indispensable for in dental regeneration processes. Bone regeneration itself is critically connected to proinflammatory cytokines. Regeneration of bone fracture is associated with biphasic TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increase, with a peak during the initiation of fracture repair, followed by a second peak at the transition from chondrogenesis to osteogenesis during endochondral maturation<sup>61,62</sup>. The balanced immune response appears to be essential for a successful bone healing process<sup>63,64</sup>. The absence of TNF- $\alpha$  delays fracture healing while prolonged exposure to TNF- $\alpha$  destroys bone<sup>65,66</sup>. Our study (unpublished results) in children with long bone fractures showed significantly lower IL-1 $\beta$  and MCP-1 serum concentrations in children with insufficient callus formation callus and less fragment dislocation (angulation and dislocation less than 1 cm). So, newer studies demonstrated that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  influence the biological behavior of dental stem cells, in a way they are needed for tooth tissue regeneration. The study from Yang et al demonstrated that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  have

synergistic effects on odontogenic differentiation of isolated dental pulp stem cell population <sup>67</sup>. In vitro treatment with both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  comparing to a single treatment with either cytokine demonstrated significantly faster stem cell proliferation, increased ALP activity, increased osteocalcin and bone sialoprotein expression, augmented mRNA expression of alkaline phosphatase, osteocalcin, bone sialoprotein, dentin sialophosphoprotein, and dentin matrix protein-1. Both cytokines synergistically induced significant morphologic dental stem cell changes 3th day at the surfaces of the HA/TCP ceramic scaffolds. In vivo experiments with dental stem cells implants pretreated with IL-1 and TNF-2 showed a significant level of hard bone formation, with even bone marrow like hematopoietic tissue.

Goldberg and authors stated that inflammatory process are very important not only for defense, but they are also important for pulp regeneration <sup>68</sup>. So it seems that local inflammation is overseen only as an unwanted and harmful process, leading only to necrotic on the undesirable outcome. Migration and odontoblastic differentiation of dental stem cells is a crucial step in dental regeneration after caries lesion <sup>69,70,71,72</sup> Leprince et al concluded that dental pulp stem cells and mesenchymal stem cells have identical characteristics, and that are needed for dental pulp regeneration <sup>73</sup>. According to this aspect, after initial response to local microbiota agents mediated by inflammatory cytokines, after their elimination and dental restoration, local stem cells are activated and induced to differentiate into cells that produce reactionary and reparative dentin <sup>74</sup>. Another inflammatory wave could regulate transdifferentiation of fibroblast-like pulp cells to stem cells <sup>75</sup> or inflammatory monocytes itself could be converged to odonto – progenitor cells <sup>76</sup>

The balance between the inflammatory process as a defense mechanism and an inflammatory initiated reparation seems to be influenced with the severity and presence of infection. Controlled, acute production of inflammatory mediators and clearing of microorganism is associated with tissue repair, while chronic, uncontrolled inflammation is destructive <sup>20</sup>.

Restorative dental materials significantly influence GCF mediators concentration <sup>29</sup>. Celik and Ilday reported that different dental restorative materials induce the various local response, inducing a significant variation of GCF IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  profile after dental therapy <sup>25,26</sup>. Sakallioğlu et al investigated the concentration of substance-P, calcitonin-

gene related peptide, neurokinin-A, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE2 in GCF samples of teeth restored with ceramic, metal, composite, opposite-composite, amalgam, opposite-amalgam, or enamel <sup>77</sup>. Although the study was performed only at 14 patients without data before therapy or tooth position, they noted significant inter-groups variations 4 weeks after restoration. They found the highest level of substance-P in amalgam restored teeth, PGE2 in composite restored, while IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were highly present after metal based restoration. Similarly, Bjorkman et al reported that removal of amalgam restoration resulted in normalization of GCF Th1 cytokines level <sup>78</sup>. We have also demonstrated that dental restorative material (both permanent and temporary) induce a significant change in GCF IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level.

