

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Cvetković

**ISPITIVANJE ULOGE KOMPONENTI
ESL1 ANTIGENA *TRICHINELLA*
SPIRALIS U OBLIKOVANJU IMUNSKOG
ODGOVORA DARK AGOUTI PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Cvetković

**THE ROLE OF *TRICHINELLA SPIRALIS*
ESL1 ANTIGENS IN SHAPING OF
IMMUNE RESPONSE IN DARK AGOUTI
RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI

dr Alisa Gruden-Movsesijan, viši naučni saradnik
Institut za primenu nuklearne energije - INEP
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Alisa Gruden-Movsesijan, viši naučni saradnik
Institut za primenu nuklearne energije - INEP
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević, naučni savetnik
Institut za primenu nuklearne energije - INEP
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Instituta za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu i na Nacionalnom Institutu za javno zdravlje i okolinu (National Institute for Public Health and the Environment-RIVM), Bilthoven, Holandija, u okviru projekta „Izučavanje imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti” (br.173047), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom Dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević.

Ogromnu zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Alisi Gruden-Movsesijan, koja je imala strpljenja da me sasluša i nesebično mi ukazivala na sve pravilnosti i nepravilnosti u mom istraživačkom radu, na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, na svim savetima, idejama i trudu da ovaj rad ugleda svetlo dana.

Dr Ljiljani Sofronić-Milosavljević, dugujem veliku zahvalnost na svemu što me je naučila, i podstakla da naučim, za pomoć koju mi je pružila u pravljenju prvih koraka na naučno-istraživačkom putu, njenoj nepresušnoj energiji koja me je gurala tokom istraživačkog rada svih ovih godina, na strpljenju i veri da uvek mogu više i bolje.

Dr Nataši Ilić sam posebno zahvalna na svim prijateljskim savetima, razumevanju, stručnim sugestijama i nesebičnoj velikoj pomoći, koju mi je pružila u sticanju iskustva u istraživačkom radu.

Dr Biljani Božić se zahvaljujem što me je uvela u svet imunologije, na ukazanom poverenju, na brizi i na savetima koji su unapredili ovu doktorsku disertaciju.

Dr Eleni Pinelli, se posebno zahvaljujem što mi je omogućila da deo eksperimentalog rada ove doktorske disertacije uradim u Nacionalnom Institutu za javno zdravlje i okolinu (National Institute for Public Health and the Environment-RIVM) u Bilthovenu, Holandiji i na spremnost da svoje znanje i iskustvo podeli sa mnom.

Veliku zahvalnost, za pomoć, razumevanje i prijatnu atmosferu, dugujem svim svojim dragim kolegama iz laboratorije, Mariji, Ivanu, Dudi, Sanji, Blaži, Saši, Ivani i drugim kolegama iz INEP-a, koji su godinama deo mog laboratorijskog života.

Svojim prijateljima Dragani, Barbari, Violeti, Branislavu, Marini, Igoru i malom Davidu se zahvaljujem na podršci, ljubavi i svakom interesantom i inspirativnom trenutku koji provodimo zajedno. Hvala puno i mojim salsa drugarima što ispunjavanju moje dane smehom, plesom i muzikom.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, sestri Valentini i svojim roditeljima, Draganu i Bosiljki Cvetković, na безусловnoj ljubavi, bezgraničnoj podršci i neizmernoj veri u moj uspeh. Zbog njih je sve ovo moguće i njima posvećujem ovaj rad.

Ispitivanje uloge komponenti ESL1 antigena *Trichinella spiralis* u oblikovanju imunskog odgovora Dark Agouti pacova

SAŽETAK

Tokom hronične faze infekcije helmint, *Trichinella spiralis*, komunicira sa imunskim sistemom domaćina posredstvom ekskretorno-sekretornih produkata (ESL1) mišićnih larvi i kreira sredinu u kojoj dominiraju Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora. Međutim, mehanizmi koji leže u osnovi ovakve polarizacije imunskog odgovora još uvek nisu poznati. Ova studija je posvećena istraživanju molekula ESL1 antigena uključenih u interakciju sa receptorima za molekulske obrasce i signalnih puteva koji tom interakcijom bivaju pokrenuti u dendritskim ćelijama, a koji dovode do sledstvene polarizacije T ćelijskog odgovora. ESL1 antigeni, primenjeni intraperitonealno, statistički značajno povećavaju produkciju IL-4 i IL-10, a ne utiču na nivo produkcije TGF- β i IFN- γ *in vivo*. Promena ugljenohidratne strukture ESL1 antigena (perjodatom tretirani ESL1, pESL1) snažno smanjuje produkciju IL-4 i IL-10, što ukazuje na važnost glikana za pokretanje Th2 i anti-inflamatornog imunskog odgovora. *In vitro* eksperimenti sa ESL1 i njegovim komponentama: 7C2C5Ag (antigen koji sadrži 45, 49 i 53-kDa glikoproteine) i rTsp53 (rekombinantni p53) su pokazali da svi ispitivani antigeni dovode do nepotpunog sazrevanja dendritskih ćelija, koje je praćeno smanjenom produkcijom IL-12p70 i povećanom produkcijom IL-10 i kapacitetom da promovišu Th2 i regulatorni imunski odgovor. Modifikacija glikana ESL1 nije uticala na fenotip dendritskih ćelija, ali je dovela do smanjenja produkcije citokina IL-12p70 i IL-10 u tretiranim dendritskim ćelijama, što je rezultiralo sniženom produkcijom IL-10 i TGF- β od strane T ćelija. Prisustvo intaktnih glikana je bitno za indukciju Th2 i regulatornog odgovora *in vitro*. Ispitivanjem interakcije receptora sličnih Toll proteinu (engl. Toll-like receptors, TLR) i ESL1 antigena, pokazano je da ESL1 antigeni angažuju TLR2 i TLR4, dok se 7C2C5Ag vezuje samo za TLR2 i da su te interakcije zavisne od prisustva intaktnih ugljenohidratnih struktura. ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag dovode do aktivacije MAP kinaza ERK1/2 i p38 u signalnom putu koji biva pokrenut interakcijom dendritskim ćelijama sa ovim *T. spiralis* antigenima,

dok pESL1 dovodi do slabe aktivacije obe ispitivane MAP kinaze. Ova studija je po prvi put pokazala da komponente ESL1 antigena (7C2C5Ag and rTsp53) imaju imunomodulatorne karakteristike i da su glikani ESL1 antigena važni za polarizaciju imunskog odgovora.

Ključne reči: *Trichinella spiralis*; ESL1; glikani ESL1; 7C2C5Ag; rTsp53; imunski odgovor, dendritske ćelije; T limfociti; TLR; MAP kinaze;

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj: [616-097 : 576.89] : [616-097 : 636.028] (043.3)

The role of *Trichinella spiralis* ESL1 antigens in shaping of immune response in Dark Agouti rats

ABSTRACT

The helminth *Trichinella spiralis* communicates with the host immune system through excretory-secretory products (ESL1). ESL1 antigens drive immune response towards Th2 and regulatory type. However, there is no information about mechanisms by which ESL1 influences such polarization. Here, we investigated the impact of ESL1 and its components on immune response, Pattern Recognition Receptors involved in the interaction with these antigens and subsequently provoked signaling events in dendritic cells. ESL1 antigens significantly increased the production of IL-4 and IL-10, while they did not affect the levels of TGF- β and IFN- γ *in vivo*. Changes in the structure of ESL1 glycans greatly reduced the production of IL-4 indicating their importance for Th2 immune response. *In vitro* experiments with ESL1 and ESL1 components: 7C2C5Ag (containing 45, 49, and 53-kDa glycoproteins) and rTsp53 (recombinant p53) resulted in the same semimature dendritic cell phenotype accompanied by reduced production of IL-12p70 and elevated production of IL-10 and the capacity to promote Th2 and regulatory responses. Modification of ESL1 glycans (periodate treated ESL1, pESL1) did not change dendritic cell phenotype but had an impact on cytokine production of dendritic cells (reduced IL-12p70 and IL-10). Dendritic cells treated with pESL1 provoked low production of IL-10 and TGF- β in T cells, indicating the importance of intact glycans for Th2 and regulatory response induction. Considering investigation of Toll-like receptors (TLR) involved in the interaction with ESL1 antigens, we have found that TLR2 is engaged by ESL1 and 7C2C5Ag, while TLR4 interacts only with ESL1. These interactions are impaired with changes in carbohydrate structure of ESL1. ESL1, 7C2C5Ag and rTsp53 transiently activated ERK1/2 MAP kinase, weakly activated p38 kinase and these activations were glycan dependent. This study indicates for the first time that some components of ESL1 (7C2C5Ag and rTsp53)

possess immunomodulatory properties and that glycans on ESL1 are important for immune response polarization.

Key words: *Trichinella spiralis*; ESL1; ESL1 glycans; 7C2C5Ag; rTsp53; immune response; dendritic cells; T lymphocytes; TLR; MAP kinase;

Research area: Biology

Area of special interest: Immunobiology

UDC number: [616-097 : 576.89] : [616-097 : 636.028] (043.3)

Skraćenice

2-DE - dvo-dimenzionalna elektroforeza

7C2C5Ag - 7C2C5 antigen *T. spiralis* izolovan na 7C2C5 koloni

A. suum - *Ascaris suum*

A. viteae - *Acanthocheilonema viteae*

AAMF - alternativno aktiviran makrofag

ADCC - ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

AMC - kisela hitinaza sisara (engl. Acidic Mammalian Chitinase)

ANOVA - analiza varijanse (engl. Analysis of variance)

AP-1 – aktivacioni protein-1 (engl. activator protein-1)

APĆ - antigen-prezentujuća ćelija

BLP - lipoprotein bakterija (engl. bacterial lipoprotein)

Breg - regulatorna B ćelija

CAMF - klasično aktiviran makrofag

cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

cDĆ - konvencionalna dendritska ćelija

CLR - lektinski receptor C-tipa (engl. C-type lectin receptors)

CRP - C-reaktivan protein

DA - Dark Agouti

DAMP – molekularni obrasci oštećenja (engl. Damage-Associated Molecular Patterns)

DC-SIGN - (engl. DC-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin)

DĆ – Dendritska ćelija

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DNKaza - dezoksiribonukleaza

dsRNK- dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. double-stranded RNA)

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

ELISA - imunoenzimski test na čvrstoj fazi (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ERK – ekstraćelijskim signalom regulisana kinaza (engl. extracellular signal-regulated kinases)

ESL1 - ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi *Trichinella spiralis*

ES-62- ekskretorno-sekretorni produkt *Acanthocheilonema viteae*

FIZZ - (engl. found in inflammatory zone)

FPR - N-formilpeptid receptor (engl. N-formyl peptide receptor)

gp 43 - glikoprotein od 43 kDa

gp 45 - glikoprotein od 45 kDa

gp 53 - glikoprotein od 53 kDa

GalNAc - N-acetilgalaktozamin

GlcNAc - N-acetilglukozamin

HEK ćelije - humane embrionalne ćelijske linije bubrega (engl. human embryonic kidney cells – HEK cells)

HMGB1 - protein hromatina (engl. High-mobility group protein B1)

HSP - proteini toplotnog šoka (engl. heat shock proteins)

ICAM – unutarćelijski adhezivni molekul (engl. Intracellular Adhesion Molecule)

iE-DAP – NOD1 ligand (engl. D- γ -glutamyl-meso-DAP dipeptide)

IFN- γ - interferon- γ

IKK – IkappaB kinaza (engl. IkappaB kinase)

IL - interleukin

IL-1R - receptor iz familije interleukina-1 (engl. interleukin-1 receptor, IL-1R)

iNOS – inducibilna forma NO sintaze

IRAK - kinaza pridružena IL-1 receptoru (engl. IL-1R receptor-associated kinase)

IRF - regulatorni faktor interferona (engl. IFN regulatory factor)

JNK - Jun N-terminalna kinaza (engl. Jun N-terminal kinase)

LNFRIII - lakto-N-fukopentoza III

LPS - lipopolisaharid

LRR - leucin-bogate sekvence (engl. Leucin-Rich Repeat - LRRs)

lyso-PC - lizofosfatidilholin

MAL – adaptorski molekul sličan MyD88 (engl. MyD88 - adaptor like protein)

MAP kinaza - mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. Mitogen-activated protein kinase)

MMP – Matriksne metaloproteinaze

MBL - manan-vezujući lektin

MCD-1- protein sličan cistatinu (engl. Multi cystatin-like domain protein)

MDP – muramil dipeptid (engl. muramyl dipeptide)

MGL - galaktozni lektin makrofaga (engl. macrophage galactose-type lectin)

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

MICL – mijeloidni lektinski receptor C-tipa (engl. myeloid C-type lectin-like receptors)

mokESL1 – antigen dobijen na isti način kao i pESL1 antigen ali u odsustvu perjodata (engl. mock treated ESL1)

MR - manozni receptor

MyD88 - (engl. Myeloid Differentiation primary response gene 88)

N. brasiliensis -*Nippostrongylus brasiliensis*

NBL - novorođena larva (engl. new born larvae-NBL) *Trichinella spiralis*

NES - ekskretorno-sekretorni antigeni *Nippostrongylus brasiliensis*

NF-κB – nuklearni faktor kappa–B (engl. nuclear factor-kappa B)

NLR – receptor sličan NODu (engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain - NOD-like receptor)

NO - azot monoksid

NOD - Ne-gojazni dijabetes (engl. Non-obese diabetes)

Pam3Cys - TLR2 agonist, sintetički analog triacetil lipopeptida

PAMP - molekularni obrasci zajednički za različite klase mikroba (engl. Pathogen Associated Molecular Patterns)

PC - fosforilholin

pDC plazmacitoidna dendritska ćelija

pESL1- perjodatom tretirani ESL1 antigen

PGN –peptidoglikan

Poly I:C – TLR3 agonist (engl. Polyinosinic:polycytidylic acid, sintetički analog dvolančane RNK virusa)

PRR – receptori koji prepoznaju molekulske obrasce patogena (engl. Pattern Recognition Receptors)

RELM β - molekul sličan rezistinu (engl. resistin-like molecule)

RIP1 – receptor-interakcioni protein 1 (engl. receptor-interacting protein 1)

RLR - receptor sličan RIGu (engl. Retinoic acid-inducible gene-I - RIG-like receptors)

RNK - ribonukleinska kiselina

RT - reverzna transkripcija

rTsp53 – rekombinantni antigen *T. spiralis* od 53 kDa

RT-PCR - Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time Polymerase Chain Reaction)

SARM - (engl. sterile α and armadillo-motif-containing protein)

S. mansoni - *Schistosoma mansoni*

SDS-PAGE - (engl. Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

SEA - solubilni ekstrakti jaja *Schistosoma mansoni*

SEAP – sekretovana embrionalna alkalna fosfataza (engl. the secreted human embryonic alkaline phosphatase)

Siat4c- sijalil transferaza 4c (engl. sialyl transferase 4c)

SR - receptor čistač (engl. scavenger receptor)

ssRNK- jednolančana ribonukleinska kiselina (engl. single-stranded RNA)

T. spiralis - *Trichinella spiralis*

T. suis - *Trichuris suis*

T. crassiceps - *Taenia crassiceps*

TAK1- protein kinaza 1 aktivirana TGFom (engl. transforming growth factor-activated protein kinase 1)

TBK1- srodna IkappaB kinaza [engl. TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1]

TcES - ekskretorno-sekretorni produkti *Taenia crassiceps*

T1D – dijabetes tipa 1

TCR - T ćelijski receptor

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

TIR - Toll/IL-1 receptorski domen

TIRAP - adaptorski molekul sličan MyD88 (engl. MyD88 - adaptor like protein)

TLR - receptor sličan Toll proteinu (engl. Toll-like receptors)

TNF- α - faktor nekroze tumora- α (engl. Tumor necrosis factor- α)

TRAF - faktor pridružen TNF receptoru (engl. Tumor necrosis factor-TNF receptor-associated factor)

TRAM - adaptorski molekul srodan TRIF-u (engl. TRIF - related adaptor molecule)

Treg - regulatorna T ćelija

TRIF - (engl. TIR - domain containing adaptor protein-inducing IFN- β)

TSL antigeni - antigeni druge grupe *T. spiralis* koji indukuju kasnu fazu imunskog odgovora

TspES - ekskretorno-sekretorni antigen *T. spiralis*

Ym1 - hitin-vezujući protein

1. UVOD.....	1
1.1. Parazit <i>Trichinella spiralis</i> , životni ciklus i odnos parazita i domaćina.....	4
1.2. Antigeni parazita <i>T. spiralis</i>	8
1.3. Imunski odgovor domaćina na <i>Trichinella spiralis</i>	17
1.4. Mehanizmi kojima <i>T. spiralis</i> moduliše imunski odgovor domaćina.....	19
1.5. Uloga dendritskih ćelija u imunskom odgovoru domaćina na parazite.....	22
1.6. Uloga makrofaga u imunskom odgovoru domaćina na parazite.....	29
1.7. Receptori za molekulske obrasce.....	30
1.8. Signalni putevi pokrenuti interakcijom TLR i PAMPa.....	35
1.9. Molekularni mehanizmi kojima paraziti modulišu imunski odgovor domaćina.....	39
2. CILJEVI.....	44
3. MATERIJAL I METODE.....	47
3.1. Životinje.....	48
3.2. Kultura ćelijskih linija.....	48
3.3. Održavanje soja parazita <i>T. spiralis</i>	50
3.4. Priprema antigena parazita.....	50
3.4.1. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) <i>T. spiralis</i>	50

3.4.2.	Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ESL1) <i>T. spiralis</i>	50
3.4.3.	Perjodatom tretirani ESL1 antigen (pESL1).....	51
3.4.4.	Antigen <i>T. spiralis</i> izolovan na 7C2C5 koloni (7C2C5Ag).....	52
3.4.5.	Rekombinantni p53 antigen (rTsp53) <i>T. spiralis</i>	52
3.5.	Dobijanje i gajenje dendritskih ćelija kostne srži.....	52
3.6.	Western blot analiza - učešće ERK1/2 i p38 kinaze u signalnom putu pokrenutom interakcijom DĆ i antigena <i>T. spiralis</i>	54
3.7.	Izolovanje ćelija slezine i magnetno sortiranje T limfocita.....	55
3.8.	Ko-kultivacija stimulisanih DĆ naivnim T limfocitima.....	56
3.9.	Određivanje ekspresije površinskih markera na dendritskim ćelijama.....	57
3.10.	<i>In vivo</i> primena nativnih i perjodatom tretiranih ESL1 produkata i analiza imunskog odgovora.....	58
3.11.	Izolovanje slezine iz pacova imunizovanih nativnim i perjodatom tretiranim ESL1 antigenima <i>T. spiralis</i>	58
3.12.	Izolovanje RNK	59
3.13.	Reverzna transkripcija.....	60
3.14.	Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	60
3.15.	Izolovanje makrofaga iz pacova imunizovanih antigenima <i>T. spiralis</i>	62
3.16.	Određivanje nivoa nitrita Griessov-om metodom.....	62
3.17.	Restimulacija T limfocita izolovanih iz <i>T. spiralis</i> inficiranih DA pacova antigenima <i>T. spiralis</i> - Recall eksperiment.....	63
3.18.	Određivanje koncentracije citokina primenom ELISA testa.....	63

3.19.	Stimulacija HEK-Blue™ ćelijskih linija sa antigenima parazita.....	64
3.20.	SEAP reporter genski test (engl. SEAP reporter gene assay).....	64
3.21.	Statistička obrada podataka.....	66

4. REZULTATI.....67

4.1.	Ispitivanje značaja glikana ESL1 produkata za polarizaciju imunskog odgovora <i>in vivo</i>	68
4.1.1.	Modifikacija ugljenohidratne strukture ESL1 produkata <i>T. spiralis</i>	68
4.1.2.	Uticaj glikana ESL1 antigena na produkciju citokina od strane ćelija slezine.....	69
4.1.3.	Uticaj glikana ESL1 antigena na ekspresiju gena za citokina u ćelijama slezine <i>in vivo</i>	70
4.1.4.	Ispitivanje značaja glikana ESL1 antigena za aktivaciju urođenog imunskog odgovora.....	73
4.1.5.	Proliferacija i citokinski profil <i>T. spiralis</i> senzibilisanih ćelija slezine restimulisanih antigenima <i>T. spiralis</i>	74
4.2.	Ispitivanje uloge glikana ESL1 i pojedinih komponenti ESL1 u pokretanju imunskog odgovora <i>in vitro</i>	77
4.2.1.	Uticaj ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53 antigena na sazrevanje dendritskih ćelija.....	77
4.2.2.	Citokinski profil dendritskih ćelija stimulisanih antigenima: ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53.....	80
4.2.3.	Kapacitet dendritskih ćelija da prezentuju antigene <i>T. spiralis</i> naivnim T limfocitima.....	83

4.2.4.	Polarizacija T ćelijskog odgovora pod uticajem dendritskih ćelija stimulisanih različitim antigenima <i>T. spiralis</i>	85
4.3.	Molekularni mehanizmi kojima <i>T. spiralis</i> moduliše imunski odgovor domaćina.....	88
4.3.1.	Interakcija TLR i NOD receptora sa antigenima <i>T. spiralis</i>	88
4.3.2.	Učešće MAP kinaza u signalnom putu pokrenutom interakcijom DĆ sa ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag.....	93

5.	DISKUSIJA.....	97
----	----------------	----

6.	ZAKLJUČCI.....	118
----	----------------	-----

7.	LITERATURA.....	123
----	-----------------	-----

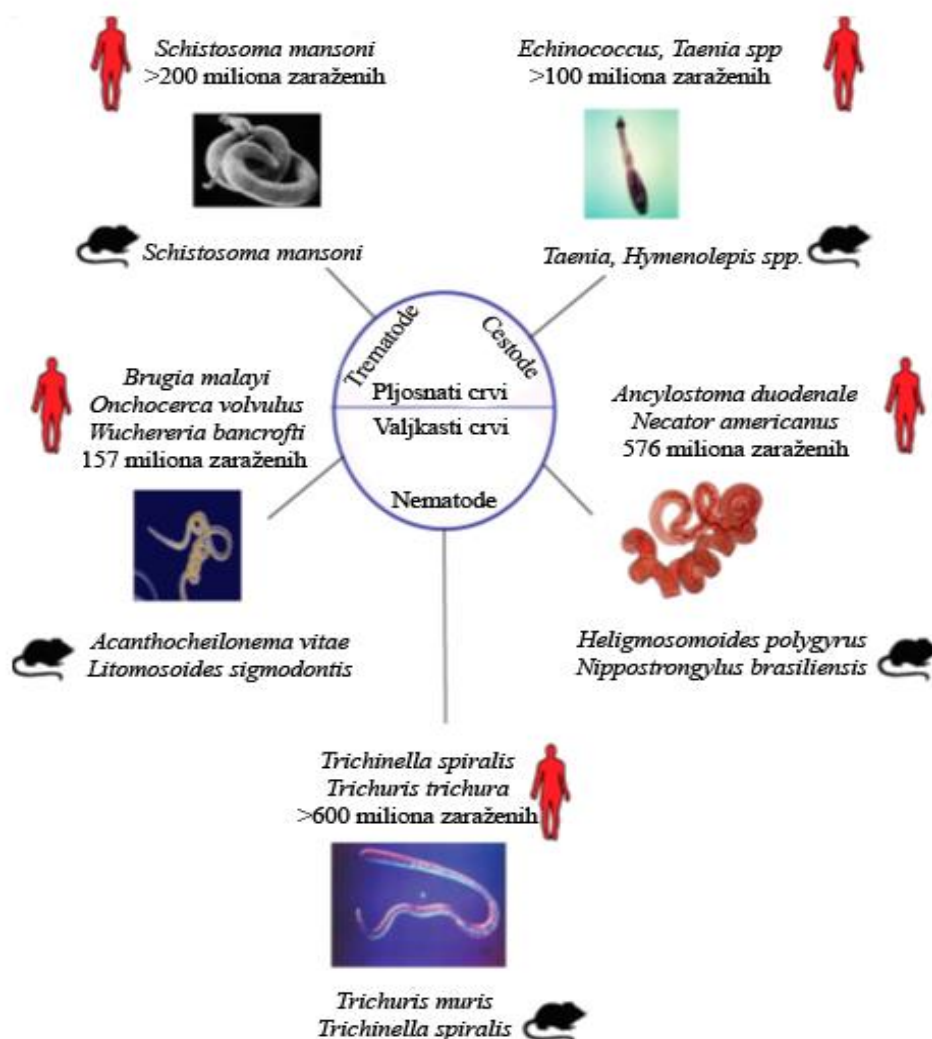
1.UVOD

Helminti predstavljaju veliku grupu višecelijskih organizama, od kojih je najveći broj adaptiran da parazitira u telu domaćina (životinje ili čoveka). Često ih nazivaju i parazitskim crvima zbog njihovih morfoloških karakteristika. Ove organizme karakteriše postojanje životnih stadijuma koji najčešće parazitiraju u različitim domaćinima (kičmenjacima i beskičmenjacima), mada neki stadijumi mogu biti i slobodnoživeći. Tokom duge ko-evolucije helminti su razvili različite mehanizme kojima izbegavaju ili ograničavaju imunski odgovor domaćina, obezbeđujući opstanak u telu domaćina dugi niz godina. Na taj način parazit ispunjava osnovnu biološku funkciju, reprodukciju, i ostvaruje opstanak vrste. Helminti se prenose biološkim vektorima, hranom, vodom ili rukama uprljavim kontaminiranim zemljištem, a zbog svoje široke rasprostranjenosti predstavljaju konstantnu pretnju zdravlju ljudi i životinja. Smatra se da su paraziti danas najčešći uzrok bolesti ljudi širom sveta, a da je jedna trećina svetske populacije inficirana nematodama (de Silva i saradnici, 2003). Najučestalije helmintoze u svetu su izazvane vrstama kao što su *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *Brugia malayi* (*B. malayi*), *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*), *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) i dr. (slika 1) (Maizels i saradnici, 2009).

S druge strane, epidemiološke studije sprovedene u poslednje dve decenije u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju pokazale su da postoji obrnuta korelacija između zastupljenosti parazitoza u populaciji i pojave različitih alergijskih, atopijskih i autoimunskih oboljenja, koja u osnovi imaju prekomerno razvijen inflamatorni odgovor (Ruysers i saradnici, 2008; Cooper, 2009). Ova zapažanja su dovela do postavke „higijenske hipoteze“ (Strahan, 1989), koja poslednjih godina izaziva sve veći interes istraživača, po kojoj neki paraziti, uključujući helminte, mogu da obuzdaju prekomernu inflamaciju i na taj način ublaže ili spreče razvoj alergijskih i autoimunskih bolesti.

Infekcije helmintima karakterišu se Th2 tipom imunskog odgovora koji obuhvata produkciju anti-inflamatornih citokina (interleukina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13), antitela IgE, IgG1, IgG4 klase, ekspanziju mast ćelija, eozinofila, bazofila, alternativno aktiviranih makrofaga i regulatornih T ćelija. Ovakav odgovor suprimira produkciju pro-inflamatornih Th1/Th17 citokina i prekomernu inflamaciju i na taj način kontroliše i ograničava odgovor organizama usmeren ne samo protiv parazita već i prema drugim neparazitskim antigenima (Allen i Maizels, 2011). S obzirom da je u osnovi patologije hroničnih inflamatornih bolesti prekomerna aktivnost inflamatornih ćelija: Th1 i Th17

(Haak i saradnici, 2009), proučavanje mehanizama kojima helminti suprimiraju i modulišu imunski odgovor domaćina može omogućiti razvoj novog imunoterapijskog pristupa u lečenju ovih oboljenja (McKay, 2009; Kuijk i van Die, 2010).



Slika 1. Prikaz najučestalijih infekcija parazitima kod ljudi

(Maizels i saradnici, 2009).

Veliki broj studija na životinjskim modelima pokazao je da helmintske infekcije mogu da spreče ili ublaže razvoj autoimunskih bolesti kao što su eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) (Fleming, 2013), dijabetes tipa 1 (Zacccone i Cooke, 2013), eksperimentalni kolitis (Smith i saradnici, 2007), reumatoidni artritis (Osada i saradnici, 2009) i dr. Takođe, prva klinička ispitivanja na ljudima su pokazala

da infekcija *Trichuris suis*-om (*T. suis*), helmintom koji prirodno inficira svinje, ali ne i ljude, poboljšava kliničku sliku obolelih od Kronove bolesti (Summers i saradnici, 2005a), ulceroznog kolitisa (Summers i saradnici, 2005b) i multiple skleroze (Benzel i saradnici, 2012). Iako infekcija parazitima daje ohrabrujuće rezultate, jasno je da primena živih parazita nosi sa sobom potencijane rizike. Zato su danas u fokusu ispitivanja molekula i mehanizama koji su uključeni u imunomodulaciju, sa ciljem da se ta saznanja primene u terapiji inflamatornih oboljenja (Maizels, 2009). Helminti komuniciraju sa organizmom domaćina putem molekula koji se nalaze na njihovoj površini ili koji se aktivno ekskretuju/sekretuju. Ovi molekuli po biohemijskoj strukturi mogu biti proteini, nukleinske kiseline, lipidi, ugljenihidrati ili njihove kombinacije (glikoproteini, glikolipidi i dr.) i imaju važnu ulogu u invaziji, procesu razvoja parazita ili u pokretanju imunskog odgovora, urođenog ili stečenog (Harnett i Harnett, 2006). Takođe, za neke od ovih molekula je potvrđeno da imaju imunomodulatorne osobine i da su efikasni u sprečavanju inflamatornih oboljenja u animalnim modelima, ukazujući da prisustvo infekcije ovim parazitima nije jedini način za indukovanje protektivnog efekta (Sewell i saradnici, 2003; Harnett i saradnici, 2004; Zacccone i Cooke, 2013). Pokazano je da solubilni ekstrakti jaja *S. mansoni* (SEA) mogu imati važnu ulogu u prevenciji EAEa (Sewell i saradnici, 2003), dijabetesa tipa 1 (Maron i saradnici, 1998) i kolitisa indukovaniog trinitrobenzen sumpornom kiselinom (Elliott i saradnici, 2003). Ekskretorno-sekretorni produkt ES-62 *Acanthocheilonema viteae* (*A. viteae*) koji sadrži fosforilholin (engl.phosphorilcholine, PC) može da suprimira artritis indukovan kolagenom (Harnett i saradnici, 2004; Pineda i saradnici, 2012), dok ekskretorno-sekretorni produkti *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) suprimiraju razvoj astme u miševima preosetljivim na ovalbumin (Trujillo-Vargas i saradnici, 2007).

1.1.Parazit *Trichinella spiralis*, životni ciklus i odnos parazita i domaćina

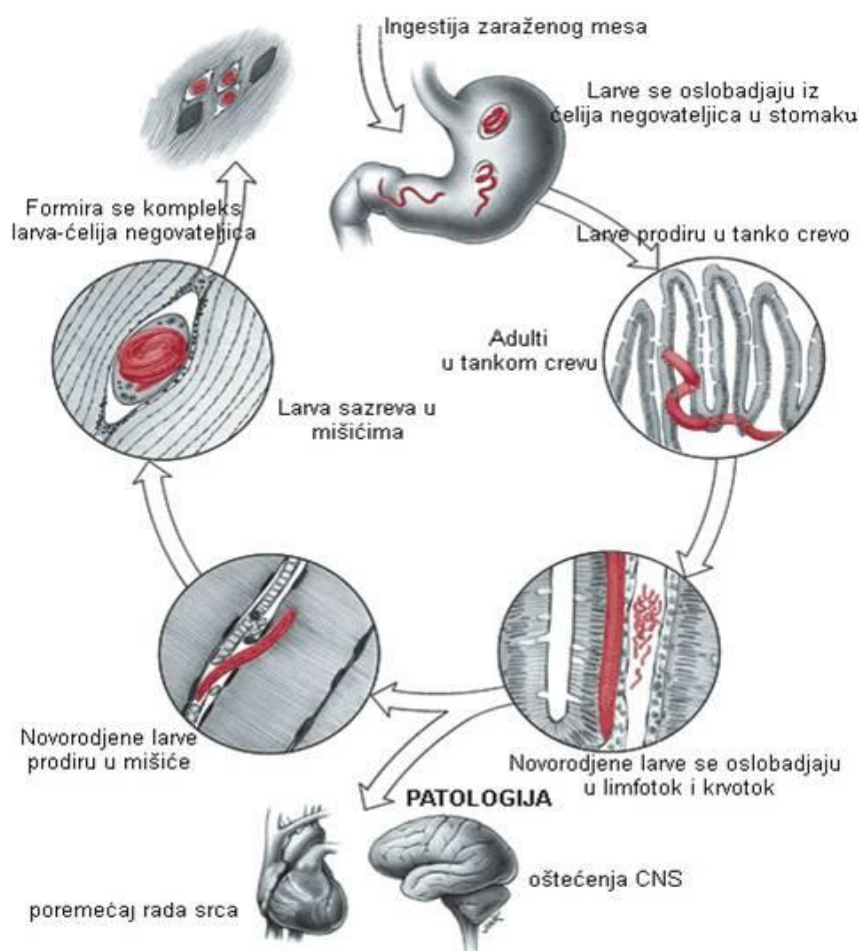
Parazitske nematode iz roda *Trichinella* su široko rasprostranjene na svim kontinentima osim Antarktika. Od otkrića ovog parazita 1835. do 1972. godine smatralo se da u okviru roda *Trichinella* postoji samo jedna vrsta i to *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*). Danas se u okviru ovog roda razlikuju devet vrsta i tri genotipa koji se, u zavisnosti od toga da li imaju sposobnost stvaranja kapsule ili ne, dele na inkapsulirane i

neinkapsulirane forme. Inkapsulirane forme inficiraju sisare uključujući čoveka i obuhvataju šest vrsta (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murelli*, *T. nelsoni* i *T. patagoniensis*) i tri genotipa (*Trichinella* T6, T8 i T9). Tri vrste: *T. pseudospiralis*, *T. papuae* i *T. zimbabwensis* ubrajaju se u neinkapsulirane forme. *T. pseudospiralis* inficira sisare i ptice, dok druge dve vrste *T. papuae* i *T. zimbabwensis* inficiraju gmizavce i sisare (Nagano i saradnici, 1999; Pozio i La Rosa, 2003; Pozio, 2007; Krivokapich i saradnici, 2012).

T. spiralis ima kosmopolitsku distribuciju i za razliku od drugih vrsta i genotipova, samo se ova vrsta prvenstveno održava kod domaćih, ali je takođe prisutna i kod divljih životinja (divlja svinja, medved, lisica i dr.). Izaziva oboljenje trihinelozu koje često prolazi asimptomatski. Klinička slika je najčešće blaga, a retko može doći do ugožavanja vitalnih funkcija i smrti domaćina. Ovaj parazit je jedinstven po tome što se sva tri stadijuma životnog ciklusa: adult, novorođena larva (engl. new born larvae-NBL) i infektivna mišićna larva (L1), odvijaju u jednom domaćinu (slika 2). Dva stadijuma, adult i L1, su intracelularna, dok je NBL pozicionirana ekstracelularno. Adulti okupiraju intestinalni epitel tankog creva dok mišićne larve naseljavaju skeletne mišiće. Za razliku od većine intracelularnih parazita, *Trichinella* okupira mišićne ćelije domaćina, ali ih ne ubija i zato se smatra jednim od najuspešnijih parazitskih simbionata (Wu i saradnici, 2001; Yopez-Mulia i saradnici, 2007; Wu i saradnici, 2009).

Do infekcije domaćina dolazi konzumiranjem mesa koje u sebi sadrži inkapsulirane infektivne larve L1. Tokom varenja, kapsule se razlažu u želucu pod uticajem hlorovodonične kiseline i gastrointestinalnih enzima, što rezultira oslobađanjem infektivnih larvi. Oslobođene larve se aktiviraju pod dejstvom žučnih sokova i prodiru u mukoza tankog creva, presvlače se četiri puta tokom prvih 30 sati (stadijumi sazrevanja L2-L4) i zatim sazrevaju u adulte. Adulti kopuliraju i već nakon 5-6 dana od infekcije ženke proizvode NBL. NBL oslobođene u crevnoj mukozu prodiru u krvotok i limfotok i na taj način dospevaju u razna tkiva i organe, uključujući miokard, mozak, ali samo one koje prodiru u poprečno-prugaste mišiće mogu nastaviti svoj razvoj (Jasmer, 1993; Despommier, 1998). Larve probijaju sarkolemu mišićnih ćelija i ulaze u citoplazmu. Inficirana mišićna ćelija podleže reprogramiranju genetskog materijala, gubi organizaciju mišićne ćelije, dolazi do njenog remodelovanja i transformacije u novu strukturu poznatu pod nazivom ćelija negovateljica. Period od

kada larva uđe u mišićnu ćeliju do formiranja kompleksa parazita i ćelije negovateljice traje 21 dan (Despommier, 1998).



Slika 2. Životni ciklus *T. spiralis* (Despommier i saradnici, 2005).

Ćelije negovateljice predstavljaju novu vrstu ćelija u organizmu domaćina i nemaju nikakvu biohemijsku i morfološku sličnost sa neinficiranim mišićnim ćelijama. Ove ćelije nastaju fuzijom inficirane mišićne ćelije i traumom aktivirane satelitske ćelije. Danas se veruje da produkti larvi pokreću dobro balansirane pro- i anti-apoptotske mehanizme koji ne samo da zaustavljaju potpuno sazrevanje satelitske u mišićnu ćeliju već istovremeno zaustavljaju i razgradnju inficirane mišićne ćelije u kojoj dovode do stvaranja velikog broja hipertrofičnih jedara. Ipak, molekularni

mehanizmi uključeni u proces transformacije nisu dovoljno poznati. Pokazano je da se ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi (ESL1) nalaze u citosolu i nukleusima mišićnih ćelija (Despommier, 1990; Lee i saradnici, 1991) i zato se smatra da oni mogu imati važnu ulogu u reorganizaciji ćelija domaćina (Guliano, 2009). Promene u reorganizaciji ćelija koreliraju sa promenama u genskoj ekspresiji domaćina (Fabre i saradnici, 2009a). Smanjena je ekspresija strukturnih i regulatornih gena mišićnih ćelija uključujući gene za kontraktilne proteine, aktin i miozin, i inaktiviran je program za diferencijaciju (Jasmer i saradnici, 1991; Jasmer, 1993), dok je indukovano stvaranje novih transkripata kao što su transmembranski glikoprotein sindekan (engl. syndecan) (Jasmer, 1993; Beiting i saradnici, 2004), kisela fosfataza (Jasmer i saradnici, 1991), kolagen i solubilni faktor, vaskularni endotel faktor rasta (VEGF) (Despommier, 1998). Kao rezultat procesa reorganizacije ćelija nastaje ćelija negovateljica, oko koje počinje da se stvara kapsula, poreklom od domaćina i izgrađena većim delom od kolagena tipa IV (sintetisan od strane ćelije negovateljice i čini unutrašnji sloj kapsule) i VI (sintetisan od okolnih fibroblasta i čini spoljašnji sloj kapsule) (Polvere i saradnici, 1997; Despommier, 1998). Kapsula je polupropustljiva membrana, obavijena novonastalim krvnim sudovima, -venulama, i omogućava prolaz hranljivih materija male molekulske mase u pravcu parazita kao i ESL1 produkata u pravcu domaćina, ali je nepropustljiva za specifična antitela i ćelije specifične za komponente parazita. Zato se kaže da parazit ima imunoprivilegovano mesto u organizmu domaćina. S druge strane, *T. spiralis* svojim produktima direktno komunicira sa organizmom domaćina, njegovim imunokompetentnim ćelijama i na taj način modulira imunski odgovor domaćina. Može se reći da metaboliti parazita utiču ne samo na formiranje ćelije negovateljice i održavanje homeostaze u okviru nje, već i na održavanje homeostaze na nivou čitavog organizma, i kreiranje sredine koja obezbeđuje opstanak parazita i organizma domaćina (Bruschi i saradnici, 2002).

1.2. Antigeni parazita *T. spiralis*

Tokom životnog ciklusa *T. spiralis* eksprimira brojne molekule od kojih su neki karakteristični za pojedine stadijume životnog ciklusa, dok su drugi prisutni u svim stadijumima (Nakada i saradnici, 2005). Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum parazita dolazi do promena u ekspresiji antigenskih molekula, što može biti jedna od strategija izbegavanja odbrane domaćina. S druge strane, razlike u strukturi antigena specifičnih za svaki stadijum ponaosob, dovode do pokretanja imunskog odgovora karakterističnog za svaku fazu životnog ciklusa ovog parazita tj. imunskog odgovora domaćina specifičnog za stadijum (Boireau i saradnici, 1997).

Zavisno od lokalizacije antigeni *Trichinella*-e se dele na: površinske, ekskretorno-sekretorne (ES) i somatske antigene (Dea-Ayela i Bolas-Fernandez, 1999). Mnogi od ovih antigena su imunogeni, indukuju imunski odgovor koji je bifaznog karaktera i u zavisnosti od vremena kada indukuju produkciju antitela u toku infekcije podeljeni su na antigene prve i antigene druge grupe.

Antigeni prve grupe su komponente parazita koje indukuju produkciju antitela u toku intestinalne faze, dve nedelje nakon infekcije (Takahashi, 1997). Ovi antigeni u svojoj strukturi sadrže PC (Takahashi i saradnici, 1993). PC je fosfolipid, mali haptent, koji je važan za razvoj i fertilitet, a ujedno ima ulogu u modulaciji imunskog sistema domaćina u smislu ublažavanja ili gašenja inflamatornog odgovora, što može doprineti ne samo dugotrajnom preživljavanju parazita već i ograničavanju patoloških promena u tkivima domaćina (Grabitzki i Lochnit, 2009). Komparativna studija, u kojoj su korišćena PC specifična antitela, je pokazala različitu distribuciju PC antigena kod različitih životnih stadijuma *T. spiralis* (Takahashi i saradnici, 1993). Na ultrastrukturnom nivou, PC antigeni su bili odsutni u novorođenim larvama, ali su u izobilju prisutni u unutrašnjoj strukturi mišićnih larvi i odraslih parazita. U mišićnim larvama, ovaj antigen je pronađen u unutrašnjem sloju kutikule i raznim organima, uključujući i hipodermis, membrane mišića, genitalni primordijum i digestivni trakt, dok je bojenje bilo odsutno na površini kutikule ili granulama stihocita. Kod odraslih parazita, unutrašnji sloj kutikule je ostao nebojen, što ukazuje na razliku u strukturi kutikule ove dve faze životnog ciklusa *T. spiralis* (Sanmartin i saradnici, 1991; Hernandez i saradnici, 1995; Takahashi, 1997). Za antitela specifična za fosforilholinu

je pokazano da se javljaju devet dana nakon infekcije i da nemaju protektivnu ulogu u zaštiti od infekcije (Peters i saradnici, 1999).

Antigeni druge grupe, označeni kao grupa II ili TSL antigeni (Appleton i Romaris, 2001), indukuju kasnu fazu imunskog odgovora i produkciju antitela četiri do pet nedelja nakon infekcije (Takahashi, 1997). Na osnovu imunohemijskih karakteristika i primenom monoklonskih i poliklonskih antitela, ovi antigeni su klasifikovani u osam grupa (TSL1-TSL8) (Yepez-Mulia i saradnici, 2007). TSL1 grupa antigena je najviše proučavana i najbolje okarakterisana grupa antigena zbog činjenice da mogu izazvati stvaranje antitela koja domaćinu obezbeđuju zaštitu od ponovne infekcije (Ortega-Pierres i saradnici, 1996; Bolas-Fernandez i saradnici, 2006). Ovi antigeni predstavljaju grupu srodnih glikoproteina, koji dele zajednički ugljenohidratni epitop, tivelozu (3,6-dideoksi-D-arabinoheksosa), karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog roda *Trichinella* (Gomez-Morales i saradnici, 2008). Ovi antigeni se oslobađaju iz mišićnih larvi najpre u intestinalnom epitelu ubrzo nakon infekcije, a potom kada se NBL larva u mišićnoj ćeliji transformiše u mišićnu larvu, što sve sugeriše na funkcionalnu ulogu pomenutih antigena u uspostavljanju i održavanju parazitizma. Ovi antigeni su stadijum specifični, potiču iz stihozoma mišićne larve parazita i nalaze se u ESL1 produktima i na površini kutikule larvi. Metodom Western blota je pokazano da većina anti-TSL1 antitela prepoznaje glikoproteine molekulskih težina između 40 i 70 kDa u homogenatu mišićnih larvi i ESL1 produktima (Ortega-Pierres i saradnici, 1996). Primenom 7C2C5 monoklonskog antitela, koje pripada ovoj grupi antitela, pokazano je prisustvo epitopa karakterističnog za stadijum mišićnih larvi čitavog roda *Trichinella*, na tripletu antigena molekulskih masa 45, 49 i 53 kDa (Gamble i Graham, 1984). Prisustvo ovih molekula u svim vrstama roda *Trichinella* čini ih dobrim kandidatima za antigene koji ne samo da imaju značajnu ulogu u uspostavljanju sistema parazita i domaćina, već i u modulaciji imunskog odgovora.

ESL1 produkti mišićnih larvi *T. spiralis* se kontinuirano oslobađaju u cirkulaciju tokom života inkapsulirane mišićne larve i predstavljaju stalan stimulus za imunski sistem. Parazit na ovaj način kreira sredinu koja je pogodna ne samo za njegovo preživljavanje, već i za preživljavanje domaćina. Analiza ESL1 smeše proteina dvo-dimenzionalnom elektroforezom (2DE) detektovala je 150 proteinskih tačaka, molekulskih masa od 14 do 66 kDa (Wang i saradnici, 2013, 2014). Deset proteinskih

tačaka, molekularnih masa između 30-40 kDa, identifikovane su i okarakterisane pomoću masene spektrometrije (engl. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) i pokazano je da predstavljaju pet različitih proteina: dve serin proteaze, jedna dezoksiribonukleaza II (DNKaza II), a preostala dva proteina pripadaju tripsinu sličnim serin proteazama. Ukupno 16 proteinskih tačaka molekularnih težina između 40 i 60 kDa su takođe okarakterisane i predstavljaju pet različitih proteina uključujući dve serin proteaze, jednu DNKazu II i dve vrste tripsina. Druge studije su takođe identifikovale postojanje jednog ES proteina u više proteinskih tačaka, kao što su 5'-nukleotidaza i serin proteaze (Robinson i Connolly, 2005; Bien i saradnici, 2012). Do sada je pokazano da se u ESL1 produktima nalaze: proteini toplotnog šoka (engl. heat shock proteins, HSP), endonukleaze, proteinaze, protein kinaze, inhibitori proteinaza, superoksid dismutaze, glikozidaze, parakini (analozi humanim citokinima) i dr. (Nagano, 2009). Najzastupljeniji antigeni u ESL1 produktima su glikoproteini molekularnih masa 43, 45 i 53 kDa. Navedeni glikoproteini imaju važnu ulogu u transformaciji mišićne ćelije, formiranju kapsule i održavanju parazitizma (Nagano, 2009). SDS elektroforezom ES antigeni se razdvajaju na oko 40 glikoproteinskih komponenti, ali se danas zna da je to svega 13 molekula dok su ostalo njihove izoforme. Za komponente koje pripadaju TSL1 grupi ustanovljeno je da nose specifičan epitop tivelozu i predstavljaju glavne antigene koje domaćin prepoznaje tokom infekcije (Appleton i saradnici, 1991). Kao što je gore pomenuto, identifikacija jednog proteina u više tačaka, može se objasniti postojanjem više izoformi jednog proteina, nastalih kao posledica alternativnog splajsovanja i posttranslacionih modifikacija (hemijska modifikacija proteina) koje obuhvataju fosforilaciju, acetilaciju, glikozilaciju i koje su važne za biološku funkciju proteina u preživljavanju parazita, izbegavanju imunskog sistema i imunopatogenezu (Bien i saradnici, 2012; Wang i saradnici, 2014).

Glikoprotein od 43 kDa (gp 43). Gen za gp 43 protein iz sastava ES antigena *Trichinella* se eksprimira u mišićnim larvama pre i posle formiranja kapsule, što ukazuje da ovaj glikoprotein možda ima važnu ulogu u formiranju kapsule, koja nastaje neposredno nakon ulaska NBL u mišićne ćelije (Wu i saradnici, 2002). Iako se ovaj protein eksprimira u intracelularnim mišićnim larvama, inhibicija ekspresije gena za gp 43 ne sprečava preusmeravanje diferencijacije i nastanak novog fenotipa inficirane

mišićne ćelije (Jasmer i Kwak, 2006). Skorašnja istraživanja su pokazala da gp 43 ima DNKaza II α aktivnost (Nagano, 2009), za koju se smatra da ima važnu ulogu u intestinalnoj fazi infekcije i invaziji larve *T. spiralis* u intestinum (Jasmer i Kwak, 2006). Za DNKazu II α je pokazano da razgrađuje oslobođenu dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) iz ćelija (u kojima je pokrenuta apoptoza) na oligonukleotidne sekvence i na taj način sprečava razvoj autoimunskog odgovora koju oslobođena DNK može pokrenuti u organizmu domaćina (Hanayama i saradnici, 2004).

Glikoprotein od 45 kDa (gp 45) pripada porodici serin proteaza sličnih tripsinu (Robinson i saradnici, 2007a) i nalazi se u beta i gama stihocitima sekretornog organa mišićnih larvi (stihozom, ima pet vrsta granula), ali i u stihocitnim granulama tipa jedan kod odraslih parazita (Nagano, 2009). Pokazano je da gp 45 može da inhibira različite funkcije neutrofila kao što su oksidativni metabolizam, mobilnost, hemotaksa i sinteza integrina, što ukazuje na njegovu anti-inflamatornu ulogu (Bruschi i saradnici, 2000).

Glikoprotein od 53 kDa (gp 53). Gen koji kodira ovaj glikoprotein se eksprimira u mišićnoj larvi (posle formiranja kapsule) i kod odraslih parazita, ali ne i kod novorođenih larvi, i mišićnih larvi pre formiranja kapsule (Wu i saradnici, 2002). Ovi nalazi ukazuju da gp 53 nije odgovoran za transformaciju mišićne ćelije i formiranje kapsule i da je mnogo verovatnije da je njegova uloga u vezi sa održavanjem parazitizma i modulacijom imunskog odgovora domaćina (Nagano i saradnici, 2009). Gp 53 poseduje epitope koji su specifični za sve inkapsulirane *Trichinella* vrste, dok su neki epitopi, kao što je epitop prepoznat od strane monoklonskog antitela US5, prisutan samo kod *T. spiralis* (Romaris i saradnici, 2002). Studije u kojima je dobijen rekombinantni 53 kDa (rTsp53) pokazale su da za razliku od drugih antigena iz TSL1 grupe, čija je antigenost uglavnom uslovljena prisustvom taveloze u sastavu epitopa, antigenost p53 je uglavnom posledica proteinskih epitopa (Perteguer i saradnici, 2004). Za rTsp53 je pokazano da ima imunomodulatorni kapacitet i da može značajno da ublaži tok eksperimentalnog kolitisa kod miševa (Du i saradnici, 2011; Du i saradnici, 2014).

Endonukleaze - ES produkti sadrže **dvolančanu endonukleazu** koja može da prepozna DNK mišićne ćelije domaćina (Mak i Ko, 1999). Uloga ove endonukleaze nije razjašnjena. Moguće je da sekretovane endonukleaze mogu kontrolisati ćelijski ciklus i zaustaviti ga u G2/M fazi (što je slučaj sa sazrevanjem satelitske ćelije pre njene fuzije

sa invadiranom mišićnom ćelijom) u toku procesa formiranja kompleksa parazita i ćelije negovateljice (Jasmer, 1993). Pronađene su i **jednolančane endonukleaze** koje se razlikuju po biohemijskoj strukturi od dvolančanih. Pretpostavlja se da imaju ulogu u patogenezi i reorganizaciji mišićnog tkiva (Mak i saradnici, 2000). U ESL1 produktima je detektovan veći broj DNKaza II (Liao i saradnici, 2014) koje imaju važnu ulogu u interakciji parazita i domaćina i razgradnji DNK oslobođene tokom pro-apoptoskih procesa u invadiranim ćelijama. *T. spiralis* tokom invazije indukuje oslobađanje velike količine DNK, koja bi mogla dovesti do pojave miozitisa i nekih autoimunskih oboljenja kao što je artritis (Liu i saradnici, 2008). DNKaze II prisutne u ESL1 produktima razgrađuju oslobođenu DNK i na taj način otklanjaju opasnost od pojave autoantitela. Zbog svoje uloge, DNK-aze II prisutne u ESL1 produktima se mogu razmotriti kao kandidati za terapeutike u lečenju autoimunskih oboljenja, DNKaze deficitarnih oboljenja ili kancera (Liu i saradnici, 2008).

Proteaze (proteinaze) imaju važnu ulogu u različitim fiziološkim i patološkim procesima u koje je uključen ovaj parazit kao što su prodiranje u tkivo, migracija larvi, izbegavanje imunskog sistema, usporavanje koagulacije krvi, digestija i degradacija ćelijskog i vanćelijskog matriksa i degradacija fibrinogena i plazminogena (Todorova i saradnici, 1995; Nagano i saradnici, 2009). Mogu da budu i imunodominantni antigeni koji stimulišu protektivni imunski odgovor, kao i potencijalna meta u terapiji (Nagano i saradnici, 2009). U ESL1 produktima *T. spiralis* su detektovane serin-, cistein-, aspartat-, i metalo proteinaze (Lun i saradnici, 2003; Dzik i saradnici, 2006; Nagano i saradnici, 2009). Nekoliko studija je predložilo ulogu helmintskih **cistein proteinaza** u inhibiciji Th1 imunskog odgovora indukcijom produkcije IL-4. IL-4 je glavni citokin odgovoran za Th2 diferencijaciju i produkuje ga uglavnom CD4⁺ T ćelije (Dzik, 2006). Machado i saradnici (1996) su pokazali da cistein proteinaze poreklom iz različitih patogena uključujući parazite, indukuju degranulaciju mast ćelija i bazofila i produkciju IL-4, koji je najverovatniji uzročnik suprimiranja Th1 odgovora. U *in vitro* uslovima, mišićne larve *T. spiralis* sekretuju cistein proteinaze iz stihozoma (Moczon i Wranicz, 1999). Cistein proteinaze poreklom od *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) indukuju produkciju Th2 citokina IL-4 i IL-10 i u isto vreme snižavaju produkciju interferona- γ (IFN- γ), Th1 citokina (O'Neill i saradnici, 2001). **Serin proteaze** su najzastupljenije u ESL1 produktima *T. spiralis* (Todorova, 2000) i pokazano je da imaju važnu ulogu u

razviću *Trichinella* prvenstveno tokom prodiranja u tkivo, invazije i migracije parazita (Li i saradnici, 2013). Lun i saradnici su detektovali (2003), postojanje **metaloproteinaza** u ESL1 produktima *T. spiralis*. Matriksne metaloproteinaze (MMP) su velika familija solubilnih ili membranskih endopeptidaza, koje učestvuju u različitim fiziološkim ili patološkim procesima. Ovi enzimi degraduju komponente ekstraćelijskog matriksa kao što su kolagen, laminin i fibronektin, ali deluju i na različite biomolekule (citokine, hormone i hemokine) (Geurts i saradnici, 2012). Tako je npr. pokazano da postoji pozitivna sprega između IL-8 i MMP-9. IL-8 pokreće hemotaksu i degranulaciju neutrofila i omogućava oslobađanje MMP-9 koja zatim seče IL-8 i povećava biološku aktivnost ovog hemokina (van den Steen i saradnici, 2000). **Aspartat proteinaze** imaju ulogu u razvoju parazita, kao i u razgradnji ekstraćelijskog matriksa, digestiji hemoglobina i dr. Nedavno je u ES produktima *T. spiralis* detektovana aspartat proteinaza, molekulske mase oko 45 kDa koja se najviše eksprimira u reproduktivnom traktu, što možda ukazuje da ovaj enzim ima važnu ulogu u razvoju organa za razmnožavanje mišićnih larvi. Takođe, za rekombinantnu formu ove proteinaze je pokazano da razgrađuje kolagen *in vitro* (Park i saradnici, 2012).

Inhibitori proteinaza. Nekontrolisana aktivnost proteinaza može biti destruktivna za ćeliju ili organizam. Zbog toga je njihova aktivnost precizno regulisana endogenim inhibitorima. Najbolje okarakterisani inhibitori proteinaza kod parazita su inhibitori cistein-, serin-, aspartat proteinaza. Za neke od njih (npr. inhibitore cistein proteinaza, cistatini i serin proteinaza, serpini) je pokazano da imaju imunomodulatorna svojstva (Hartmann i Lucius, 2003; Dzik, 2006; Gregory i saradnici, 2008) i da mogu redukovati progresiju inflamatornih bolesti. Robinson i saradnici (2007b) su u okviru ESL1 antigena *T. spiralis* otkrili **protein sličan cistatinu** (engl. Multi cystatin-like domain protein, MCD-1) molekulske težine od 46 kDa. Ovaj protein nije pronađen u ES produktima *T. pseudospiralis*. Proteini slični cistatinu nemaju aktivnost inhibicije cistein proteinaza, a to je po svemu sudeći slučaj i sa MCD-1, pošto je ustanovljeno da ovaj protein ne inhibira cistein proteinazu papain *in vitro*. Za fetuin, protein sličan cistatinu je pokazano da vezuje faktore transformacije rasta β (engl. Transforming Growth Factor β , TGF- β 1 i TGF- β 2) i da može imati funkciju antagonista citokina. Pretpostavlja se da bi MCD-1 mogao imati ulogu pro-inflamatornog faktora i sličnu funkciju kao fetuin jer je detektovan nizak nivo ekspresije TGF- β u epitelu intestinuma

tokom infekcije sa *T. spiralis*. Ovaj nalaz možda bi mogao da objasni zašto je inflamatorni odgovor manji kod infekcija sa *T. pseudospiralis* nego sa *T. spiralis*. **Serpini** imaju ključnu ulogu u regulaciji bioloških procesa kao što su modulacija i inhibicija: imunskog odgovora domaćina, fibrinolize, koagulacije (serpin, antitrombin inhibira trombin i druge proteolitičke koagulacione faktore: FIXa, Xa i XIa) i inflamacije, tako da se pretpostavlja da patogeni produkuju serpine u cilju inhibicije odbrambenih funkcija domaćina (Zang i Maizels, 2001; Rau i saradnici, 2007). Serpin *B. malayi* inhibira dve ključne proteaze neutrofila, katepsin G i elastazu neutrofila, koji su važni medijatori inflamacije i urođenog imunskog odgovora (Maizels i saradnici, 2001). Moguće funkcije serpina opisane su i kod drugih organizama. Protein serpin 1 miksoma virusa vezuje i inhibira proteolitičku aktivnost humanih proteinaza kao što su: plazmin, urokinaza, aktivator plazminogena i protein komplementa C1s i u odsustvu ovog proteina dolazi do jačeg inflamatornog odgovora (Macen i saradnici, 1993). Serpin je detektovan u stihocitima mišićnih larvi *T. spiralis* u ranoj fazi infekcije i pokazano je da rekombinantni protein serpin inhibira 82 % aktivnosti serin proteinaze (Nagano i saradnici, 2009). Nagano i saradnici (2001) su klonirali, okarakterisali gen za serpin kod *T. spiralis* i pokazali da se proteinski produkt ovog gena, molekulske mase oko 42 kDa, nalazi u produktima mišićnih, ali ne i adultnih i novorođenih larvi *T. spiralis*. Funkcija ovog proteina nije opisana.

Parakini (citokinski homolozi). Danas je poznato da kod parazita postoje visoko konzervirane citokinske genske familije čiji se produkti mogu vezivati za citokinske receptore na imunskim ćelijama sisara (Vermeire i saradnici, 2008). Komponente ES produkata parazita koje imaju ovakva svojstva mogu se nazvati parakini (tj. citokini poreklom od parazita, Despommier, 1997). Despommier (1998) smatra da *T. spiralis* sekretuje ove molekule u toku mišićne faze i da ćelije domaćina odgovaraju na signalne molekule i omogućavaju formiranje ćelije negovateljice. U ESL1 produktima mišićnih larvi *T. spiralis* detektovan je homolog humanog inhibitornog faktora migracije (engl. migration inhibitory factor, **MIF**), citokin koji ima značajnu ulogu u urođenoj imunosti kao pro-inflamatorni medijator (Calandra i Roger, 2003).

Proteini toplotnog šoka štite parazita od stresa i oštećenja i imaju važnu ulogu u invaziji tkiva i preživljavanju u toku intraćelijske faze. U ESL1 produktima su

identifikovani proteini molekulskih težina od 11, 45, 53 i 64 kDa (Ko i Fan, 1996). Protein toplotnog šoka 70 (**Hsp70**) *T. spiralis* je protektivni antigen koji indukuje delimičan protektivni imunski odgovor protiv infekcije *T. spiralis* kod miševima. Ova protekcija korelira sa povećanjem titra ukupnog IgG, IgG1 i IgG2a, i povećanim nivoom Th1/Th2 citokina (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 i dr) (Fang i saradnici, 2014). Wu i saradnici (2007) su detektovali mali protein oko 19 kDa (**sHsp**) koji je prisutan u hipodermisu, stihocitima i ezofagusu mišićnih larvi. Pokazano je da rekombinantni sHsp poseduje šaperonsku aktivnost i suprimira agregaciju toplotom indukovane citrat sintaze. Najveći nivo sHsp je zabeležen u zrelih mišićnim larvama (infektivnim larvama), a manji nivo u adultima, novorođenim i nezrelim mišićnim larvama. Ekspresija ovog proteina se povećava usled niskih ili visokih temperatura i sHsp ima ulogu u toleranciji na hemijski i fizički stres i na taj način povećava preživljavanje mišićnih larvi *T. spiralis*.

Glikozidaze se nalaze u ES produktima mnogih parazita, pa i *Trichinella*. Ovi enzimi vrše hidrolizu glikozidnih veza u šećerima i imaju ulogu u invaziji ćelija, modifikaciji i remodelovanju površine ćelija. Jedan od enzima koji je pronađen je **egzo- β heksoaminidaza** (50 kDa), glikan koji sadrži tivelozu i pokazano je da ovaj enzim katalizuje hidrolizu glikozidnih veza koje formiraju N-acetilglukozamin (GlcNAc β) i N-acetilgalatkozamin (GalNAc β) sa drugim molekulima u složenim šećerima (Bruce i Gounaris, 2006).

Protein kinaze kovalentno modifikuju proteine fosforilacijom i na taj način mogu da promene enzimsku aktivnost i regulišu različite metaboličke puteve, gensku ekspresiju i ćelijski ciklus. Protein kinaze *T. spiralis* fosforilišu MyoD (jedan od transkripcionih regulatora bitnih za mišićnu ćeliju) koji se povećano eksprimira u inficiranoj mišićnoj ćeliji kao odgovor na traumatu. Serin-treonin protein kinaze predstavljaju veliku subfamiliju protein kinaza. U ES produktima kod *T. spiralis* su pronađene dve serin-treonin protein kinaze molekulskih težina 70 i 135 kDa koje fosforilišu uglavnom proteine između 50 i 55 kDa (Arden i saradnici, 1997) i njihov značaj nije dovoljno ispitan.

Glikani u sastavu ESL1 antigena. ESL1 produkte čine uglavnom glikoproteini. Većina antigena iz sastava mišićnih larvi *T. spiralis* koji pripadaju grupi označenoj kao TSL1 antigeni poseduje u svom sastavu N-glikane sa tri- i tetra-antenarnom strukturom,

koja sadrži grane (tzv. antene) GalNAc β 1–4 GlcNAc β , na čijim terminalnim delovima se nalazi šećer tveloza. Takođe, veliki broj ovih grana je fukozilovan na GlcNAc reziduama (Reason i saradnici, 1994; Ellis i saradnici, 1997; Morelle i saradnici, 2000). Gruden-Movsesijan i saradnici (2002) su opisali da N-glikani mišićne larve *T. spiralis* poseduju strukture sa terminalno postavljenom manozom i trimanoznim jezgrom, pri čemu je jezgro uglavnom fukozilovano. Tveloza kreira jedinstven epitop na glikanskim antigenima mišićnih larvi *T. spiralis*, koji indukuje sintezu antitela specifičnih za parazit tokom mišićne faze infekcije (Ellis i saradnici, 1994; 1997). Ova antitela obezbeđuju zaštitu od reinfekcije i u *in vitro* uslovima inhibiraju migraciju i invaziju larvi L1 u epitelnim ćelijama (McVay i saradnici, 1998; 2000).

Iako se u helmintskim produktima nalaze brojni molekuli, za glikane je pokazano da su ključni u indukciji i usmeravanju imunskog odgovora ka Th2 i anti-inflamatornom tipu, kreirajući sredinu pogodnu za njihovo preživljavanje (Harn i saradnici, 2009, van Die i Cummings, 2010). Imunski odgovor Th2 tipa može da obuzda produkciju inflamatornih Th1 citokina, dok anti-inflamatorni i regulatorni mehanizmi drže pod kontrolom imunski sistem organizma domaćina i obezbeđuju određeni vid homeostaze u kojoj i parazit i domaćin opstaju. Na ulogu glikana u usmeravanju imunskog odgovora ka Th2 tipu tokom helmintske infekcije prvi put su ukazali Okano i saradnici (1999), koristeći perjudat za hemijski izmenu ugljenohidratne strukture solubilnog antigena jaja *S. mansoni*, SEA. Druge studije koje su koristile različite metode za uklanjanje ili promenu ugljenohidratnih struktura su takođe pokazale da je ekspresija glikana na helmintskim antigenima važna za generisanje Th2 imunskog odgovora. Ugljenohidratne komponente nematode *B. malayi* imaju važnu ulogu u indukciji predominantnog Th2 imunskog odgovora (Tawill, 2004), dok hemijski izmenjeni glikani ekskretorno-sekretornog produkta *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) ne mogu da modulišu aktivnost dendritskih ćelija i usmeravaju imunski odgovor ka Th2 (Gomez-Garsia i saradnici, 2006; Terrazas i saradnici, 2010). Nedavno su Klaver i saradnici (2013) istakli značaj glikana solubilnih produkata *T. suis* u modulaciji funkcije dendritskih ćelija i supresiji pro-inflamatornog fenotipa ovih ćelija. Iako su mnogi proteini i lipidi glikozilovani u ESL1 produktima, do sada nije poznata imunomodulatorna uloga glikana *T. spiralis*.

1.3. Imunski odgovor domaćina na *Trichinella spiralis*

S obzirom da se ceo životni ciklus *T. spiralis* odvija u jednom domaćinu, antigeni sva tri životna stadijuma (adult, novorođena i mišićna larva) imaju uticaj na razvoj i uspostavljanje imunskog odgovora domaćina. Domaćin aktivira različite efektorske mehanizme u cilju eliminacije parazita, ograničavanja oštećenja koje indukuje parazit i zaštite od reinfekcije (Wakelin, 1993). Infekcija *T. spiralis* se karakteriše indukcijom Th1 tipa imunskog odgovora na početku intestinalne faze, da bi zatim kako infekcija napreduje, došlo do preusmeravanja odgovora ka Th2 tipu. Th2 postaje dominantan u trenutku kada počinje diseminacija novorođenih larvi i suštinski je važan za izbacivanje parazita i kontrolu infekcije na intestinalnom nivou (Mosmann, 1991; Wakelin i saradnici, 1994; Ishikawa i saradnici, 1998). Parazit dostiže adultni stadijum i reprodukuje se pre nego što Th2 posredovana ekspulzija eliminiše sve ženke parazita (mužjaci se eliminišu odmah nakon kopulacije) iz gastrointestinalnog trakta. Zato imunski odgovor na intestinalnom nivou s jedne strane daje određeni nivo zaštite organizmu domaćina, ali on nije potpun jer se novorođene larve produkuju pre izbacivanja adulta, što obezbeđuje opstanak određenog broja parazita u domaćinu (Bruschi, 2002).

U toku intestinalne faze infekcije, inflamatorni odgovor se pokreće već posle nekoliko časova od kontakta parazita i domaćina. Karakteriše se prisustvom neutrofila u početnoj fazi, a zatim se u efektorske mehanizme protiv parazita uključuju mastociti, eozinofili i povećani nivo IgE. Na intestinalnom nivou, imunski odgovor na *T. spiralis* zavisi od prisustva CD4⁺ T ćelija (Grencis i saradnici, 1985; Riedlinger i saradnici, 1986) sa inicijalnom predominacijom Th1 i posledičnom dominacijom Th2 tipa koji se karakteriše produkcijom Th2 citokina, uključujući IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 (Patel i saradnici, 2009). Ove citokine produkuju T ćelije, ali i B limfociti, eozinofili, mast ćelije i bazofili, što ukazuje na njihovu važnu ulogu u razvoju Th2 imunskog odgovora, ključnog za ekspulziju parazita. Za ovu odbrambenu aktivnost naročito su značajni citokini IL-4 i IL-13 (Bruschi i Chiumiento, 2012). IL-4 stimuliše B ćelijsku diferencijaciju u smeru stvaranja IgE antitela. Uloga ovog citokina nije samo u regulaciji produkcije specifičnih IgE antitela, već i u stimulaciji enterocita da

preuzimaju i vrše transport IgE u intestinum. IgE se u lumenu creva veže za parazit i tako vrši prevenciju invazije (Bruschi, 2012). Takođe, ovaj citokin je, zajedno sa citokinom IL-13, neophodan za ekspanziju mast i goblet ćelija (Knight, 2008) i indukciju protektivnog odgovora na infekciju *T. spiralis*. Mast ćelije imaju ključnu ulogu u odgovoru domaćina na intestinalnom nivou, oslobađajući efektorske molekule kao što su histamini, citokini, i serin proteaze, β -himaze. Privremeno postojanje intestinalne mastocitoze i degranulacija mast ćelija u toku ekspanzije adulta parazita, ukazuje da mast ćelije imaju važnu ulogu u intestinalnoj odbrani protiv parazita (Patel i saradnici, 2009). Tokom infekcije *T. spiralis*, dolazi i do ekspanzije goblet ćelija koje sekretuju mucine, intelektine, molekul sličan rezistinu β (engl. resistin-like molecule-RELM β), sialil transferazu 4c (engl. sialyl transferase 4c - Siat4c) i dr. Mucini su veliki glikoproteini koji formiraju sloj mukusa preko epitelnih ćelija koji može doprineti protekciji tokom infekcije *T. spiralis* (Knight, 2008), dok se za intelektine smatra da mogu imati ulogu u ranom imunskom odgovoru na ove parazite (Pemberton i saradnici, 2004; Artis, 2006). Eozinofilija je karakteristika parazitskih infekcija uključujući infekciju *T. spiralis*. Uloga eozinofila tokom parenteralne faze infekcije je da učestvuju u odbrani od novorođenih larvi indukcijom ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitela (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). IL-5 stimuliše produkciju eozinofila i diferencijaciju ove granulocitne populacije u koštanoj srži i sprečava njihovu apotozu. Ovaj citokin ima malu ulogu u mehanizmima ekspanzije parazita tokom primarne infekcije *T. spiralis*, ali je pokazano da IL-5 deficijentni miševi pokazuju oslabljenu odbranu od sekundarne infekcije ovim parazitom, pokazujući da IL-5 ima važnu ulogu u reinfekciji (Vallance i saradnici, 2000; Fabre i saradnici, 2009a; Svensson-Frej, 2011).

Tokom mišićne faze, prisustvo parazita u poprečno-prugastoj muskulaturi indukuje jak inflamatorni odgovor, koji nije u mogućnosti da eliminiše parazite, već uzrokuje inflamatorne miopatije (miozitis) koje se karakterišu inflamacijom mišića i okolnih tkiva i odgovorne su za kliničke znake parenteralne infekcije (Bruschi i saradnici, 2011). Ova faza je delimično regulisana intestinalnom fazom infekcije jer je pokazano da jačina mišićne inflamacije oralnim putem inficiranih životinja novorođenim larvama veća nego kod intravenoznim putem inficiranih životinja (Fabre i saradnici, 2009b, c). Hroničan inflamatorni proces je praćen akumulacijom ćelija

imunskog sistema domaćina, uključujući neutrofile, eozinofile, aktivirane makrofage i T limfocite i vodi destrukciji mišićnog tkiva (Bruschi i saradnici, 2011). Uloga eozinofila u ovoj fazi infekcije *T. spiralis* je dvostruka. Eozinofili štite parazita dok se ne situira u ćeliji negovateljici, a takođe štite i organizam domaćina od reinfekcije (Huang i saradnici, 2014; 2015). Mišićnu fazu infekcije karakteriše kombinovani Th1/Th2 imunski odgovor uz dominaciju Th2 tipa koji se odlikuje povećanom produkcijom IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i smanjenom produkcijom IFN- γ (Lee i Ko, 2006). Tokom mišićne faze takođe dolazi do aktivacije anti-inflamatornih i regulatornih mehanizama, koji se ogledaju u povećanoj zastupljenosti regulatornih T ćelija i porastu produkcije citokina IL-10 i TGF- β . Ovi mehanizmi kontrolišu i suprimiraju Th1 imunski odgovor i ograničavaju inflamaciju u mišićnom tkivu, što obezbeđuje preživljavanje parazita (Beiting i saradnici, 2007).

1.4. Mehanizmi kojima *T. spiralis* moduliše imunski odgovor domaćina

Kao što je ranije navedeno, *T. spiralis* u organizmu domaćina kreira sredinu u kojoj dominiraju anti-inflamatorni i regulatorni mehanizmi koji kontrolišu imunski odgovor ne samo prema parazitskim antigenima, već i prema neparazitskim antigenima, kao što su autoantigeni i alergeni. Ovi mehanizmi ograničavaju prekomernu inflamaciju obezbeđujući na taj način preživljavanje i parazita i domaćina. Supresiju inflamatornog Th1 odgovora *T. spiralis* može da ostvari indukovanjem Th2 imunskog odgovora. Međutim, protektivni efekat infekcije ovim helmintom u slučaju alergija, kod kojih dominira Th2 odgovor, ukazuje na značajno učešće regulatornih T ćelija (Treg), regulatornih B ćelija (Breg) i alternativno aktiviranih makrofaga (AAMF) (Ashour, 2013a).

Potencijalna imunomodulatorna uloga infekcije sa *T. spiralis* ili produkata ovog helminta je ispitana na animalnim modelima različitih bolesti i pokazano je da infekcija ovim parazitom može da suprimira alergijske reakcije i autoimunska oboljenja, kao što su Kronova bolest (Khan i saradnici, 2002), ulcerozni kolitis (Motomura i saradnici, 2009; Ashour i saradnici, 2013b), dijabetes tipa 1 (T1D) (Saunders i saradnici, 2007) i EAE (Tabela 1).

Tabela 1. Infekcija sa helmintom *T. spiralis* ili njegovim produktima suprimira alergijske reakcije i autoimunska oboljenja kod eksperimentalnih životinja.

Infektivni agens ili produkt	Oboljenje	Reference
<i>T. spiralis</i>	Eksperimentalni kolitis	Khan i saradnici (2002)
“	Eksperimentalni kolitis	Cho i saradnici (2012)
“	Eksperimentalni kolitis	Ashour i saradnici (2013b)
“	T1D	Saunders i saradnici (2007)
“	EAE	Gruden-Movsesijan i saradnici (2008)
“	EAE	Gruden-Movsesijan i saradnici (2010)
“	EAE	Sofronic-Milosavljevic i saradnici (2013)
“	Astma i alergijski poremećaji	Park i saradnici (2011)
Sirovi ekstrakt mišićnih larvi <i>T. spiralis</i>	Eksperimentalni kolitis	Motomura i saradnici (2009)
“	EAE	Kuijk i saradnici (2012)
ESL1 produkti <i>T. spiralis</i>	EAE	Radovic i saradnici (2015)

EAE je eksperimentalni model multiple skleroze, hronične inflamatorne demijelinizirajuće bolesti centralnog nervnog sistema (Deboriverie, 2008). Infekcija *T. spiralis* dovodi do ublažavanja kliničke slike EAEa, koje se ogleda u značajnom smanjenju parametara bolesti (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2008). Mehanizmi koji leže u osnovi uočenog efekta obuhvataju s jedne strane povećanu produkciju IL-4, IL-10 i TGF- β , a sa druge strane značajno smanjenu produkciju IFN- γ i IL-17, citokina koji su ključni za inicijaciju i progresiju EAE-a. U suprimiranju Th1 i Th17 imunskog

odgovora uključene su i CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T ćelije (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2010). Ovaj tip regulatornih T ćelija je važan regulator imunskog odgovora (Tang i saradnici, 2008), a pokazano je da može imati protektivnu ulogu u EAEu (Anderton i Liblau, 2008).

Infekcija parazitom *T. spiralis* može sprečiti pojavu kao i progresiju dijabetesa tipa 1 kod NOD miševa. Naime, pokazano je da infekcija NOD miševa ovim parazitom dovodi do pokretanja Th2 imunskog odgovora, koji se karakteriše povećanom koncentracijom IL-4. Povećana produkcija ovog citokina mogla bi biti odgovorna za supresiju Th1 odgovora (koji inače prati razvoj dijabetesa kod NOD miševa) i inhibiciju puteva koji vode destruktiji beta ćelija pankreasa (Saunders i saradnici, 2007). Hronična infekcija *T. spiralis*, takođe može da menja ekspresiju citokina i integrina koji dovode do migracije citotoksičnih ćelija iz pankreasa i na taj način doprinese povoljnom ishodu bolesti (Cooke, 2009).

Zapaljenske bolesti digestivnog trakta (Kronova bolest i ulcerozni kolitis) karakterišu se intestinalnom inflamacijom koja oštećuje tkivo i intestinalnu barijeru. Pokazano je da prethodno uspostavljena infekcija *T. spiralis* ublažava kliničku sliku eksperimentalnog kolitisa izazvanog dinitrobenzensulfonskom kiselinom na makroskopskom i histološkom nivou. Modulacija se postiže smanjenom aktivnošću enzima mijeloperoksidaze, smanjenom ekspresijom Th1 citokina (IFN- γ) i povećanom produkcijom IL-4, IL-13 i TGF- β (Khan i saradnici, 2002). Cho i saradnici (2012) su takođe zabeležili da infekcija *T. spiralis* suprimira kolitis izazvan dekstran natrijum sulfatom. U osnovi supresije je smanjena produkcija pro-inflamatornih citokina (IL-6 i IFN- γ), povećana produkcija regulatornih citokina IL-10 i TGF- β i povećan broj regulatornih T ćelija. Prisustvo Foxp3⁺ regulatornih ćelija u inflamatornim zonama zabeležili su i drugi autori (Ashour i saradnici, 2013a).

Th2 alergijska stanja karakterišu se povećanom produkcijom Th2 citokina, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, kao i povećanjem broja eozinofila i nivoa alergena-specifičnih IgE antitela (Di Lorenzo i saradnici, 2009). Iako je pokazano da je Th2 odgovor u infekcijama helminitima sličan alergijskom odgovoru, pokazano je da helminti mogu da modulišu alergijski-pridruženi Th2 tip inflamacije (Lee i saradnici, 2008). Eksperimentalna ovalbuminom indukovana **alergijska respiratorna inflamacija kod miševa je bila suprimirana infekcijom *T. spiralis*** i pokazano je da infekcija ovim

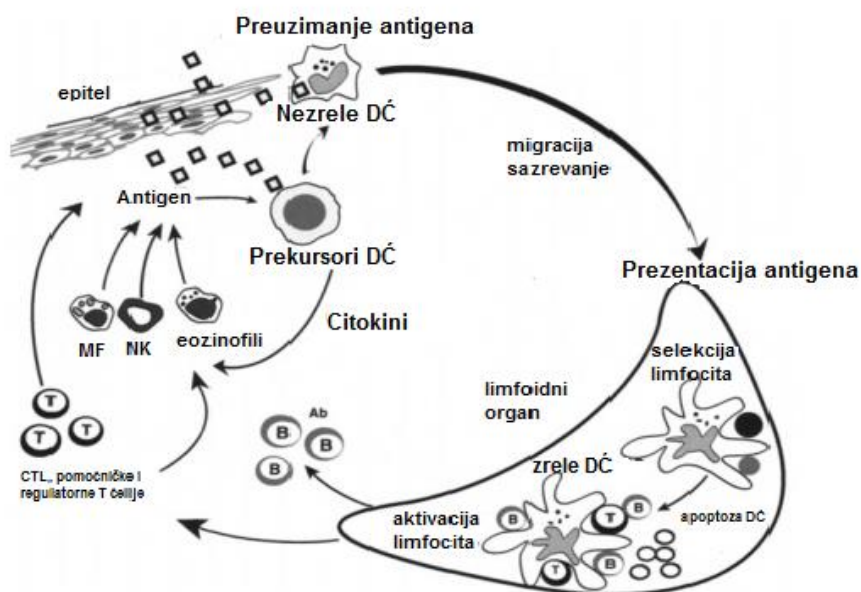
parazitom značajno redukuje koncentraciju citokina IL-5 i povećava koncentraciju regulatornih citokina IL-10 i TGF- β . Prisustvo ovih citokina ukazuje na postojanje regulatornih T ćelija, što je i potvrđeno u limfnim čvorovima pluća (Park i saradnici, 2011). Smatra se da u osnovi povoljnog efekta infekcije *T. spiralis* na alergiju leže upravo regulatorni mehanizmi koji suprimiraju prekomerni Th2 odgovor.

1.5.Uloga dendritskih ćelija u imunskom odgovoru domaćina na parazite

Dendritske ćelije (DĆ) su najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) koje stimulišu imunski sistem i vrše aktivaciju i kontrolu kako urođenog, tako i adaptivnog imunskog odgovora. Štaviše, DĆ predstavljaju važnu kariku između urođenog i adaptivnog imunskog odgovora, „prenoseći“ informacije iz spoljašnjeg sveta. Pod uticajem različitih stimulusa DĆ zadobijaju različit funkcionalni fenotip koji potom rezultira pokretanjem odgovarajućeg imunskog odgovora. Pored učesća u polarizaciji imunskog odgovora pod uticajem različitih patogena, DĆ su značajne za indukciju imunološke tolerancije i za regulaciju imunskog odgovora posredovanog T ćelijama (Granucci i saradnici, 2008). Po svom poreklu, fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama predstavljaju veoma heterogenu ćelijsku populaciju. Dosadašnjim istraživanjima je pokazano da se ove ćelije mogu podeliti na plazmacitoidne i konvencionalne DĆ (pDĆ i cDĆ). Plazmacitoidne DĆ predstavljaju malu subpopulaciju DĆ koje imaju slično poreklo kao i cDĆ, ali različite razvojne puteve. Nalaze se u krvi i limfoidnim organima i ulaze preko krvi u limfne čvorove (Merad i saradnici, 2013). U kontaktu sa DNK virusa, ove ćelije se transformišu u DĆ koje proizvode velike količine IFN-a tip I i imaju kapacitet da prezentuju strane antigene (Brière i saradnici, 2002; Merad i saradnici, 2013). Konvencionalne DĆ naseljavaju limfoidna i nelimfoidna tkiva i imaju važnu ulogu u prepoznavanju, preuzimanju i prezentaciji stranih i sopstvenih antigena naivnim T limfocitima. U okviru ove grupe ubrajaju se: cDĆ u nelimfoidnim tkivima (CD103⁺CD11b⁻ i CD11b⁺ cDĆ), epidermalne Langerhansove ćelije, migratorne DĆ tkiva i rezidentne DĆ limfoidnih organa (CD8⁺ i CD11b⁺cDĆ) (Merad i saradnici, 2013).

Razvojni put od zajedničkih progenitora ćelija mijeloidne loze do pojedinačnih subpopulacija DĆ može se podeliti u četiri osnovna stadijuma: a) stadijum

progenitorskih ćelija kostne srži b) stadijum prekursora DĆ c) stadijum nezrelih i d) stadijum zrelih DĆ. Prekursori DĆ se nalaze u kostnoj srži i krvi. Nastaju diferencijacijom od pluripotentnih matičnih ćelija (CD34⁺) kostne srži i zatim napuštaju kostnu srž i preko krvi dospevaju u različita tkiva gde opstaju kao nezrele DĆ (slika 3).



Slika 3. Razvoj dendritskih ćelija (DĆ). Prekursori DĆ u cirkulaciji mogu da prepoznaju patogene i proizvode IFN- α , koji dalje aktivira eozinofile, makrofage i NK ćelije i na taj način prekursori DĆ mogu da spreče širenje infekcije. Ove ćelije dospevaju u različita tkiva gde opstaju kao nezrele DĆ. Nakon prepoznavanja antigena, nezrele DĆ migriraju u limfoidne organe, sazrevaju i prezentuju antigene antigen-specifičnim limfocitima koji zatim dospevaju u inficirano tkivo. Pomoćničke T ćelije proizvode citokine koji aktiviraju makrofage, NK ćelije i eozinofile, dok citotoksični T limfociti liziraju inficirane ćelije. B ćelije se aktiviraju nakon kontakta sa T ćelijama i DĆ i zatim migriraju u različite regione, gde sazrevaju u plazma ćelije koje proizvode antitela i tako neutrališu patogene. Smatra se, da nakon interakcije sa limfocitima, DĆ umiru apoptozom (Banchereau i saradnici, 2000).