There are several explanations of GCF IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level increase after restoration. Local inflammatory mediators could be induced from dental cells with chemical content liberated from the restorative material, and/or by mediators generated from de novo plaque accumulation. Since there were no clinical signs of any inflammatory process or plaque accumulation after restoration either in our or previous studies <sup>29, 25,26</sup> inflammatory mediator increase could be attributed to a healing or reparation process. Calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate (MTA) are known to stimulate dentinogenesis and cementogenesis, together with early inflammation <sup>79</sup>, while MTA, at least in vitro, demonstrated significant IL-1 $\beta$  stimulating capacity <sup>80</sup> Hydroxyl ions derived from these restorative materials change oxido/reductive balance at lesion site <sup>28</sup>, ultimately inducing chemical tissue irritation and cellular necrosis. Necrotic cells release low levels of cytokines and other damage signals to facilitate the removal of the dead or dying cells, leading to a inflammation without microorganisms in lesion itself <sup>81,82</sup>

So, the significant presence of inflammatory mediators in GCF of restored teeth without signs of the inflammatory process could be associated with the reparative process. Different influence of the various type of dental fillings on GCF IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  level could be base for selection of the optimal restorative material.

## **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

## **Informed consent**

Patients were informed verbally and in writing about the study and gave written informed consent.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Acknowledgment**

This study was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia in Belgrade, Serbia (project references: no. 41008 and no. 173056).

## **REFERENCES:**

1. Jin L, Lamster I, Greenspan J, Pitts N, Scully C, Warnakulasuriya S, 2016. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. *Oral Dis.* 22, 609–619. <https://doi.org/10.1111/odi.12428>
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. 2005. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Organ.* 83, 661–669.
3. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. (2015) An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm.* 2015:794143. doi: 10.1155/2015/794143.
4. Sanz M, Beighton D, Curtis M.A, Cury JA, Dige I, Dommisch H, Ellwood R, Giacaman R, Herrera D, Herzberg MC, Könönen E, Marsh PD, Meyle J, Mira A, Molina A, Mombelli A, Quirynen M, Reynolds EC, Shapira L, Zaura E. (2017).

- Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 44, S5–S11. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>
5. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ (2010) Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 38(9):687-97. doi: 10.1016/j.jdent.2010.05.016
  6. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA (2007) Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 22(1):5-13. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00310.x
  7. Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble ML, Bleicher F, Staquet MJ, Lebecque S, Farges JC. (2006) Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol.* 1;176(5):2880-7. doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2880
  8. Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Roméas A, Vincent C, Bleicher F, Lebecque S, Farges JC. (2008) Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res.* 87(3):256-61. doi: 10.1177/154405910808700304
  9. Jiang HW, Zhang W, Ren BP, Zeng JF, Ling JQ. (2006) Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue. *J Endod.* 32(8):747-51. doi: 10.1016/j.joen.2006.01.010
  10. Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Kufer TA, Farges JC. (2011) Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res.* 23(3):296-301. doi: 10.1177/0022034511405390
  11. He W , Yu Q , Zhou Z , Wang P (2010) CpG oligonucleotides induce an immune response of odontoblasts through the TLR9, MyD88 and NF-kappaB pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399(2):274-278 doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.068
  12. Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Vincent C, Staquet MJ, Farges JC. (2010) Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in



- human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology*. 215(1):53-9. doi: 10.1016/j.imbio.2009.01.009.
13. Farges JC, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Staquet MJ. (2010) Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*. 216(4):513-7. doi: 10.1016/j.imbio.2010.08.006
  14. He W, Zhang Y, Zhang J, Yu Q, Wang P, Wang Z, Smith AJ. (2012) Cytidine-phosphate-guanosine oligonucleotides induce interleukin-8 production through activation of TLR9, MyD88, NF- $\kappa$ B, and ERK pathways in odontoblast cells. *J Endod*. 38(6):780-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.026.
  15. Paris S, Wolgin M, Kielbassa AM, Pries A, Zakrzewicz A. (2009) Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*. 35(4):520-3. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.015.
  16. Dommisch H, Winter J, Açil Y, Dunsche A, Tiemann M, Jepsen S. (2005) Human beta-defensin (hBD-1, -2) expression in dental pulp. *Oral Microbiol Immunol*. 20(3):163-6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00206.x
  17. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. (2015) Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015:230251. doi: 10.1155/2015/230251
  18. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
  19. Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, et al. (2009). Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *Journal of dental research*, 88, pp. 762-7. doi:10.1177/0022034509341779
  20. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. (2014) Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 40(4 Suppl):S46-51. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.021
  21. Silva AC, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. (2009) Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci*. 17(5):527-32. doi: 10.1590/S1678-77572009000500031