Nezrele DĆ patroliraju u potrazi za patogenima i mrtvim ćelijama (nastale kao posledica apoptoze i nekroze). One poseduju snažnu fagocitnu aktivnost zahvaljujući

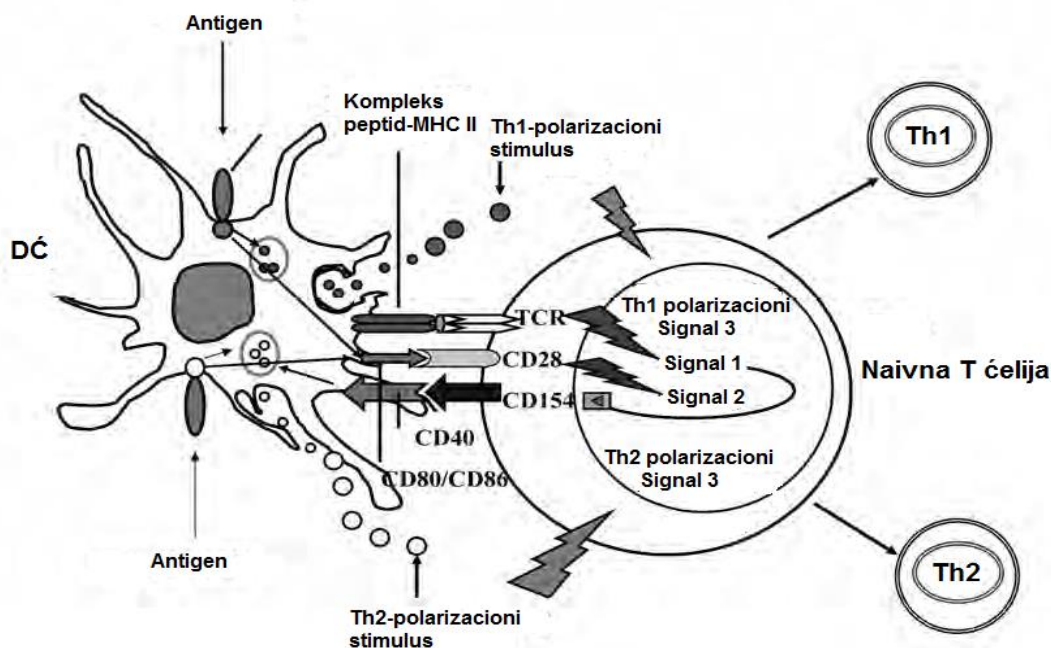
ekspresiji različitih receptora koji prepoznaju strukturne obrasce na antigenima (engl. pattern recognition receptors - PRRs). Preuzimanje antigena od strane DĆ, kao i uticaj različitih medijatora kao što su pro-inflamatorni citokini IL-1 β i faktor nekroze tumora- α (engl. Tumor necrosis factor- α , TNF- α) rezultiraju morfološkom i funkcionalnom transformacijom DĆ, tj. njihovim sazrevanjem iz ćelija koje preuzimaju antigene u ćelije koje su specijalizovane da efikasno prikažu antigene i stimulišu T ćelije. Od prirode stimulusa koji je doveo do sazrevanja DĆ zavisice u kom pravcu će biti polarizovan imunski odgovor (Mellman, 2013; Banchereau i saradnici, 2000). Sazrevanje DĆ prati ekspresija molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC), kostimulatornih molekula (CD40, CD80, CD86), adhezivnih molekula familije β -integrina, unutarćelijskih adhezivnih molekula (engl. Intracellular Adhesion Molecule, ICAM), CD1 i više molekula koji su zajednički za limfocite i monocite. Razlikuju se od ostalih APC (B limfocita i makrofaga) po svojoj jedinstvenoj sposobnosti da aktiviraju naivne T limfocite. Pored naivnih T limfocita, ove ćelije aktiviraju i efektorske T i B ćelije, kao i NK ćelije (Banchereau i saradnici, 2000; Liu i saradnici, 2001; Wu i Dakic, 2004).

Zrele DĆ u limfoidnim organima stupaju u bliske kontakte sa naivnim T limfocitima i ova dvosmerna interakcija između T limfocita i DĆ dovodi do proliferacije i diferencijacije T limfocita u različite subpopulacije efektorskih ćelija, bilo da je reč o CD4⁺ ili CD8⁺ T ćelijama. Interakcija kompleksa MHC II i antigena prezentovanog na površini DĆ sa receptorima na naivnim T ćelijama predstavlja prvi signal za T ćelijsku polarizaciju, dok drugi signal predstavlja ekspresija kostimulatornih molekula. Treći signal koji upravlja polarizacijom u željenom pravcu su citokini koje proizvode i oslobađa zrela DĆ (slika 4). U slučaju polarizacije CD4⁺ T limfocita u pravcu Th1 treći signal je IL-12 (Kapsenberg, 2003), dok je za Th17 polarizaciju neophodno prisustvo IL-1, IL-6 ili IL-23 (van Beelen i saradnici, 2007).

U slučaju polarizacije u Th2 pravcu slika nije još uvek sasvim jasna. Th2 imunski odgovor je, kao što je već rečeno, karakterističan za infekcije helmintima. Pod uticajem antigena poreklom od različitih helminta DĆ ne sazrevaju u potpunosti, a u nekim slučajevima ostaju potpuno nezrele, pa ipak imaju sposobnost da polarizuju naivne T ćelije. Delimično sazrele DĆ slabo ekspimiraju MHC II, a često imaju nizak ili srednji nivo ekspresije kostimulatornih molekula. Karakterišu se i smanjenom produkcijom

pro-inflamatornih citokina i povećanom produkcijom anti-inflamatornog citokina IL-10 (MacDonald i Maizels, 2008, Ilić i saradnici 2008, 2011, Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Prvo se mislilo da su kandidati za treći signal u Th2 polarizaciji IL-4 i IL-10, ali je pokazano da i IL-4 i IL-10 deficijentni miševi mogu da pokrenu Th2 imunski odgovor. Na osnovu dosadašnjih saznanja MacDonald i Maizels (2008) su predložili mogući model polarizacije Th ćelija koji bi podrazumevao kompeticiju između Th1 signala koji dovode do pojačane sinteze IL-12 i Th2 signala koji indukuju sintezu IL-10. Ishod kompeticije ova dva signala u smislu Th polarizacije, zavisiće od njihove relativne snage. Modifikacija ovog modela predlaže da ukoliko Th1 i Th2 signali indukuju različite kaskade koje se delimično prepliću, onda osim kompeticije moguće je da se pojavi i unakrsna inhibicija na molekulskom nivou, tako da Th2 ligandi suprimiraju DC-pokrenutu indukciju Th1 odgovora i obrnuto (Kane i saradnici, 2004). Urođeni imunski odgovor nema samo ulogu u prepoznavanju parazitskih antigena i inicijaciju adaptivnog Th2 odgovora, već obezbeđuje održavanje Th2 imunskog odgovora tokom infekcije (Allen i Maizels, 2011; Koyasu i saradnici, 2010; Saenz i saradnici, 2010).

DC su takođe bitne za ostvarivanje imunološke tolerancije, sprečavanjem produkcije efektorskih T ćelija specifičnih za sopstvene antigene. U odsustvu infekcije, DC kontinuirano preuzimaju i procesuiraju sopstvene antigene i nepatogene antigene prisutne u vanćelijskom prostoru i migriraju u regionalna limfoidna tkiva, pri čemu ne sazrevaju u potpunosti. Ovakve delimično sazrele DC prezentuju autoantigene T ćelijama i favorizuju produkciju imunosupresivnih regulatornih T ćelija, značajnih za održavanje periferne tolerancije (Mellman, 2013).



Slika 4. Stimulacija i polarizacija T ćelija zahteva tri signala od strane DĀ. T ćelijski receptor (TCR) prepoznaje kompleks peptidnog antigena i MHC molekula na DĀ i to obezbeđuje prvi signal. Drugi signal je kostimulatorni signal posredovan interakcijom koreceptora CD28 na T ćeliji i kostimulatornih molekula (CD80 i CD86) na DĀ. Signal 3 je polarizacioni signal koji je posredovan različitim citokinima koji promovišu razvoj Th1 ili Th2 (Fadilah i Cheong, 2007).

Iako različiti helmintski antigeni indukuju različit fenotip DĀ, zajednička karakteristika je da su ove ćelije nepotpuno zrele i da kao takve mogu da promovišu intenzivnu proliferaciju antigen specifičnih CD4⁺ T ćelija i Th2 diferencijaciju (Segura i saradnici, 2007; MacDonald i Maizels, 2008). Tako je pokazano da DĀ stimulisane antigenom SEA, ne sazrevaju na konvencionalan način i ne pokazuju povećanu ekspresiju kostimulatornih molekula ili citokina (MacDonald i saradnici, 2001; Kane i saradnici, 2004), ali da mogu da indukuju Th2 imunski odgovor (MacDonald i saradnici, 2001; Tomas i Harn, 2004). Takođe, SEA antigen je sposoban da preusmeri DĀ koje indukuju Th1 tip odgovora u DĀ koje indukuju Th2 tip. Naime, Kane i saradnici, 2004 i van Liempt i saradnici, 2007 su opisali da su DĀ koje su prethodno tretirane lipopolisaharidom (LPS, komponenta zida gram-negativnih bakterija) i Poly I:C-om (engl. polyinosinic:polycytidylic acid, sintetički analog dvolančane RNK virusa) bile sposobne da indukuju Th1 tip odgovora, a da je nakon tretmana sa SEA došlo do

smanjene ekspresiju MHC II, kostimulatornih molekula i produkcije IL-6, IL-12, TNF- α i sledstvene polarizacije ka Th2 tipu odgovora. DĆ stimulisane ekskretorno-sekretornim antigenima *Nippostrongylus brasiliensis* (NES), slično SEA, pokazuju nezreo status (smanjena produkcija IL-6, IL-12p40, smanjena ekspresija kostimulatornih molekula) i indukuju Th2 imunski odgovor (Balic i saradnici, 2004), dok ES produkti *Heligmosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*) ne indukuju aktivaciju DĆ i suprimiraju i Th1 i Th2 odgovor (Segura i saradnici, 2007). DĆ stimulisane sa ES-62 antigenom *A. viteae* pokazuju delimično zreo fenotip i indukuju T limfocite da produkuju povećanu koncentraciju IL-4 i smanjenu koncentraciju IFN- γ (Whelan i saradnici, 2000), dok DĆ stimulisane SEA iniciraju povećanu produkciju oba citokina od strane T ćelija u *in vitro* uslovima (MacDonald i saradnici, 2001).

Stimulacijom pacovskih i mišjih DĆ antigenima sva tri životna stadijuma *T. spiralis* (adult, novorođena larva i mišićna larva), ove ćelije postaju delimično zrele, ali je stepen ekspresije MHC II i kostimulatornih molekula, kao i produkcija citokina IL-10 i IL-12 različit u zavisnosti od porekla antigena ili ćelija (Ilic i saradnici, 2008; 2011). Pacovske DĆ pod uticajem ES antigena adulta, solubilnog ekstrakta NBL, ES antigena kao i "sirovog" ekstrakta mišićnih larvi *T. spiralis* (homogenat celih larvi) pokazuju povećanu ekspresiju CD86 i ICAM 1 ali ne i MHC II (Ilic i saradnici, 2008, Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011), dok mišje DĆ reaguju povećanjem ekspresije i MHC II i kostimulatornih molekula, s tim što je povećanje ekspresije u slučaju MHC II umereno, u slučaju ICAM 1 i OX40L (CD252) neznatno, dok je ekspresija CD80 i CD86 značajno povećana (Ilic i saradnici, 2011). Ovo je u skladu sa rezultatima studije drugih autora, u kojoj je bio korišćen samo "sirovi" ekstrakt mišićne larve *T. spiralis* i koja je pokazala da ova smeša antigena takođe dovodi do nepotpunog sazrevanja DĆ (Leech i Grecis, 2006). Za razliku od navedenih rezultata Langelaar i saradnici (2009) su pokazali da ES antigeni mišićnih larvi *T. spiralis* nemaju uticaja na ekspresiju MHC II i kostimulatornih molekula na mišjim DĆ (što se tumači izuzetno malom dozom antigena korišćenom u radu). Iako nepotpuno zrele, DĆ opisanog fenotipa imaju kapacitet da prezentuju antigene T ćelijama i produkuju citokine koji su važni signali za inicijaciju i regulaciju imunskog odgovora na patogene. IL-12, pro-inflamatorni citokin, ima važnu ulogu u polarizaciji imunskog odgovora ka Th1 (MacDonald i Maizels, 2008), dok je anti-inflamatorni citokin, IL-10 značajan za usmeravanje ka Th2 i regulatornom tipu

imunskog odgovora (Manickasingham i saradnici, 2003). IL-10 ispoljava i autokrino dejstvo, suprimirajući ekspresiju ćelijskih površinskih markera, proliferaciju DĆ i prezentaciju antigena (Chang i saradnici, 2009). Stimulacija pacovskih DĆ sa antigenima *T. spiralis* indukuje povećanu produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 i smanjenu produkciju pro-inflamatornog citokina IL-12p70 (Ilic i saradnici, 2008), dok isti tretman mišjih DĆ indukuje povećanu produkciju i pro- i anti-inflamatornih citokina. Iako postoje podaci da povećana produkcija IL-10 suprimira sintezu IL-12p70 (Kane i saradnici, 2004; Sallusto i Lanzavecchia, 2002), u ovom slučaju, kao i u drugim studijama dobijeno je da se Th2 ili mešoviti Th1/Th2 odgovor javljaju kao posledica povećane produkcije i pro- i anti-inflamatornih citokina od strane DĆ (Carvalho i saradnici, 2008; Shaw i saradnici, 2002). Mišje DĆ stimulisane antigenima *T. spiralis*, u *in vitro* uslovima polarizuju CD4⁺ T ćelije u pravcu produkcije i Th2 (IL-4, IL-9, IL-13 i IL-10) i Th1 citokina (IFN- γ). Za razliku od njih pacovske DĆ stimulisane ESL1 antigenima indukuju *in vitro* povećanu produkciju IL-4, IL-10 i TGF- β i smanjenu produkciju IFN- γ . Uloga ESL1 u polarizaciji imunskog odgovora ima poseban značaj s obzirom da mišićna larva ove produkte oslobađa kontinuirano i dugo tokom čitave hronične faze infekcije, sve dok ne dođe do uginuća parazita i njegove kalcifikacije (kod glodara ova faza traje do kraja života, dok za ljude ne postoje pouzdani podaci pošto se simptomi i znaci bolesti gube posle 6 meseci do najduže 2 godine, ali se zna da specifična antitela u krvi mogu da se detektuju i do tri decenije nakon infekcije). Ovim produktima parazit ostvaruje komunikaciju sa imunskim i drugim sistemima domaćina. *In vivo* aplikacija DĆ stimulisanih ESL1 generiše mešoviti Th1/Th2 imunski odgovor, sa predominacijom Th2 odgovora i aktivacijom regulatorne mreže. Ovakav profil odgovara stanju koje se sreće tokom hronične infekcije *T. spiralis* (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Malo je podataka o efektima pojedinačnih ESL1 molekula koje imaju imunomodulatorne karakteristike. Najviše su istraženi glikoproteini od 45, 49 i 53 kDa (prethodno opisani) koji nose na svojim ugljenohidratnim strukturama terminalno postavljen šećer tivelozu. Već je pokazano da navedeni glikoproteini imaju važnu ulogu u transformaciji mišićne ćelije, formiranju kapsule i održavanju parazitizma. Međutim, njihova imunomodulatorna uloga nije dovoljno poznata (Nagano, 2009).

1.6. Uloga makrofaga u imunskom odgovoru domaćina na parazite

Makrofagi su ćelije urođene imunosti koje imaju ulogu u imunskom odgovoru na patogene, ali i u homeostazi tkiva, koordinaciji adaptivnog imunskog odgovora, inflamaciji i reparaciji tkiva (Martinez i saradnici, 2009). Predstavljaju veoma heterogenu populaciju i nalaze se kako u primarnim i sekundarnim limfnim organima, tako i u tkivima i organima kao što su kosti (osteoklasti), koža (dermalni makrofagi), jetra (Kupferove ćelije), pluća (alveolarni makrofagi), nervno tkivo (mikroglia), serozne šupljine (peritonealni makrofagi), adipozno tkivo, bubrezi i dr. (Gordon i saradnici, 2014). U zavisnosti od vrste stimulusa prisutnih u mikrosredini tkiva (citokina, adhezivnih molekula i komponenti vanćelijskog matriksa) ili patogena, makrofagi se mogu naći u različitim stanjima aktivacije. Pod uticajem IFN- γ sa ili bez LPSa i TNFa, nastaju klasično aktivirani makrofagi (CAMF) koje karakteriše izražena sposobnost ubijanja patogena, povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika i azota, pro-inflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-12, TNF), niska produkcija IL-10 i povećana ekspresija MHC II i CD86. U Th2 citokinskom miljeu, pod uticajem IL-4 i IL-13, nastaju alternativno-aktivirani makrofagi (AAMF) koji se odlikuju povećanom ekspresijom MHC II, CD40, CD80, CD86, PRR i sposobnošću da inhibiraju Th1 ćelijsku proliferaciju produkcijom anti-inflamatornih medijatora (IL-10, IL-13 i TGF- β) i malih količina pro-inflamatornih medijatora azot monoksid (NO), IL-12 i IL-18 (Martinez i Gordon, 2014). Karakterišu se i povećanom ekspresijom arginaze 1 i proteina iz familije hitinaza (Ym1, hitin-vezujući protein bez hitinazne aktivnosti i kisele hitinaze sisara, AMC-aze) i RELM- α , ranije poznat kao FIZZ (engl. found in inflammatory zone) (Jang i Nair, 2013). Metabolizam arginina je neophodan za aktivaciju i razvoj kako klasično, tako i alternativno aktiviranih makrofaga. Th1 citokini, IL-12 i IFN- γ , indukuju ekspresiju inducibilne forme NO sintaze (iNOS), enzima čijom aktivnošću nastaje NO kod klasično aktiviranih makrofaga. S druge strane, Th2 citokini, IL-4, IL-13 i IL-21 aktiviraju arginazu 1, koja usled visokog afiniteta za arginin, smanjuje njegovu dostupnost za iNOS, što dovodi do smanjene produkcije NO (Kreider i saradnici, 2007).

AAMF su normalno pronađeni na imunoprivilegovanim mestima (placenta ili pluća), što ukazuje da imaju ulogu u zaštiti tkiva od inflamacije (Martinez i Gordon,

2014; Zaccone i saradnici, 2008). Detektovani su u raznim helmintskim infekcijama, kao što *S. mansoni* (Herbert i saradnici, 2004), *H. polygyrus* (Anthony i saradnici, 2006), *N. brasiliensis* (Reece i saradnici, 2006), *T. crassiceps* (Rodriguez-Sosa i saradnici, 2002), *T. spiralis* (Dzik i saradnici, 2004), *F. hepatica* (Donnelly i saradnici, 2005), *Ascaris suum* (*A. suum*) (Oshiro i saradnici, 2005) i pokazano je da imaju ulogu u regulaciji inflamacije. Infekcija miševa, koji poseduju deficijenciju gena za makrofag specifičan receptor IL-4R α *S. mansoni*, praćena je povećanom inflamacijom, uključujući povećanu produkciju Th1 citokina, aktivnost iNOS i sepsu (Herbert i saradnici, 2004). Ovo ukazuje da AAMF imaju važnu ulogu u zaštiti od letalne, infekcijom indukovane inflamacije. Arginaza 1 inhibira inflamatorni odgovor inhibiranjem ekspresije pro-inflamatornih citokina i blokiranjem proliferacije T ćelija. U infekciji *S. mansoni*, ovaj enzim inhibira inflamaciju blokiranjem produkcije IL-12 i IL-23p40 (Herbert i saradnici, 2010). AAMF imaju značajnu ulogu u reparaciji i remodelovanju oštećenog tkiva, nastalog kao posledica infekcije helmintima. AAMF proizvode različite proteine koji direktno ili indirektno indukuju angiogenezu ili aktivaciju fibroblasta i na ovaj način omogućavaju reparaciju tkiva. Arginaza katalizuje produkciju prolina i poliamina koji formiranjem kolagena i indukovanjem ćelijske proliferacije obnavljaju oštećeno tkivo. RELM α stimuliše produkciju kolagena i diferencijaciju miofibroblasta što posreduje u formiranju ekstracelularnog matriksa (Jang i Nair, 2013).

1.7.Receptori za molekulske obrasce

Interakcija APC sa antigenima i njihova aktivacija omogućena je prisustvom receptora koji prepoznaju visoko konzervirane molekulske obrasce na različitim patogenima (engl. **Patogen Associated Molecular Patterns, PAMPs**), kao što su različite komponente ćelijskog zida bakterija (LPS, peptidoglikani, PGN i lipopeptidi), flagelin, nemetilovani CpG motivi DNK bakterija, jednolančana ili dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. single stranded RNA, ssRNA ili double- stranded RNA - dsRNA) virusa, manani kvasca, glukani gljiva itd. Ovi receptori se zbog ove svoje sposobnosti nazivaju receptorima koji prepoznaju molekulske obrasce (engl. **Pattern Recognition Receptors - PRRs**) (Medzhitov, 2007). PRR takođe prepoznaju endogene

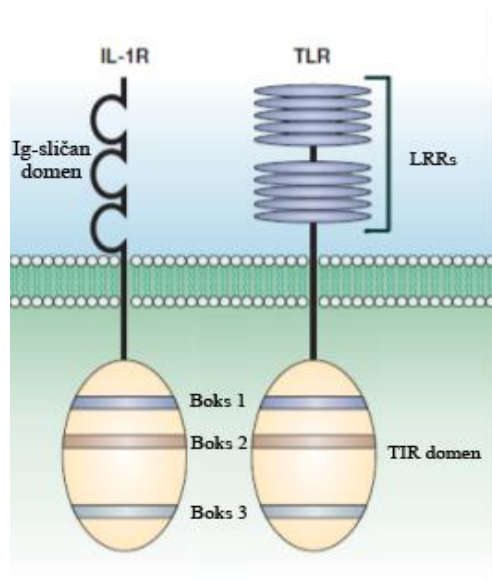
molekule, tzv. „opasne signale“ **DAMP**ove (engl. damage-associated molecular patterns), koji nastaju kao posledica oštećenja ćelija i tkiva u inflamatornim i stresnim reakcijama. Primeri ovih molekula su proteini toplotnog šoka tj. HSP, protein hromatina HMGB1 (engl. High-mobility group protein B1), proteinski fragmenti ekstracelularnog matriksa i dr. (Tang, 2012).

Nakon prepoznavanja PAMP-ova od strane PRR, PRR pokreću pro-inflamatorni i anti-mikrobijalni odgovor aktiviranjem intraćelijskih signalnih puteva u koje su uključeni adapterski molekuli, kinaze i transkripcioni faktori. PRR - signalna transdukcija indukovana PRR vodi genskoj ekspresiji i sintezi velikog broja solubulnih molekula uključujući citokine, hemokine, ćelijske adhezione molekule koji zajedno orkestriraju rani odgovor domaćina na infekciju i predstavljaju važnu vezu sa adaptivnim imunskim odgovorom (Akira i Takeda, 2004; Akira i saradnici, 2006; Kawai i Akira, 2010).

Receptori za molekulske obrasce su podeljeni na: a) **solubilne PRR** - receptore za molekulske obrasce u serumu i tkivnim tečnostima koji se vezuju za molekule na površini patogena, apoptotskih, nekrotičnih i malignih ćelija i omogućavaju njihovu eliminaciju fagocitozom. U ove molekule se ubrajaju komponente sistema komplementa, kolektini (manan-vezujući lektin (MBL) surfaktant proteini A i D), fikolini i pentraksini (kao što je C-reaktivni protein, CRP) i b) **ćelijske PRR**, koji su dalje podeljeni na membranske (vanćelijske senzore) i citoplazmatske (unutarćelijske senzore) (Medzhitov i Janeway, 2002; Medzhitov, 2007). U membranske receptore ubrajaju se: **receptori slični Toll proteinu** (engl. Toll-like receptors, **TLR**), **lektinski receptori C tipa** (engl. C-type lectin receptors, **CLR**), **receptori čistači** (engl. scavenger receptors, **SR**) i **N-formilpeptid receptori** (engl. N-formyl peptide receptors, **FPR**), dok se u citoplazmatske ubrajaju: **receptori slični NOD-u**, (engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain - NOD- like receptors, **NLRs**) i **receptori slični RIG-u** (engl. Retinoic acid-inducible gene-I - RIG-like receptors, **RLR**) (Mogensen, 2009; Geijtenbeek i Grinhuis, 2009; Stephen i saradnici, 2010).

TLR su najbolje okarakterisani PRR, imaju moćnu "imunoadjuvantnu" osobinu da aktiviraju antigen-prezentujuće ćelije i ključnu ulogu u odbrambenim mehanizmima protiv različitih patogena. Ovi receptori su visoko konzervirani, homologni Toll proteinu vinske mušice *Drosophila melanogaster* i pripadaju porodici integralnih membranskih

glikoproteina tipa I. Sastoje se iz ekstracelularnog N-terminalnog domena, koji je odgovoran za vezivanje liganada, transmembranskog domena i intracelularnog C-terminalnog signalnog domena (slika 5) (Akira i Takeda, 2004; Medzhitov, 2007; Beutler, 2009; Kawai i Akira, 2010). C-terminalni domen pokazuje homologiju sa receptorima iz familije interleukina-1 (engl. interleukin-1 receptors, IL-1R) i poznat je pod nazivom Toll/IL-1 receptorski (TIR) domen. U okviru ovog domena postoje tri visoko homologna regiona koji su važni u TLR signalnom putu. Ekstracelularni N-terminalni domen sadrži 16-28 ponovaka bogatih leucinom (engl. Leucin-Rich Repeats, LRR), kao i konzervirane sekvence. LRR domeni receptora formiraju strukturu potkovice i smatra se da su uključeni u direktno prepoznavanje različitih struktura patogena (proteina, lipida, nukleinskih kiselina) kao i DAMPova (tabela 2) (Akira i Takeda, 2004).



Slika 5. Struktura TLR receptora.

Receptori slični Toll proteinu (TLR) i receptori iz familije interleukina-1 (IL-R) imaju konzervirani citoplazmatski domen, Toll/IL-1 receptor (TIR) domen. TIR domen se karakteriše prisustvom tri visoko konzervirana homologna regiona poznatih kao boks 1, 2 i 3. Za razliku od citoplazmatskog dela, ekstracelularni deo ovih receptora se razlikuje: TLR receptori imaju tandemski ponavljajuće leucin-bogate sekvence (LRR) dok IL-R tri domena sličnih imunoglobulinu (engl. Ig-like domain) (Akira i Takeda, 2004).

Familija TLR uključuje deset članova kod ljudi (TLR 1-10) odnosno 12 (TLR 1-9 i 11-13) kod miševa (Medzhitov, 2001; Takeda i saradnici, 2003; Richez i saradnici, 2011). Ekspimirani su na antigen prezentujućim ćelijama kao što su makrofagi, DĆ i B limfociti (Iwasaki i Medzhitov, 2004), ali je pokazano da se mogu ekspimirati i na drugim tipovima ćelija, konstitutivno ili inducibino, u toku infekcije (Iwasaki i Medzhitov, 2004; Miettinen i saradnici, 2001; Muzio i saradnici, 2000)

Tabela 2. Receptori slični Toll proteinu (TLR) i njihovi ligandi

(Akira i Takeda, 2004).

Receptor	Ligand	Poreklo liganda	Referenca
TLR1	Triacil lipopeptidi	Bakterije i mikobakterije	Takeuchi i saradnici, 2002
	Solubilni faktori	<i>Neisseria meningitidis</i>	Wyllie i saradnici, 2002
TLR2	Lipoproteini/lipopeptidi	Razni patogeni	Aliprantis i saradnici, 1999
	Peptidoglikani	Gram-pozitivne bakterije	Takeuchi i saradnici, 1999 Schwadner i saradnici, 1999
	Lipoteihoična kiselina	Gram-pozitivne bakterije	Schwadner i saradnici, 1999
	Lipoarabinomanan	Mikobakterije	Means i saradnici, 1999
	Fenol-solubilni modulin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hajjar i saradnici, 2001
	Glikoinozitolfosfolipidi	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Coelho i saradnici, 2002
	Glikolipidi	<i>Treponema maltophilum</i>	Optiz i saradnici, 2001
	Porini	<i>Neisseria</i>	Massari i saradnici, 2002
	Atipični lipopolisaharid	<i>Leptospira interrogans</i>	Werts i saradnici, 2001
	Atipični lipopolisaharid	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Hirschfeld i saradnici, 2001
	Zimozan	Gljive	Underhill i saradnici, 1999
	Protein toplotnog šoka 70	Domaćin	Asea i saradnici, 2002
	TLR3	Dvolančana RNK	Virusi
TLR4	Lipopolisaharid	Gram-negativne bakterije	Poltorak i saradnici, 1998
	Taksol	Biljke	Kawasaki i saradnici, 2000
	Fuzioni protein	Respiratorni sincitialni virus	Kurt-Jones i saradnici, 2000
	Protein omotača	Mišji mamarni-tumor virus	Rassa i saradnici, 2002
	Protein toplotnog šoka 60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bulut i saradnici, 2002 Ohashi i saradnici, 2000
	Protein toplotnog šoka 70	Domaćin	Vabulas i saradnici, 2002
	Tip III ponavljajući ekstra domen A fibronektina	Domaćin	Okamura i saradnici, 2001
	Oligosaharidi hijaluronske kiseline	Domaćin	Termeer i saradnici, 2002
	Polisaharidni fragmenti heparan sulfata	Domaćin	Johnson i saradnici, 2002
	Fibrinogen	Domaćin	Smiley i saradnici, 2001
TLR5	Flagelin	Bakterije	Hayashi i saradnici, 2001
TLR6	Diacil lipopeptidi	Mycoplasma	Takeuchi i saradnici, 2001
	Lipoteihoična kiselina	Gram-pozitivne bakterije	Means i saradnici, 1999
TLR7	Zimosan	Gljive	Ozinsky i saradnici, 2000
	Imidazokvinolin	Sintetičko jedinjenje	Hemmi i saradnici, 2002
	Loksoribin	Sintetičko jedinjenje	Heil i saradnici, 2003
	Bropirimin	Sintetičko jedinjenje	Heil i saradnici, 2003
TLR8	Jednolančana RNK	Virusi	Heil i saradnici, 2004 Diebold i saradnici, 2004
	Imidazokvinolin	Sintetičko jedinjenje	Jurk i saradnici, 2002
TLR9	Jednolančana RNK	Virusi	Heil i saradnici, 2004
TLR9	DNK koja sadrži CpG	Bakterije i virusi	Hemmi i saradnici, 2000
TLR10	Nije definisano	Nije definisano	-
TLR11	Nije definisano	Uropatogene bakterije	Zhang i saradnici, 2004

Prepoznavanje ugljenohidratnih struktura prisutnih na antigenima različitih patogena je posredovano familijom receptora poznatih kao **CLR**, koje eksprimiraju ćelije urođenog i adaptivnog imunskog odgovora uključujući DĆ, makrofage i epitelne ćelije (Cambi i saradnici, 2005). Neke studije su pokazale da CLR imaju važnu ulogu u indukovanju imunskog odgovora specifičnog za patogene modulacijom TLR signalnog puta ili direktno indukovanjem genske ekspresije (Rogers i saradnici, 2005; Gringhuis i saradnici, 2007, 2009; Meyer-Wentrup i saradnici, 2009). CLR familija se sastoji od solubilnih i transmembranskih receptora koji pokazuju jedinstvenu specifičnost za ugljenohidratne domene (Cambi i saradnici, 2005). CLR eksprimirani na DĆ ostvaruju interakciju sa patogenima (virusima, bakterijama, gljivama, parazitima). Prepoznavanje PAMPova od strane CLR vodi internalizaciji patogena, njihovoj degradaciji i prezentaciji antigena (Rothfuchs i saradnici, 2007; van Kooyk i Rabinovich, 2008; Geijtenbeek i Gringhuis, 2009). Najpoznatiji lektinski receptori su: DC-SIGN (engl. DC-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin), MCLL (engl. myeloid C-type lectin-like receptors), manozni receptor (MR), galaktozni lektin makrofaga (engl. macrophage galactose-type lectin, MGL), dektin 1 i 2 (engl. dendritic cell-associated C-type lectin) i dr. (Gringhuis i saradnici, 2009).

NLR su najveća familija intracelularnih PRR i glavni senzori za intracelularne mikrobe i DAMPove. Zbog toga se smatra da imaju važnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora tokom infekcije. Receptori se sastoje iz tri domena: N-terminalni protein intereagujući domen (engl. N-terminal protein interaction domain), centralni nukleotid-vezujući domen (engl. central nucleotide-binding domain) i C-terminalni LRR domen. Na osnovu N-terminalne strukture, članovi ove familije su podeljeni u pet subfamilija i do sada je identifikovano 23 člana kod ljudi i 34 kod miša (Kanneganti i saradnici, 2007). Najbolje su opisani NOD1 i NOD2 receptori koji prepoznaju različite motive PGN, važne komponente ćelijskog zida bakterija. NOD1 prepoznaje iE-DAP (engl. D- γ -glutamyl-meso-DAP dipeptide), komponentu PGN svih gram-negativnih bakterija i nekih gram- pozitivnih bakterija kao što *Bacillus subtilis* i *L. monocytogenes* (Chamaillard i saradnici, 2003; Girardin i saradnici, 2003a), dok NOD2 prepoznaje MDP (engl. muramyl dipeptide), veliku komponentu PGN gram-negativnih bakterija i gram-pozitivnih bakterija (Girardin i saradnici, 2003b; Inohara i saradnici, 2003).

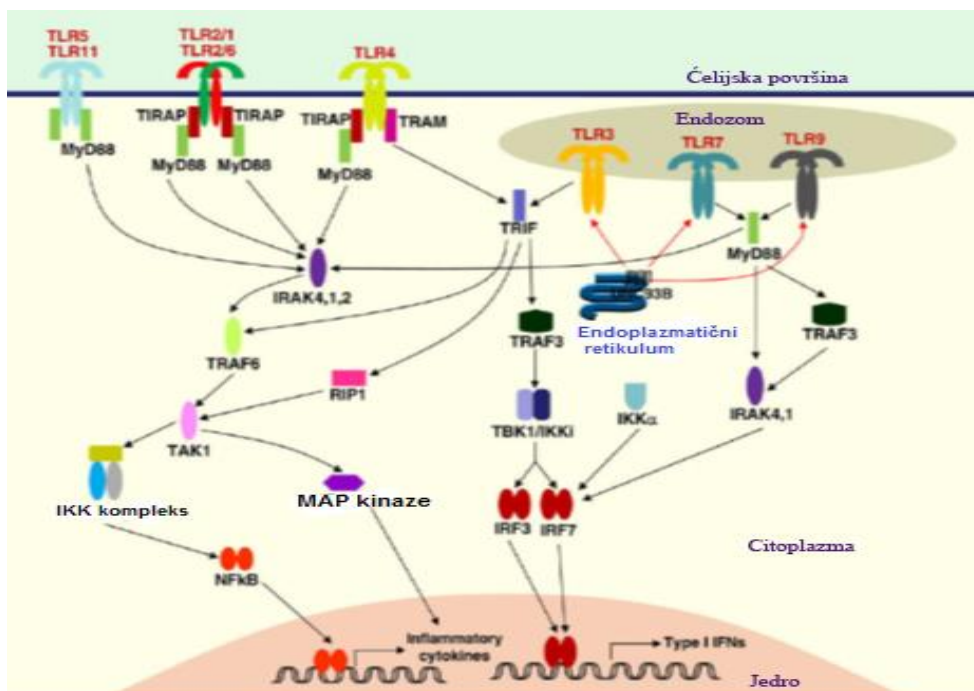
Angažovanje ovih receptora vodi aktivaciji mitogenom aktivirane protein kinaze, **MAP kinaze** (engl. Mitogen-activated protein kinase, MAPK), transkripcionog faktora nuklearnog faktora kappa B (engl. nuclear factor-kappa B, NF- κ B) i indukovanju ekspresije gena za inflamatorne citokine (Viala i saradnici, 2004; Kobayashi i saradnici, 2005).

1.8. Signalni putevi pokrenuti interakcijom TLR i PAMPa

Nakon angažovanja TLR odgovarajućim ligandima, pokreću se različiti signalni putevi posredovani familijom adaptorskih molekula koji sadrže TIR domen (engl. TIR-domain containing proteins) i koji su uključeni u determinisanje specifičnog imunskog odgovora. U adaptorske molekule se ubrajaju: **MyD88** (engl. Myeloid Differentiation primary response gene 88), **MAL** ili **TIRAP** (engl. MyD88 adaptor like protein), **TRIF** (engl. TIR domain containing adaptor protein-inducing IFN- β), adaptorski molekul srodan TRIF-u (engl. TRIF related adaptor molecule, **TRAM**) i **SARM** (engl. sterile α and armadillo-motif-containing protein) (Watters i saradnici, 2007). Rekrutovanje adaptorskih molekula pokreće kaskadu signalnih događaja koji vode aktivaciji MAP kinaza i transkripcionih faktora kao što su NF- κ B i regulatorni faktori IFN (engl. IFN regulatory factors, IRFs) (Kumar i saradnici, 2009a). Aktivacija NF- κ B transkripcionog faktora dovodi do sazrevanja DĆ koje se ogleda u povećanoj ekspresiji kostimulatornih molekula CD80, CD83 i CD86 i hemokinskog receptora CCR7, kao i u povećanoj produkciji inflamatornih citokina. Ovi podaci ukazuju da TLR signalizacija usmerava nezreo DĆ fenotip ka inflamatornom, što dovodi do indukcije odgovarajućeg adaptivnog imunskog odgovora (Medzhitov i Janeway, 2002).

TLR - indukovani signalni putevi su podeljeni na: **MyD88 zavisni put** i **MyD88 nezavisni, TRIF zavisni put** (slika 6). TLR4 je jedini receptor u ovoj familiji koji pokreće oba signalna puta i MyD88 zavisni put i TRIF zavisni put. Svi TLR osim TLR3 aktiviraju MyD88 zavisni put, dok MyD88 nezavisni, TRIF zavisni put može biti pokrenut od strane TLR3 i TLR4. MyD88 zavisni put ima ključnu ulogu u indukciji pro-inflamatornih citokina i odgovoran je za ranu fazu aktivacije transkripcionog faktora NF- κ B i aktivaciju MAPK. Nakon vezivanja liganda, TLR homo ili heterodimerizuju, podležu konformacionim promenama i regrutuju preko

citoplazmatskog TIR domena adapterski molekul **MyD88** i proteine iz familije kinaza pridružene IL-1 receptoru (engl. IL-1R receptor-associated kinase - **IRAK familija**), koje zatim vode aktivaciji ubikvitin ligaze, **TRAF6** (faktor 6 pridružen TNF receptoru, engl. Tumor necrosis factor-TNF receptor-associated factor 6) i protein kinaze aktivirana TGFom (engl. transforming growth factor-activated protein kinase 1, **TAK1**).



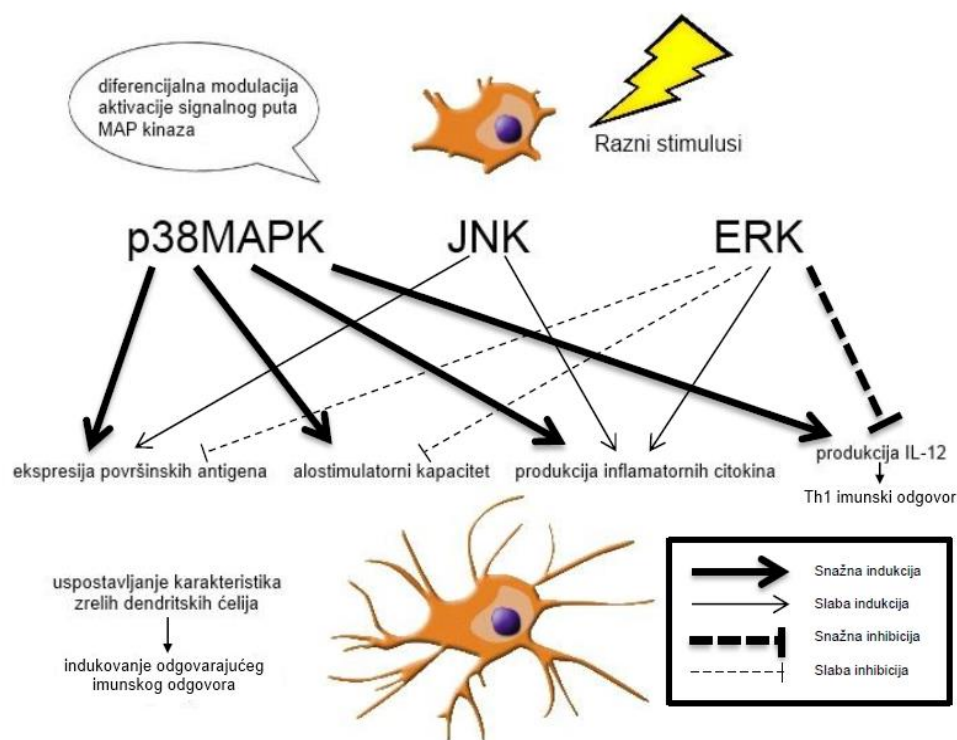
Slika 6. TLR signalni putevi u denditskim ćelijama i makrofagama. Stimulisanje DĆ i makrofaga TLR1, 2, 5, 6 i 11 ligandima indukuje MyD88 zavisni put dok TLR3 ligand aktivira MyD88 nezavisni, TRIF zavisni put. TLR4 aktivira oba puta (MyD88 - zavisni i TRIF zavisni put). U MyD88 zavisnom putu, MyD88 angažuje familiju IRAK i TRAF6 koji preko TAK1 aktiviraju transkripcioni faktor NF-κB i MAP kinaze. U TRIF zavisnom putu, TRIF intereaguje sa RIP1 i TRAF6 i aktivira NF-κB i MAP kinaze. Takođe, TRIF, preko TRAF3 i IKK srodnih kinaza (TBK1/IKKε), aktivira IRF3 i IRF7, koji indukuju transkripciju interferona tipa I (Kumar i saradnici, 2009a).

TAK1 aktivira dva različita puta. U jednom putu, ova kinaza aktivira MAPK, a u drugom putu fosforiliše β subjedinicu IKK kompleksa (engl. IkappaB kinase) koji se sastoji od IKK-α, IKK-β i IKK-γ. Ovaj kompleks potom fosforiliše protein IκB.

Fosforilisani I κ B, prepoznat od strane ubikvitin ligaze, podleže ubikvitinaciji i proteazomalnoj degradaciji i oslobađa se od NF- κ B. Transkripcioni faktor NF- κ B se zatim translocira u jedro i indukuje ekspresiju gena (Akira i saradnici, 2006; Beutler, 2009; Kawai i Akira, 2009; Kumar i saradnici, 2009b).

MyD88 nezavisni, TRIF zavisni put učestvuje u inflamatornom odgovoru i vodi aktivaciji IFN- β i IFN-inducibilnih gena i takođe posreduje u aktivaciji MAPK i kasne faze NF- κ B odgovora. Angažovanje TLR3 ili TLR4 receptora odgovarajućim ligandima, dovodi do regrutovanja adapterskog molekula TRIF koji preko protein ligaze **TRAF 3** aktivira IKK srodne kinaze (engl. IKK-related kinases): **TBK1** [engl. TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1] i **IKK ϵ** . Ove kinaze fosforilišu regulatorne faktore IFN, IRF3 i IRF7 i kao posledica fosforilacije, ovi faktori formiraju homo- ili heterodimere, translociraju se u jedro i indukuju transkripciju IFN-inducibilnih gena. Osim toga IRF zajedno sa NF- κ B i aktivacionim proteinom-1 (engl. activator protein-1, AP-1) formiraju multiproteinski kompleks tzv. enhanceosome (engl. enhanceosome) koji indukuje transkripciju IFN- β gena. Takođe ovaj signalni put aktivira transkripcioni faktor NF- κ B i MAPK, aktiviranjem molekula TRAF6 ili receptor interakcionog proteina 1 (engl. receptor-interacting protein 1, RIP1) (Mogensen, 2009).

Jedan od najvećih signalnih puteva pokrenut od strane TLR su MAP kinazni signalni putevi. Ovi signalni putevi su visoko evolutivno konzervirani i uključeni su u odgovor na različite ekstracelularne stimulse, kontrolišući na taj način veliki broj ćelijskih procesa kao što su rast, proliferacija, preživljavanje, apoptoza ćelije, a takođe imaju važnu ulogu u imunskom odgovoru. Tri najpoznatije familije MAP kinaza su: **p38**, Jun N-terminalna kinaza (engl. Jun N-terminal kinase, **JNK**) i ekstraćelijskim signalom regulisana kinaza (engl. extracellular signal-regulated kinases, **ERK1/2**) (Chang i Karin, 2001; Arthur i Ley, 2013; Dong i saradnici, 2002).