22. Kim YS, Min KS, Lee SI, Shin SJ, Shin KS, Kim EC. (2010) Effect of proinflammatory cytokines on the expression and regulation of human beta-defensin 2 in human dental pulp cells. *J Endod.* 36(1):64-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.022
23. Hase N, Ozeki N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M. (2015) Products of dentin matrix protein-1 degradation by interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-3 promote proliferation of odontoblastic cells. *Biosci Trends.* 9(4):228-36. doi: 10.5582/bst.2015.01092.
24. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. (2005) Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 73(1):123-8. doi: 10.1002/jbm.b.30182
25. Celik, N, Askin, S, Ali Gul M, Seven N. 2017. The effect of restorative materials on cytokines in gingival crevicular fluid. *Archives of Oral Biology.* 84. 10.1016/j.archoralbio.2017.09.026.
26. Ilday NO, Celik N, Dilsiz A, Alp HH, Aydin T, Seven N, Kiziltunç A. (2016) The effects of overhang amalgam restoration on levels of cytokines, gingival crevicular fluid volume and some periodontal parameters. *Am J Dent.* 29(5):266-270
27. Ilday NO, Celik N, Dilsiz A, Alp HH, Aydin T, Seven N, Kiziltunç A. (2013). The effects of silorane composites on levels of cytokines and periodontal parameters. *Contemporary Clinical Dentistry,* 4(4), 437–442. doi.org/10.4103/0976-237X.123021
28. Taso E, Stefanovic V., Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A. Vujanovic D. (2018). Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* 2018, 1823189. doi.org/10.1155/2018/1823189
29. Stefanović V, Taso E, Petković-Ćurčin A, Đukić M, Gardašević M, Rakić M, Xavier S, Jović M, Miller K, Stanojević I, Vojvodić D. (2016) Influence of dental filling material type on the concentration of interleukin 9 in the samples of gingival crevicular fluid. *Vojnosanit Pregl.* 73(8):728-34. doi: 10.2298/VSP140227054S
30. Ariaans K, Heussen N, Schiffer H, Wienert AL, Plümäkers B, Rink L, Wolfart S. (2016) Use of molecular indicators of inflammation to assess the biocompatibility

- of all-ceramic restorations. *J Clin Periodontol.* 43(2):173-9. doi: 10.1111/jcpe.12500.
31. Fisher J, Glick M, 2012. A new model for caries classification and management: the FDI World Dental Federation caries matrix. *J. Am. Dent. Assoc.* 143, 546–551.
  32. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz, M, Tonetti, MS, n.d. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 45, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
  33. Lang NP, Bartold PM, n.d. Periodontal health. *J. Clin. Periodontol.* 45, S9–S16. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12936>
  34. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M., 2013. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin. Oral Implants Res.* 24, 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02518.x>
  35. Almeahadi AH, Alghamdi F. (2018) Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 22;93:12-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.004.
  36. Hokari T, Morozumi T, Komatsu Y, Shimizu T, Yoshino T, Tanaka M, Yoshie H. (2018). Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy and Local Administration of Minocycline on Clinical, Microbiological, and Inflammatory Markers of Periodontal Pockets: A Pilot Study. *International Journal of Dentistry*, 2018, 1748584. doi.org/10.1155/2018/1748584
  37. Zhang J, Zhang AM, Zhang ZM, Jia JL, Sui XX, Yu LR, Liu HT. (2017) Efficacy of combined orthodontic-periodontic treatment for patients with periodontitis and its effect on inflammatory cytokines: A comparative study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 152(4):494-500. doi: 10.1016/j.ajodo.2017.01.028.
  38. Cicek Ari V, Ilarslan YD, Erman B, Sarkarati B, Tezcan I, Karabulut E, Oz SG, Tanriover MD, Sengun D, Berker E. (2016) Statins and IL-1 $\beta$ , IL-10, and MPO Levels in Gingival Crevicular Fluid: Preliminary Results. *Inflammation.* 39(4):1547-57. doi: 10.1007/s10753-016-0390-7.