Slika 8. Različiti stimuli mogu kontrolisati ravnotežu u fosforilaciji sve tri MAP kinaze i uticati na različiti razvoj DĆ koje zatim učestvuju u indukciji imunskog odgovora (Nakahara i saradnici, 2006).

Nakon aktivacije receptora na površini DĆ nastupa fosforilacija MAP kinaza, kao rani događaj u signalnoj transdukciji. U zavisnosti od familije, MAPK koja biva aktivirana interakcijom receptora sa specifičnim ligandom, dovodi do posledične polarizacije T ćelijskog odgovora u određenom pravcu. Smatra se da aktivacija p38 vodi ka sazrevanju DĆ koje će indukovati Th1 tip odgovora, dok aktivacija ERK u DĆ rezultira supresijom IL-12 i indukcijom IL-10 i više je u vezi sa pokretanjem Th2 i anti-inflamatornog odgovora (Nakahara i saradnici, 2006) (slika 8).

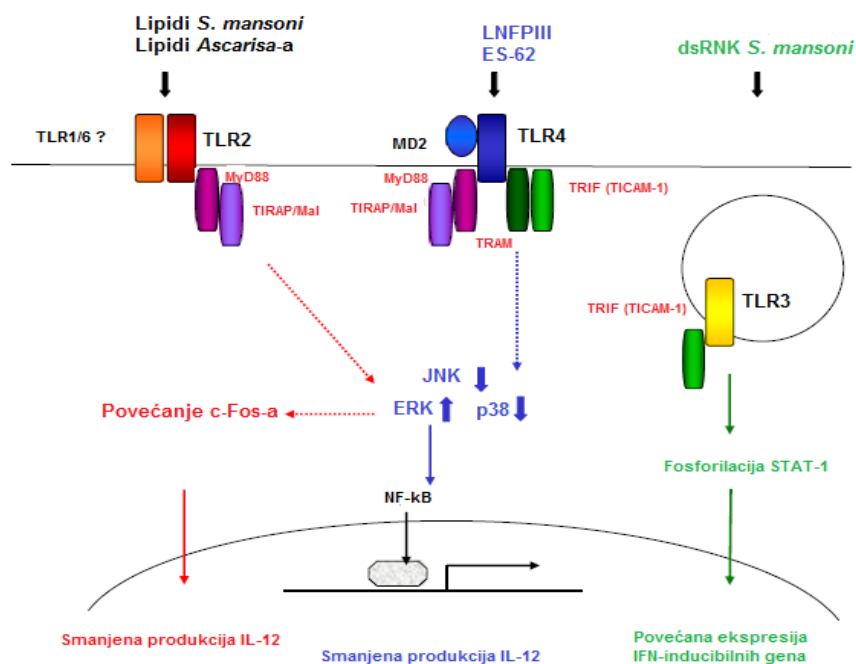
1.9. Molekularni mehanizmi kojima paraziti modulišu imunski odgovor domaćina

Za razliku od dobro poznatih signalnih puteva koji pokreću Th1 odgovor, signalni putevi kojima produkti parazita učestvuju u pokretanju i razvoju Th2 odgovora nisu dovoljno poznati (Harnet i Harnet, 2006). Iako je TLR familija, a posebno TLR4, do sada uglavnom bila povezana sa pokretanjem Th1 inflamatornog, a ne Th2 i anti-inflamatornog odgovora karakterističnog za infekcije helmintima, pokazano je da su neki helmintski molekuli uključeni u aktivaciju signalnih puteva preko nekoliko TLR (Thomas i saradnici, 2005; van Riet i saradnici, 2007) (slika 9).

Nađeno je da lizofosfatidilholin (lyso-PC) *S. mansoni* i lipidi *Ascaris lumbricoides* intereaguju sa TLR2 na DC i indukuju njihovu diferencijaciju u DC2, ćelije koje imaju potencijal da izvrše polarizaciju imunskog odgovora u Th2 pravcu i indukuju produkciju IL-4 i IL-10 (van der Kleij i saradnici, 2002; van Riet i saradnici, 2007). Za razliku od ovih antigena, dsRNK *S. mansoni* se vezuje za TLR3 u DC i vodi povećanoj ekspresiji gena za IFN i produkciji IFN tipa-1 (Aksoy i saradnici, 2005). Takođe je pokazano da lakto-N-fukopentoza III, LNFR III (molekul SEA, koji sadrži glikan Lewis^x) i ES-62 *A. viteae* aktiviraju DC preko TLR4 receptora (Thomas i saradnici, 2003, 2005; Goodridge i saradnici, 2005). LPS-om indukovano sazrevanje DC moguće je inhibirati ekskretorno-sekretornim antigenima *T. spiralis* (TspES) i to posredstvom intereakcije sa TLR4, ali mehanizmi koji se nalaze u osnovi ove inhibicije nisu poznati (Aranzamendi i saradnici, 2012).

Iako je pokazano da se helmintski produkti vezuju za TLR i da je njihovo vezivanje preko ovih receptora prepoznato kao mehanizam koji ograničava razvoj Th1 imunskog odgovora, još uvek je nejasno da li signali indukovani vezivanjem antigena helminta posredstvom TLR mogu direktno promovisati Th2 ćelijsku diferencijaciju (Perrigou i saradnici, 2008). Postoje dokazi koji sugerišu da su TLR nizvodni signalni putevi u negativnoj korelaciji sa razvojem Th2 odgovora. Npr. miševi deficijentni za TLR4 i MyD88 su visoko rezistentni na hroničnu infekciju i pokazuju pojačan Th2 odgovor nakon infekcije sa parazitom *T. suis* (Helmsby i Grensis, 2003a). Odsustvo ligaze TRAF6 rezultuje u Th2 posredovanoj inflamatornoj bolesti, što podržava negativnu regulatornu ulogu TLR signalnog puta u diferencijaciji Th2 ćelija (Chiffolleau

i saradnici, 2003). Angažovanje TLR2 i TLR3 receptora od strane SEA je neophodno za produkciju inflamatornih citokina. Naime, u odgovoru na SEA, DĆ miševa deficijentnih za TLR2 i TLR3, produkuju manje inflamatornih citokina (IL-12p40, TNF- α) u odnosu na DĆ normalnih miševa. Tokom infekcije ovih miševa *S. mansoni*, dolazi do snažnog Th2 imunskog odgovora (Vanhoutte i saradnici, 2007).



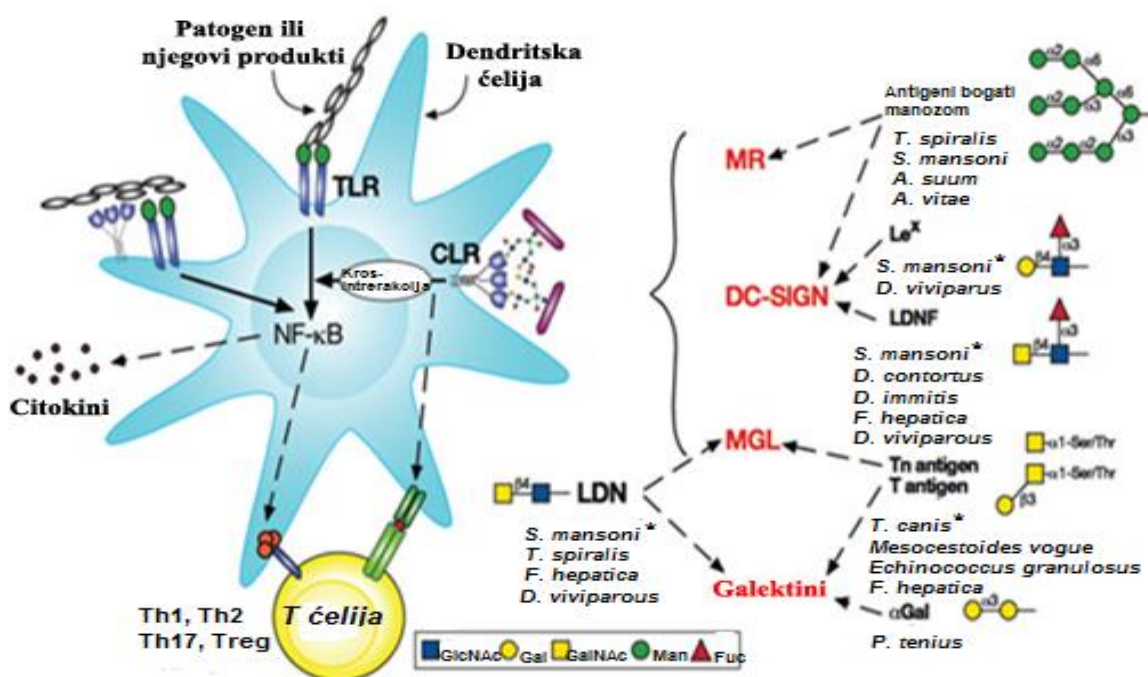
Slika 9. TLR signalni put u dendritskim ćelijama indukovan od strane helmintskih molekula. dsRNK iz solubilnih ekstrakata jaja *S. mansoni* indukuje IFN-inducibilne gene preko TLR3, dok lipidi parazita *S. mansoni* i *Ascaris-a* ili LNFPIII *S. mansoni* i ES62 *A. viteae* preko TLR2 ili -4 receptora, indukuju Th2 ćelijski odgovor ili imunomodulaciju. Za TLR4 ligande (LNFPIII i ES-62) je pokazano da indukuju Th2 ćelijski odgovor preko povećanja fosforilacije ERKa i c-Fos-a (transkripcioni faktor koji je stabilizovan od strane ERK-a). Lipidi parazita takođe povećavaju ekspresiju transkripcionog faktora c-Fos u DĆ ukazujući da helmintski antigeni indukuju Th2 preko sličnih puteva, iako aktiviraju različite receptore. Za lipide helminta *S. mansoni* i *Ascaris-a* je pokazano da aktiviraju TLR2 i da je signalni put pokrenut interakcijom lipida i TLR2 zavisan od MyD88 i TIRAP, ali nije poznato da li lipid *Ascaris-a* redukuje IL-12 i povećava ekspresiju c-Fos-a direktno preko TLR2 signalnog puta (van Riet i saradnici, 2007).

Razlog različitog odgovora na TLR4 ligand, LPS, i dva TLR4 aktivirajuća helmintska antigena - LNFPIII i ES-62 je još uvek nejasan. Studije na C3H/HeJ miševima, koji imaju tačkastu mutaciju u TIR domenu TLR4 receptora, pokazale su da postoje razlike u tome kako mutirani receptor reaguje na TLR4 ligande poreklom od parazita i na LPS. Naime, C3H/HeJ miševi reaguju na LPS tako što ne proizvode citokine, dok na ES-62 reaguju isto kao i miševi koji ne nose mutaciju. Ova studija pokazuje da ES-62 aktivira TLR4 signalni put drugačije nego LPS, ali mehanizam konvertovanja pro-inflamatornog TLR signalnog puta od strane helmintskih produkata ostaje i dalje nepoznat (Goodridge i saradnici, 2007). Jedna druga studija je pokazala da je indukcija produkcije citokina od strane ES-62 zavisna od MyD88. Međutim, nije jasno kako ES-62 indukuje inhibitorne signale preko MyD88, kada je produkcija citokina pokrenuta od strane lipoproteina bakterija, BLP, LPS i CpG (TLR2, 4 i 9 liganada) MyD88-zavisna (Goodridge i saradnici, 2005). Aktivacija TLR helmintskim antigenima vodi nizvodnoj aktivaciji kinaza, koja se razlikuje od aktivacije kinaza indukovane Th1 stimulusima. Tako je pokazano da, za razliku od LPS-a koji vodi fosforilaciji sve tri velike MAPK familije tj. ERK, JNK i p38, i perzistentnoj aktivaciji NF- κ B u DC, LNFRIII i ES-62 vezivanjem za TLR4, indukuju jaku fosforilaciju ERK, slabu ili nikakvu fosforilaciju JNK i p38 i kratkotrajnu aktivaciju NF- κ B (Thomas i saradnici, 2003; 2005; Goodridge i saradnici, 2005) (slika 9). Ovi rezultati potvrđuju da Th2 aktivirajući helmintski molekuli mogu angažovati TLR4, ali na način koji se razlikuje od LPS-a. Osim toga pronađeno je da je signalni put preko NF- κ B1 neophodan u diferencijaciji DC i polarizaciji ka Th2 imunskom odgovoru, s obzirom da stimulisane DC NF- κ B1^{-/-} deficijernih miševa molekulima SEA i LNFRIII, ne mogu indukovati Th2 odgovor (Artis i saradnici, 2005; Thomas i saradnici, 2005). Thomas i saradnici (2005) su pokazali da stimulacija DC sa LNFPIII indukuje kratkotrajnu aktivaciju NF- κ B, za razliku od perzistentne aktivacije koja je zapažena stimulacijom ćelija LPSom, kao i da ova kratkotrajna aktivacija nije povezana sa degradacijom članova I κ B familije. Pokazano je da dugotrajna aktivacija NF- κ B neophodna za produkciju pro-inflamatornih citokina i azot monoksida (NO), dok kratkotrajna aktivacija indukuje diferencijaciju u DC2 fenotip.

Signalni putevi pokrenuti aktivacijom TLR2 receptora od strane lipida *S. mansoni* su nepoznati, ali se pretpostavlja da, kao i u slučaju Pam3Cys (TLR2 agonist koji

indukuje Th2 odgovor), ovi lipidi menjaju balans između ERK i p38 u korist ERKa i vode do stabilizacije transkripcionog faktora c-Fos i supresiji produkcije citokina IL-12p70 (Agrawal i saradnici, 2003).

Jedno od mogućih objašnjenja mehanizama kojima produkti helminta preusmeravaju pro-inflamatornu TLR signalizaciju je kooperacija TLR sa drugim PRR kao što su lektinski receptori C-tipa (slika 10).



Slika 10. Dendritske ćelije prepoznaju i vezuju patogene i kontrolišu T ćelijski odgovor. Nepotpuno zrele DĆ eksprimiraju Toll-like receptore i lektinske receptore C tipa koji prepoznaju patogene i prezentuju ih u sklopu MHC molekula II klase. Kros-interakcija između CLR i TLR, na površini ćelija ili intracelularno, determiniše finalni patogen-specifičan T ćelijski odgovor (Th1, Th2, Th17 ili Treg). CLR su efikasni u internalizaciji mikroba i njihovih produkata. Mnogi helminti eksprimiraju glikane koji su ligandi za lektine, (DC-SIGN, MR illi MGL). Zvezdica (*) pokazuje primere gde je pokazana interakcija glikana helminta i lektin (van Die i Cummings, 2010).

Tako je pokazano da humane DĆ vezuju i internaliziraju antigene jaja *S. Mansoni*, SEA interakcijom sa MGL, MR i DC-SIGN i usmeravaju odgovor prema Th2 (van Liempt i saradnici, 2007). Takođe, DC-SIGN prepoznaje antigene *Toxocara canis*

(Schabussova i saradnici, 2007), dok se ekskretorno-sekretorni produkti *T. crassiceps* (TcES) vezuju za MGL i MR (Terrazas i saradnici, 2013). Pretpostavlja se da CLR aktivirani helmintskim antigenima mogu biti uključeni u aktivaciju različitih nizvodnih signalnih puteva ili mogu pozitivno ili negativno interferirati sa TLR signalnim putem. Lyso-PC *S. mansoni* koji aktivira TLR2 na DĆ, posreduje u indukciji regulatornih T ćelija, verovatno na sličan način kao zimozan (glukan iz ćelijskog zida kvasca), koji angažuje dva receptora TLR2 i Dectin-1 na DĆ (van Riet i saradnici, 2007). Pokretanje Th2 imunskog odgovora pod uticajem TcES u potpunosti je inhibirano blokiranjem MR, MGL i TLR2 na DĆ, dok blokiranje pojedinačnih receptora rezultira samo u smanjenju nivoa Th2 citokina (Terrazas i saradnici, 2013). Interferencija sa signalima, poreklom od TLR pokazana je u slučaju interakcije glikolipida *S. mansoni* sa DĆ, pri čemu je za aktivaciju DĆ preko TLR4 neophodna kooperacija sa DC-SIGN receptorom (van Stijn i saradnici, 2010). Očigledno, podešavanje imunskog odgovora je rezultat fine regulacije ravnoteže između TLR i CLR signalnih puteva.

2. CILJEVI

Infekcija helmintom *T. spiralis* pokreće snažne anti-inflamatorne i regulatorne mehanizme domaćina u čemu značajnu ulogu imaju metabolički produkti parazita. Mišićne larve *T. spiralis* su stadijum životnog ciklusa parazita koji učestvuje u definitivnom uspostavljanju evolucijom definisanog sistema interakcije parazita i domaćina i odgovorne su za postojanje dugotrajne, hronične faze infekcije. U toj fazi infekcije organizam domaćina je izložen dejstvu ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi (ESL1). Radi se o kompleksnoj smeši bioaktivnih molekula koja ima i snažne imunomodulatorne kapacitete. Rezultati dobijeni na animalnim eksperimentalnim modelima pokazali su da infekcija *T. spiralis*, ali i ESL1 produkti mišićnih larvi, uspešno ublažavaju kliničku sliku i menjaju tok autoimunskih oboljenja. Međutim, malo se zna o mehanizmima koje ESL1 antigeni koriste u usmeravanju imunskog odgovora, receptorima na površini imunskih ćelija koji učestvuju u interakciji sa parazitskim antigenima i signalnim putevima koje ova interakcija pokreće. Takođe, malo je podataka o imunomodulatornim karakteristikama pojedinačnih ESL1 molekula.

Osnovni cilj istraživanja obuhvaćenih ovom studijom je identifikacija komponenti ESL1 produkata mišićnih larvi *T. spiralis* koje su odgovorne za oblikovanje imunskog odgovora u toku infekcije DA pacova *T. spiralis*, sa posebnim osvrtom na ulogu ugljenohidratnih struktura u interakciji parazitskih antigena i imunskog sistema domaćina. U skladu sa osnovnim ciljem istraživanja postavljeni su sledeći eksperimentalni ciljevi:

1. Ispitivanje uloge glikana ESL1 produkata u pokretanju imunskog odgovora karakterističnog za infekciju *T. spiralis*, određivanjem produkcije citokina i praćenjem ekspresije gena za citokine u ćelijama slezine inficiranih DA pacova.
2. Utvrđivanje značaja glikana ESL1 produkata za *in vivo* indukciju urođenog imunskog odgovora, ispitivanjem produkcije pro- i anti-inflamatornih medijatora peritonealnih makrofaga DA pacova prethodno tretiranih antigenima *T. spiralis*.
3. Ispitivanje značaja glikana ESL1 produkata, kao i uticaja pojedinih komponenti ESL1 na polarizaciju odgovora T limfocita tokom infekcije *T. spiralis*, analizom

odgovora *T. spiralis* senzibilisanih T ćelija na restimulaciju primenom ESL1, pESL1 ili pojedinih komponenti ESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag.

4. Ispitivanje uticaja različitih antigena *T. spiralis* (ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53) na sazrevanje dendritskih ćelija (DĆ) poreklom iz kostne srži DA pacova, određivanjem ekspresije površinskih markera karakterističnih za DĆ i njihovog citokinskog profila.
5. Utvrđivanje kapaciteta DĆ da preuzimaju i prezentuju antigene ESL1, pESL1, 7C2C5Ag ili rTsp53, naivnim T limfocitima DA pacova, ispitivanjem proliferacije i citokinskog profila T limfocita, nakon ko-kultivacije sa stimulisanim DĆ.
6. Ispitivanje učešća pojedinih PRR u interakciji sa različitim antigenima *T. spiralis*, kao i značaja ugljenohidratnih struktura ESL1 za ovu interakciju.
7. Ispitivanje učešća MAP kinaza (ERK1/2 i p38 kinaze) u signalnom putu pokrenutom interakcijom DĆ i ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag.

3. MATERI JAL I METODE

3.1. Životinje

Visoko srodni Dark Agouti (DA) pacovi su gajeni na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije u Beogradu. U eksperimentalnim studijama su korišćene ženke i mužjaci DA pacova, starosti između 12 i 18 nedelja. Sve procedure u radu sa životinjama bile su u skladu sa pravilnikom Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama i sa odobrenjem Etičkog komiteta INEP-a.

3.2. Kultura ćelijskih linija

U studijama su korišćene humane embrionalne ćelijske linije bubrega (engl. human embryonic kidney cells, HEK cells), označene kao HEK-Blue™ od strane proizvođača InvivoGen, California, USA, i to: HEK-Blue™ null1 (hkb-null1), HEK-Blue™ hTLR2 (hkb-htlr2), HEK-Blue™ hTLR3 (hkb-htlr3), HEK-Blue™ hTLR4 (hkb-htlr4), HEK-Blue™ hTLR5 (hkb-htlr5), HEK-Blue™ hTLR7 (hkb-htlr7), HEK-Blue™ hNOD1 (hkb-hnod1) i HEK-Blue™ hNOD2 (hkb-hnod2). Sve ćelijske linije dobijene su ko-transfekcijom HEK293 ćelijske linije genima za pojedinačan specifičan hPRR i reporter gena za humanu embrionalnu alkalnu fosfatazu SEAP (engl. the secreted human embryonic alkaline phosphatase). Ćelije su kultivisane u kompletnom medijumu, DMEM (engl. Dulbeccos Modified Eagles Medium, Sigma, Germany) sa 100 U/ml penicilinom, 100 µg/ml streptomycinom, 0,3 mg/ml L-glutaminom (Gibco; Pen-Strep-Glu 100x) i 10 % (v/v) serumom fetusa govečeta - FBS (engl. Fetal bovine serum, inaktiviranog toplotom 30 minuta na 56 °C) (HyClone, Thermo scientific) na 37°C u prisustvu 5 % CO₂. Takođe, u cilju održavanja stabilne ćelijske linije, ćelije su gajene u prisustvu selektivnih antibiotika (videti tabelu 3).

Tabela 3. Selekcija antibiotika za HEK-Blue™ ćelijsku kulturu.

<i>Ćelijska linija</i>	<i>Antibiotici (početne koncentracije)</i>	<i>Koncentracije za selekciju</i>
HEK-Blue null1	Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	100 µg/ml 100 µg/ml
HEK-Blue hTLR2	HEK-Blue Selection (250x) Normocin (50 mg/ml)	1x 100 µg/ml
HEK-Blue hTLR3	Blasticidin (10 mg/ml) Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	10 µg/ml 100 µg/ml 100 µg/ml
HEK-Blue hTLR4	HEK-Blue Selection (250x) Normocin (50 mg/ml)	1x 100 µg/ml
HEK-Blue hTLR5	Blasticidin (10 mg/ml) Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	10 µg/ml 100 µg/ml 100 µg/ml
HEK-Blue hTLR7	Blasticidin (10 mg/ml) Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	30 µg/ml 100 µg/ml 100 µg/ml
HEK-Blue hNOD1	Blasticidin (10 mg/ml) Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	30 µg/ml 100 µg/ml 100 µg/ml
HEK-Blue hNOD2	Blasticidin (10 mg/ml) Zeocin (100 mg/ml) Normocin (50 mg/ml)	30 µg/ml 100 µg/ml 100 µg/ml

Specifikacije

Normocin (InvivoGen; ant-nr)

Zeocin (InvivoGen; ant-zn)

Blasticidin (InvivoGen; ant-bl)

HEK-Blue Selection (InvivoGen; hb-sel)

3.3.Održavanje soja parazita *T. spiralis*

Parazit *T. spiralis* održava se u INEP-u serijskom pasažom na Wistar pacovima (zdrave životinje odgajane su na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije u Beogradu). Primenom izoenzimskih analiza izvršenih 1991. god. u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite, Rim, Italija (European Union Reference Laboratory for Parasites, Institute Superiore di Sanita, Rome, Italy) potvrđena je pripadnost ovog parazita T1 genskom pulu, a izolat je obeležen kao ISS161.

3.4.Priprema antigena parazita

3.4.1. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) *T. spiralis*

Nakon žrtvovanja inficiranih pacova, uklanjanja kože i unutrašnjih organa, preostala tkiva su usitnjena mlevenjem. Infektivne mišićne larve (L1 stadijuma) dobijene su metodom enzimske digestije mesa (1 % rastvor pepsin-HCl, pH 1,6-1,8 u toku 4 h na 37 °C, uz konstantno mešanje) u skladu sa direktivom Evropske unije broj 2075/2005. Nakon završene digestije, oslobođene mišićne larve su ostavljene da se istalože na dnu suda, a potom su propuštene kroz mikrobiološko sito u cilju oslobađanja od detritusa. Larve su potom isprane toplim fiziološkim rastvorom, resuspendovane u fiziološkom rastvoru i korišćene za infekciju ili za pripremu ekskretorno-sekretornih (ES) produkata parazita.

3.4.2. Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ESL1) *T. spiralis*

Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ESL1) *T. spiralis* dobijeni su kultivacijom izolovanih larvi u kompletnom medijumu-DMEM sa 10mM Hepesa, 2mM L-glutamina, 1mM Na-piruvata i 50 U/ml gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija), tokom 18-20h na 37 °C, uz prisustvo 10 % CO₂. Nakon kultivacije larve su izdvojene spontanim taloženjem u konusnim epruvetama, a medijum sa prisutnim ESL1 produktima parazita filtriran je preko membrane sa otvorima prečnika 0,22 µm (Millipore, USA), dijalizovan prema fiziološkom rastvoru i koncentrovan preko Amicon sistema (Stirred cells 8400 i 8010, Amicon Corp, USA) uz korišćenje membrana za

ultrafiltraciju čija je veličina pora 10.000 NMWL (Amicon PM 10 Ultrafiltration Discs, polyethersulfone). Endotoksini (LPS), čije je prisustvo eventualno moguće, uklonjeni su iz rastvora antigena ESL1 (i njegovih derivata) korišćenjem komercijalnog dostupnog kita SERVA Blue PrepProtein Endotoxin ExMicroKit prema uputstvu proizvođača. Koncentracija dobijenog ESL1 je određena bihinonskom reakcijom korišćenjem komercijalnog dostupnog kita (BCA protein assay kit, Pierce, Rockford, IL), a njegov kvalitet je testiran u ELISA testu (imunoenzimski test na čvrstoj fazi, engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) i zatim je antigen čuvan do na -20 °C do upotrebe.

3.4.3. Perjodatom tretirani ESL1 antigen (pESL1)

Perjodatom tretirani ESL1 antigen (pESL1) larvi *T. spiralis* dobijen je tretmanom molekula nativnog ESL1 sa natrijum metaperjodatom (NaIO₄), prema izmenjenoj proceduri koju je opisao Tawill (Tawill i saradnici, 2004). Ovaj tretman menja strukturnu konformaciju glikana, dok struktura proteina ostaje neizmenjena (Velupillai i saradnici, 1997). Ukratko, ESL1 antigen koncentracije 0,5 mg/ml tretiran je sa 50 mM NaIO₄ (Sigma-Aldrich) u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0 (V/V), na 37 °C u mraku, 30 min. Reakciona smeša je zatim dijalizovana naspram 0,05 M PBS, pH 7,4, na +4 °C i koncentrovana. Kao kontrola pESL1 antigenima, prilikom imunizacije životinja, korišćen je mokESL1 (engl. mockESL1). MokESL1 antigeni su dobijeni kao i pESL1 antigeni, inkubacijom u acetatnom puferu, ali u odsustvu perjodata. Koncentracije pESL1 i mokESL1 antigena su određene bihinonskom reakcijom prema uputstvu proizvođača. Uspešnost perjodatnog tretmana je ispitana u Western blotu korišćenjem lektina concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich, GmbH, Taufkirchen, Germany) koji prvenstveno prepoznaje terminalne rezidue manoze i glukoze u okviru ugljenohidratnih struktura glikolipida i glikoproteina (Moothoo i Naismith, 1998). ESL1 i pESL1 antigeni su razdvojeni na proteinske komponente, putem SDS-PAGE elektroforeze na 10 % poliakrilamidnom gelu i zatim je izvršen elektrotransfer razdvojenih proteina na membrani od polivinil difluorida, PVDF (engl. polyvinil difluoride membrane, ThermoScientific). Membrane su inkubirane preko noći na +4 °C sa ConA obeleženim sa peroksidazom iz rena (horseradish peroksidase-HRPO) (ConA-HRPO), optimalno razblaženim u TBS puferu (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6). Vezivanje

konjugata ConA-HRPO detektovano je taložnom reakcijom sa 3,3 diaminobenzidinom (0,05 % DAB, 0,01 % vodonik peroksid u 0.2 M Tris-HCl pH 7,6). Nakon Western blota, pESL1 i mokESL1 antigeni su do korišćenja čuvani na -20 °C.

3.4.4. Antigen *T. spiralis* izolovan na 7C2C5 koloni (7C2C5Ag)

Ćelijska linija hibridoma 7C2C5, dobijena fuzijom ćelija slezine miševa inficiranih *T. spiralis* i ćelija mijeloma, je donacija Dr Ray Gamble (USDA, Agricultural Research Service, Parasite Biology and Epidemiology Laboratory, Beltsville, Maryland, USA). Ova ćelijska linija se održava u INEP-u i korišćena je za dobijanje 7C2C5 monoklonskog antitela. Ovo antitelo je IgM klase i prepoznaje epitope karakteristične za mišićne larve *T. spiralis* koji se nalaze na antigenima molekulskih masa 45, 49 i 53 kDa (Gamble i Graham 1984). Komponente ESL1 koje su dobijene imunoafinitetnom hromatografijom na koloni sa imobilisanim monoklonskim 7C2C5 antitelom označene su kao 7C2C5 antigeni (7C2C5Ag) i njih čine glikoproteini molekulskih masa 45, 49 i 53 kDa.

3.4.5. Rekombinantni p53 antigen (rTsp53) *T. spiralis*

Rekombinantni p53 antigen (rTsp53) *T. spiralis*, dobijen korišćenjem ekspresionog sistema *E. coli*, je donacija Dr Isao Nagano, Odeljenje za Parazitologiju, Medicinski fakultet, Gifu Univerzitet, Japan (engl. Department of Parasitology, Gifu University, Graduate School of Medicine, Gifu, Japan). Ovaj antigen je protein i ne sadrži u svojoj strukturi ugljenohidratne komponente.

3.5. Dobijanje i gajenje dendritskih ćelija kostne srži

Dendritske ćelije kostne srži mužjaka DA pacova (starosti 16-18 nedelja) dobijene su metodom koja predstavlja modifikaciju procedure koju je opisao Talmor (Talmor i saradnici, 1998). Kostna srž izolovana je iz femura i tibije pacova, ispiranjem koštanih kanala medijumom za ispiranje - RPMI 1640 (PAA laboratories, Austrija) sa

2% FCS. Dobijena ćelijska suspenzija je profiltrirana kroz sterilnu mrežicu čije su pore 100 µm (BD Biosciences, Bedford, USA), u cilju uklanjanja detritusa. Ćelije su zatim centrifugirane na 1800 rpm, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Talog je potom resuspendovan u medijumu sa 2 % FCS, eritrociti su lizirani, a ćelije još jednom isprane, resuspendovane u medijumu i postavljene u kulturu. 5×10^6 ćelija/bazenu gajene su u pločama sa 6 bazena, u po 2 ml medijuma za kultivaciju (RPMI 1640, dopunjen sa 2 mM L-glutaminom, 1 mM Na-piruvatom, 10 mM Hepsom, 50 U/ml gentamicina, 50 µM 2-merkaptetanolom) obogaćenim sa 10 % (v/v) inaktivisanim fetalnim telećim serumom FCS (engl. Fetal Calf Serum, PAA laboratories, Austrija), kao i faktorima rasta (Biosource Invitrogen, USA): pacovski rekombinantni GM-CSF (faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga, engl. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), pacovski rekombinantni IL-4 i humani Flt-3 ligand (engl. Fms-related tyrosine kinase 3 ligand), svaki po 25 ng/ml. Ova kombinacija faktora rasta korišćena je prema proceduri koju je opisala Brissette-Storkus (Brissette-Storkus i saradnici, 2002). Kultivacija je vršena u inkubatoru na 37 °C, u prisustvu 5 % CO₂. Trećeg i šestog dana od početka kultivacije ćelija vršeno je osvežavanje medijuma. Osmog dana od početka kultivacije, ćelije su tretirane antigenima *T. spiralis*: ESL1 (50 µg/ml), pESL1 (50 µg/ml), rTsp53 (10 µg/ml) i 7C2C5Ag (10 µg/ml). Ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene su kao negativne kontrole, a ćelije tretirane LPSom (200 ng/ml) kao pozitivne kontrole. Za procenu statusa fosforilacije p44/p42 (ERK1/2) i p38, ćelije su inkubirane sa antigenima 15, 30 i 60 minuta. Po isteku tretmana, ćelije su lizirane u RIPA puferu (engl. Radioimmunoprecipitation assay buffer, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % natrijum deoksiolata, 0,1 % natrijum dodecil sulfata i koktela inhibitora proteaza i fosfataza, pH 8, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) na ledu u trajanju od 5 minuta i zatim centrifugirane na 8000 g/10 minuta/+4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatanti su izdvojeni za dalju analizu i koncentracija proteina u svakom uzorku utvrđena je bihinonskom reakcijom korišćenjem komercijalnog dostupnog kita (BCA protein assay) prema uputstvu proizvođača.

Takođe, osmog dana od početka kultivacije vršena je i stimulacija ćelija istim antigenima u trajanju od 48 sati, posle čega su sakupljene neadherentne ćelije, određena

im je vijabilnost i broj i raspoređene su za različite analize u cilju određivanja ekspresije površinskih markera i produkcije citokina, kao i za ko-kultivaciju sa T limfocitima.

3.6. Western blot analiza - učešće ERK1/2 i p38 kinaze u signalnom putu pokrenutom interakcijom DĆ i antigena *T. spiralis*

Aktivacija MAP kinaza u lizatima DĆ stimuliranih antigenima ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag je ispitana primenom Western blot analize. Ukratko, uzorci lizata stimuliranih ćelija su neposredno pre elektroforeze, skuvani 90 sekundi odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (Tris 0,151 g, glicerol 2 ml, SDS 0,4 g, 2 - merkaptoetanol 0,5 ml – dopuniti do 10 ml H₂O). Napravljeni su gelovi debljine 1,5 mm. Prvo je napravljen separacioni 10 % akrilamidni gel (3,97 ml H₂O, 3,33 ml 30 % akrilamida, 0,1 ml 10 % SDS, 0,5 M Tris HCL pH 8,8, i katalizatori polimerizacije: 0,004 ml tetrametiletildiamina- TEMED i 0,1 ml 10 % amonijum–persulfata – APS) na koji je naslojen 4 % akrilamidni gel (3,097 ml H₂O, 0,665 ml 30 % akrilamida, 0,05 ml 10 % SDS, 0,5 M Tris HCL pH 6,8, 2,5 µl TEMED-a i 50 µl 10 % APS-a). Kao standardi za određivanje molekulske mase korišćeni su Precision Plus Protein™ Dual Color Standardi od 10 do 250 kDa (BioRad, Marnes-la-Coquette, Francuska) Ispitivani uzorci nanošeni su u koncentraciji od 30 µg/kanalu gela.

Po završetku elektroforeze proteini sa gela su prebačeni na PVDF membranu pomoću aparature za polusubi transfer (aparatus LKM Multiphor II), uz korišćenje pufera za elektrotransfer (TRIS – HCl 0,025 M, pH 8,3; glicin 0,192 M; 20 % metanol) u toku 30 minuta na sobnoj temperaturi, pri jačini struje od 25 mA/cm² gela. Po završenom transferu, membrane su bojene korišćenjem kita: Novex® Reversible Protein Stain (Life Technologies, USA) u cilju vizuelizovanja bendova. Membrana je zatim inkubirana u 5% mleku za blokiranje (engl. nonfat dry milk, Cell Signaling Technology), 60 minuta na sobnoj temperaturi u cilju redukcije nespecifičnog vezivanja. Posle blokiranja, membrane su isprane tri puta po 5 minuta u 1xTBS puferu sa 0,1 % Tween-om (TBS/Tween) i zatim inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima (1:1000 u 3% BSA) preko noći na +4°C. Primarna antitela (Cell Signaling Technology) koja su korišćena u ovoj studiji su: anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), anti-p38 MAPK, anti-fosfo-ERK1/2 (fosfo-p44/42 MAPK), anti-ERK1/2 (p44/42 MAPK) i anti-β-actin.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su isprane u TBS/Tween-u tri puta i zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima obeleženim peroksidazom, 90 minuta na sobnoj temperaturi. U ovoj studiji su korišćena: anti-miš antitelo (anti-mouse antibody, Cell Signaling Technology) (1:2000 u 3 % BSA) za fosfo-ERK1/2 i β -actin i anti-zec antitelo (anti-rabbit antibody, Cell Signaling Technology) (1:1000 u 3 % BSA) za ERK1/2, p38 i fosfo-p38. Po inkubaciji sa sekundarnim antitelom, membrane su isprane tri puta po 5 minuta, u cilju uklanjanja nevezanog sekundarnog antitela, a potom su odgovarajući proteini detektovani hemiluminiscentnom reakcijom korišćenjem supstrata ECL (Enhanced chemiluminescent-ECL western blotting substrate, Pierce, Rockford, IL), prema upustu proizvođača. Ukratko, membrane su inkubirane sa supstratom 5 minuta, a zatim su filmovi bili izloženi hemiluminiscenciji 1, 5 i 30 minuta. Nakon ekspozicije, filmovi su razvijeni, skenirani i ekspresija proteina (fosforilisane forme proteina i totalne, nefosforilisane forme proteina) je kvantifikovana denzitrometrijom pomoću SigmaScan Pro 5.0 software (Sigma, St. Louis, MO). Nivo ekspresije ispitivanih proteina (fosfo-ERK1/2, ERK1/2, p38 i fosfo-p38) normalizovan je u odnosu na ekspresiju proteina, β -aktina, detektovanog u istom uzorku i izražen kao odnos fosfo-p38/p38 i fosfo-ERK1/2/ERK1/2.

3.7. Izolovanje ćelija slezine i magnetno sortiranje T limfocita

Slezine su aseptično izolovane iz zdravih pacova (mužjaci, starosti 3 meseca) i potom je suspenzija ćelija dobijena istiskivanjem tkiva iz slezinske kapsule i provlačenjem suspenzije kroz iglu šprica. Dobijena ćelijska suspenzija je zatim prebačena u epruvetu i ćelije su istaložene centrifugiranjem i resuspendovane u odgovarajućoj zapremini medijuma. Primenom tehnike razdvajanja ćelija na gradijentu gustine, mononuklearne ćelije su izdvojene iz suspenzije ćelija. Ukratko, u epruvetu je naliven fikol (3 ml). Nakon toga, na fikol je polako naslojena suspenzija ćelija (4 ml), da bi se izbeglo mešanje slojeva, i sadržaj je centrifugiran na 4000 rpm, 15 minuta. Nakon centrifugiranja, pipetom je pažljivo pokupljen beličasti prsten mononuklearnih ćelija i prebačen u novu epruvetu u koju je zatim nalivena maksimalna količina medijuma, kako bi se ćelije isprale od fikola. Posle centrifugiranja na 1500 rpm, 10

minuta, eritrociti su po potrebi lizirani, a ćelije ponovo isprane u medijumu, centrifugirane i talog je resuspendovan u 2 ml medijuma. Ćelije su potom bojene Tripan plavim, brojane i određena im je vijabilnost.

Ćelije poreklom iz slezina pacova su korišćene za magnetno sortiranje T limfocita upotrebom Pan T izolacionog kompleta i MiniMACS kolone za separaciju (Miltenuyi Biotech, USA) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, 1×10^7 ćelija je resuspendovano u hladnom sorting puferu (PBS pH 7,2; 2 mM EDTA, 0,5 % BSA) i zatim je suspenziji ćelija dodato 20 μ l magnetnih čestica obloženih monoklonskim antitelom OX52 (engl. MicroBeads conjugated to monoclonal mouse anti-rat Anti-T Cell (OX52) antibodies). Inkubacija ćelija magnetnim česticama je trajala 15 minuta na + 4 °C. Nakon toga ćelije su isprane u sorting puferu, centrifugirane na 1200 rpm, 10 min, 6 °C i talog je resuspendovan u sorting puferu. Da bi se odstranile neobeležene ćelije, suspenzija ćelija je prebačena u kolonu postavljenu u magnetno polje i prethodno je isprana sa 500 μ l sorting pufera. Kao posledica izlaganja magnetnom polju, ćelije koje su se vezale za antitelo nakačeno na magnetne čestice ostaju priljubljene uz zid epruvete, dok su nevezane ćelije ostale slobodne u rastvoru. Kolona je isprana tri puta sa 500 μ l pufera u cilju uklanjanja nevezanih ćelija. Vezane ćelije su otkaçene i potisnute sa kolone primenom 1 ml pufera pod pritiskom. Sortirane ćelije su centrifugirane na 1200 rpm, 10 min, 6 °C, resuspendovane u medijumu, prebrojane, proverena im je vijabilnost bojenjem sa Tripan plavim, kao i čistoća bojenjem sa anti-CD4 i anti-CD3 antitelima i FACS analizom.

3.8. Ko-kultivacija stimulisanih DĆ naivnim T limfocitima

DĆ kultivisane u medijumu ili stimulisane nativnim ESL1, pESL1, rTsp53, 7C2C5Ag i LPSom korišćene su za kultivaciju sa naivnim T limfocitima u cilju ispitivanja stimulisanih DĆ da prezentuju antigene *T. spiralis* naivnim T limfocitima.

Proliferativni odgovor T limfocita je meren preko ugradnje radioaktivno obeleženog timidina (^3H -timidin), koji se kao prekursor sinteze DNK ugrađuje u DNK ćelija koje se dele. Limfociti su postavljeni u ploči sa 96 mesta sa U dnom (1×10^5 ćelija/bunariću) i ko-kultivisani dvostrukim serijskim razblaženjima stimulisanih DĆ (1×10^4 , $0,5 \times 10^4$, $0,25 \times 10^4$ /bunariću) u 200 μ l finalne zapremine, u inkubatoru, na

37°C sa 5 % CO₂. Kultivacija je trajala 7 dana, sa dodavanjem rekombinantnog pacovskog IL-2 (20 IU/mL) (Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) nakon 48 h i preseljavanjem ćelija na ploče obložene sa anti-pacovskim CD3 antitelima (3 µg/ml, 200 µl po bazenu) nakon dodatnih 72 h. Ćelijama je dodat ³H-timidin (1 µCi/bunariću) (Amersham, UK) 18 h pre završetka kultivacije. Ćelije su zatim sakupljene automatskim multikanalnim sakupljačem ćelijskih kultura, koji aspirira i lizira ćelije i vrši prebacivanje DNK obeležene ³H-timidinom na filter papir, uz propuštanje nevezanog radioaktiviteta. Ugrađeni ³H-timidin je izmeren nakon dodavanja scintilacione tečnosti, u scintilacionom brojaču β zračenja i izražen kao broj otkućaja na minut (cpm).

U cilju određivanja produkcije citokina, T limfociti ($2,5 \times 10^6$ ćelija/otvoru) su ko-kultivisani sa stimulisanim DĆ (5×10^5 ćelija/otvoru) u otvorima ploče sa 24 mesta, u 1 ml finalne zapremine. Nakon inkubacije od 48 h, rekombinantni pacovski IL-2 (20IU/ml) je dodat u kulturu ćelija i posle 72 h, ćelije su prebačene u bazene nove ploče koje su dan ranije presvučene anti-CD3 antitelima (3 µg/ml, 200 µl po bazenu). Posle 48 sati, supernatanti su skupljeni i izmerena je koncentracija citokina.

3.9. Određivanje ekspresije površinskih markera na dendritskim ćelijama

Ekspresija površinskih markera (MHC II, CD54 i CD86) na DĆ nakon stimulacije LPSom ili antigenima *T. spiralis* (ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53) vršena je primenom protočne citometrije tj. FACS analizom. 1×10^5 ćelija je isprano u puferu za FACS (PBS sa 1 % BSA i 0,05 % NaN₃) centrifugiranjem na 1500 rpm, 10 minuta na 6°C. Za blokiranje Fcγ receptora korišćen je Fc blokator (BD Biosciences, Stockholm, Sweden), protiv pacovskog Fcγ receptora, u trajanju od 30 minuta na 4°C. Nakon ovog koraka, sledilo je još jedno ispiranje u puferu za FACS. Ćelije su potom inkubirane sa antitelima protiv površinskih markera, u trajanju od 30 minuta na 4 °C. Korišćena su sledeća monoklonska antitela: anti-MHC II (1:50), anti-CD54 (ICAM-1) (1:25) i FITC obeleženo anti-CD86 (1:5) (Abcam PLC, Cambridge, UK). Ćelije inkubirane sa neobebeženim antitelima su nakon toga inkubirane sa sekundarnim antitelom, tj. anti-pacov IgG obebeženim sa FITCom (INEP, Beograd), u trajanju od 30 minuta na 4 °C. Mišje antitelo za pacovski CD4 (IgG2a) pacova, obeleženo sa fikoeritriinom, PE

(Phycoerythrin, BD, Biosciences, USA) korišćeno je kao izotipska kontrola. Nakon svake inkubacije sa antitelima, sledilo je ispiranje u puferu za FACS, a nakon poslednjeg ispiranja ćelije su fiksirane u puferu za FACS koji sadrži 1 % formaldehida i čuvane su na 4 °C do FACS analize. Analiza fenotipa DĆ vršena je na aparatu EPICS XL-MCL (Coulter, Krefeld, Germany), korišćenjem odgovarajućeg softvera - SYSTEM II Software (Coulter) i rezultati su analizirani korišćenjem FlowJo software.

3.10. *In vivo* primena nativnih i perjodatom tretiranih ESL1 produkata i analiza imunskog odgovora

Životinje su podeljene u 4 grupe (5 životinja/grupi): dve eksperimentalne i 2 kontrolne. Glikozilovani (nativni) ESL1 produkti (250 µg u 1 ml), perjodatom tretirani ESL1 produkti (pESL1) (250 µg u 1 ml), mokESL1 (250 µg u 1 ml) i PBS (1 ml) su intraperitonealno primenjeni DA pacovima dva puta, u sedmodnevnom intervalu. Polarizacija imunskog odgovora pod uticajem primenjenih antigena je ispitana na nivou ćelija slezine izolovane prvog, trećeg i sedmog dana, nakon poslednje primene antigena i na nivou peritonealnih makrofaga izolovanih trećeg dana, nakon druge primene antigena životinjama. Praćena je produkcija citokina od strane ćelija slezine restimulisanih u kulturi ESL1 (specifični stimulus) ELISA testom i aktivacija gena za citokine metodom real-time PCRa. Takođe, merena je produkcija citokina i azot monoksida (NO) od strane makrofaga.

3.11. Izolovanje slezine iz pacova imunizovanih nativnim i perjodatom tretiranim ESL1 antigenima *T. spiralis*

Slezine su aseptično izolovane iz sve četiri grupe DA pacova imunizovanih antigenima *T. spiralis* ili PBS-om i potom je suspenzija ćelija dobijena na prethodno opisan način (odjeljak 3.7). Za ispitivanje ekspresije gena za citokine, suspenzija ćelija (5×10^6 ćelija) je centrifugirana na 5000 obrtaja, 3 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odličen, talog je resuspendovan sa 400 µl TRI rastvora (TRI Reagent Solution, Ambion, Applied Biosystems) i uzorci su čuvani na -80°C do izolovanja RNK.

Takođe, u cilju ispitivanja produkcije citokina, 2×10^6 ćel/ml je postavljeno u otvore ploča sa 24 mesta i ćelije su bile restimulisane ESL1 (50 µg/mL), ConA (2,5 µg/mL) ili bile kultivisane samo u medijumu. Kultivacija ćelija je trajala 48 h i nakon toga supernatanti su skupljeni i izmerena je produkcija citokina.

3.12. Izolovanje RNK

RNK je izolovana iz uzoraka mononuklearnih ćelija resuspendovanih u TRI reagensu (videti prethodni odeljak) prema uputstvu proizvođača. Ovaj reagens je rastvor guanin-izotiocijanata i fenola koji efikasno izoluju ukupnu RNK iz ćelija. Uzorci su prvo otopljeni, intenzivno vorteksovani, stavljeni na led i nakon toga je na uzorke naliveno 80 µl hloroforma. Uzorci su ponovo vorteksovani, centrifugirani na 12000 rpm u trajanju od 15 minuta na +4 °C. Centrifugiranjem su se izdvojile tri faze: donja faza (u kojoj su se nalazili proteini), vodena faza (u kojoj se nalazila RNK), a između je bio prsten sa DNK. Vodena faza je pažljivo skupljena pomoću pipete i nastavka i prebačena u novu ependorficu. Zatim je dodat izopropanol (280 µl) u ependorfice, da bi RNK precipitirala. Uzorci su pažljivo promućkani invertovanjem ependorfica, ostavljeni na ledu 30 minuta i zatim ponovo centrifugirani na 12000 rpm u trajanju od 15 minuta na +4 °C. Supernatant je odliven, a dobijeni talog RNK je resuspendovan sa 1 ml 70 % etanola. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 12000 rpm, na +4 °C, 7 minuta, etanol je odliven u jednom potezu i obod je malo obrisan filter papirom. Na taloge je ponovo naliven 1 ml 70 % etanola, uzorci su centrifugirani i etanol je odliven kao u prethodnom koraku. Talog RNK (koji se video kao želatinozna masa koja polako nestaje) je ostavljen na sobnoj temperaturi nekoliko minuta da se osuši i da sav etanol ispari. Potom je RNK rastvorena u 20 µl dejonizovane vode tretirane DEPCom (Diethylpyrocarbonate, Sigma-Aldrich). Kvalitet dobijene RNK je proveren na agaroznom gelu, izmerena je njena koncentracija na spektrofotometru (The Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer) i čuvana na -80 °C do korišćenja.

3.13. Reverzna transkripcija

Dobijena RNK je prevedena u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT). Ukratko, 1 μ l 10 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP) (GeneAmp dNTPs, Applied Biosystems), 1 μ l nasumičnih heksamernih prajmera (0,2 μ g/ml) (Random hexamer primer, Thermo scientific) i 13 μ l izolovane RNK (1 μ g/ μ l) u vodenom rastvoru je naliveno u PCR tubice. Uzorci su inkubirani na 70 °C u trajanju od 5 minuta, što je omogućilo nasumično vezivanje prajmera za RNK i zatim je reakcija prekinuta prebacivanjem tubica na led. Nakon toga, u uzorke je dodato 4 μ l pufera za reverznu transkripciju (5x reaction buffer, Thermo scientific), 1 μ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (Thermo Scientific RevertAid reverse transcriptase) i 0,5 μ l inhibitora RNKaze (Thermo Scientific RiboLock Rnase Inhibitor, 40u/ μ l). Uzorci su preneti u termoblok aparata za PCR (Agilent Technologies) i ukupna RNK je prevedena u cDNK pri sledećim uslovima: 15 min na 25 °C, 1 h na 42 °C (temperaturi optimalnoj za rad reverzne transkriptaze), 15 min na 70 °C (temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze i prekidanja reakcije) i 2 min 95°C u cilju razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK. Koncentracija sintetisane cDNK određena je na nano-drop aparatu (The Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer) i zatim je čuvana na -20 °C do dalje upotrebe.

3.14. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Za amplifikaciju dobijene cDNK i analizu ekspresije gena od interesa korišćena je reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-PCR). Ova metoda omogućuje detekciju i kvantifikaciju umnoženog segmenta DNK u realnom vremenu tj. u toku amplifikacije uzorka (Higuchi i drugi, 1993). U svaki bunarić mikroploče sa 96 mesta (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) je dodato 10 μ l reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), (smeša sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim DNK polimeraza AmliTaq Gold i dNTP), 1 μ l specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je

500nM) za ispitivani gen ili za referentni gen (sekvence prajmera koji su korišćene prikazani su u Tabeli 4) i 8 µl 10 puta razblažene cDNK. Ploča je pokrivena sa optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD), centrifugirana 2 minuta na 1000 g, preneti u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD).

Tabela 4. Sekvence prajmera (Metabion, Martinsried, Nemačka) koje su korišćene u Real-time PCR-u.

Gen	Oligonukleotidne sekvence
β-actin	5'-GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT-3' 5'-CCA GCG CAG CGA TAT CG-3'
IL-4	5'-CGG TGA ACT GAG GAA ACT CTG TAG A-3' 5'-TCA GTG TTG TGA GCG TGG ACT C-3'
IL-10	5'-GAA GAC CCT CTG GAT ACA GCT GC-3' 5'-TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT-3'
IFN-γ	5'-TGG CAT AGA TGT GGA AGA AAA GAG-3' 5'-TGC AGG ATT TTC ATG TCA CCA T-3'
TGF-β	5'-CCCTGCCCTACATTTGGA-3' 5'-CACGAAGGCGTAGTGGCA-3'

Uslovi PCR amplifikacije bili su sledeći: aktivacija dUTP (50 °C, 5 minuta), početna denaturacija (95 °C, 10 minuta) i 40 ciklusa umnožavanja cDNK. Svaki ciklus sastojao se iz denaturacije (95 °C, 15 sekundi) i hibridizacije prajmera za lanac cDNK i sinteze novog lanca cDNK (60 °C, 60 sekundi). Dobijeni rezultati su analizirani korišćenjem odgovarajućeg kompjuterskog programa (7500 System software; Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD).

3.15. Izolovanje makrofaga iz pacova imunizovanih antigenima *T. spiralis*

Peritonealni makrofagi su izolovani iz sve četiri grupe DA pacova kojima su primenjeni ESL1, pESL1, mokESL1 i PBS, prema ranije opisanoj proceduri (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2006). Ukratko, peritoneum je ispran sa po 20 ml hladnog, sterilnog PBS-a. Peritonealni eksudat je pokupljen i centrifugiran na 1500 rpm, 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odliven, a talog resuspendovan u medijumu (RPMI-1640 suplementiran sa 5 % FCS) i zatim je određen ukupan broj ćelija i njihova vijabilnost. Da bi se obezbedila što homogenija ćelijska populacija, ćelije su zatim kultivisane u petrijevim šoljama u medijumu (RPMI-1640 suplementiran sa 5 % inaktiviranim FCS i 50 U/mL gentamicinom) 24 h na 37 °C, 5 % CO₂. Posle inkubacije, neadherentne ćelije su uklonjene ispiranjem petrijeve šolje i potom su adherentne ćelije (makrofagi) odlepljene sa površine petrijeve šolje delovanjem 10 ml hladnog PBS i resuspendovane u medijumu. Nakon toga, makrofagi su centrifugirani 7 minuta na 1500 rpm, talog je resuspendovan u medijumu i određen je ukupan broj ćelija. Ćelije su potom bile postavljene u pločama sa 24 mesta (5 x 10⁵ ćelija/otvoru), restimulisane ESL1 (50 µg/mL) ili kultivisane samo u medijumu. Kultivacija ćelija je trajala 48 h i nakon toga supernatanti su skupljeni i izmerena je produkcija citokina i azot monoksida (NO).

3.16. Određivanje nivoa nitrita Griessov-om metodom

Produkcija azot monoksida od strane makrofaga u kulturi određivana je merenjem koncentracije neorganskog nitrita (NO²⁻), stabilnog krajnjeg produkta oksidacije kratkoživećeg NO, u reakciji sa Griess-ovim reagensom (Griess, 1879). Ovaj reagens čine sulfonilamid (SA) i N-(1-Naftil etilendiamin) (NAD) u odnosu 1:1. U ovoj metodi, nitriti u prisustvu SA, u uslovima kisele sredine, formiraju prelaznu diazonijum so, koja zatim reaguje sa NAD i formira stabilno azo jedinjenje ljubičaste boje (Sun i drugi, 2003). 50 µl supernatanta kulture makrofaga je pomešano sa 50 µl Griessovog reagensa, i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena pomoću ELISA čitača, na talasnoj dužini 540 nm. Kvantifikacija nitrita je određivana pomoću

standardne krive konstruisane korišćenjem poznatih koncentracija natrijum-nitrita (NaNO₂).

3.17. Restimulacija T limfocita izolovanih iz *T. spiralis* inficiranih DA pacova antigenima *T. spiralis* - Recall eksperiment

Slezine su izolovane iz DA pacova inficiranih *T. spiralis* (30 dana posle infekcije izazvane peroralnom primenom 500 L1 larvi/pacovu) na način prethodno opisan (videti odeljak 3.7.). Izolovane ćelije slezine (5×10^5 ćelija/otvoru, u triplicatu) su kultivisane antigenima ESL1 (50 µg/ml), pESL1 (50 µg/ml), rTsp53 (10 µg/ml) i 7C2C5Ag (10 µg/ml) ili samo u medijumu 48 h. Nakon inkubacije, određena je koncentracija citokina u supernatantima i proliferativni odgovor ćelija.

3.18. Određivanje koncentracije citokina primenom ELISA testa

Citokinski profili DĆ, makrofaga i T limfocita i ćelija slezine su određeni u supernatantima ovih kultura metodom enzimskog imunoeseja ELISA, koristeći komercijalne kit testove prema uputstvima proizvođača.

Za određivanje koncentracije IL-12p70 korišćen je Rat IL-12p70 CytoSet-a (Invitrogen, USA).

Za određivanje koncentracije IL-4, IL-10 i IFN- γ korišćeni su BD OptEIA Set Rat kitovi (BD Biosciences, USA).

Za određivanje koncentracije TGF- β korišćen je ELISA komplet za pacovski TGF- β 1 (R&D Systems, USA).

Za određivanje koncentracije IL-6 korišćen je Rat IL-6 ELISA kit (Quantikine M, R&D Systems, UK).

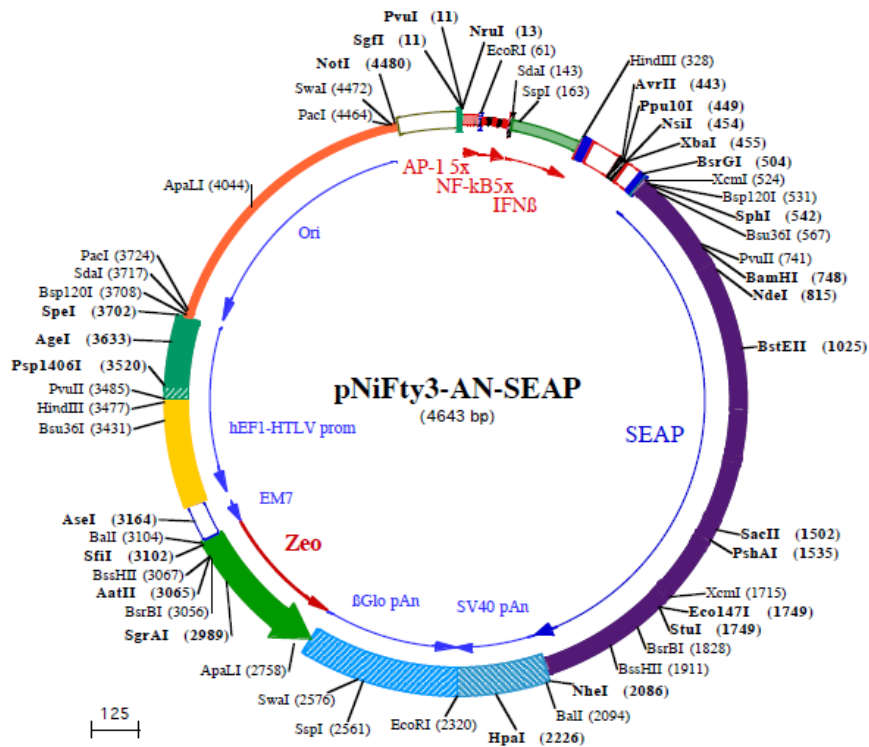
3.19. Stimulacija HEK-Blue™ ćelijskih linija antigenima parazita

U ispitivanju interakcije ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag i PRR, korišćene su HEK-Blue™ hTLR2, HEK-Blue™ hTLR3, HEK-Blue™ hTLR4, HEK-Blue™ hTLR5, HEK-Blue™ hTLR7, HEK-Blue™ hNOD1 i HEK-Blue™ hNOD2 ćelije. 25.000 ćelija u 150 µl medijuma je postavljeno po bazenu u pločama sa 96 mesta (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) i nakon toga ćelije su stimulisane antigenima *T. spiralis*: ESL1 (50, 5 i 0,05 µg/ml), pESL1 (50, 5 i 0,05 µg/ml) i 7C2C5Ag (1, 0,1 i 0,01 µg/ml) u trajanju od 22-24 sata na 37 °C u prisustvu 5 % CO₂. Ćelije inkubirane samo u medijumu korišćene su kao negativna kontrola. Kao pozitivne kontrole, korišćene su ćelije stimulisane sledećim PRR agonistima: TLR2 ligand, Pam3CSK4 (Invivogen; tlr1-pm2s) (10 ng/ml); TLR3 ligand, Poly (I:C) HMV (Invivogen; tlr1-pic) (1 µg/ml); TLR4 ligand, LPS *E. coli* K12 (Invivogen; tlr1-pek1ps) (1 ng/ml); TLR5 ligand, FLA-ST (flagelin poreklom iz bakterije *Salmonella typhimurium* Invivogen; tlr1-stfla) (50 ng/ml); TLR7 ligand, Imiquimod (Invivogen; tlr1-kit1hw) (10 µg/ml); NOD1 ligand, iE-DAP (Invivogen; tlr1-dap) (25 µg/ml) i NOD2 ligand, MDP (Invivogen; tlr1-mdp) (10 µg/ml).

3.20. SEAP reporter genski test (engl. SEAP reporter gene assay)

Nakon stimulacija HEK-Blue™ ćelijskih linija, interakcije PRR i antigena *T. spiralis* su određene na osnovu merenja alkalne fosfataze SEAP. S obzirom da se SEAP gen nalazi pod kontrolom IFN-β minimalnog promotora i transkripcionih faktora: NF-κB i AP-1 (slika 11), stimulacija ćelija PRR agonistima pokreće intraćelijsku signalnu kaskadu koja vodi aktivaciji transkripcionih faktora NF-κB i AP-1, ekspresiji SEAP gena i produkciji ove alkalne fosfataze u ćelijskoj kulturi.

SEAP koncentracija može se izmeriti korišćenjem QUANTI-Blue™ detekcionog medijuma (InvivoGen, rep-qb1 or rep qb2). Ovaj medijum sadrži supstrat za alkalne fosfataze uključujući SEAP. U prisustvu SEAP, dolazi do hidrolize supstrata što vodi promeni boje medijuma u ljubičasto-plavu. Promena boje je proporcionalna SEAP koncentraciji u supernatatu i može se kvantifikovati merenjem absorbance na 620-655nm.



Slika 11. Mapa pNiFty3-AN-SEAP plazmida (InvivoGen, California, USA). pNiFty3-AN-SEAP plazmid koji sadrži reporter gena za alkalnu fosfatazu SEAP (engl. secreted alkaline phosphatase), IFN- β minimalnog promotora miša, pet NF- κ B i AP-1 vezujućih mesta.

Za eksperimente, alkalna fosfataza SEAP u ćelijskoj kulturi je određena prema uputstvu proizvođača. Ukratko, QUANTI-Blue™ medijum u prahu rastvoren je u 100ml destilovane vode (HyClone™ Water, Cell Culture Grade-Endotoxin-Free), inkubiran 30 minuta na 37 °C i filtriran preko membrane sa otvorima prečnika 0,2 μ m. Nakon toga, 180 μ l medijuma i 20 μ l supernatanta stimuliranih ćelija je postavljeno po bazenu u pločama sa 96 mesta. Nakon 4 i 24 časa, merena je absorbanca na 649 nm na BioTek EL808 ELISA čitaču i SEAP koncentracija je izračunata korišćenjem Gen5 Data Analysis Software (BioTek, Vermont, USA).

3.21. Statistička obrada podataka

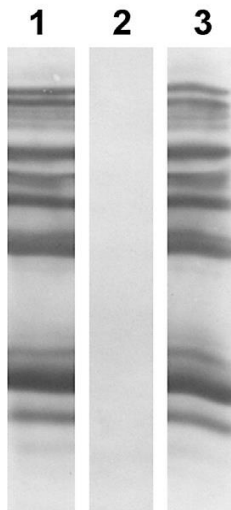
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) triplikata kultura dva ili tri nezavisno izvedena eksperimenta. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Bonferroni testom za višestruka poređenja (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4.REZULTATI

4.1. Ispitivanje uticaja ESL1 produkata na polarizaciju imunskog odgovora *in vivo*

4.1.1. Modifikacija ugljenohidratne strukture ESL1 produkata *T. spiralis*

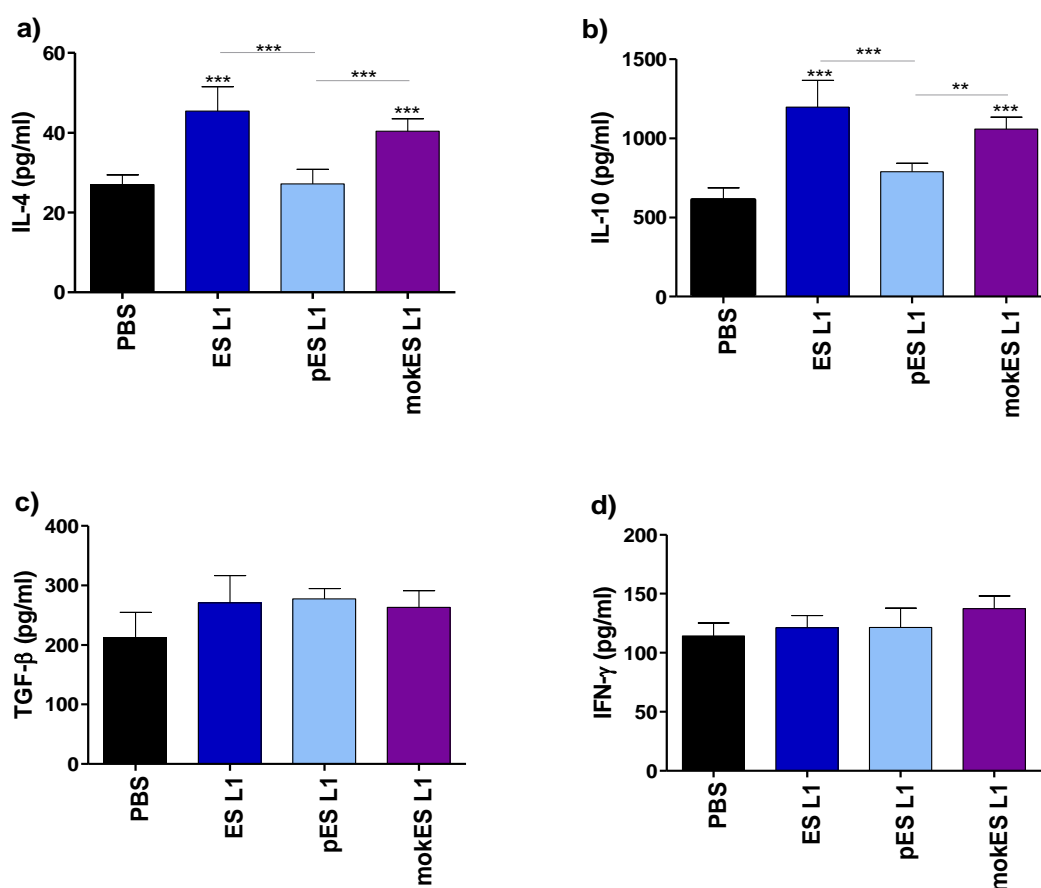
Da bi se ispitala uloga glikana ESL1 u indukovanju imunskog odgovora *in vivo*, u eksperimentima je korišćen ESL1 sa hemijski izmenjenom ugljenohidratnom strukturom, dobijen tretmanom natrijum metaperjodatom (pESL1). Western blot analizom dobijenog preparata, korišćenjem ConA obeleženog peroksidazom (ConA-HRPO), pokazano je da u sastavu dobijenog pESL1 nema šećera u onom obliku koji bi ovaj lektin prepoznao, čime je potvrđena uspešnost perjodatnog tretmana (slika 12). Za kontrolu efekta pESL1 antigena korišćen je mokESL1 (dobijen na isti način kao i pESL1 antigen tj. u acetatnom puferu ali bez perjodata). Kao što se sa slike 12 (traka 3) vidi, sam tretman acetatnim puferom nije narušio strukturu ESL1 antigena.



**Slika 12. Vezivanje ConA-HRPO za komponente:
ESL1 (1), pESL1 (2) i mokESL1 (3).**

4.1.2. Uticaj glikana ESL1 antigena na produkciju citokina od strane ćelija slezine

Nativni ESL1 antigeni, pESL1 i mokESL1 su intraperitonealno primenjeni zdravim DA pacovima i njihov uticaj na polarizaciju imunskog odgovora ispitan je na nivou ćelija slezine. Kao kontrolna grupa korišćeni su pacovi kojima je intraperitonealno primenjen PBS. Nakon sedam dana od primene antigena, ćelije slezine su izolovane, postavljene u mikrotitarske ploče i *in vitro* su restimulisane ESL1 antigenom (specifični stimulus). U supernatantima u kojima su ćelije gajene praćena je produkcija IL-4, IL-10, TGF- β i IFN- γ .

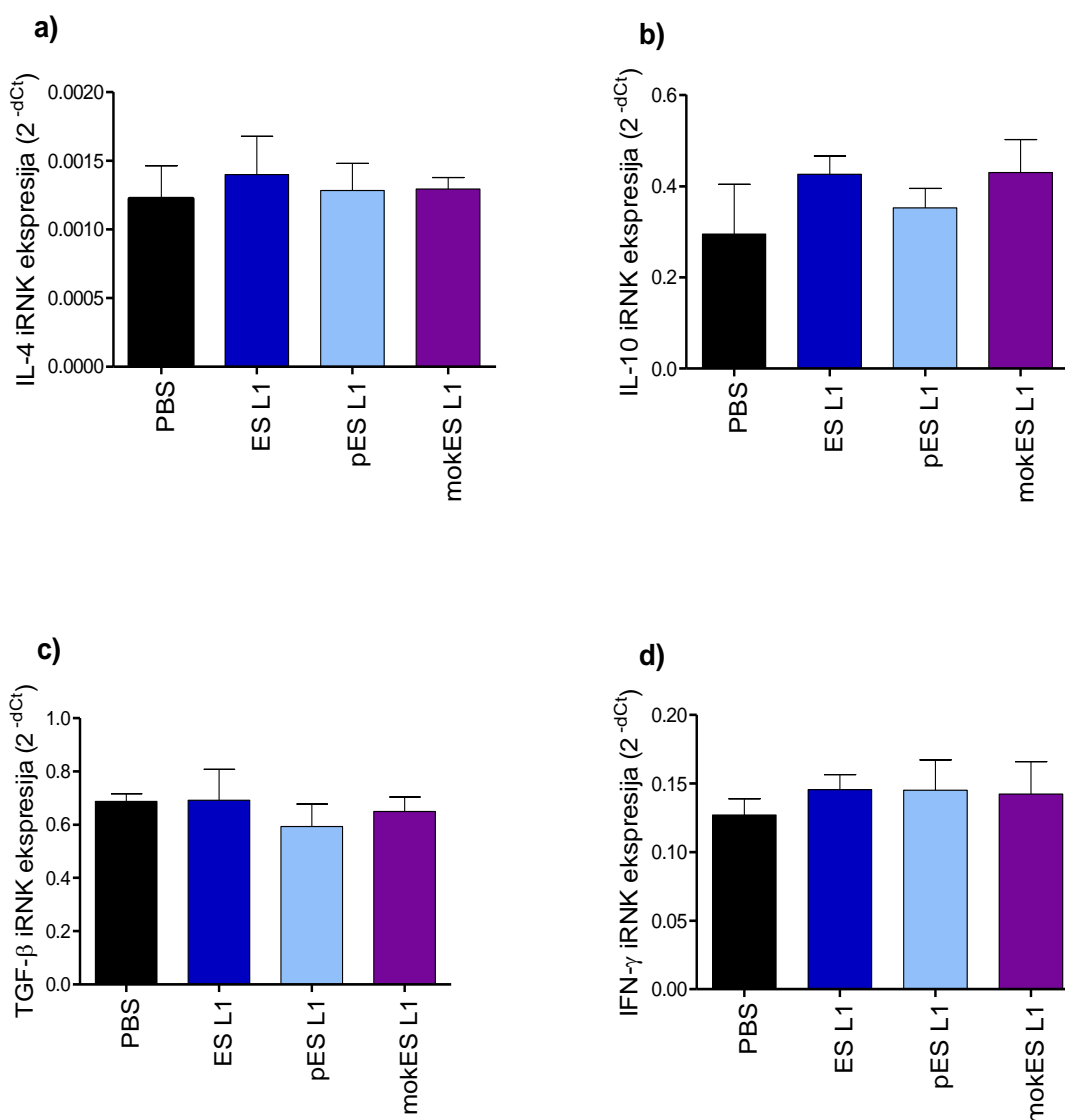


Grafik 1. Uticaj glikana ESL1 antigena na produkciju citokina ćelija slezine. ESL1, pESL1, mokESL1 ili PBS su intraperitonealno primenjeni DA pacovima. Posle sedam dana od finalne primene, ćelije slezine su izolovane, kultivisane 48 sati u prisustvu ESL1 i nivo IL-4 (a), IL-10 (b), TGF- β (c) i IFN- γ (d) je određen u ćelijskim supernatantima ELISA testovima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisno izvedena eksperimenta; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

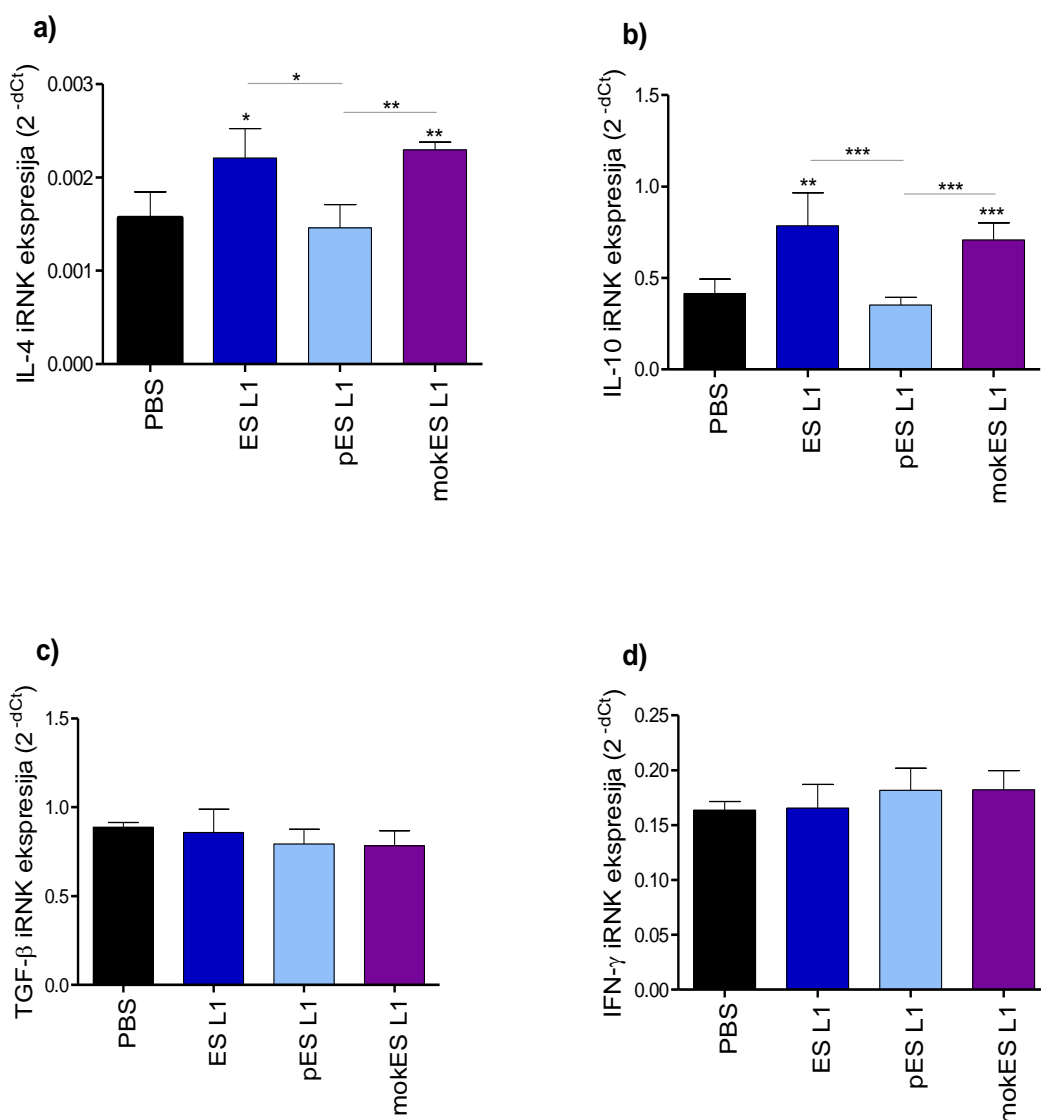
Primena ESL1 antigena indukovala je snažnu produkciju IL-4 i IL-10, dok je produkcija TGF- β bila neznatno uvećana u poređenju sa kontrolom (grafik 1 a,b,c). Intraperitonealna primena ESL1 nije dovela do promene u produkciji IFN- γ u poređenju sa ćelijama slezine životinja tretiranih PBSom (grafik 1 d). Međutim, promena u strukturi ESL1 glikana dovela je do značajne promene u produkciji anti-inflamatornih i Th2 citokina, što ukazuje na značaj očuvane ugljenohidratne strukture za ovaj tip polarizacije imunskog odgovora. Naime, ćelije slezine pacova tretiranih pESL1, a restimulisane ESL1 antigenom, produkovale su statistički značajno manji nivo IL-4 i IL-10 u poređenju sa ćelijama slezine pacova kojima je primenjen nativni ESL1 ili mokESL1 antigen (grafik 1 a i b). Izmena ugljenohidratne strukture ESL1 nije dovela do promene u produkciji regulatornog citokina TGF- β i pro-inflamatornog citokina IFN- γ u poređenju sa ESL1 i mokESL1 (grafik 1 c i d).

4.1.3. Uticaj glikana ESL1 antigena na ekspresiju gena za citokine u ćelijama slezine

Dalja ispitivanja značaja ugljenohidratnih struktura ESL1 za indukciju citokina obuhvatala su detekciju i kvantifikaciju ekspresije gena za niz citokina u ćelijama slezine zdravih DA pacova, 24 i 72 sata nakon intraperitonealne primene ESL1, pESL1 i mokESL1 antigena. Kao kontrolna grupa korišćeni su pacovi kojima je intraperitonealno primenjen PBS. Nakon 24 sata, nije primećena razlika u nivou iRNK za IL-4, IL-10, TGF- β i IFN- γ između ćelija slezine pacova imunizovanih antigenima i kontrolne grupe pacova (grafik 2). Međutim, nakon 72 sata ustanovljena je značajno veća ekspresija gena za IL-4 i IL-10 kod životinja koje su primile ESL1 i mokESL1, u odnosu na pacove koji su primili PBS (grafik 3 a i b). Primena pESL1 nije izazvala povećanu transkripciju gena za IL-4 i IL-10, već je bila na nivou PBS kontrole, što ukazuje na važnost ugljenohidratnih struktura ESL1 produkata glikana za indukciju sinteze Th2 i anti-inflamatornih citokina. Nije uočena razlika u povećanju nivoa iRNK za TGF- β i IFN- γ između tretiranih i kontrolnih grupa (grafik 3 c i d).



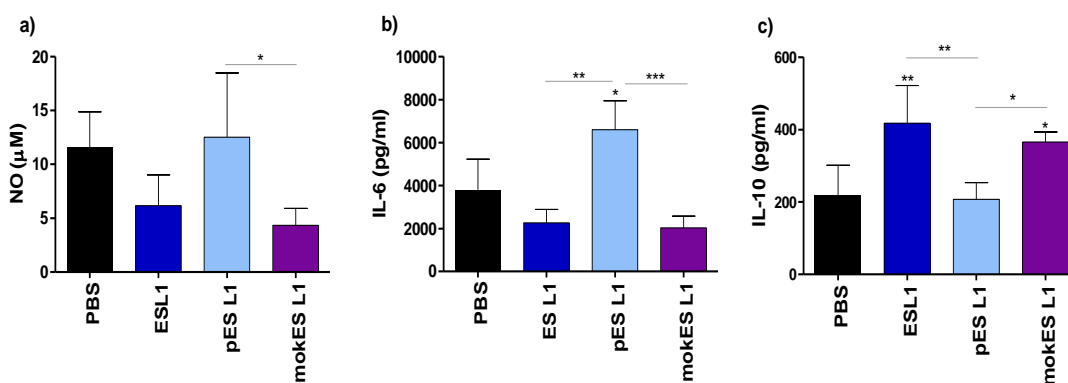
Grafik 2. Uticaj glikana ESL1 antigena na ekspresiju gena u ćelijama slezine. ESL1, pESL1, mokESL1 ili PBS su intraperitonealno primenjeni DA pacovima dva puta u sedmodnevnom intervalu. Nakon 24 sata od finalne aplikacije, ekspresija gena za IL-4 (a), IL-10 (b), TGF- β (c) i IFN- γ (d) je analizirana u ćelijama slezine. Nivo ekspresije ispitivanih gena je određen pomoću Real-time PCR-a, normalizovan u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao 2^{-dCt} . Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Grafik 3. Uticaj glikana ESL1 antigena na ekspresiju gena u ćelijama slezine. ESL1, pESL1, mokESL1 ili PBS su intraperitonealno primenjeni DA pacovima dva puta u sedmodnevnom intervalu. Nakon 72 sata od finalne primene, ekspresija gena za IL-4 (a), IL-10 (b), TGF- β (c) i IFN- γ (d) je analizirana u ćelijama slezine. Nivo ekspresije ispitivanih gena je određen pomoću Real-time PCR-a, normalizovan u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz dva nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.1.4. Ispitivanje značaja glikana ESL1 antigena za aktivaciju urođenog imunskog odgovora

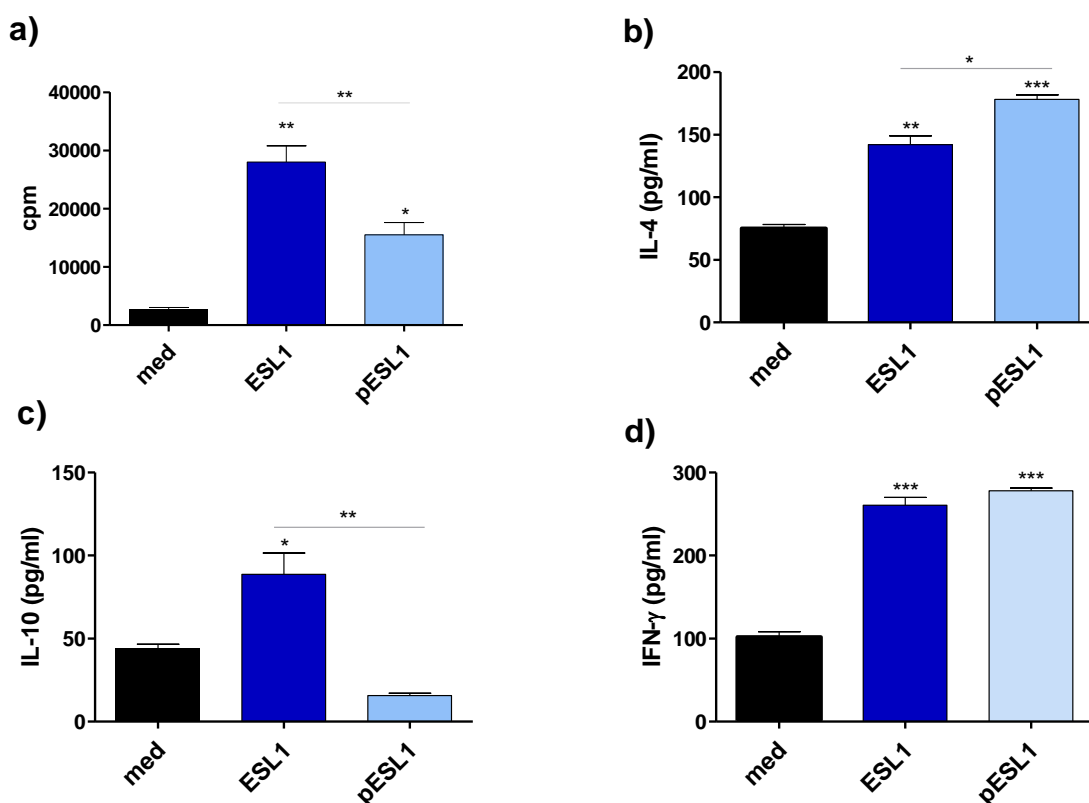
Moguća uloga glikana prisutnih u ESL1 produktima u pokretanju urođenog imunskog odgovora, ispitivana je praćenjem aktivacije peritonealnih makrofaga DA pacova koji su primili ESL1, pESL1, mokESL1 ili PBS. Nakon trećeg dana od poslednje primene, peritonealne makrofage su izolovane, kultivisane, restimulisane *in vitro* ESL1 antigenom i praćena je produkcija pro-inflamatornih medijatora NO i IL-6, kao i anti-inflamatornog citokina IL-10 u ćelijskim supernatantima. Peritonealne makrofage pacova, kojima je primenjen ESL1 antigen, pokazuju smanjenu produkciju NO i IL-6 i statistički značajno povećanu produkciju IL-10 u poređenju sa kontrolnom grupom (grafik 4). Sa druge strane, primena pESL1 indukuje značajno povećanje produkcije NO i IL-6, dok se produkcija IL-10 ne menja u odnosu na kontrolne životinje, što ukazuje da antigeni sa izmenjenom strukturom šećera mogu dovesti do dijametralno suprotnog odgovora u odnosu na ESL1 od strane aktiviranih makrofaga.



Grafik 4. Uticaj glikana ESL1 antigena na produkciju citokina i NO u peritonealnim makrofagima. ESL1, pESL1, mokESL1 ili PBS su intraperitonealno primenjeni DA pacovima dva puta u sedmodnevnom intervalu. 72 sata nakon finalne primene, peritonealne makrofage su izolovane i kultivisane 48 sati sa ESL1. Produkcija NO (a) i citokina IL-6 (b) i IL-10 (c) je određena u ćelijskim supernatantima. Citokinski nivoi su mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova, dok je nivo NO određen Griessov-om metodom. Rezultati su predstavljani iz dva nezavisno izvedena eksperimenta kao srednja vrednost \pm SD; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

4.1.5. Proliferacija i citokinski profil *T. spiralis* senzibilisanih ćelija slezine restimulisanih antigenima *T. spiralis*

Da bi dalje ispitali značaj glikana ESL1 produkata u polarizaciji odgovora T ćelija tokom infekcije *T. spiralis*, izolovane su ćelije slezine DA pacova, koji su bili u hroničnoj fazi infekcije (faza infekcije u kojoj dominira Th2/regulatorni tip imunskog odgovora). Na ovaj način *T. spiralis* senzibilisane ćelije slezine su kultivisane u prisustvu ESL1 i pESL1, a zatim je određivana proliferacija ovih ćelija i nivo produkovanih citokina od strane tako restimulisanih ćelija.