39. Luo L, Xie P, Gong P, Tang XH, Ding Y, Deng LX. (2011) Expression of HMGB1 and HMG2 in gingival tissues, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 56(10):1106-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.03.020.
40. Abduljabbar T, Akram Z, Vohra F, Warnakulasuriya S, Javed F. (2018) Assessment of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in the peri-implant sulcular fluid among waterpipe (narghile) smokers and never-smokers with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 20(2):144-150. doi: 10.1111/cid.12557.
41. Petković A, Matic S, Stamatović N, et al. (2010). Proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (IL-8 and MIP-1 $\alpha$ ) as markers of peri-implant tissue condition. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 39, pp. 478-85. doi:10.1016/j.ijom.2010.01.014
42. Che C, Liu J, Ma L, Xu H, Bai N, Zhang Q. (2017) LOX-1 is involved in IL-1 $\beta$  production and extracellular matrix breakdown in dental peri-implantitis. *Int Immunopharmacol.* 52:127-135. doi: 10.1016/j.intimp.2017.09.003.
43. Schincaglia GP, Hong BY, Rosania A, Barasz J, Thompson A, Sobue T, Panagakos F, Burleson JA, Dongari-Bagtzoglou A, Diaz PI. (2017) Clinical, Immune, and Microbiome Traits of Gingivitis and Peri-implant Mucositis. *J Dent Res.* 96(1):47-55. doi: 10.1177/0022034516668847.
44. Renvert S, Widén C, Persson GR. (2015) Cytokine expression in peri-implant crevicular fluid in relation to bacterial presence. *J Clin Periodontol.* 42(7):697-702. doi: 10.1111/jcpe.12422.
45. Dögan ŞB, Kurtiş MB, Tüter G, Serdar M, Watanabe K, Karakış S. (2015) Evaluation of Clinical Parameters and Levels of Proinflammatory Cytokines in the Crevicular Fluid Around Dental Implants in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 30(5):1119-27. doi: 10.11607/jomi.3787.
46. Raslan SA, Cortelli JR, Costa FO, Aquino DR, Franco GC, Cota LO, Gargioni-Filho A, Cortelli SC. (2015) Clinical, microbial, and immune responses observed in patients with diabetes after treatment for gingivitis: a three-month randomized clinical trial. *J Periodontol.* 86(4):516-26. doi: 10.1902/jop.2014.140197.

47. Özçaka Ö, Alpöz E, Nalbantsoy A, Karabulut G, Kabasakal Y. (2018) Clinical periodontal status and inflammatory cytokines in primary Sjögren syndrome and rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 89(8):959-965. doi: 10.1002/JPER.17-0730.
48. Cetinkaya B, Guzeldemir E, Ogus E, Bulut S. (2013) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 84(1):84-93. doi: 10.1902/jop.2012.110467.
49. Javed F, Ahmed HB, Mikami T, Almas K, Romanos GE, Al-Hezaimi K. (2014) Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent.* 5(1):1-8. doi: 10.1111/jicd.12066.
50. Bıyıkoğlu B, Buduneli N, Aksu K, Nalbantsoy A, Lappin DF, Evrenosoğlu E, Kinane DF. (2013) Periodontal therapy in chronic periodontitis lowers gingival crevicular fluid interleukin-1beta and DAS28 in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 33(10):2607-16. doi: 10.1007/s00296-013-2781-5.
51. Kumar NK, Reddy VK, Padakandla P, Togaru H, Kalagatla S, Chandra SN. (2016) Evaluation of chemokines in gingival crevicular fluid in children with dental caries and stainless steel crowns: A clinico-biochemical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 34(3):273-9. doi: 10.4103/0970-4388.186754.
52. Coughlo D, Onay H, Ozdemir Y, Aslan G, Ozkinay F, Kutukculer N, Eronat C. (2015) Associations of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, and IL-10 with dental caries. *Journal of Oral Science* 57(1):31-6
53. Eslami H, Puralibabai F, Sepan R, Zerandis A. Evaluation of Relationship between *Streptococcus mutans*, Dental Caries and IL-1 $\alpha$  and IL-6. *Journal of Periodontology&Implant Dentistry*
54. McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Landini G, Cooper PR. S100 and cytokine expression in caries. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):4102-8.
55. Jean-Christophe Farges, Brigitte Alliot-Licht, Caroline Baudouin, Philippe Msika, Françoise Bleicher and Florence Carrouel. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Frontiers in Physiology* 2013, November 2013 | Volume 4 | Article 326 doi: 10.3389/fphys.2013.00326

56. Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol.* 2011 Jan 24;12:9. doi: 10.1186/1471-2172-12-9.
57. He Y, Gan Y, Lu J, Feng Q, Wang H, Guan H, Jiang Q. Pulpal Tissue Inflammatory Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Mice. *J Endod.* 2017;43(1):90-95. DOI: 10.1016/j.joen.2016.09.003.
58. Geraldeli S, Li Y, Hogan MM, Tjaderhane LS, Pashley DH, Morgan TA, Zimmerman MB, Brogden KA. Inflammatory mediators in fluid extracted from the coronal occlusal dentine of trimmed teeth. *Arch Oral Biol.* 2012 Mar;57(3):264-70
59. Iwasaki L.R et al .tooth movement and cytokines in gingival crevicular fluid and whole blood in growing and adult subjects: *Am J Orthod* 2005;128:483-91.
60. Evans C.A, Georgel A: Detection of root resorption using dentine and bone markers :*Orthod Craniofac Res* 2009;3:229-35.
61. Kon T, et al. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16:1004–1014
62. Lehmann W, et al. (2005) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 36:300–310.
63. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN.The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Aug;16(4):427-34.
64. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, Schmidt G, Martin C, Perka C, Buttgerit F, Volk HD, Duda G. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing.*J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Feb;8(2):120-30.
65. Karnes J, Daffner S, Watkins C. Multiple Roles of Tumor Necrosis Factor - Alpha in Fracture Healing. 2015, *Bone* 78 DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.001
66. Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AG (2011) Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 17: 393-402.

67. Yang X, Han G, Pang X. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res Part A* 2011;00A:000–000.
68. Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm*. 2015;2015:347649.
69. Louvrier A, Euvrard E, Nicod L, Rolin G, Gindraux F, Pazart L H. Odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells from healthy and carious teeth on an original PCL-based 3D scaffold. *International endodontic journal*. 2018, 51: e252-e263
70. Werle S, Lindemann D, Steffens D, Demarco F, de Araujo F, Pranke P, Casagrande L. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Investig*. 2016 Jan;20(1):75-81.
71. Rombouts C, Jeanneau C, Bakopolou A, About I. Dental Pulp Stem Cell Recruitment Signals within Injured Dental Pulp Tissue. *Dent. J*. 2016, 4(2), 8.
72. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Ariji Y, Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther*. 2017 ;8(1):61.
73. Leprince JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J*. 2012 Aug;45(8):689-701.
74. Goldberg M, Opsahl S, Aubin I, Septier D, Chaussain-Miller C, Boskey A, Guenet J-L. Discovery: Sphingomyelin degradation is a key factor in dentin and bone mineralization: lessons from the fro/fro mouse. *J Dent Res*. 2008; 87 :9–13.
75. Yang G, Crawford R, Wang J (2004) Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J. Biomech*. 37: 1543–1550.
76. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y. Human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J of leukocyte biology*.2003; 74:833-845.