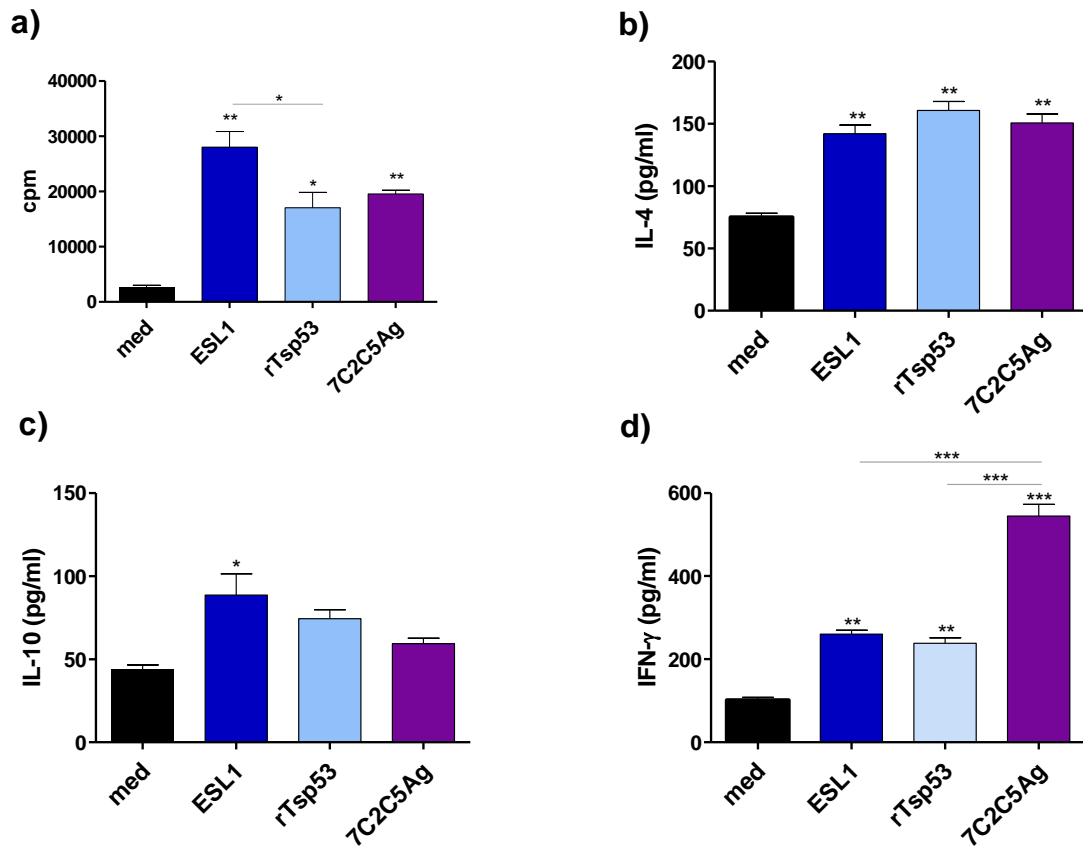


Grafik 5. Proliferativni odgovor i produkcija citokina restimulisanih ćelija slezine pacova inficiranih parazitom *T. spiralis*. DA pacovi su inficirani *T. spiralis* i 30 dana posle infekcije izolovane su ćelije slezine. Ćelije su kultivisane (5×10^5 ćelija/otvoru) bez i sa antigenima ESL1 i pESL1. Nakon 48 sati, određen je proliferativni odgovor ćelija (a) i koncentracija citokina u supernatantima (IL-4, IL-10 i IFN- γ) (b-d). Proliferativni odgovor ćelija je izmeren na osnovu ugradnje ^3H -timidina i izražen kao broj otkućaja na minut (cpm), dok su citokinski nivoi mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Kao što je prikazano na grafiku 5 a, ESL1 i pESL1 indukuju snažnu proliferaciju ćelija slezine pacova inficiranih *T. spiralis*, u poređenju sa kontrolnom grupom tj. slezinskim ćelijama gajenim samo u medijumu. Međutim, proliferativni odgovor ćelija na pESL1 je bio statistički značajno slabiji u poređenju sa odgovorom ćelija na ESL1. Analiza produkcije citokina je pokazala da ćelije restimulisane ESL1 antigenom produkuju statistički značajno veću koncentraciju IL-4, IL-10 i IFN- γ u odnosu na kontrolne ćelije (ćelije kultivisane samo u medijumu) (grafik 5 b-d). Restimulacija senzibilisanih ćelija pESL1 izazvala je supresiju produkcije IL-10 u odnosu na kontrole, a još više u odnosu na nativni ESL1, dok je produkcija IL-4 bila je značajno povećana ne samo u odnosu na kontrole, već i u poređenju sa ćelijama stimulisanim ESL1 antigenom. Oslobođanje pro-inflamatornog citokina IFN- γ bilo je visoko i na sličnom nivou koji je indukovao nativni ESL1.

Ranija istraživanja su pokazala da ESL1 poseduje imunomodulatorna svojstva, ali se malo zna o pojedinačnim komponentama u okviru ESL1 koje ta svojstva poseduju. Za ispitivanje uticaja pojedinih komponenti ESL1 na pokretanje imunskog odgovora, u testu restimulacije *T. spiralis* senzibilisanih ćelija slezine korišćeni su: 1. triplet antigena od 45, 49 i 53 kDa izolovan pomoću 7C2C5 monoklonskog antitela (7C2C5Ag) i 2. rekombinantni protein od 53 kDa (rTsp53). Pod uticajem rTsp53 i 7C2C5Ag proliferativni odgovor ćelija slezine je bio značajno veći u odnosu na kontrolne ćelije, ali slabiji u odnosu na odgovor indukovan kompletnim ESL1 antigenima (grafik 6 a).

Analiza citokinskog profila je pokazala da ćelije slezine *T. spiralis* inficiranih DA pacova, nakon restimulacije ESL1 antigenom, produkuju značajno veće koncentracije IL-4, IL-10 i IFN- γ u odnosu na kontrolne ćelije (grafik 6 b, c i d). Ćelije restimulisane rTsp53 i 7C2C5Ag produkuju značajno veće koncentracije IL-4 u odnosu na kontrolu, a nivo produkcije je veoma sličan onom koji se javlja posle restimulacije ESL1 (grafik 6b). Iako i rTsp53 i 7C2C5Ag dovode do povećanja koncentracije IL-10 u odnosu na kontrolu, taj porast nije statistički značajan (grafik 6 c). Merenjem produkcije IFN- γ od strane ćelija slezine, nađeno je da i rTsp53, a posebno 7C2C5Ag indukuju značajno veću produkciju citokina IFN- γ u odnosu na kontrolnu grupu i na ESL1 (grafik 6 d).



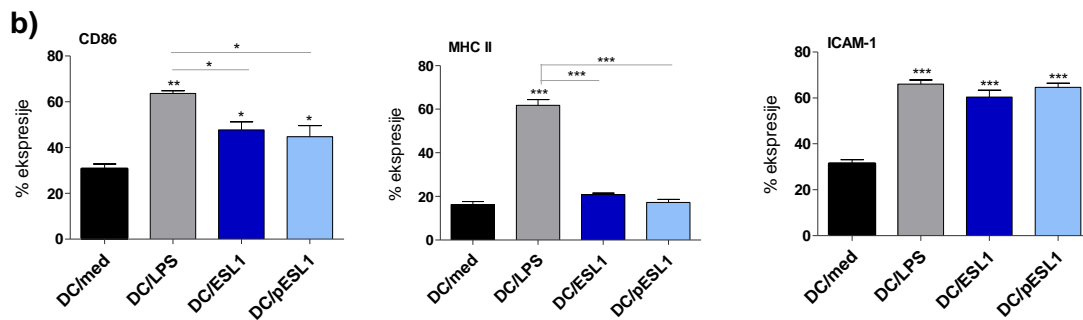
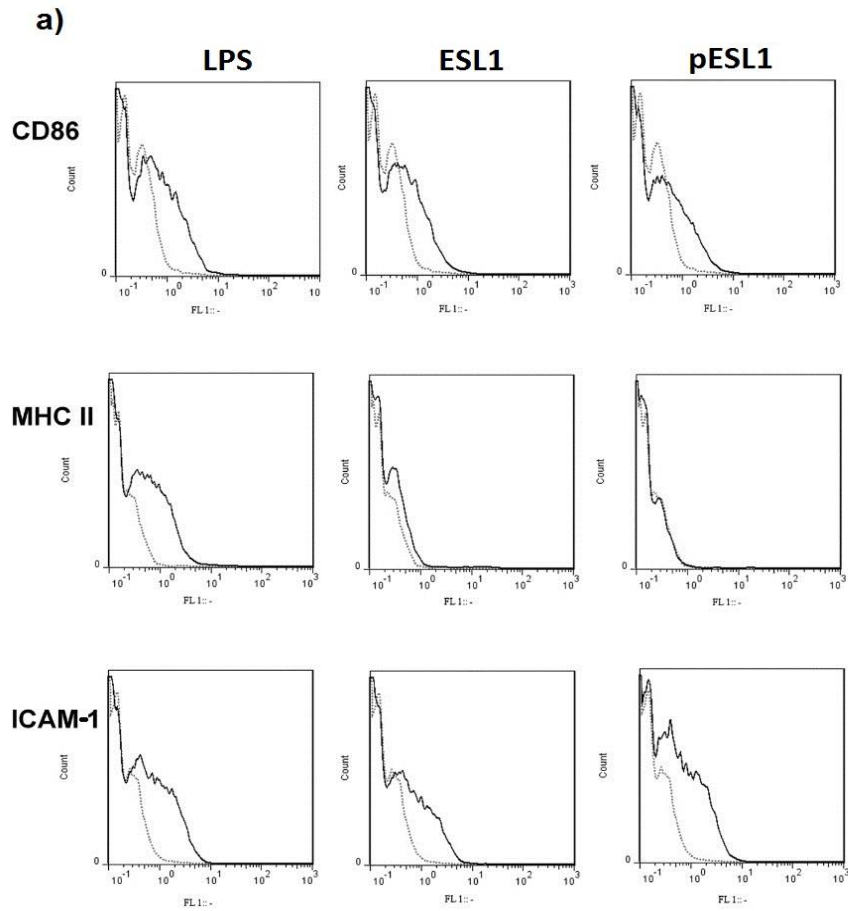
Grafik 6. Proliferativni odgovor i produkcija citokina ćelija slezine restimuliranih rTsp53 i 7C2C5Ag. Ćelije slezine su izolovane 30 dana nakon infekcije DA pacova *T. spiralis*. Ćelije su kultivisane (5×10^5 ćelija/otvoru) ESL1, rTsp53, 7C2C5Ag ili samo u medijumu. Nakon 48 sati, određen je proliferativni odgovor ćelija (a) i koncentracija citokina u supernatantima (IL-4, IL-10 i IFN- γ) (b-d). Proliferativni odgovor ćelija je izmeren na osnovu ugradnje ^3H -timidina i izražen kao broj otkucaja na minut (cpm), dok su citokinski nivoi mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2. Ispitivanje uloge glikana ESL1 i pojedinih komponenti ESL1 u pokretanju imunskog odgovora *in vitro*

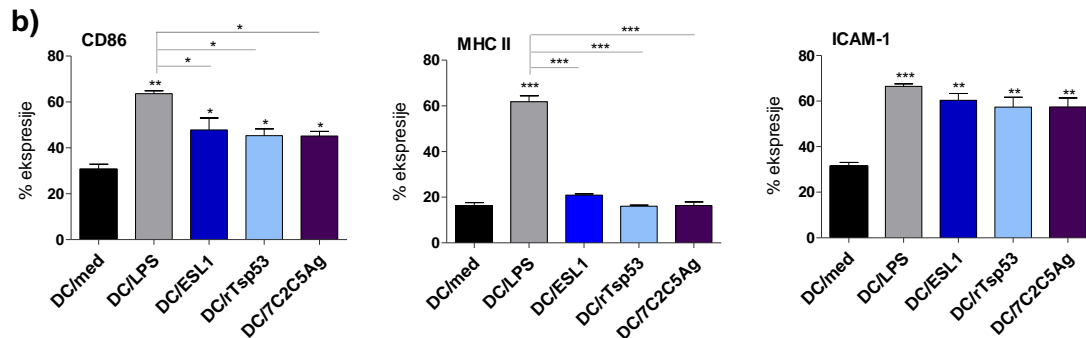
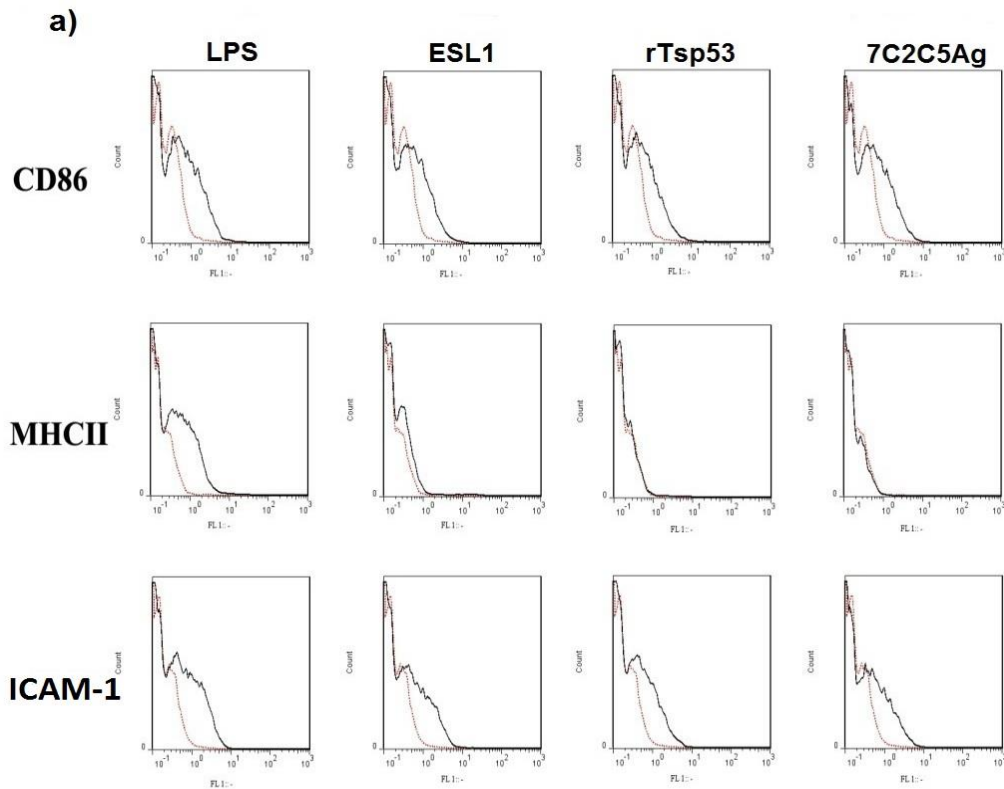
4.2.1. Uticaj ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53 antigena na sazrevanje dendritskih ćelija

S obzirom da su naši prethodni rezultati pokazali da ESL1 ali ne i pESL1 antigeni indukuju Th2 imunski odgovor, postavilo se pitanje na koje mehanizme imunskog odgovora utiču ugljenohidratne komponente nativnog ESL1. Da bi ispitali da li ima razlike u sazrevanju dendritskih ćelija (DĆ) stimuliranih ESL1 i pESL1, ćelije su kultivisane LPSom (Th1 stimulus koji dovodi do potpunog sazrevanja DĆ, DĆ/LPS), antigenima *T. spiralis*: ESL1 i pESL1 (DĆ/ESL1 i DĆ/pESL1) ili samo u medijumu (DĆ/med) i analizirana je ekspresija površinskih markera i produkcija citokina. Kao pokazatelj stepena zrelosti DĆ, ispitivana je ekspresija markera MHC II, CD86 i ICAM-1. Ćelije stimulirane LPSom imale su fenotip karakterističan za zrele DĆ tj. pokazale su značajno veću ekspresiju svih ispitivanih površinskih markera u odnosu na kontrolu. U skladu sa već publikovanim rezultatima (Ilic i saradnici, 2008; Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011), ESL1 antigeni nisu uticali na povećanje ekspresije MHC II molekula, umereno su povećavali ekspresiju CD86 molekula, dok su značajno povećavali ekspresiju ICAM-1 u poređenju sa negativnom kontrolom tj. ekspresijom na nestimuliranim DĆ (grafik 7 a i b). Kao što se sa grafika 7 vidi, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji površinskih markera između DĆ stimuliranih sa ESL1 i pESL1, što ukazuje da narušavanje ugljenohidratne strukture nema uticaja na ovaj aspekt sazrevanja DĆ.

U cilju ispitivanja uloge pojedinačnih komponenti ESL1 u sazrevanju DĆ, DĆ DA pacova su gajene u prisustvu rTsp53 i 7C2C5Ag (DĆ/rTsp53 i DĆ/7C2C5Ag). Ćelije stimulirane rTsp53 i 7C2C5Ag pokazale su tipične morfološke karakteristike delimično zrelih DĆ. Ovi antigeni su izazvali značajno povećanje ekspresije ICAM-1 molekula, blago povećanje ekspresije CD86 i nisu indukovali povećanu ekspresiju markera MHC II u poređenju sa negativnom kontrolom (nestimuliranim DĆ), što je fenotipski profil koji odgovara stimulaciji kompletnim ESL1. Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji površinskih markera između DĆ stimuliranih ESL1 ili pojedinačnim komponentama ESL1 (7C2C5Ag i rTsp53) (grafik 8).



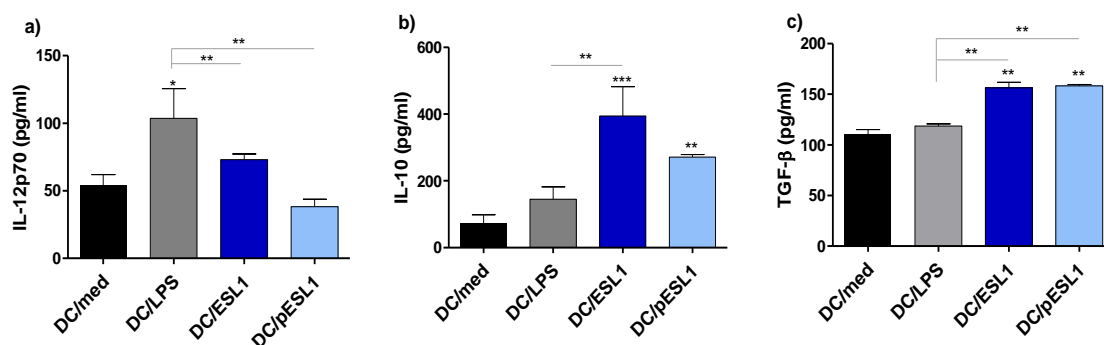
Grafik 7. Uticaj ESL1 i pESL1 antigena na ekspresiju površinskih markera dendritskih ćelija. DĆ kostne srži DA pacova, stimulisane su LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 i pESL1 antigenima (50 µg/ml) ili su kultivisane samo u medijumu (negativna kontrola), 48 sati. a) Reprerzentativni plotovi. Siva linija predstavlja negativnu kontrolu (ekspresija markera na netretiranim ćelijama), a crna predstavlja ekspresiju ispitivanih molekula na tretiranim DĆ. b) Procenat ekspresije površinskih markera stimulisanih i nestimulisanih DĆ. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



Grafik 8. Uticaj rTsp53 i 7C2C5Ag na ekspresiju površinskih markera dendritskih ćelija. DĆ kostne srži DA pacova, stimulisane su LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 antigenima (50 µg/ml), rTsp53 (10 µg/µl), 7C2C5Ag (10 µg/µl) ili su kultivisane samo u medijumu (negativna kontrola), 48 sati. a) Reprerentativni plotovi. Crvena linija predstavlja negativnu kontrolu (ekspresija markera na netretiranim ćelijama), a crna predstavlja ekspresiju ispitivanih molekula na tretiranim DĆ. b) Procenat ekspresije površinskih markera stimulisanih i nestimulisanih DĆ. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

4.2.2. Citokinski profil dendritskih ćelija stimuliranih antigenima: ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53

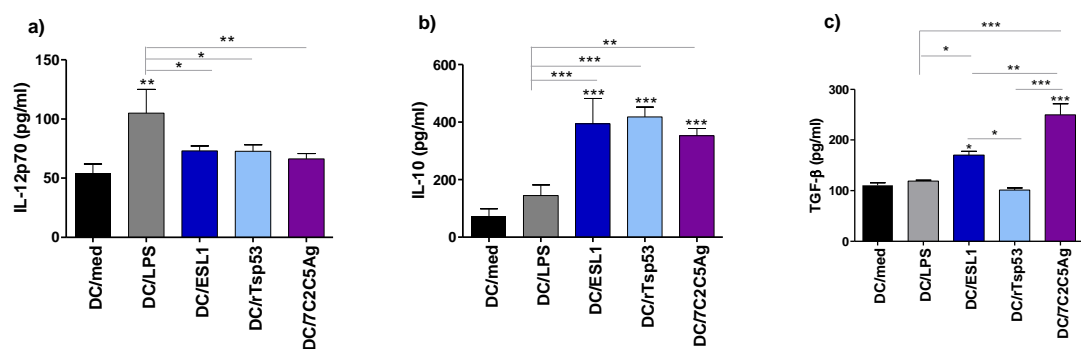
Funkcionalna karakterizacija DĆ poreklom od pacova stimuliranih antigenima *T. spiralis* u *in vitro* uslovima praćena je određivanjem koncentracije citokina u supernatantima kulture DĆ. Praćena je produkcija IL-10, koji učestvuje u usmeravanju u pravcu Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora, TGF- β , koji učestvuje u generisanju i ekspanziji Treg, kao i pro-inflamatornog citokina IL-12p70, odgovornog za usmeravanje ka Th1 tipu imunskog odgovora (grafik 9). Ćelije stimulirane LPSom predstavljale su pozitivnu kontrolu, tj. one su bile mera potpunog sazrevanja DĆ. DĆ/LPS su produkovale visok nivo IL-12p70, dok je produkcija IL-10 i TGF- β , pod uticajem ovog stimulusa, bila zanemarljiva u odnosu na kontrolne ćelije gajene samo u medijumu. Kod ćelija stimuliranih ESL1 antigenima, znaćajno je povećana produkcija IL-10 i TGF- β u odnosu na kontrole tj. na nestimulirane ćelije i ćelije stimulirane LPSom (grafik 9 b i c), dok je produkcija IL-12p70 znaćajno snižena u poređenju sa stimuliranim ćelijama LPSom i skoro je na nivou produkcije nestimuliranih DĆ (grafik 9 a).



Grafik 9. Uticaj glikana ESL1 antigena na produkciju citokina dendritskih ćelija. DĆ kostne srži DA pacova, stimulirane su LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 i pESL1 antigenima (50 μ g/ml) ili su gajene samo u medijumu bez stimulacije (negativna kontrola) 48 sati. Citokinski nivoi IL-12p70 (a), IL-10 (b) i TGF- β (c) su mereni u ćelijским supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednja \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Uticaj glikana prisutnih na ESL1 na aktivaciju DC^Ć ispitivan je primenom ESL1 antigena sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom, pESL1 (grafik 9). pESL1 antigeni su doveli do značajnog smanjenja produkcije IL-12p70 u odnosu na LPS, dok je produkcija u odnosu na native ESL1 antigene bila snižena, ali ne statistički značajno. Produkcija IL-10 pod uticajem ovih antigena bila je značajno viša u odnosu na kontrolne, nestimulisane DC^Ć, ali ipak niža u odnosu na DC^Ć/ESL1. Nije uočena razlika u produkciji TGF- β između ćelija stimuliranih ESL1 i pESL1, odnosno produkcija ovog citokina je bila značajno povećana i pod uticajem pESL1. Navedeni rezultati pokazuju da ESL1 antigeni sa izmenjenom strukturom glikana (pESL1), imaju sposobnost da indukuju oslobađanje ispitivanih citokina u istom trendu kao pod uticajem nativnog ESL1. Njihova sposobnost da suprimiraju produkciju IL-12 je nešto veća nego nativnog antigena. Oni takođe stimulišu produkciju IL-10, ali manje od nativnog antigena, dok jednako snažno dovode do povećanog oslobađanja TGF- β u odnosu na kontrole.

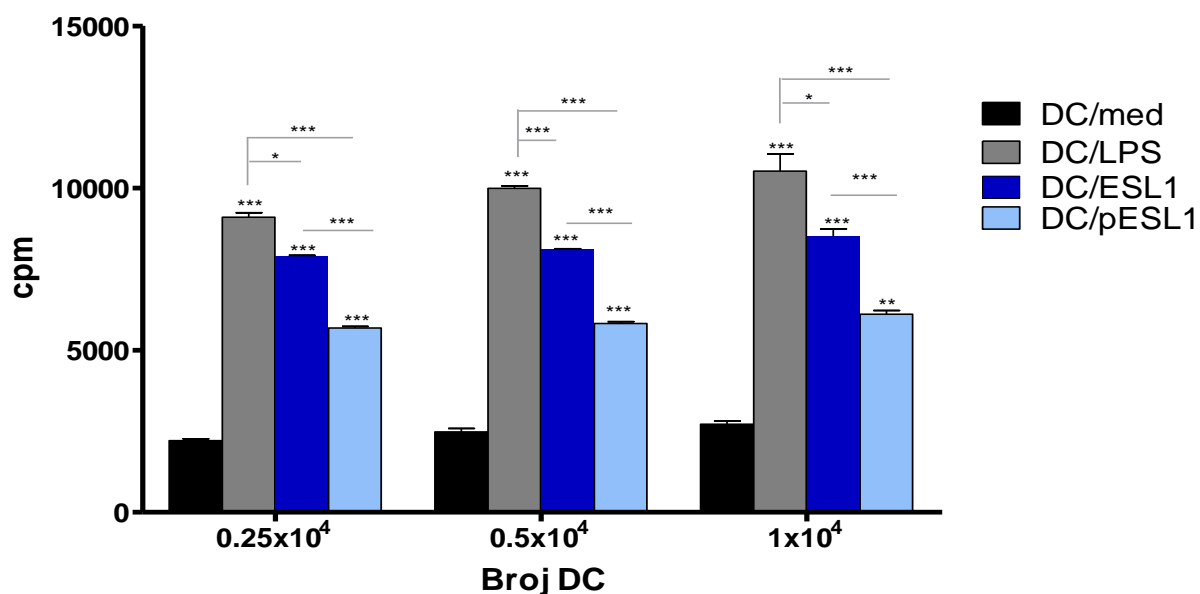
Kapacitet pojedinih komponenti ESL1 antigena da indukuju produkciju IL-12, IL-10 i TGF- β ispitivan je u kulturi DC^Ć gajenih u prisustvu rTsp53 i 7C2C5Ag. Rekombinantni protein rTsp53, kao i 7C2C5 antigeni indukovali su produkciju IL-12p70 i IL-10, koja u potpunosti odgovara produkciji izazvanoj sa kompletnim ESL1 antigenom. Kao što se sa grafika 10 (a i b) vidi, ne postoji statistički značajna razlika u produkciji IL-12p70 i IL-10 između DC^Ć/ESL1 i DC^Ć/rTsp53 i DC^Ć/7C2C5Ag, tj. svi navedeni antigeni indukuju značajno povećanu produkciju IL-10 (grafik 10 b), dok je produkcija IL-12p70 bila na nivou koji odgovara koncentraciji citokina koje proizvode netretirane ćelije kao i one tretirane ESL1 (grafik 10 a). Analiziranjem produkcije TGF- β u supernatantima DC^Ć stimuliranih rTsp53 i 7C2C5Ag, pokazano je da rTsp53 nema kapacitet da pokrene povećanu produkciju ovog citokina, dok 7C2C5Ag indukuje produkciju značajno više koncentracije TGF- β u poređenju sa nestimuliranim ćelijama, DC^Ć/LPS, DC^Ć/rTsp53 ili DC^Ć/ESL1 (grafik 10 c).



Grafik 10. Uticaj rTsp53 i 7C2C5Ag na produkciju citokina dendritskih ćelija. DĆ kostne srži DA pacova, stimulisane LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 antigenom (50 µg/ml), rTsp53 (10 µg/µl), 7C2C5Ag (10 µg/µl) 48 sati. Ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene su kao negativna kontrola. Citokinski nivoi IL-12p70 (a), IL-10 (b) i TGF-β (c) su mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

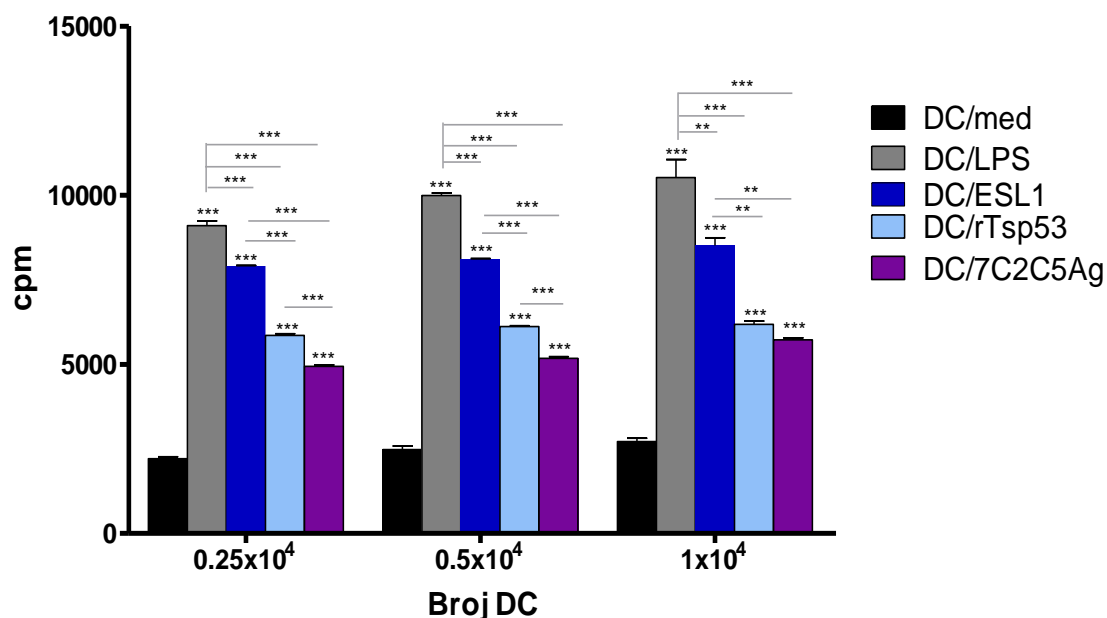
4.2.3. Kapacitet dendritskih ćelija da prezentuju antigene *T. spiralis* naivnim T limfocitima

U cilju određivanja kapaciteta stimulisanih DC da prezentuju antigene i indukuju proliferaciju naivnih T limfocita, vršena je ko-kultivacija naivnih T limfocita, izolovanih iz slezina zdravih DA pacova, sa DC koje su bile stimulisane ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5 antigenima. Rastući broj stimulisanih DC je inkubiran sa istim brojem T limfocita. Kada je reč o ispitivanju uticaja glikana ESL1 na proliferaciju naivnih T limfocita pokazalo se da pESL1 indukuje njihovu proliferaciju, ali je taj proliferativni odgovor statistički značajno niži u odnosu na proliferativni odgovor T ćelija indukovanih DC/ESL1 (grafik 11). Ovi rezultati ukazuju na značaj glikana ESL1 u indukovanju proliferacije naivnih T ćelija posredstvom DC.



Grafik 11. Proliferacija naivnih T limfocita nakon ko-kultivacije sa DC stimulisanim ESL1 i pESL1 antigenima. T ćelije (1×10^5 ćelija/otvoru), izolovane iz limfnih čvorova zdravih DA pacova su ko-kultivisane sa DC u rastućem broju ($0,25 \times 10^4$, $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 ćelija/otvoru) koje su prethodno stimulisane sa ESL1, pESL1 i LPSom. Ćelijama je dodat ^3H -timidin 18 h pre završetka kultivacije. Proliferativni odgovor je meren ugradnjom ^3H -timidina i izražen kao broj otkucaja na minut (cpm). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz jednog reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

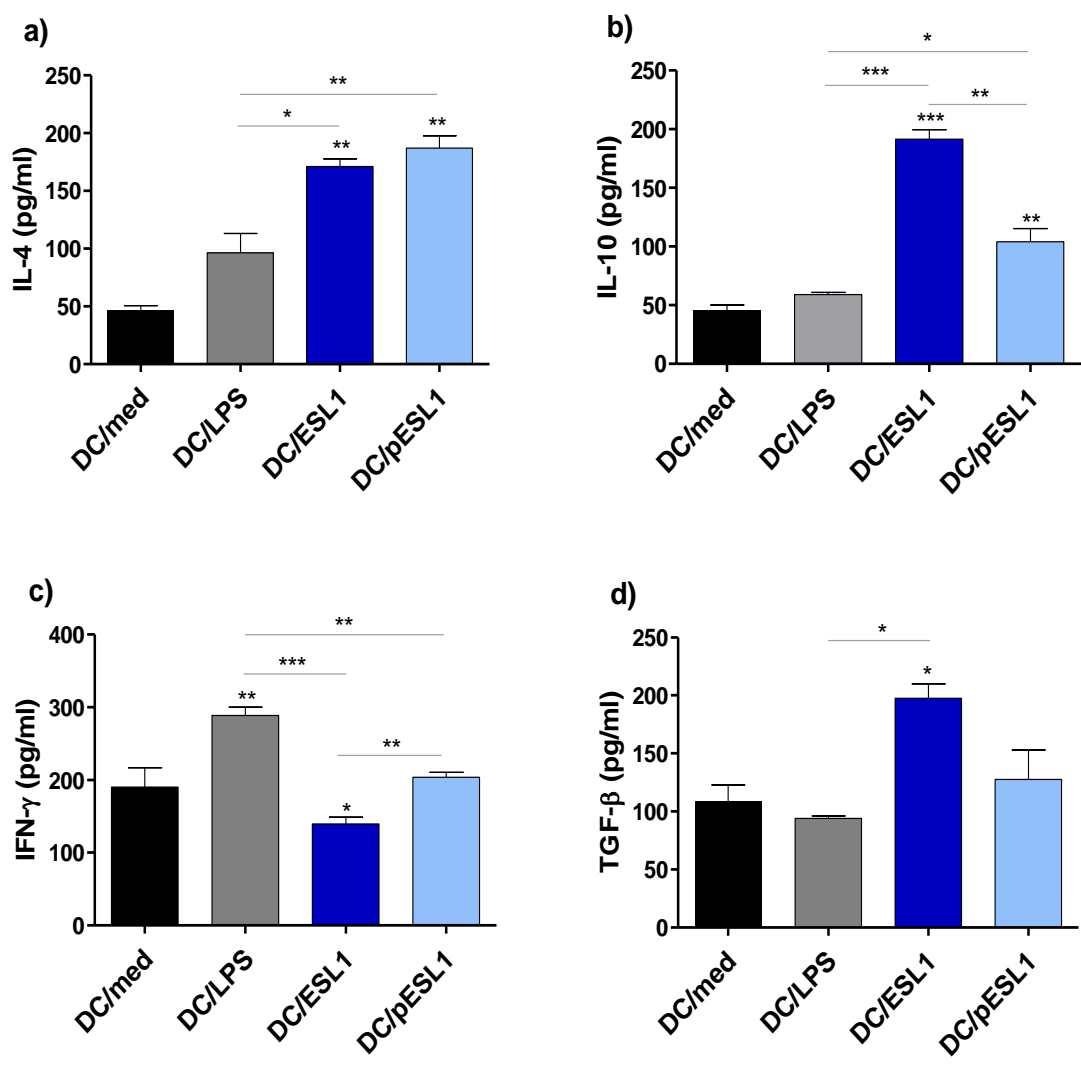
U cilju određivanja potencijala DĆ da procesuju i prezentuju pojedine komponente ESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag, naivnim T limfocitima, praćen je takođe proliferativni odgovor T ćelija pod uticajem DĆ stimuliranih rTsp53, 7C2C5Ag, ESL1 ili LPSom. Negativnu kontrolu predstavljala je ko-kultura T ćelija i nestimuliranih DĆ. U poređenju sa DĆ/ESL1, koje čak i u najvećem razblaženju ćelija dovode do značajne proliferacije naivnih T limfocita, proliferativni odgovor izazvan DĆ stimuliranim rTsp53 i 7C2C5Ag bio je značajno niži (grafik 12). Pa ipak, DĆ stimulirane rTsp53 i 7C2C5Ag dovode do značajne proliferacije naivnih T ćelija u odnosu na nestimulirane ćelije.



Grafik 12. Proliferacija naivnih T limfocita nakon ko-kultivacije sa DĆ stimuliranim ESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag. T ćelije (1×10^5 ćelija/otvoru), izolovane iz limfnih čvorova zdravih DA pacova su ko-kultivisane sa DĆ u rastućem broju ($0,25 \times 10^4$, $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 ćelija/otvoru) stimuliranim ESL1, 7C2C5Ag, rTsp53 i LPSom u trajanju od 7 dana. Ćelijama je dodat ³H-timidin 18 h pre završetka kultivacije. Proliferativni odgovor je meren ugradnjom ³H-timidina i izražen kao broj otkucanja na minut (cpm). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz jednog reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

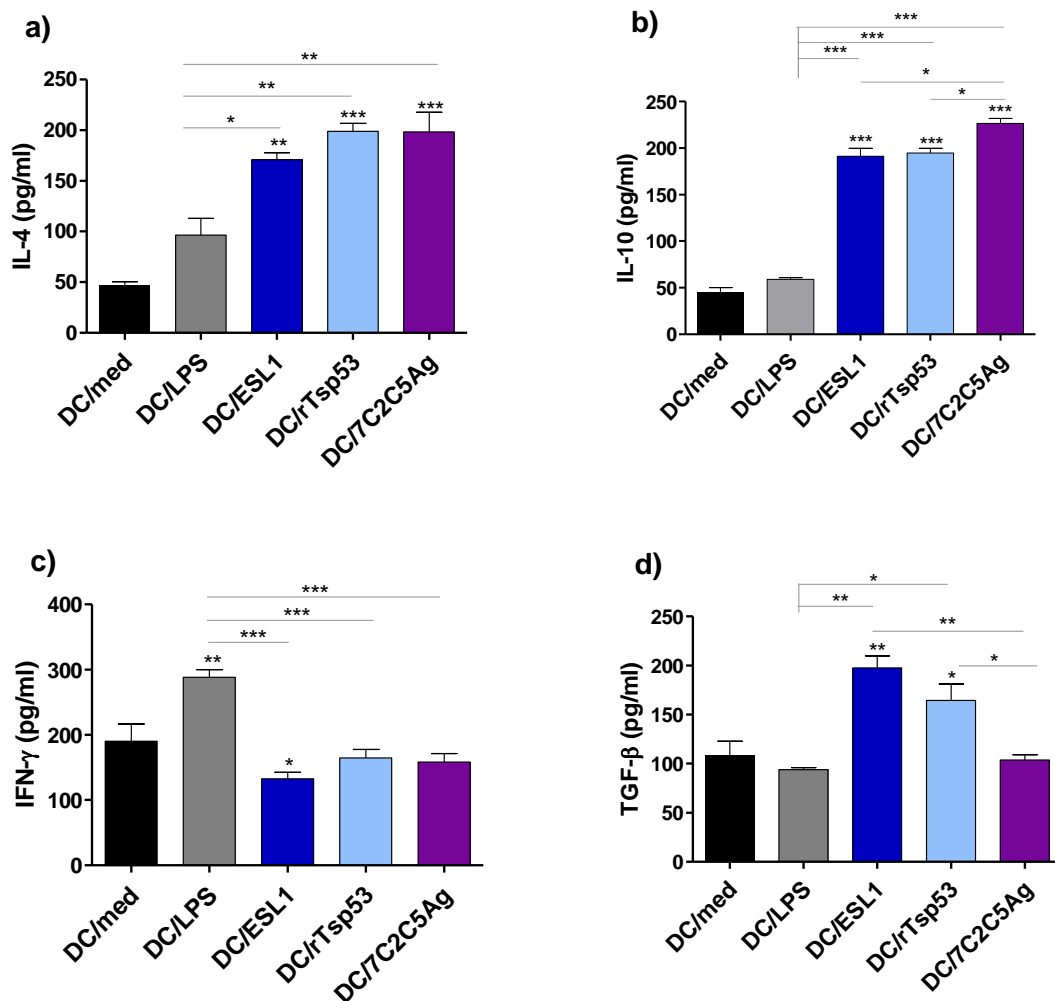
4.2.4. Polarizacija T ćelijskog odgovora pod uticajem dendritskih ćelija stimulisanih različitim antigenima *T. spiralis*

Iako DC⁺ stimulisane ESL1 antigenom pokazuju nepotpuno zreo fenotip, one poseduju kapacitet da polarizuju imunski odgovor ka Th2 tipu i regulatornom tipu *in vitro* (Ilic i saradnici, 2008; Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). U cilju ispitivanje značaja glikana ESL1 u ovom odgovoru, T limfociti zdravih DA pacova su ko-kultivisani sa DC⁺/ESL1 i DC⁺/pESL1 i određena je produkcija citokina od strane T ćelija. U skladu sa ranije dobijenim rezultatima (Ilic i saradnici, 2008; Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011), naivni T limfociti nakon ko-kultivacije sa DC⁺/ESL1, produkuju značajno povećane koncentracije citokina i to najviše IL-10, zatim IL-4, pa TGF- β u poređenju sa kontrolnim T limfocitima (ko-kultura T ćelija i DC⁺/LPS ili DC⁺/medijum) (grafik 13 a, b, d). Takođe, DC⁺/ESL1 uzrokuju značajno smanjenu produkciju IFN- γ u poređenju sa DC⁺/LPS (grafik 13 c), ali i nestimulisanim DC⁺. Promena ugljenohidratne strukture ESL1 antigena, posredstvom DC⁺, dovodi do promena u produkciji IL-10, IFN- γ i TGF- β od strane T limfocita (grafik 13 b, c, d), dok ne utiče na produkciju IL-4 koja ostaje značajno povećana kao što je i bila sa nativnim ESL1 (grafik 13 a). Iako je nivo produkcije IL-10 od strane T ćelija stimulisanih sa DC⁺/pESL1 značajno viši u odnosu na DC⁺/LPS i DC⁺/medijum, on je ipak značajno niži u poređenju sa produkcijom u T ćelijama ko-kultivisanim sa DC⁺/ESL1. Nivo produkcije TGF- β pod uticajem DC⁺/pESL1 je bio skoro na nivou kontrola, što znači da narušena struktura glikana ESL1 ne može da indukuje produkciju TGF- β kao što to čini nativni ESL1. Naši rezultati ukazuju na značaj ugljenohidratnih struktura prisutnih na ESL1 u pokretanju anti-inflamatornog i regulatornog imunskog odgovora posredstvom DC⁺. Kada je reč o IFN- γ , pESL1 indukuje statistički značajnu redukciju ovog citokina u poređenju sa DC⁺/LPS (grafik 13 c), ali ne u meri u kojoj to rade ESL1 antigeni.