77. Sakallioğlu U, Müge Lütfoğlu, Sakallioğlu E, Ceylan G, Pamuk F, Dede F, dede D. Gingival Crevicular Fluid Levels of Neuropeptides following Dental Restorations. *J Appl Biomater Funct Mater* 2015; 13(2): e186-e193.
78. Björkman L, Brokstad KA, Moen K, Jonsson R. Minor changes in serum levels of cytokines after removal of amalgam restorations. *Toxicol Lett.* 2012 Jun 1;211(2):120-5.
79. Reyes-Carmona JF, Santos AR, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1225-35.
80. Cavalcanti, D. A deployment strategy for Internet Exchange Points as part of a National Broadband Plan, Proceedings of the 5th ACORN-REDECOM Conference, Lima, May 2011.
81. Luheshi N, McColl B, Brough D. Nuclear retention of interleukin-1 $\alpha$  by necrotic cells: a mechanism to dampen sterile inflammation. *Eur J Immunol.* 2009 November ; 39(11): 2973–2980.
82. Acosta-Pérez G, Maximina Bertha Moreno-Altamirano M.Rodriguez-Luna G, Javier Sanchez-Garcia F. Differential Dependence of the Ingestion of Necrotic Cells and TNF $\alpha$ /IL1 $\beta$  Production by Murine Macrophages on Lipid Rafts. *Scand J of immunology.*68:423-429

**Table 1. The IL-1 $\beta$  and TNF-a concentration between caries affected and healthy teeth**

<b>Biomarker</b>	<b>Control</b>	<b>Baseline</b>	<b>Day 7</b>	<b>Day 30</b>	<b>Baseline/C</b>	<b>Day 7/C</b>	<b>Day 30/C</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	78.23 $\pm$ 90.53	245.67 $\pm$ 750.10	79.02 $\pm$ 84.00	148.39 $\pm$ 290. 12	<b>p=0.012</b>	NS	NS
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	24.05 $\pm$ 47.67	41.45 $\pm$ 109.34	84.01 $\pm$ 356.50	88.14 $\pm$ 361.21	NS	NS	<b>p=0.010</b>



All values are expressed as mean  $\pm$  SD; C-control.

**Table 2. Average concentration of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in GCF samples of patients according to different time points**

		IL-1 $\beta$ (pg, x $\pm$ SD)			TNF- $\alpha$ (pg, x $\pm$ SD)		
		0 d	7 d	30 d	0 d	7 d	30 d
<b>dental</b> <b>filling</b> <b>type</b>	<b>TEC</b>	111 $\pm$ 211	92 $\pm$ 122	<sup>a</sup> 158 $\pm$ 188	24 $\pm$ 24	19 $\pm$ 17	28 $\pm$ 23
	<b>AMA</b>	155 $\pm$ 197	126 $\pm$ 177	187 $\pm$ 210	34 $\pm$ 37	24 $\pm$ 44	27 $\pm$ 25
	<b>BEA</b>	54 $\pm$ 84	88 $\pm$ 106	<sup>b</sup> 55 $\pm$ 107	12 $\pm$ 21	25 $\pm$ 46	18 $\pm$ 43
	<b>CFC</b>	31 $\pm$ 26	54 $\pm$ 104	<sup>c</sup> 65 $\pm$ 100	4 $\pm$ 5	7 $\pm$ 7	4 $\pm$ 5
	<b>GJC</b>	103 $\pm$ 104	153 $\pm$ 170	192 $\pm$ 265	33 $\pm$ 33	37 $\pm$ 39	37 $\pm$ 28
	<b>CPC</b>	243 $\pm$ 269	235 $\pm$ 245	<sup>a,b,c</sup> 427 $\pm$ 331	29 $\pm$ 38	44 $\pm$ 50	49 $\pm$ 57
<b>caries</b> <b>level</b>	<b>C2</b>	76 $\pm$ 104	94 $\pm$ 105	<sup>d</sup> 115 $\pm$ 161	20 $\pm$ 26	24 $\pm$ 39	29 $\pm$ 62
	<b>C3</b>	172 $\pm$ 243	51 $\pm$ 92	182 $\pm$ 182	27 $\pm$ 44	47 $\pm$ 66	42 $\pm$ 52
	<b>C4</b>	49 $\pm$ 59	113 $\pm$ 144	<sup>e</sup> 104 $\pm$ 119	5 $\pm$ 6	10 $\pm$ 9	12 $\pm$ 12
	<b>C5</b>	<sup>f</sup> 101 $\pm$ 103	156 $\pm$ 169	<sup>d,e,f</sup> 286 $\pm$ 226	36 $\pm$ 35	30 $\pm$ 23	35 $\pm$ 23
<b>dental</b> <b>filling</b>	<b>&lt;0.5g</b> <b>&lt;1.0g</b>	107 $\pm$ 183 118 $\pm$ 174	114 $\pm$ 187 148 $\pm$ 213	167 $\pm$ 253 56 $\pm$ 61	36 $\pm$ 93 33 $\pm$ 63	18 $\pm$ 17 19 $\pm$ 24	33 $\pm$ 30 25 $\pm$ 22

<b>volume</b>	<b>&gt;1.0g</b>	137 ± 204	113 ± 121	236 ± 229	35 ± 55	11 ± 13	30 ± 26
<b>tooth</b>	<b>1</b>	59 ± 74	43 ± 25	141 ± 190	2 ± 2	5 ± 9	14 ± 12
<b>position</b>	<b>2</b>	46 ± 48	44 ± 54	149 ± 205	15 ± 12	15 ± 17	15 ± 20
	<b>3</b>	117 ± 152	135 ± 93	253 ± 227	49 ± 62	35 ± 30	47 ± 62
	<b>4</b>	44 ± 37	65 ± 58	77 ± 75	17 ± 17	20 ± 29	18 ± 20
	<b>5</b>	107 ± 111	70 ± 79	103 ± 149	31 ± 40	34 ± 56	29 ± 35
	<b>6</b>	<sup>g,h</sup> 59 ± 41	<sup>g</sup> 166 ± 164	<sup>h</sup> 214 ± 198	24 ± 27	32 ± 45	34 ± 44
	<b>7</b>	133 ± 225	175 ± 171	223 ± 222	20 ± 19	26 ± 24	23 ± 22

<sup>a</sup> IL-1 $\beta$ , dental filling type, TEC / CPC, 30d, \*

<sup>b</sup> IL-1 $\beta$ , dental filling type, BEA / CPC, 30d, \*\*

<sup>c</sup> IL-1 $\beta$ , dental filling type, CFC / CPC, 30d, \*\*\*

<sup>d</sup> IL-1 $\beta$ , caries level, C2 / C5, 30d, \*

<sup>e</sup> IL-1 $\beta$ , caries level, C4 / C5, 30d, \*

<sup>f</sup> IL-1 $\beta$ , caries level C5, 0d / 30d, \*

<sup>g</sup> IL-1 $\beta$ , tooth position 6, 0/7d, \*

<sup>h</sup> IL-1 $\beta$ , tooth position 6, 0/30d, \*

TEC, AMA, BEA, all values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation

**Table 3. Percentage of patients with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  GCF increase at time points (at least 20% up increase comparing to 0 time point, before dental filling)**