Grafik 13. Citokinski profil T limfocita nakon ko-kultivacije sa DĆ stimuliranih ESL1 ili pESL1 antigenom. Naivni T limfociti ($2,5 \times 10^6$ ćelija/otvoru) limfnih čvorova zdravih DA pacova, ko-kultivisani su sa DĆ/medijum, DĆ/ESL1, DĆ/pESL1 i DĆ/LPS (5×10^5 ćelija/otvoru). Kultivacija je trajala sedam dana posle čega su sakupljeni supernatanti i koncentracija citokina IL-4 (a), IL-10 (b), IFN- γ (c) i TGF- β (d) je određena korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

U cilju ispitivanja moguće uloge komponenti ESL1 antigena, rTsp53 i 7C2C5Ag u polarizaciji imunskog odgovora ka Th2 i regulatornom tipu *in vitro*, DČ tretirane ESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag su ko-kultivisane sa naivnim T ćelijama i analiziran je citokinski profil tako tretiranih T ćelija. (grafik 14).



Grafik 14. Citokinski profil T limfocita nakon ko-kultivacije sa DČ stimuliranih rTsp53 ili 7C2C5Ag. Naivni T limfociti ($2,5 \times 10^6$ ćelija/otvoru) limfnih čvorova zdravih DA pacova kultivisani su sa DČ/medijum, DČ/ESL1, DČ/rTsp53, DČ/7C2C5Ag i DČ/LPS (5×10^5 ćelija/otvoru). Kultivacija je trajala 7 dana, posle čega su supernatanti sakupljeni i određena je koncentracija citokina IL-4 (a), IL-10 (b), IFN- γ (c) i TGF- β (d) ELISA testovima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

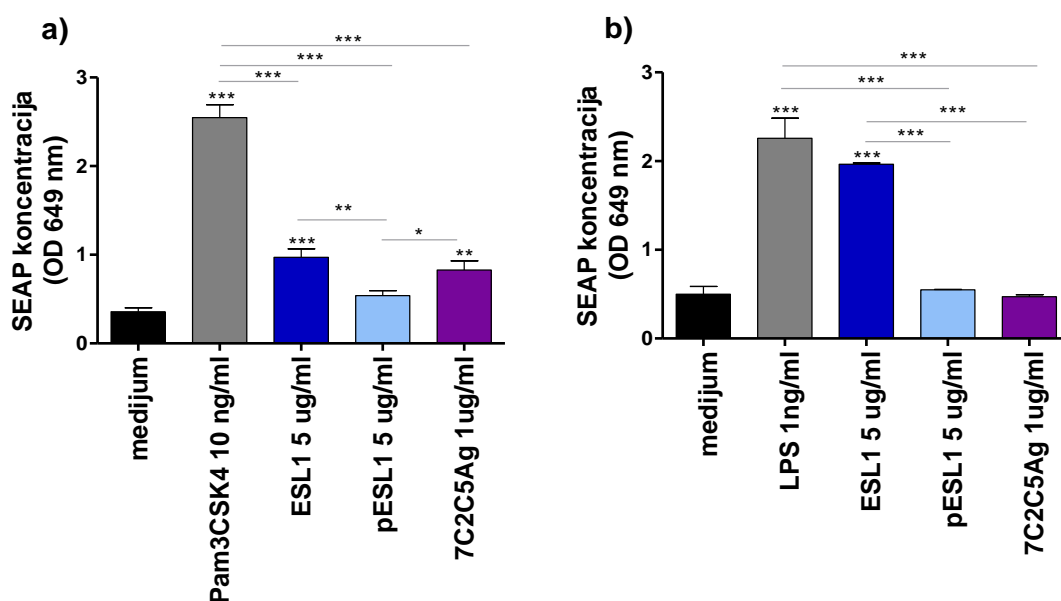
Antigeni 7C2C5Ag i rTsp53 modulišu funkciju DĆ koja se ogleda u promeni funkcije T ćelija. Kao što se sa grafika 14 a i b može videti, ispitivane komponente ESL1 utiču na DĆ da one u ko-kulturi stimulišu produkciju IL-4 i IL-10 od strane T ćelija skoro u istoj meri kao i kompletan ESL1, što znači da indukuju značajno povišen nivo ovih citokina u odnosu na kontrole (T ćelije kultivisane sa nestimulisanim DĆ i T ćelije kultivisane sa DĆ/LPS). Međutim, 7C2C5Ag indukuje značajno veću koncentraciju citokina IL-10 u poređenju sa ESL1 i rTsp53. Kao i ESL1, antigeni rTsp53 i 7C2C5Ag, indukuju sniženu produkciju IFN- γ , Th1 citokina, u odnosu na LPS, koja je zapravo na nivou kontrole tj. DĆ/med (grafik 14 c). Koncentracija TGF- β raste u kulturi naivnih T limfocita ko-kultivisanih sa DĆ/rTsp53 u odnosu na kontrolu, dok je u kulturi T ćelija ko-kultivisanih sa DĆ/7C2C5Ag na nivou kontrole, što znači da DĆ/7C2C5Ag nemaju potencijal da pokrenu produkciju TGF- β od strane T ćelija u ovako postavljenom *in vitro* sistemu (grafik 14 d).

4.3. Molekularni mehanizmi kojima *T. spiralis* moduliše imunski odgovor domaćina

4.3.1. Interakcija TLR i NOD receptora sa antigenima *T. spiralis*

Postoji veoma mali broj podataka koji govore o receptorima odgovornim za interakciju DĆ i antigena *T. spiralis*. Kao što je već naglašeno, ključnu ulogu u prepoznavanju i vezivanju molekula patogena i sledstvenom aktiviranju DĆ imaju PRR. U ovom radu je ispitivana interakcija TLR i NOD receptora sa ESL1 antigenima i pojedinim komponentama ESL1, kao što je 7C2C5Ag, kako bi se utvrdilo koji receptori prepoznaju strukturne motive na ESL1. Takođe je ispitivano da li je interakcija receptora i ESL1 zavisna od prisustva intaktnih glikana. Studija je rađena na HEK-Blue™ ćelijskim linijama, koje eksprimiraju pojedinačne TLR (TLR2, -3, -4, -5, -7), kao i NOD1 i NOD2 receptore. Potvrda interakcije receptora i odgovarajućih liganada omogućena je postojanjem reporter gena za alkalnu fosfatazu SEAP, koji se eksprimira po aktivaciji receptora. Kao pozitivne kontrole korišćene su ćelije stimulisane specifičnim ligandima za svaki pojedinačni receptor.

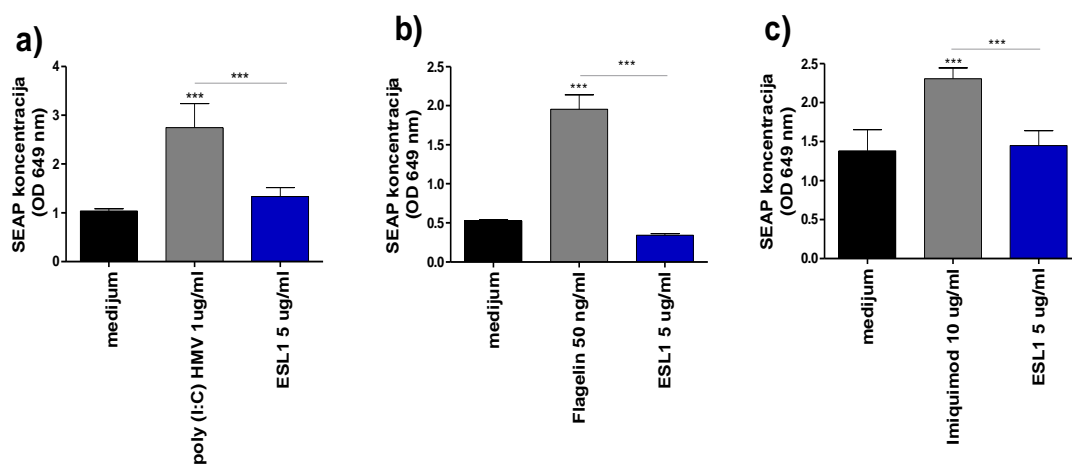
HEK-hTLR2 ćelije su korišćene u cilju ispitivanja interakcije TLR2 sa ESL1, 7C2C5Ag i pESL1. Ćelije su takođe kultivisane Pam3CSK4, specifičnim ligandom za TLR2 (pozitivna kontrola) ili su gajene samo u medijumu (negativna kontrola). Potvrda angažovanosti TLR2 u vezivanju ponuđenih liganada dobijena je merenjem alkalne fosfataze u supernatantima kultivisanih ćelija. Kao što je na grafiku 15 a prikazano, stimulacija HEK-hTLR2 ćelija sa Pam3CSK4 indukuje snažnu produkciju alkalne fosfataze SEAP. ESL1 i 7C2C5Ag dovode do statistički značajnog porasta koncentracije SEAP u odnosu na negativnu kontrolu, što ukazuje da antigeni ESL1 i 7C2C5Ag aktiviraju TLR2 receptor. S druge strane, stimulacija ćelija sa pESL1 antigenom nije indukovala povećanu produkciju alkalne fosfataze, što znači da je izostala interakcija TLR2 receptora i pESL1. Dobijeni podaci pokazuju da je za interakciju sa TLR2 neophodno postojanje ugljenohidratnih struktura ESL1.



Grafik 15. Odgovor HEK-hTLR2 (a) i HEK-hTLR4 (b) ćelija na antigene *T. spiralis* (ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag). Ćelije (25 000 ćelija/otvoru) su stimulisane Pam3CSK4 (10 ng/ml) ili LPSom (1 ng/ml) ili antigenima ESL1 (5 μ g/ml), pESL1 (5 μ g/ml) i 7C2C5Ag (1 μ g/ml) u trajanju od 22-24 h na 37°C. Ćelije inkubirane samo u medijumu su korišćene kao negativna kontrola. Interakcija TLR2 i antigena *T. spiralis* je ispitana na osnovu merenja alkalne fosfataze SEAP korišćenjem Quanti-Blue detekcionog medijuma. Koncentracija alkalne fosfataze je određena u supernatantima nakon 24 h od početka inkubacije sa Quanti-Blue detekcionim medijumom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Kada je reč o interakciji antigena *T. spiralis* i TLR4, pokazalo se da ovaj receptor vezuje samo kompletni ESL1 i da je to vezivanje zavisno od prisustva glikana. Kao što se na grafiku 15 b vidi HEK-hTLR4 ćelije su proizvodile značajnu koncentraciju alkalne fosfataze SEAP po stimulaciji specifičnim ligandom za TLR4, LPSom, kao i nakon stimulacije ESL1 antigenima, u poređenju sa nestimulisanim ćelijama. Modifikacija ugljenohidratne strukture ESL1 (pESL1) poništila je efekat nativnog antigena. Ćelije stimulisane 7C2C5Ag nisu proizvodile značajnu koncentraciju SEAP u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni podaci ukazuju da 7C2C5Ag ne aktivira TLR4 receptor i da neke druge komponente u sastavu ESL1 poseduju TLR4 aktivnost.

TLR5, TLR3 i TLR7 ne učestvuju u prepoznavanju i vezivanju antigena *T. spiralis*. Ispitivanja na HEK-hTLR3 ćelijama su pokazala da stimulacija sa ESL1 ne dovodi do povećanja produkcije alkalne fosfataze SEAP u poređenju sa negativnom kontrolom, dok Poly (I:C) HMV kao pozitivna kontrola snažno aktivira produkciju SEAP (grafik 16 a).

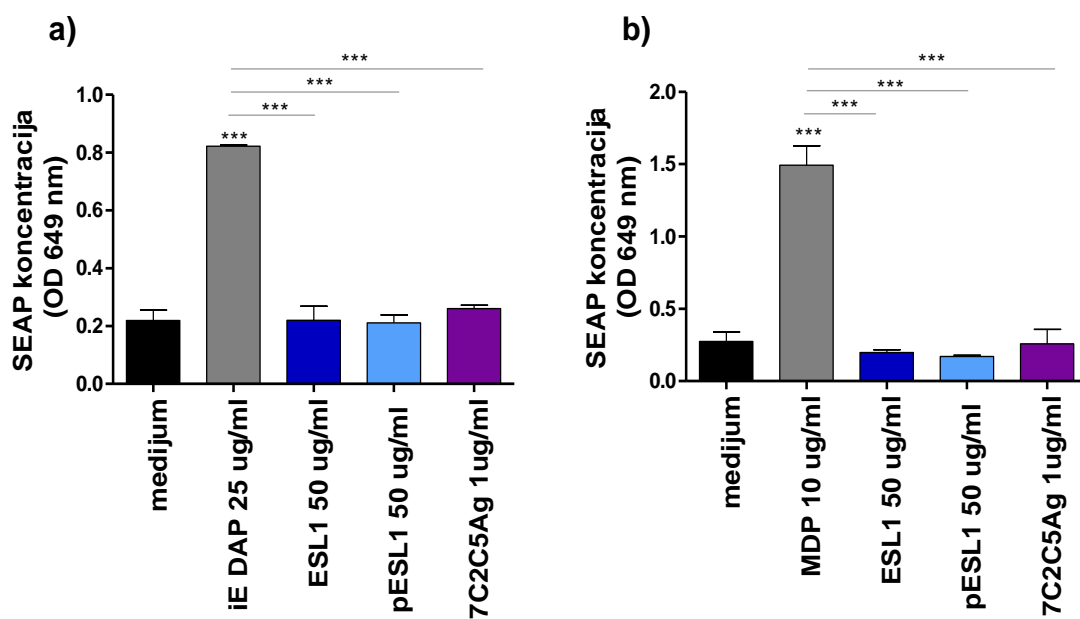


Grafik 16. Odgovor HEK-hTLR3, HEK-hTLR5, HEK-hTLR7 ćelija na ESL1. Ćelije ($2,5 \times 10^4$ ćelija/otvoru) su gajene u prisustvu Poly (I:C) HMV (1 µg/ml), flagelina (50 ng/ml), Imiquimoda (10 µg/ml) ili ESL1 (5 µg/ml) u trajanju od 22-24 h na 37°C. Ćelije inkubirane samo u medijumu su korišćene kao negativna kontrola. Interakcija TLR3 (a), TLR5 (b) i TLR7 (c) sa antigenima *T. spiralis* je ispitana na osnovu merenja alkalne fosfataze SEAP korišćenjem Quanti-Blue detekcionog medijuma. Koncentracija alkalne fosfataze je određena u supernatantu nakon 24 h od početka inkubacije sa Quanti-Blue detekcionim medijumom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Slični rezultati su dobijeni u ogledima sa HEK-hTLR5 (grafik 16 b) i HEK-hTLR7 ćelijama (grafik 16 c). Naime, stimulacija ovih ćelija ESL1 antigenima nije dovela do povećanja produkcije SEAP, šta više koncentracija SEAP u supernatantima ovih kultura bila je na nivou izmerenom za negativnu kontrolu. Za razliku od antigena *T. spiralis*, flagelin (TLR5 ligand) i Imiquimod (TLR7 ligand), doveli su do značajnog povećanja produkcije SEAP od strane HEK-hTLR5, odnosno HEK-hTLR7 ćelija.

Za ispitivanje interakcije antigena *T. spiralis* i citoplazmatskih receptora NOD1 i NOD2, korišćene su humane HEK-NOD1 (grafik 17 a) i HEK-NOD2 (grafik 17 b) ćelije stimulisane ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag. Ćelije tretirane NOD1 ligandom (iE-DAP) ili NOD2 ligandom (MDP) su korišćene kao pozitivne kontrole, dok su ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene kao negativne kontrole. Nakon stimulacije ćelija antigenima, merena je produkcija SEAP u ćelijskim supernatantima i određena je aktivnost receptora NOD1 i NOD2.

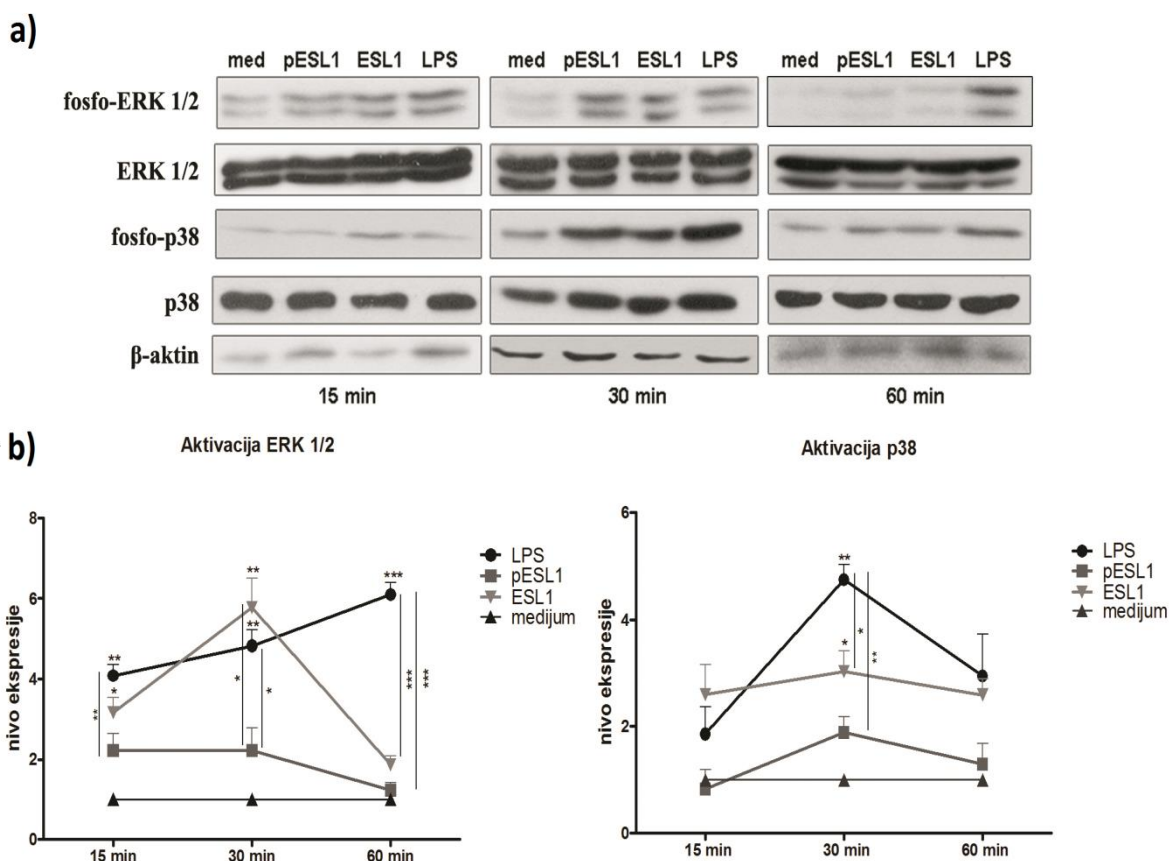
Ligandi za NOD1 i NOD2 aktiviraju sintezu i sekreciju SEAP, što dovodi do značajnog porasta koncentracije SEAP u supernatantima, u poređenju sa negativnom kontrolom tj. nestimulisanim ćelijama. Nije primećena statistički značajna razlika u produkciji alkalne fosfataze SEAP između nestimulisanih ćelije i stimulisanih HEK-hNOD1 i HEK-hNOD2 ćelija antigenima ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag (grafik 17). Na osnovu navedenih rezultata zaključeno je da ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag ne aktiviraju citoplazmatske receptore NOD1 i NOD2.



Grafik 17. Odgovor HEK-hNOD1 i HEK-hNOD2 ćelija na antigene *T. spiralis* (ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag). Ćelije (25 000 ćelija/otvoru) su stimulisane iE-DAP (25 $\mu\text{g/ml}$), MDPom (10 $\mu\text{g/ml}$) ili helmintskim antigenima ESL1 (50 $\mu\text{g/ml}$), pESL1 (50 $\mu\text{g/ml}$) i 7C2C5Ag (1 $\mu\text{g/ml}$) u trajanju od 22-24 h na 37°C. Ćelije inkubirane samo u medijumu su korišćene kao negativna kontrola. Interakcija receptora NOD1 (a) i NOD2 (b) i antigena *T. spiralis* je ispitana na osnovu merenja alkalne fosfataze SEAP korišćenjem Quanti-Blue detekcionog medijuma. Koncentracija alkalne fosfataze je određena u supernatantu 24 h i kvantifikovana merenjem absorbance na 649 nm. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

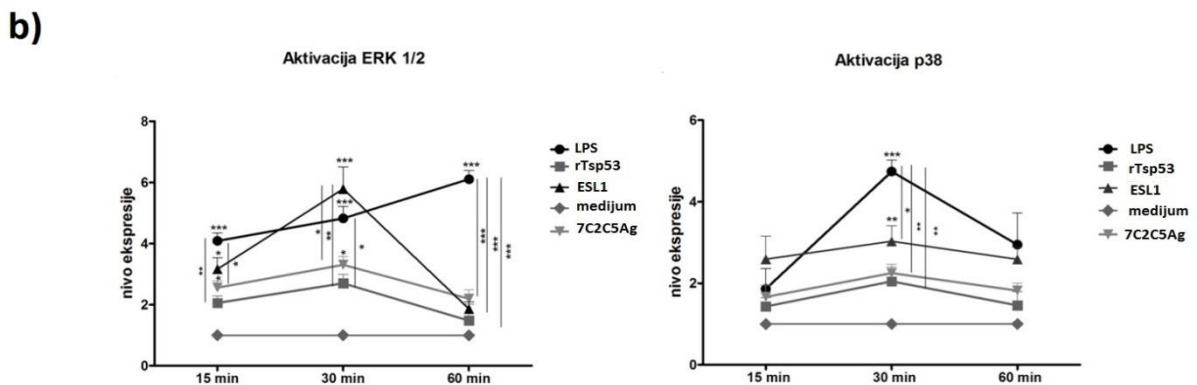
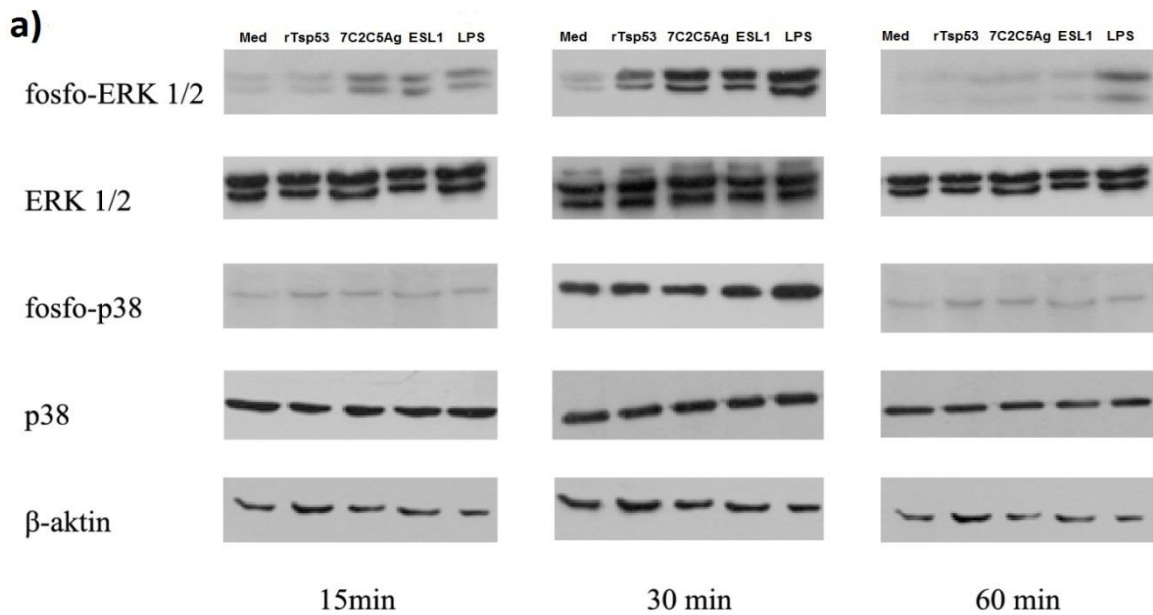
4.3.2. Učešće MAP kinaza u signalnom putu pokrenutom interakcijom dendritskih ćelija sa ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag

Ranija istraživanja su pokazala da adoptivni transfer DĆ stimuliranih ESL1 antigenima naivnim DA pacovima indukuje Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora, koji inače karakteriše hroničnu infekciju parazitom *T. spiralis* (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Iz ovih razloga su DĆ stimulirane antigenima *T. spiralis* izabrane kao model za ispitivanje signalnih puteva koji utiču na njihovo sazrevanje. Studije sa drugim helmintima su ukazale na značaj MAP kinaza u aktivaciji DĆ tj. produkciji IL-10 i regulaciji produkcije IL-12 (Thomas i saradnici, 2003; Klotz i saradnici, 2011). DĆ su prvo tretirane sa ESL1 ili pESL1, kako bi se utvrdila priroda aktivacije MAPK i da li je za tu aktivaciju neophodno postojanje intaktnih glikana. Stimulacija LPSom predstavljala je pozitivnu kontrolu, dok su DĆ kultivirane samo u medijumu bile negativna kontrola. Stimulacija je trajala 15, 30 i 60 minuta, a potom je aktivacija ERK1/2 i p38 analizirana Western blotom. Kao što je očekivano, LPS indukuje jaku fosforilaciju obe ispitivane kinaze: p38 i ERK1/2 (grafik 18). ESL1 indukuje jaku, prolaznu fosforilaciju ERK1/2 u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Nivo fosforilacije ove kinaze dostiže maksimum posle 30 minutnog tretmana DĆ sa antigenom i zatim nivo opada i spušta se na nivo kontrolne grupe u 60 min (grafik 18). Nasuprot tome, ESL1 dovodi do slabe fosforilacije p38 u poređenju sa kontrolnom grupom, čiji se nivo ne menja tokom vremena. Za razliku od ESL1, pESL1 vodi slaboj aktivaciji p38 i ERK1/2 (grafik 18).



Grafik 18. ESL1 indukuje prolaznu aktivaciju ERK1/2 i p38 u dendritskim ćelijama. DĆ kostne srži DA pacova kultivisane su i stimulisane LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 ili pESL1 antigenima (50 µg/ml) u trajanju od 15, 30 i 60 minuta. Ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene su kao negativna kontrola. Nakon isteka vremena, ćelije su lizirane i nivo aktiviranih, fosforilisanih MAP kinaza (ERK1/2 i p38) i totalnih nefosforilisanih kinaza (ERK1/2 i p38) je ispitan u Western blot analizi korišćenjem antitela specifičnih za fosfo-p38, p38, fosfo-ERK1/2, ERK1/2 i β-aktina. (a) Grafik prikazuje reprezentativni imunoblot (b) Nivo ekspresije proteina je kvantifikovan denzitometrijom, normalizovan u odnosu na ekspresiju β-aktin-a, detektovanog u istom uzorku i iskazan kao odnos fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 i fosfo-p38 / p38. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti, preračunate u odnosu na kontrolnu grupu i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

U cilju bližeg određivanja komponenti u okviru ESL1 antigena koje su odgovorne za pokretanje signalnih puteva i sazrevanje DĆ, vršena je stimulacija rTsp53 i 7C2C5Ag antigenima u istim vremenskim intervalima, kako je prethodno prikazano. Kao što je prikazano na grafiku 19, LPS dovodi do jake aktivacije obe kinaze. U skladu sa našim prethodno dobijenim rezultatima, ESL1 je indukovao kratkotrajnu jaku aktivaciju kinaze ERK1/2 i slabu ali ipak statistički značajnu aktivaciju p38 u odnosu na nestimulisane ćelije. Antigen rTsp53 je doveo do slabe aktivacije p38 i ERK1/2 u poređenju sa kontrolnom grupom (grafik 19). Stimulacija ćelija 7C2C5Ag dovodi do fosforilacije ERK1/2 koja dostiže maksimum posle 30 minutnog tretmana i zatim nivo fosforilacije pada. Nivo fosforilacije je niži u odnosu na nivo fosforilacije koji indukuju LPS i ESL1 ali je statistički značajan u odnosu na nestimulisane ćelije. Takođe, ovaj antigen je indukovao slabu aktivaciju tj. fosforilaciju kinaze p38 (grafik 19).



Grafik 19. Dejstvo 7C2C5Ag i rTsp53 na aktivaciju ERK1/2 i p38 u dendritiskim ćelijama DĆ kostne srži DA pacova, kultivisane su i stimulisane LPSom (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ESL1 antigenima (50 µg/ml), 7C2C5Ag (10 µg/ml) i rTsp53 (10 µg/ml) u trajanju od 15, 30 i 60 minuta. Ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene su kao negativna kontrola. Nakon isteka vremena, ćelije su lizirane i nivo aktiviranih, fosforilisanih MAP kinaza (ERK1/2 i p38) i totalnih kinaza (ERK1/2 i p38) je ispitan u Western blot analizi, korišćenjem antitela protiv: fosfo-p38, p38, fosfo-ERK1/2, ERK1/2 i β-aktina. a) Grafik prikazuje reprezentativni imunoblot b) Nivo ekspresije proteina je kvantifikovan denzitometrijom, normalizovan u odnosu na ekspresiju β-aktin-a, detektovanog u istom uzorku i iskazan kao odnos fosfo-ERK1/2 / ERK1/2 i fosfo-p38 / p38. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti, preračunate u odnosu na kontrolnu grupu i predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

5. DISKUSIJA

U ovom radu ispitana je uloga pojedinih komponenti ekskretorno-sekretornih produkata (ESL1) larvi *T. spiralis* odgovornih za oblikovanje imunskog odgovora u toku infekcije *T. spiralis*, sa posebnim osvrtom na ulogu šećernih komponenti u interakciji helmintskih antigena i imunskog sistema organizma domaćina. Ranije je pokazano da Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora, koji se razvija tokom hronične faze infekcije sa *T. spiralis*, može da blokira Th1/Th17 posredovani razvoj EAE-a inflamacije, što podstiče istraživanja koja teže otkrivanju molekula i razumevanju mehanizama kojima helminti modulišu imunski odgovor domaćina, sa ciljem da se kreiraju novi terapijski pristupi u terapiji inflamatornih oboljenja (McSorley i saradnici, 2013). Značaj ovde prikazanih istraživanja upravo i leži u definisanju komponenti ESL1 antigena koje su ključne za pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora, a koje imaju potencijalnu imunomodulatornu funkciju.

Prvi korak je bio ispitivanje uticaja ESL1 produkata *T. spiralis* i značaja ugljenohidratnih struktura ESL1 za pokretanje i polarizaciju imunskog odgovora *in vivo*. Efekat ESL1 produkata mišićnih larvi *T. spiralis* na DĆ i njihovu sposobnost pokretanja i polarizacije T ćelijskog odgovora ispitivan je ranije u *in vitro* uslovima i pokazana je povećana produkcija IL-4, IL-10 i TGF- β i smanjena produkcija IFN- γ (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). U ovim istraživanjima takođe je praćena produkcija Th2/anti-inflamatornih i regulatornih citokina: IL-4, IL-10 i TGF- β , kao i pro-inflamatornog citokina IFN- γ . Citokini IL-4, IL-10 i TGF- β su plejotropni medijatori, od kojih IL-4 i IL-10 mogu da spreče Th1 proliferaciju i produkciju pro-inflamatornih citokina (Hocke i saradnici, 2006), dok TGF- β ima ulogu u regulisanju adaptivnog imunskog odgovora (Travis i Sheppard, 2014). IFN- γ , s druge strane promovise razvoj Th1 imunskog odgovora i aktivaciju makrofaga (Valencia-Pacheco i saradnici, 2014), što je od izuzetnog značaja za adekvatan imunski odgovor na infekciju.

U ovom radu, intraperitonealna primena ESL1 antigena *T. spiralis* intaktnim DA pacovima na nivou ćelija slezine indukuje povećanu produkciju IL-4 i IL-10, dok ne utiče na produkciju TGF- β i IFN- γ . Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da primena izolovanih antigena pokreće Th2/anti-inflamatorni odgovor u organizmu recipijenta, što se ne podudara sa citokinskim miljeom koji se stvara tokom infekcije (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2010) ili po primeni DĆ stimulisanih ESL1, a koji

podrazumeva i povećanu produkciju regulatornog citokina TGF- β i sniženu produkciju IFN- γ (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Međutim, podaci dobijeni u ranijim istraživanjima pokazuju da primena ESL1 antigena DA pacovima ipak dovodi do pokretanja regulatorne mreže, jer je u značajnom stepenu povećan broj CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija, kao i atipičnih regulatornih T ćelija koje eksprimiraju marker Foxp3, ali ne i CD25 (Radović i saradnici, 2015). Primena izolovanih ESL1 antigena pre indukcije EAE, iako, kako je ovde pokazano, ne dovodi do pokretanja imunskog odgovora koji je karakterističan za infekciju *T. spiralis*, ublažava kliničku sliku bolesti sa skoro sličnim stepenom uspeha kao i sama infekcija (Radović i saradnici, 2015). Ovaj podatak je veoma značajan, s obzirom da infekcija sa sobom nosi rizike, tako da postoji namera da se otkriju molekuli poreklom od helminata koji bi mogli da proizvedu isti efekat, uz minimum rizika za organizam koji se tretira. Iz literature je poznato da korišćenje antigena solubilnih ekstrakata jaja *S. mansoni* može sprečiti razvoj inflamatornih oboljenja u animalnim modelima kao što su EAE (Sewell i saradnici, 2003), dijabetes tipa 1 (Maron i saradnici, 1998) i kolitis indukovani trinitrobenzen sumpornom kiselinom (Elliott i saradnici, 2003). Takođe, ES-62 *A. viteae*, glikoprotein koji sadrži fosforilholin, može sprečiti razvoj ili suprimirati kolagenom-indukovan artritis kod miševa (Harnett i saradnici, 2004).

Kao što je već prikazano, intraperitonealna primena ESL1 dovodi do povećane produkcije IL-4, Th2 citokina koji ima važnu ulogu u raznim imunobiološkim aktivnostima kao što su promovisanje proliferacije i diferencijacije antigenprezentujućih ćelija i stimulisanje produkcije IgE antitela. Takođe, ovaj citokin suprimira razvoj Th1 ćelija čak i u prisustvu visokog nivoa IFN- γ (Dhanda i saradnici, 2013; Raphael i saradnici, 2014). Drugi citokin čija je produkcija pokrenuta pod dejstvom ESL1, IL-10, je anti-inflamatorni i regulatorni citokin, koji može da kontroliše i Th1 i Th2 odgovor (Redpath i saradnici, 2014) i ima važnu ulogu u Th2 polarizaciji (Helmbly i Grecis, 2003b). IL-10 ima centralnu ulogu u infekciji, tako što ograničava inflamatorni odgovor na patogene i samim tim sprečava oštećenje organizma domaćina (Saraiva, 2010). Iz ovih razloga smanjena produkcija IFN- γ uočena tokom infekcije *T. spiralis* može biti objašnjena kao posledica povećane produkcije IL-10.

Na značaj glikana helmintskih antigena za pokretanje imunskog odgovora specifičnog za parazit ukazao je veći broj studija (Prasanphanich i saradnici, 2013;

Tundup i saradnici, 2012). Naša istraživanja su bila usmerena na uticaj glikana ESL1 antigena *T. spiralis* na inicijaciju urođenog i adaptivnog imunskog odgovora. Promena ugljenohidratne strukture ESL1 dovela je do smanjene produkcije citokina IL-4 i IL-10 u *in vivo* uslovima u poređenju sa ESL1, što ukazuje da je za pokretanje imunskog odgovora karakterističnog za hroničnu infekciju *T. spiralis* neophodno prisustvo intaktnih glikana.

Tokom helmintske infekcije, usmeravanje imunskog odgovora u pravcu Th2 zahteva ranu produkciju citokina IL-4 (Osborne i Devaney, 1998; Sabin i saradnici, 1996), ali mehanizmi koji dovode do rane sekrecije ovog citokina su i dalje nepoznati. Tačno poreklo rane produkcije IL-4 je i dalje tema mnogih debata i brojne studije opisuju različite ćelije imunskog sistema, u različitim eksperimentalnim sistemima, kao izvor ovog citokina, uključujući mast ćelije, bazofile i eozinofile (Falcone i saradnici, 1996; Sabin i saradnici, 1996). Mikhalkovich i saradnici (2006) su opisali da su naivni CD4⁺ T limfociti važan rani izvor IL-4 i da ove ćelije mogu odmah nakon stimulacije T ćelijskog receptora da indukuju sopstvenu diferencijaciju u Th2 ćelije. U ovoj studiji smo pratili ekspresiju gena za IL-4, da bi utvrdili koliko rano nakon primene ESL1 dolazi do njegove aktivacije u T limfocitima. Nakon 24 sata od primene ESL1, ne dolazi do povećanja ekspresije gena za IL-4, ali se značajno povećanje uočava posle 72 sata. Tawill i saradnici (2004) su zabeležili da solubilni produkti *B. malayi* indukuju povećanu ekspresiju gena za IL-4 takođe nakon 72 sata, dok su drugi autori opisali da antigeni *S. mansoni* i *Brugia pahangi* stimulišu ekspresiju ovog gena u T limfocitima već nakon 2-24h (Sabin i saradnici, 1996; Osborne i Devaney, 1998). To ukazuje da različiti helmintski antigeni koriste različite mehanizme u regrutovanju i razvoju određenog ćelijskog tipa koji učestvuju u produkciji ovog citokina. Primena ESL1 dovela je takođe do povećane ekspresije gena za IL-10 u ćelijama slezine, u roku od 72 sata, dok je ekspresija gena za IFN- γ i TGF- β ostala nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu, što je u saglasnosti sa prethodno opisanim rezultatima za produkciju ovih citokina na proteinskom nivou. Kao i u slučaju produkcije citokina, ekspresija gena za IL-4 i IL-10 zavisila je od prisustva nenarušene ugljenohidratne strukture ESL1 produkata. Prikazani rezultati dobijeni na *in vivo* modelu jasno ukazuju da su glikani ESL1 produkata važni za interakciju parazita i domaćina i ostvarivanje Th2/anti-inflamatornog tipa imunskog odgovora. Naši rezultati su u skladu sa brojnim

literaturnim podacima koji su opisali značaj glikana helmintskih molekula u Th2 polarizaciji. Tako je demonstrirano da su glikani SEA neophodni za polarizaciju Th2 CD4 imunskog odgovora i da nazalni limfociti poreklom iz miševa intranazalno tretiranih nativnim SEA, ali ne i perjodat-tretiranim SEA i zatim *in vitro* restimuliranih nativnim SEA, produkuju citokine IL-4, IL-5 i IL-10 (Okano i saradnici, 1999). Tawill i saradnici (2004) su pokazali da perjodat-tretirani solubilni produkti *B. malayi* direktno stimulišu nižu ekspresiju gena za IL-4 u poređenju sa nativnim produktima i da glikani solubilnih produkata *B. malayi* imaju kapacitet da indukuju Th2 imunski odgovor u *in vivo* modelu, verovatno preko rane indukcije Th2 citokina, IL-4. Gómez-García i saradnici (2006) su opisali da je očuvana ugljenohidratna struktura solubilnih antigena *T. crassiceps* neophodna za produkciju citokina i ekspresiju gena za IFN- γ , IL-4, IL-10 i TGF- β i indukovanje Th2 i anti-inflamatornog odgovora. Naši rezultati zajedno sa rezultatima drugih autora, ukazuju da su glikani helmintskih produkata važni za indukovanje Th2 imunskog odgovora i da verovatno koriste slične mehanizme u polarizaciji imunskog odgovora. Tundup i saradnici (2012) smatraju da glikani usmeravaju CD4⁺ T ćelijski odgovor ka Th2 i anti-inflamatornom tipu preko ostvarivanja interakcije sa lektinskim receptorima C tipa na antigen prezentujućim ćelijama (makrofagama i DC) i njihove aktivacije.

Imunomodulatorne karakteristike ESL1 i uloga glikana ESL1 u indukovanju urođenog imunskog odgovora, ispitane su na nivou peritonealnih makrofaga. Makrofagi su važne antigen-prezentujuće ćelije urođenog imunskog odgovora i predstavljaju heterogenu familiju ćelija imunskog sistema, koje imaju ključnu ulogu u odgovoru na različite patogene i njihovom uništavanju, uklanjanju apoptotskih ćelija, održavanju homeostaze, reparaciji tkiva i regulisanju imunskog odgovora domaćina. U odgovoru na Th1 citokine kao što je IFN- γ , nastaju klasično aktivirani makrofagi koji obezbeđuju zaštitu od intraćelijskih patogena fagocitozom i eliminacijom. Alternativno aktivirani makrofagi (AAMF) su indukovani Th2 citokinima čija je produkcija značajno povećana tokom helmintskih infekcija, uključujući IL-4, IL-13, IL-21 i IL-33 (Jang i Nair, 2013).

Aktivacija peritonealnih makrofaga u ovoj studiji određena je merenjem nivoa pro-inflamatornih medijatora NO i IL-6, kao i anti-inflamatornog citokina IL-10. ESL1, intraperitonealno primenjen, indukovao je značajno smanjenje produkcije NO i IL-6 i povećanu produkciju IL-10 od strane peritonealnih makrofaga, što bi moglo da ukaže na

njihovu alternativnu aktivaciju. Bai i saradnici (2012) su takođe našli da stimulacija makrofaga miša ES produktima *T. spiralis* dovodi do povećanja produkcije citokina IL-10 i smanjenja produkcije citokina IL-6. Takođe, komponenta ESL1, rekombinantni p53 protein *T. spiralis* (rTsp53) indukuje povećanu ekspresiju manoznog receptora, Ym1 (proteina iz familije hitinaza), arginaze-1 i IL-10, što ukazuje na alternativni fenotip (Du i saradnici, 2014). Slični rezultati su zabeleženi sa produktima drugih parazita kao što je ES-62 *A. viteae* koji redukuje kapacitet makrofaga stimulisanih IFN- γ i LPSom da proizvode citokine IL-6 i IL-12 (Goodridge i saradnici, 2001). Ottow (2014) je takođe pokazao da solubilni produkti *T. suis* redukuju TLR4 indukovani pro-inflamatorni fenotip makrofaga što može doprineti protektivnom efektu *T. suis* u različitim inflamatornim oboljenjima. Naime, u prisustvu LPSa, solubilni produkti *T. suis* suprimiraju LPSom indukovani pro-inflamatorni fenotip humanih makrofaga i dovode do redukcije iRNK za mnoge pro-inflamatorne medijatore uključujući citokine, hemokine i transkripcijske faktore kao i do smanjene produkcije citokina IL-6 i TNF- α i povećanja produkcije anti-inflamatornog medijatora IL-10, ukazujući na anti-inflamatorni efekat.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji možemo pretpostaviti da ESL1 produkti imaju protektivni efekat kada je reč o inflamaciji i da taj efekat mogu da ostvare delujući na makrofage, tako što suprimiraju produkciju pro-inflamatornih medijatora NO i IL-6. To bi mogao biti jedan od mehanizama koji leže u osnovi ublažavanja inflamacije indukovane infekcijom *T. spiralis*, kao i ublažavanja inflamatornih oboljenja u animalnim modelima, kao posledice prethodne infekcije *T. spiralis*. Citokin IL-6 se proizvodi na mestu inflamacije i ima ključnu ulogu u aktivaciji sinteze proteina akutne faze. Zajedno sa solubilnim receptorom sIL-6R α , indukuje prelazak iz akutne u hroničnu inflamaciju promenom tipa infiltrata leukocita (od polimorfonuklearnih neutrofila do monocita/makrofaga). Takođe, ovaj citokin pokazuje stimulatorne efekte na T i B ćelije i favorizuje hroničan inflamatorni odgovor (Gabay, 2006), što se može videti u infekciji nekim helmintima kao što je *S. mansoni* (Angeli i saradnici, 2001).