	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
--	--------------	---------------

control time point		7 d		30 d		7 d		30 d	
(n/total) %		n/total	%	n/total	%	n/total	%	n/total	%
<b>all</b>		39/86	<b>45</b>	33/74	<b>45</b>	35/84	<b>42</b>	25/74	<b>34</b>
<b>dental filling type</b>	<b>TEC</b>	9/17	<b>53</b>	8/17	<b>47</b>	6/17	<b>35</b>	9/17	<b>53</b>
	<b>AMA</b>	2/14	<b>14</b>	4/11	<b>36</b>	4/13	<b>31</b>	2/11	<b>18</b>
	<b>BEA</b>	8/15	<b>53</b>	3/15	<b>20</b>	6/15	<b>40</b>	2/15	<b>13</b>
	<b>CFC</b>	6/14	<b>43</b>	4/ 9	<b>44</b>	6/13	<b>46</b>	3/ 9	<b>33</b>
	<b>GJC</b>	7/13	<b>54</b>	6/11	<b>55</b>	6/13	<b>46</b>	4/11	<b>36</b>
	<b>CPC</b>	7/13	<b>54</b>	8/11	<b>73</b>	7/13	<b>54</b>	5/11	<b>45</b>
<b>caries level</b>	<b>C2</b>	31/58	<b>53</b>	19/51	<b>37</b>	31/58	<b>53</b>	19/51	<b>37</b>
	<b>C3</b>	1/ 9	<b>11</b>	5/ 9	<b>55</b>	1/ 9	<b>11</b>	4/ 7	<b>57</b>
	<b>C4</b>	2/ 6	<b>33</b>	3/ 6	<b>50</b>	2/ 6	<b>33</b>	2/ 5	<b>40</b>
	<b>C5</b>	7/13	<b>54</b>	6/11	<b>55</b>	7/13	<b>54</b>	6/11	<b>55</b>
<b>dental filling volume</b>	<b>&lt;0.5g</b>	35/69	<b>51</b>	23/62	<b>37</b>	30/69	<b>44</b>	22/62	<b>35</b>
	<b>&lt;1.0g</b>	4/ 9	<b>44</b>	1/ 7	<b>14</b>	4/ 9	<b>44</b>	1/ 7	<b>14</b>
	<b>&gt;1.0g</b>	2/ 8	<b>25</b>	4/ 8	<b>50</b>	1/ 8	<b>13</b>	3/ 8	<b>38</b>
<b>tooth position</b>	<b>1</b>	3/ 5	<b>60</b>	2/ 4	<b>50</b>	2/ 5	<b>40</b>	3/ 4	<b>75</b>
	<b>2</b>	5/ 9	<b>56</b>	4/ 9	<b>44</b>	6/ 9	<b>66</b>	3/ 9	<b>33</b>
	<b>3</b>	5/ 7	<b>71</b>	4/ 7	<b>57</b>	4/ 7	<b>57</b>	4/ 7	<b>57</b>
	<b>4</b>	6/11	<b>55</b>	2/10	<b>20</b>	3/11	<b>27</b>	2/10	<b>20</b>
	<b>5</b>	6/24	<b>25</b>	6/18	<b>33</b>	9/24	<b>38</b>	6/18	<b>33</b>
	<b>6</b>	7/12	<b>58</b>	5/11	<b>45</b>	6/12	<b>50</b>	4/11	<b>36</b>
	<b>7</b>	7/16	<b>44</b>	6/14	<b>32</b>	7/16	<b>44</b>	6/14	<b>32</b>

**Table 4. Correlation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentration in GCF samples in the different time points**

	IL-1 $\beta$ + TNF- $\alpha$	
	7 d	30 d
<i>Caries destruction level</i>		
C2	0.0004	0.0030

C3	ns	ns
C4	ns	ns
C5	ns	ns
<i>Restorative biomaterial</i>		
TEC	ns	ns
AMA	0.0030	ns
BEA	ns	0.0002
CFC	ns	0.0170
GJC	ns	ns
CPC	ns	ns
<i>Biomaterial amount</i>		
<0.5g	0.0007	0.0003
<1.0g	0.0140	ns
>1.0g	ns	ns

---

Received on November 16, 2018.

Revised on March 13, 2019.

Accepted March 13, 2019.

Online First March, 2019.