Sa druge strane, ESL1 je indukovao snažno oslobađanje citokina IL-10 od strane makrofaga. Ove ćelije su važan izvor IL-10, ali i target ćelije za ovaj citokin (Saraiva i saradnici, 2010). AAMF, putem IL-10 podržavaju diferencijaciju naivnih T ćelija ka

Th2 (Allen i Loke, 2001) ili inhibiraju Th1 odgovor (Allen i saradnici, 1996; Goodridge i saradnici, 2001). Ovaj citokin ima i autokrino dejstvo, tako što inhibira produkciju NO, povećava aktivnost arginaze (Allen i Loke, 2001) i suprimira produkciju pro-inflamatornih citokina od strane makrofaga (Terrazas i saradnici, 2001). Oko mišićnih ćelija inficiranih *T. spiralis* nađen je veliki broj makrofaga i visoka koncentracija IL-10, što može uticati na ćelijsku infiltraciju, koju uglavnom čine CD11b⁺ ali i MHCII⁺ i CD45⁺ ćelije dok je broj CD4⁺, CD8⁺ i B220⁺ ćelija mali. U miševima kojima je izbačen gen za IL-10, broj infiltrata ćelija imunskog sistema je drastično smanjen u poređenju sa normalnim miševima (Beiting i saradnici, 2004). Očigledno je da ESL1 može da moduliše ravnotežu između anti-inflamatornih i pro-inflamatornih citokina promenom aktivnosti makrofaga.

NO je takođe važan medijator citotoksičnosti i pokazano je da ima mikrobicidno, anti-virusno, anti-parazitisko i anti-tumorsko dejstvo. U makrofagima, produkcija NO je posredovana enzimom inducibilnom azot-oksid sintazom (iNOS) čija je transkripcija indukovana u odgovoru na LPS, TNF- α , IFN- γ i IL-1 β (Dzik, 2014). Zapaženo je da NO ima važnu ulogu u indukovanju intestinalne fiziološke funkcije i inflamacije tokom infekcije *T. spiralis*. Niska produkcija NO od strane makrofaga koji su bili pod uticajem ESL1, može biti posledica povećane koncentracije IL-10, kao i supresivnog delovanja ESL1 na transkripciju iNOS preko IL-4R α /Stat6 signalnog puta. Ranije je pokazano da infekcija *T. spiralis* inhibira ekspresiju izoforme NOS (NOS-2) domaćina (Bian i saradnici, 2001) i da je ta inhibicija zavisna od IL-4R α /Stat6. Takođe, makrofagi tretirani supernatantima u kome su gajene mišićne larve *T. spiralis in vitro*, pre aktivacije LPSom, imaju značajno manju ekspresiju NOS-2, što ukazuje da sekretovane supstance parazita imaju inhibitorni efekat na transkripciju ovog enzima (Bian i saradnici, 2005). Regulacija ekspresije iNOS u makrofagima može biti važan mehanizam kojim *T. spiralis* može kontrolisati intestinalnu patologiju i imunski odgovor domaćina i omogućiti preživljavanje u domaćinu.

Kao i u slučaju polarizacije T ćelijskog odgovora, glikani ESL1 produkata igraju značajnu ulogu u indukciji adekvatnog urođenog imunskog odgovora. Naime, rezultati dobijeni primenom ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom pokazuju značajan porast produkcije NO i IL-6 i supresiju produkcije IL-10 od strane peritonealnih makrofaga. Ovi rezultati potvrđuju da su intaktni glikani neophodni za

kreiranje anti-inflamatorne sredine. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima dobijenim na miševima, koji su pokazali da je očuvana struktura glikana solubilnih antigena *T. crassiceps* neophodna za alternativnu aktivaciju makrofaga. U miševima imunizovanim nativnim solubilnim produktima ovog parazita, ekspresija gena za citokine (IL-10 i TGF- β) i markere alternativne aktivacije makrofaga tj. arginazu, Ym1 i manozni receptor je bila povećana, dok je ekspresija markera klasično aktiviranih makrofaga, iNOS, bila znatno smanjena u poređenju sa miševima imunizovanim sa perjodat-tretiranim produktima (Gómez-García i saradnici, 2006). Atochina i saradnici (2008) su demonstrirali važnost šećera u indukciji anti-inflamatornog odgovora. Makrofagi izolovani iz miševa imunizovanih sa lakto-N-fukopentozom (LNFPIII) pokazuju povećanu aktivnost arginaze 1 i Ym1, ali nije detektovana ekspresija inducibilne azot-oksida sintaze (iNOS) i produkcija NO. Pod uticajem LNFPIII, makrofagi pokazuju fenotip alternativno-aktiviranih makrofaga, a adoptivni transfer ovako stimuliranih makrofaga naivnim miševima, indukuje povećan nivo IL-10 i IL-13.

Restimulacija *T. spiralis* senzibilisanih T limfocita (dobijenih iz pacova sa hroničnom infekcijom sa *T. spiralis*) nativnim ili perjodat-tretiranim ESL1 potvrdila je važnost glikana u T ćelijskom odgovoru tokom infekcije *T. spiralis*. Izmenjena ugljenohidratna struktura ESL1 antigena ne umanjuje značajno stepen proliferacije senzibilisanih T limfocita u odnosu na nativni ESL1, što znači da ugljenohidratni deo epitopa nije presudan za njihovu aktivaciju. Ovi rezultati su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u studiji gde je ispitivan značaj ugljenohidratnih komponenti solubilnih produkata *B. malayi*. Restimulacija limfocita (poreklom iz miševa imunizovanih solubilnim produktima *B. malayi*) sa nativnim ili perjodat-tretiranim produktima je pokazala da izmenjena struktura glikana ne utiče na proliferativni odgovor limfocita (Tawill i saradnici, 2004). ESL1 antigeni u kulturi *T. spiralis* senzibilisanih T limfocita stimulišu sekreciju IL-4, IL-10 i IFN- γ . Nasuprot tome, produkcija IL-10 od strane *T. spiralis* senzibilisanih T limfocita pod uticajem pESL1 je bila značajno snižena u odnosu na nivo dobijen restimulacijom sa ESL1, što ukazuje na značaj intaktnih glikana za pokretanje i održavanje anti-inflamatornog odgovora. Nivo sekrecije IL-4 koji se dobija restimulacijom pESL1 veći je čak od nivoa dobijenog pod uticajem nativnog ESL1, što može da znači da su šećeri, prisutni na ESL1, značajni u inicijaciji Th2

odgovora *in vivo*, ali da efektorske T ćelije zadržavaju kapacitet da produkuju IL-4, nezavisno od prisustva ugljenohidratnih struktura na ESL1 antigenima.

U potrazi za komponentama ESL1 koje bi bile odgovorne za pokretanje i održavanje imunskog odgovora karakterističnog za infekciju sa *T. spiralis*, ispitivali smo odgovor *T. spiralis* senzibilisanih T limfocita na restimulaciju 7C2C5Ag (glikoprotein od 45, 49 i 53 kDa) i rTsp53 (rekombinantnim proteinom od 53 kDa). Restimulacija ćelija 7C2C5Ag ili rTsp53 dovela je do jake proliferacije T limfocita, koja je ipak bila niža u poređenju sa ESL1. Može se reći da su ove komponente ESL1 značajne za aktivaciju senzibilisanih T limfocita. Antigeni 7C2C5Ag ili rTsp53 su stimulisali sekreciju citokina IL-4 i IFN- γ skoro na nivou kompletnog ESL1, dok je njihov potencijal da pokrenu sekreciju IL-10 bio nešto niži. Do sada u literaturi nema podataka o ulozi ovih komponenti ESL1 u indukovanju imunskog odgovora. Zna se da antigeni koje smo označili kao 7C2C5 poseduju na sebi imunodominantne epitope koji su značajni za stvaranje protektivnih antitela u serumu inficiranih životinja, koja ih štite od reinfekcije (Appleton i saradnici, 1991). Naši rezultati pokazuju da 7C2C5Ag stimulišu sekreciju IL-4, koji je neophodan za inicijaciju i održavanje Th2 tipa imunskog odgovora. Kada je reč o rTsp53, Du i saradnici (2011, 2014) su pokazali da ovaj rekombinantni protein ima imunomodulatorni potencijal i da može suprimirati kolitis u animalnom modelu, kao i da indukuje alternativnu aktivaciju makrofaga.

Kao što je već naglašeno, centralnu ulogu u pokretanju i polarizaciji imunskog odgovora imaju imaju DĆ, kao profesionalne antigen-prezentujuće ćelije. U zavisnosti od antigena koji prepoznaju, ove ćelije indukuju diferencijaciju naivnih T ćelija u različite T ćelijske subpopulacije. Uloga ESL1 i pojedinih njegovih komponenti u indukovanju imunskog odgovora, kao i značaj glikana prisutnih na ESL1 antigenima za ove procese, ispitan je, iz tog razloga, u kulturi DĆ poreklom iz kostne srži DA pacova. Pod uticajem infektivnih agenasa, pre svega virusa i bakterija, DĆ fenotipski i funkcionalno sazrevaju i nastaju zrele DĆ koje se karakterišu povišenom ekspresijom MHC II i kostimulatornih molekula (CD40, CD80 i CD86) kao i produkcijom pro-inflamatornih citokina i hemokina IL-12, IL-6, IL-23 i TNF (Kapsenberg, 2003). Za razliku od ovog klasičnog modela sazrevanja DĆ, sve veći broj podataka ukazuje da DĆ pod uticajem helmintskih antigena ne sazrevaju na konvencionalni način, već ostaju nezrele ili poprimaju fenotip nepotpuno zrelih ćelija (MacDonald i Maizels, 2008).

Prikazani rezultati jasno pokazuju da DĆ, pod uticajem nativnog ESL1, perijodontom-tretiranog ESL1, kao i pojedinačnih komponenti ESL1, 7C2C5Ag i rTsp53, zadobijaju nepotpuno zreo status.

Ekspresija određenih molekula na površini DĆ, omogućuje ovim ćelijama da izvrše aktivaciju naivnih T limfocita. Naime, DĆ stimulisane molekulima patogena, počinju da eksprimiraju MHC II molekule koji obezbeđuju prvi stimulatorni signal i prezentuju peptide patogena T ćelijama. Takođe, DĆ eksprimiraju kostimulatorne molekule kao što je CD86, koji učestvuju u isporučivanju kostimulatornih signala, a koji su neophodni za polarizaciju T ćelijskog odgovora uključujući i Th2, kao i različite adhezivne molekule, kao što je ICAM-1, koji stabilizuju međusobni kontakt DĆ i naivnih T limfocita i tako doprinose aktivaciji T ćelija (Kapsenberg, 2003; Mikhailkevich i saradnici, 2006; Balkow, 2010; Harris i Ronchese, 1999). Zbog svega navedenog, u ovoj studiji fenotipski profil stimulisanih DĆ je ispitan merenjem ekspresije molekula MHC II, kostimulatornog molekula CD86 i intracelularnog adhezivnog molekula ICAM-1. Pod uticajem bakterijskog LPSa, DĆ sazrevaju u potpunosti, što se ogleda u povišenoj ekspresiji svih ispitivanih markera. Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima dobijenim u brojnim studijama (Grauer i saradnici, 2002; Muthana i saradnici, 2004; Janelidze i saradnici, 2005). Sa druge strane, stimulacija DĆ ESL1 antigenima nije dovela do povećanja ekspresije MHC II, dok je u isto vreme umereno povećala ekspresiju CD86 i značajno povećala ekspresiju ICAM-1. Nepotpuno sazrevanje DĆ pod uticajem ESL1 je u saglasnosti sa rezultatima koji prikazuju uticaj ESL1 na pacovske, mišje i humane DĆ (Ilic i saradnici, 2008; 2011; Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011; Langelaar i saradnici, 2009; Aranzamendi i saradnici, 2012; Sofronic-Milosavljevic i saradnici, 2013). Studije koje su obuhvatale antigene drugih parazita, kao što su *T. crassiceps* (Terrazas i saradnici, 2010), *S. mansoni* (MacDonald i saradnici, 2001; Kuijk i saradnici, 2012) *H. polygyrus* (Segura i saradnici, 2007), *F. hepatica* (Hamilton i saradnici, 2009), *A. suum* (Silva, 2006), *T. suis* (Ebner i saradnici, 2014), takođe su pokazale delimično povećanje ekspresije MHC II i kostimulatornih molekula, a neke čak i odsustvo ekspresije nekih od ovih molekula na DĆ nakon stimulacije parazitskim antigenima.

Polarizacija naivnih T limfocita u određeni tip efektorskih ćelija zahteva pored MHC II, kostimulatornih i adhezivnih molekula i citokine koje proizvode DĆ koji

predstavljaju značajan signal za inicijaciju i regulaciju imunskog odgovora. U zavisnosti od tipa citokina koje proizvode, DĆ polarizuju imunski odgovor ka Th1, Th2 ili regulatornom tipu. Tako, produkcija IL-12 od strane DĆ u odgovoru na bakterijske antigene stimuliše razvoj CD4⁺ Th1 ćelija, dok se citokini IL-10 i TGF-β smatraju važnim citokinima koji omogućavaju polarizaciju imunskog odgovora u Th2 i/ili Treg pravcu (Maldonado-Lopez i saradnici, 2001; Steinman i saradnici, 2003; Kapsenberg, 2003; Valencia-Pacheco i saradnici, 2014). Funkcionalne karakteristike stimulisanih DĆ ispitane su merenjem koncentracije citokina: IL-12p70, IL-10 i TGF-β. Ova studija je pokazala da DĆ stimulisane ESL1 antigenima, pored toga što pokazuju nepotpuno zreo fenotip, imaju nisku produkciju IL-12p70 i visoku produkciju IL-10 i TGF-β. Ovi rezultati su u skladu sa objavljenim rezultatima da ESL1 indukuje tolerogene karakteristike DĆ, pa tako stimulisane DĆ nakon primene mogu da indukuju Th2 i Treg odgovor *in vitro* ili *in vivo* u intaktnim pacovima (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Naši rezultati su u saglasnosti i sa studijama gde su ispitani uticaji drugih helmintskih antigena na DĆ, kao što su SEA *S. mansoni* (Kane i saradnici, 2004), ekskretorno-sekretorni produkti *T. crassiceps* (Terrazas i saradnici, 2011), solubilni produkti *T. suis* (Klaver i saradnici, 2013), kao i antigeni tegumenta *F. hepatica* (Hamilton i saradnici, 2009).

IL-10 i TGF-β proizvodjeni od strane DĆ mogu biti supresori produkcije pro-inflamatornih citokina, kontrolisanjem Th1/Th17 ćelija (Pulendran i saradnici, 2010) ili inhibicijom oslobađanja IL-12 (Corinti i saradnici, 2001). Oba citokina su važna u promovisanju Th2 i regulatornog imunskog odgovora (Steinman i saradnici, 2003; Maldonado-Lopez i saradnici, 2001) koji kontrolišu prekomernu inflamaciju i kreiraju nepovoljno okruženje za razvoj autoimunskih oboljenja. IL-12 predstavlja vezu između urođene i adaptivne imunosti, budući da je medijator ranog urođenog imunskog odgovora i da utiče na diferenciranje Th1 efektorskih ćelija ćelijske imunosti (Yilmaz i saradnici, 2005). U našem eksperimentu povećana produkcija IL-10 i TGF-β i smanjena produkcija IL-12p70 od strane DĆ stimulisanih ESL1 antigenima, ukazuje da su DĆ aktivirane u pravcu koji će dalje usmeriti imunski odgovor ka Th2 i/ili Treg tipu. Nizak nivo produkcije IL-12p70 u ovoj studiji je verovatno posledica povećane produkcije citokina IL-10 i TGF-β. U prilog tome govore podaci studije autora Du i Sriram (1998) koji su pokazali da IL-10 i TGF-β suprimiraju produkciju IL-12, inhibiranjem

transkripcije IL-12p40 gena kao i studije koje su pokazale da IL-10 i IL-12 imaju različite efekte na polarizaciju CD4⁺ T limfocita i da je njihova produkcija od strane DĆ recipročno regulisana (Xia i Kao, 2003; Muthana i saradnici, 2006).

Narušavanje ugljenohidratne strukture ESL1 antigena dovelo je, posle njegove primene *in vivo*, do poremećaja u produkciji Th2 citokina IL-4 i anti-inflamatornog citokina IL-10. Zbog toga smo ispitivali na koje mehanizme imunskog odgovora utiču ugljenohidratne komponente nativnog ESL1. Iako hemijska promena ugljenohidratne strukture perijodatnim tretmanom nije uticala na ekspresiju MHC II, CD86 i ICAM-1 na DĆ, smanjila je produkciju citokina IL-12p70 i IL-10 u odnosu na DĆ tretirane nativnim antigenom. Produkcija TGF- β je ostala nepromenjena u poređenju sa DĆ tretiranim ESL1. Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa drugim studijama koje su opisale uticaj glikana helmintskih antigena na citokinski profil DĆ. Pokazano je da je modulacija citokinske produkcije DĆ primarno posredovana glikanima prisutnim na ES-62 *A. viteae* (Harnett i saradnici, 2009). Drugi istraživači su pokazali da hemijski izmenjeni glikani ES produkta *T. crassiceps*, za razliku od nativnih produkata, ne mogu da modulišu aktivnost DĆ (Terrazas i saradnici, 2010), dok su Klaver i saradnici (2013) ukazali na važnost glikana solubilnih produkata *T. suis* za modulaciju funkcije DĆ i suprimiranje pro-inflamatornog fenotipa ovih ćelija. Razlika u citokinskom profilu DĆ stimulisanih ESL1 i pESL1 daje mesta za pretpostavku da u interakciji ESL1 antigena i DĆ učestvuju i njihove ugljenohidratne rezidue i da bi ta interakcija mogla da se odvija preko lektinskih receptora C-tipa (CLR). CLR na DĆ prepoznaju ugljenohidratne strukture različitih patogena, učestvuju u njihovoj internalizaciji, degradaciji, prezentaciji i vode aktivaciji signalne kaskade, koja pak dovodi do aktivacije DĆ i sledstvene polarizacije T ćelijskog odgovora (Geijtenbeek i Gringhuis, 2009). Ovi receptori aktiviraju DĆ indukovanjem genske ekspresije nezavisno od drugih PRR ili modulacijom TLR indukovane genske ekspresije na transkripcionom ili posttranskripcionom nivou (Rogers i saradnici, 2005; Sato i saradnici, 2006; Gringhuis i saradnici, 2007; Meyer-Wentru i saradnici, 2009). Interakcija ESL1 antigena *T. spiralis* i CLR nije dovoljno poznata. U ranijim studijama je pokazano da ESL1 interaguje sa peritonealnim makrofagima *in vitro* i da ova interakcija zahteva angažovanje manoznog receptora (MR) (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2006), dok hemijska modifikacija šećera sprečava vezivanje antigena *T. spiralis* za MR. Takođe, naši preliminarni

rezultati ukazuju da ESL1 može da se veže za DC-SIGN. Međutim, posledice interakcije ovih receptora sa ESL1 još uvek nisu istražene. Poznato je da aktivacija MR ili DC-SIGN rezultuje u nemogućnosti DĆ da produkuje IL-12 u odgovoru na TLR ligande (Nigou i saradnici, 2001), kao i da angažovanje receptora DC-SIGN vodi povećanoj produkciji IL-10 (Geijtenbeck i saradnici, 2003). Druge studije, takođe opisuju da glikani helmintskih antigena (SEA, antigeni *T. canis*, ES produkti *T. crassiceps*) preko interakcije sa pojedinim CLR, kao što su DC-SIGN, MR, MGL, usmeravaju odgovor prema Th2 (van Liempt i saradnici, 2007; Schabussova i saradnici, 2007; van Stijn i saradnici, 2010; Terrazas i saradnici, 2013), dok ES produkti *T. suis* suprimiraju maturaciju humanih DĆ i produkciju pro-inflamatornih citokina i hemokina vezivanjem glikana za lektinske receptore C-tipa (Klaver, 2013).

U ovoj studiji ispitano je i učešće pojedinih komponenti složene smeše ESL1 produkata u pokretanju imunskog odgovora koji prati infekciju sa *T. spiralis*, praćen je uticaj 7C2C5Ag, koje čine glikoproteini molekulske mase 45, 49 i 53 kDa i rTsp53, rekombinantnog proteina molekulske mase 53 kDa, na sazrevanje DĆ. Rezultati su pokazali da stepen ekspresije površinskih markera MHC II, CD86 i ICAM-1, pod uticajem 7C2C5Ag i rTsp53 odgovara stepenu ekspresije na DĆ stimulisanim ESL1 antigenima. Analiziranjem citokinskog profila uočeno je da DĆ stimulisane 7C2C5Ag i rTsp53 produkuju isti nivo citokina IL-10 i IL-12p70 kao i DĆ tretirane ESL1 antigenima, što ukazuje da ispitivani antigeni uzimaju značajno učešće u ukupnom efektu koji proizvodi ESL1 na DĆ. Du i saradnici (2014) su opisali da rTsp53 stimuliše povećanu produkciju IL-10 i smanjenu produkciju IL-12 od strane makrofaga i da bi samim tim ovaj molekul mogao da ima anti-inflamatorni potencijal. Treba, međutim, istaći da rekombinantni p53 nije glikozilovan, tako da je, za razliku od drugih antigena iz grupe TSL1, čija je antigenost uslovljena prisustvom šećera taveloze u sastavu epitopa, njegova antigenost je posledica proteinskih epitopa (Perteguer, 2004). Uticaj 7C2C5Ag i rTsp53 na produkciju TGF- β od strane DĆ je suprotan. Dok je 7C2C5Ag stimulisao izuzetno visoku produkciju ovog citokina, čak i u odnosu na ESL1, rTsp53 nije imao uticaja na produkciju TGF- β , nivo produkcije je odgovarao negativnoj kontroli. Ako uzmemo u obzir i podatak da glikani nemaju značaj za produkciju TGF- β , možemo da pretpostavimo da su za produkciju ovog citokina odgovorne obe ili jedna od proteinskih komponenti glikoproteina p45 i p49 u okviru tripleta 7C2C5Ag. Ovo

naravno ne isključuje potencijalni značaj drugih proteinskih komponenti u okviru ESL1. U literaturi je poznato da retinoinska kiselina, faktor rasta fibroblasta-2 (FGF-2), proteaze uključujući plazmin, matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9, mogu biti aktivatori TGF- β (Kubiczkova i saradnici, 2012).

Aktivacioni status D \acute{C} se ogleda u njihovoj sposobnosti da prezentuju antigene T limfocitima i da indukuju produkciju citokina, koji su važni činiooci u regulaciji imunskog odgovora na infektivne agense. Zbog toga smo u daljem istraživanju, primenom testa polifracije, ispitali prvo kapacitet D \acute{C} da prezentuju antigene, ESL1, pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53, naivnim T limfocitima. Pokazan je značajan potencijal D \acute{C} da prezentuju ESL1 antigene naivnim T ćelijama, što je u skladu sa ranijim istraživanjima vezanim za ESL1 antigene *T. spiralis* (Ilic i saradnici, 2011; Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011) kao i za antigene drugih parazita kao što su *S. mansoni* (Agrawal i saradnici, 2003), *L. brasiliensis* i *L. major* (Shaw i saradnici, 2002; Carvalho i saradnici, 2008; Wiethe i saradnici, 2008), u kojima su D \acute{C} bile nepotpuno zrele, ali su ipak, kao i u našoj studiji, izazvale značajnu proliferaciju specifičnih i naivnih singenih T limfocita. Ćelije koje su bile stimulisane sa pESL1 zadržale su kapacitet da prezentuju antigene naivnim singenim T limfocitima, ali je on manji u odnosu na D \acute{C} stimulisane nativnim ESL1 antigenima, što ukazuje na značaj glikana za indukciju proliferacije naivnih T ćelija posredstvom D \acute{C} . Takođe, zabeležen je statistički značajan proliferativni odgovor T ćelija indukovanih D \acute{C} stimulisanim 7C2C5Ag i rTsp53, ali je ipak odgovor bio statistički značajno niži u odnosu na odgovor indukovanih sa D \acute{C} /ESL1. Dobijeni podaci pokazuju da su za indukovanje jakog proliferativnog odgovora važne i druge komponente ESL1 antigena.

Ispitivanje uticaja ESL1 antigena na polarizaciju imunskog odgovora posredstvom D \acute{C} u *in vitro* uslovima, pokazalo je da za razliku od D \acute{C} stimulisanih LPSom, koje indukuju povećanu koncentraciju IFN- γ i smanjenu produkciju IL-4, IL-10, TGF- β , D \acute{C} nakon edukacije ESL1 antigenima, stimulišu povećanu produkciju IL-4, IL-10, TGF- β i smanjenu produkciju pro-inflamatornog citokina IFN- γ od strane naivnih singenih T limfocita. IL-4 se smatra ključnim citokinom Th2 imunskog odgovora (Raphael i saradnici, 2014), dok produkcija IL-10, iako može biti pripisana i Th2 ćelijama, obično vodi poreklo, kao i TGF- β , od Treg ćelija (Jangpataraponsa i saradnici, 2008; Travis i Sheppard, 2014). Dobijeni rezultati govore u prilog uticaja

ESL1 na polarizaciju T ćelijskog odgovora u pravcu Th2/Treg tipa u *in vitro* uslovima, što je u skladu sa ranije opisanim *in vivo* eksperimentom. Ovi rezultati su potvrda prethodno dobijenih podataka o uticaju DĆ stimulisanih ESL1 antigenom na polarizaciju naivnih T limfocita (Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011; Ilic i saradnici, 2012). Drugi autori su takođe opisali efekte različitih helmintskih antigena na polarizaciju imunskog odgovora. DĆ stimulisane ES produktima *T. crassiceps* ili ES-62 antigenom *A. viteae*, iako nepotpuno zrele, izazivaju povećanu produkciju IL-4, a smanjenu produkciju IFN- γ od strane T limfocita, sa kojima su ko-kultivisane (Whelan i saradnici, 2000; Terrazas i saradnici, 2013).

T ćelije ko-kultivisane *in vitro* sa DĆ/pESL1 imale su sličan trend produkcije ispitivanih citokina IL-4, IL-10, TGF- β i IFN- γ , kao i ko-kulture sa DĆ/ESL1, ali je intenzitet produkcije bio izmenjen. Promena ugljenohidratne strukture nije uticala na produkciju IL-4, tj. nije postojala statistički značajna razlika u produkciji IL-4 od strane T ćelija ko-kultivisanih sa DĆ/pESL1 i DĆ/ESL1. Međutim, narušavanje ugljenohidratne strukture umanjilo je potencijal ESL1 da polariše odgovor T ćelija u anti-inflamatornom i regulatornom pravcu. Naime, T ćelije ko-kultivisane sa DĆ/pESL1 produkovale su značajno niži nivo IL-10 u odnosu na ko-kulture sa DĆ/ESL1, iako je produkcija značajno prevazilazila kontrole. Međutim, DĆ/pESL1 nisu imale kapacitet da pokrenu sintezu TGF- β , njegova koncentracija u kulturi je bila skoro na nivou kontrole. DĆ/pESL1 su dovele do smanjenja produkcije IFN- γ u odnosu na DĆ/LPS, ali nivo ovog citokina nije bio toliko smanjen kao u slučaju ESL1. Na osnovu *in vitro* dobijenih rezultata može se zaključiti da su glikani na ESL1 važni za supresiju produkcije Th1 citokina IFN- γ . S obzirom da je pESL1 indukovao produkciju IL-4 na istom nivou kao i ESL1, može se zaključiti da glikani ESL1 nemaju važnu ulogu u indukovanju produkcije citokina IL-4 od strane T ćelija *in vitro*. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima koji su dobijeni *in vivo*, gde je pokazano da je produkcija IL-4 zavisna od prisustva intaktnih glikana na ESL1 antigenima. Moguće je da glikani *T. spiralis* indukuju Th2 imunski odgovor *in vivo* mehanizmima koji regrutuju i druge ćelije imunskog sistema i da primarni izvor IL-4 nisu T ćelije, već mast ćelije, bazofili i eozinofili (Falcone i saradnici, 1996; Sabin i saradnici, 1996; Niborski i saradnici, 2004). Ove ćelije verovatno imaju receptore kojima vezuju ESL1 antigene i za čiju interakciju je neophodno prisustvo šećernih struktura na ESL1 antigenima. Mnoge

studije su već pokazale značaj ugljenohidratnih struktura ekskretorno-sekretornih produkata helminata u indukovanju Th2 i anti-inflamatornog odgovora (Harn i saradnici, 2009). Lakto-N-fukopentoza III, šećer prisutan kod *S. mansoni*, preko DĆ indukuje Th2 citokinski odgovor koji se karakteriše pojačanom produkcijom IL-4 i smanjenom produkcijom IFN- γ (Thomas i saradnici, 2003). Posredstvom DĆ, glikani ES produkta helminta *T. crassiceps* su neophodni za polarizaciju Th2 ćelija koje dalje proizvode sniženu koncentraciju IFN- γ i povećanu produkciju IL-4 (Terrazas, 2010).

Dalja istraživanja obuhvatila su ispitivanje citokinskog profila T limfocita stimuliranih DĆ edukovanim pojedinim komponentama ESL1 antigena tj. 7C2C5Ag i rTsp53. Naši rezultati pokazuju da obe komponente, kao i ESL1, posredstvom DĆ kod naivnih T limfocita izazivaju sniženu produkciju IFN- γ i povećanu produkciju IL-4 i IL-10. Za razliku od DĆ/7C2C5Ag, koje nisu indukovale povećanu produkciju regulatornog citokina TGF- β , DĆ/rTsp53 su indukovale povećanu koncentraciju ovog citokina od strane T limfocita. Ovi rezultati ističu da 7C2C5Ag i rTsp53 imaju potencijal, kao i kompletni ESL1 antigen, da posredstvom DĆ usmere T ćelijski odgovor ka Th2 i anti-inflamatornom tipu, a da samo rTsp53, u datim uslovima, poseduje kapacitet da izvrši polarizaciju u pravcu Treg. Kako je pokazano ovom studijom da produkcija TGF- β nije zavisna od prisustva glikana, to se može spekulirati da su za indukciju ovog tipa citokinskog odgovora bitnije proteinske komponente ESL1. Everts i saradnici (2012) su opisali da je jedan od antigena koji se nalazi u sastavu SEA *S. mansoni*, omega-1, glikozilovana T2 ribonukleaza, odgovorna za Th2 polarizaciju, ali je pored glikana neophodna i proteinska komponenta koja ima RNKaznu aktivnost. Povećana produkcija IL-4 i IL-10 je primećena i nakon primene rTsp53 miševima kojima je indukovana kolitis (Du i saradnici, 2011). Mehanizam koji se nalazi u osnovi ovog odgovora je nepoznat, ali s obzirom da smo pokazali da rTsp53 antigen suprimira produkciju pro-inflamatornog citokina IL-12p70 i povećava produkciju regulatornog citokina IL-10 u stimuliranim DĆ, može se pretpostaviti da je nakon interakcije DĆ i naivnih T limfocita, ovakav citokinski profil DĆ odgovoran za polarizaciju T ćelija u pravcu Th2/Treg tipa.

DĆ eksprimiraju veliki broj različitih receptora za molekulske obrasce kojima ove ćelije prepoznaju različite patogene i iniciraju odgovarajući adaptivni imunski odgovor. DĆ eksprimiraju receptore slične Toll proteinu (TLR) i receptore slične NOD-

u (NLR), koji imaju važnu ulogu u detekciji molekularnih obrazaca različitih patogena (Iwasaki i Medznikov, 2004, Akira i Takeda, 2004, Kawai and Akira, 2009). U ovoj studiji ispitana je interakcija različitih TLR i NLR i antigena *T. spiralis* (ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag) da bi se ustanovilo koji receptori učestvuju u prepoznavanju i vezivanju ovih antigena, s obzirom da do sada takvi podaci nisu postojali. Korišćene su transfektovane HEK ćelije koje eksprimiraju pojedinačne receptore. Ova istraživanja su po prvi put pokazala da se ESL1 antigeni vezuju za TLR2 i TLR4 i da je ta interakcija zavisna od prisustva intaktnih ugljenohidratnih struktura. Naime, hemijska modifikacija glikana ESL1 onemogućila je vezivanje ESL1 za TLR2 i TLR4. Komponente ESL1, tj. 7C2C5Ag uspešno prepoznaje i vezuje TLR2, dok interakcija sa TLR4 izostaje. Iz dobijenih rezultata može se izvesti zaključak da ESL1 poseduje komponente koje su ligandi za TLR4, ali da one ne ulaze u sastav 7C2C5Ag. Nije ustanovljena interakcija između ESL1, 7C2C5Ag i pESL1 i ostalih ispitivanih receptora TLR3, TLR5, TLR7, NOD1 i NOD2. Interakcija ESL1 antigena sa receptorima TLR2 i TLR4, ukazuje da ovi PRR mogu da prepoznaju i druge patogene, a ne ekskluzivno mikrobijalne produkte. Zna se, naime, da TLR4 uglavnom vezuje lipopolisaharid ćelijskog zida gram-negativnih bakterija (Poltorak i saradnici, 1998), dok TLR2 vezuje komponente gram-pozitivnih bakterija (peptidoglikane, lipoteihoičnu kiselinu) ili zimosan (Takeuchi i saradnici, 1999; Schwadner i saradnici, 1999; Underhill i saradnici, 1999). Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale interakciju TLR2 ili TLR4 sa drugim helmintskim antigenima. Ekstrakti lipida i lizofosfatidilholin (lyso-PC) helminta *S. mansoni* i lipidi *A. lumbricoides* reaguju sa TLR2 na DĆ i indukuju njihovu diferencijaciju u ćelije koje indukuju Th2 imunski odgovor (van der Kleij i saradnici, 2002; van Riet i saradnici, 2007; Magalhães i saradnici, 2010). Ugljenohidratna komponenta SEA *S. mansoni* lakto-N-fukopentoza (LNFPIII) koja sadrži glikan Lewis^x, kao i glikoprotein ES 62 *A. viteae*, aktiviraju TLR4 receptor i dovode do posledične polarizacije T ćelijskog odgovora ka Th2 (Agwalar i saradnici 2003; Goodridge i saradnici, 2005; Harnett, 2014). Mikrobni i helmintski produkti mogu da angažuju iste TLR, ali i da pokrenu različite nizvodne signalne puteve i da dovedu do polarizacije imunskog odgovora različitog tipa. U odgovoru na LPS, C3H/HeJ miševi (miševi koji imaju tačkastu mutaciju u TIR domenu TLR4) ne odgovaraju produkcijom pro-inflamatornih citokina, dok ne postoji razlika u odgovoru C3H/HeJ miševa i miševa koji

ne nose mutaciju na ES-62, što ukazuje da LPS i ES-62 aktiviraju TLR4 na različite načine (Goodridge i saradnici, 2007). Takođe, smatra se da helmintski molekuli promovišu Th2 ćelijsku diferencijaciju kao posledicu kooperacije TLR i drugih PRR kao što su CLR. Za DC-SIGN receptor je pokazano da moduliše signalni put pokrenut od strane TLR4 i da preko serin-treonin protein kinaze RAF1 fosforiliše subjedinicu p65 NF- κ B (transkripcionog faktora prethodno aktiviranog od strane TLR4) i vodi povećanoj transkripciji gena za IL-10. Ovaj receptor može modifikovati inflamatorni u anti-inflamatorni fenotip DĆ i izmeniti odnos Th1/Th2 (van Vliet i saradnici, 2007; Geijtenbeek i Grinhuis, 2009). Osim DC-SIGN receptora i drugi receptori lektinskog tipa saraduju sa TLR. Skoro je pokazano da sposobnost ES produkata *T. crassiceps* da indukuju Th2 odgovor može biti potpuno blokirana istovremenim inhibiranjem MR, MGL i TLR2 receptora, a da blokiranje pojedinačnih receptora samo smanjuje nivo Th2 citokina, što potvrđuje važnost ovih receptora u modulaciji imunskog odgovora (Terrazas i saradnici, 2013).

Angažovanje receptora za molekulske obrasce sa odgovarajućim strukturama helmintskih molekula pokreće intraćelijske signalne puteve i aktivaciju MAP kinaza, uključujući p38, JNK i ERK1/2. Aktivirane MAP kinaze vode maturaciji DĆ, indukciji produkcije različitih citokina, hemokina i kostimulatornih molekula, što dalje vodi indukciji odgovarajućeg adaptivnog imunskog odgovora (Dong i saradnici, 2002; Arthur i Ley, 2013). Budući da podataka o signalnim putevima pokrenutim interakcijom DĆ i antigena *T. spiralis* nema, a u cilju boljeg razumevanja molekularnih procesa koji bivaju pokrenuti u DĆ nakon susreta sa ESL1 antigenima, u ovoj studiji su ispitani signalni događaji indukovani nativnim ESL1 i perjodat-tretiranim ESL1 antigenom, kao i komponentama ESL1 antigena: 7C2C5Ag i rTsp53. Ova studija je obuhvatila ispitivanje dve efektorske kinaze koje pripadaju MAPK familiji, ERK i p38 kinaze, pošto je poznato da ove kinaze učestvuju u molekularnom programiranju DĆ i oblikovanju imunskog odgovora. Kinaza p38 ima važnu ulogu u sazrevanju DĆ i usmeravanju imunskog odgovora ka Th1, dok aktivacija kinaze ERK ima veći značaj u suprimiranju citokina IL-12 i indukciji ekspresije IL-10, što usmerava DĆ ka tolerogenom fenotipu (Nakahara i saradnici, 2006). U našim eksperimentima, LPS, koji je kao Th1 ligand korišćen kao pozitivna kontrola, indukuje jaku fosforilaciju i ERK1/2 i p38. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (DeFranco i saradnici, 1998;

Xia i saradnici, 2003). ESL1 je indukovao prolaznu fosforilaciju kinaze ERK1/2, pri čemu je intenzitet fosforilacije nakon 30 minuta stimulacije DĆ odgovarao intenzitetu fosforilacije indukovane LPSom. Takođe, ESL1 je doveo da slabe aktivacije kinaze p38. Dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa podacima koji su dobili Bai i saradnici (2012). Naime ovi autori su pokazali da ES produkti *T. spiralis* redukuju LPSom indukovanu fosforilaciju obe kinaze ERK1/2 i p38 u makrofagima poreklom iz miša. Ova razlika se možda može objasniti time da ESL1 koriste različite mehanizme u modulaciji funkcije DĆ i makrofaga. Međutim naši rezultati su u skladu se drugim studijama koje su ispitivale uticaj drugih helmintskih antigena na aktivnost MAP kinaze i pokazale da postoje razlike u signalnim putevima indukovanim helmintskim produktima i signalnim putevima indukovanim mikrobijalnim produktima. Solubilni ekstrakti jaja helminta *S. mansoni* SEA, indukuju jaku fosforilaciju ERKa, slabu fosforilaciju p38, ali ne aktiviraju JNK u humanim dendritskim ćelijama (Agrawal i saradnici, 2003). Neki helmintski molekuli, kao što su LNFPIII *S. mansoni* i glikoprotein ES-62 *A. viteae* interkijom sa TLR4 receptorom jako aktiviraju ERK, slabo aktiviraju ili ne aktiviraju druge dve kinaze p38 i JNK (Thomas i saradnici, 2003; Goodridge i saradnici, 2005; Harnet i Harnet, 2010; Harnet, 2014) što potvrđuje da helmintski molekuli mogu angažovati TLR4, ali na način koji se razlikuje od LPSa.

Nepotpuno fenotipsko sazrevanje DĆ (odsustvo povećane ekspresije MHC II, umereno povećanje ekspresije CD86) pod uticajem ESL1 može se objasniti povećanom aktivacijom ERK1/2 i slabom aktivacijom p38. Pokazano je da ERK i p38 kinaze različito regulišu sazrevanje DĆ i ukazuje da od nivoa njihove aktivacije zavisi i polarizacija naivnih T ćelija ka Th1 ili Th2 fenotipu. Arrighi i saradnici (2001) su opisali da kinaza p38 pozitivno reguliše ekspresiju fenotipskih markera i da preinkubacija DĆ u prisustvu inhibitora p38 kinaze inhibira povećanje ekspresije površinskih molekula (CD40, CD80, CD83, CD86, MHC II i) indukovano TNF- α ili LPSom. Sa druge strane, ERK signalni put negativno reguliše fenotipsko sazrevanje DĆ. Inhibicija ERKa povećava ekspresiju MHC II i kostimulatornih molekula na DĆ indukovanim LPSom (Puig-Kröger i saradnici, 2001).

Citokinski obrazac DĆ indukovano ESL1 se isto može objasniti različitom aktivacijom MAP kinaza, ERK i p38. Inhibicija p38 kinaznog signalnog puta vodi smanjenoj produkciji IL-12p70 od strane DĆ stimuliranih LPSom ili TNF- α (Arrighi i

saradnici, 2001), dok preinkubacija DC sa ERK inhibitorom, pre stimulacije ovih ćelija LPSom, povećava produkciju pro-inflamatornog citokina IL-12 (Puig-Kröger i saradnici, 2001) i suprimira produkciju regulatornog citokina IL-10 (Xia i saradnici, 2003). Pored toga, skoro je pokazana linearna povezanost jačine fosforilacije ERKa i produkcije citokina IL-10 u različitim ćelijskim tipovima (Kaiser i saradnici, 2009). Agrawal i saradnici (2003) su pronašli da helmintski antigen SEA suprimira produkciju IL-12p70 indukovanjem fosforilacije ERKa i povećanjem ekspresije c-Fos (transkripcioni faktor koji pripada AP-1 familiji transkripcionih faktora). Povećana aktivnost ERKa vodi povećanoj fosforilaciji i stabilizaciji transkripcionog faktora c-Fos (Murphy i saradnici, 2002) koji dalje suprimira produkciju IL-12p70 i povećava produkciju IL-10. Sa druge strane, kinaza p38 indukuje jaku ekspresiju IL-12p70 i manju produkciju IL-10 (Dilon i saradnici, 2004; Saraiva i O'Garra, 2010). S obzirom da smo u našim eksperimentima dobili povećanu fosforilaciju ERK i u isto vreme smanjenu produkciju IL-12p70 pod uticajem ESL1, možemo pretpostaviti da postoji povezanost ova dva događaja. Promena ugljenohidratne strukture ESL1 je dovela do smanjenog inteziteta fosforilacije obe kinaze ERK1/2 i p38 u poređenju sa ESL1 antigenom. Ovakva razlika u aktivnosti kinaza može objasniti smanjenu produkciju IL-12p70 i IL-10 od strane DC tretiranih pESL1, kao i činjenicu da pESL1 primenjen *in vivo* nije indukovao Th2/regulatorni tip imunskog odgovora. Dodatno, Thomas i saradnici (2003) su pokazali značaj glikana LNFPIII *S. mansoni* za aktivnost MAP kinaza.

S obzirom da smo pokazali imunomodulatorni potencijal obe komponente ESL1 antigena, 7C2C5Ag i rTsp53, ispitali smo uticaj ovih komponenti na aktivacioni profil MAP kinaza. Oba antigena, 7C2C5Ag i rTsp53, su na sličan način aktivirali ERK i p38, odnosno indukovali su kratkotrajnu aktivaciju ERKa u DC, koja opada 30 minuta nakon tretmana, dok je aktivacija p38 bila niska. Iako obe ispitivane komponente mogu da dovedu do aktivacije MAPK signalnih puteva, njihov potencijal je znatno niži od ESL1. Ovi rezultati su u skladu sa podacima drugih studija gde je pokazano da glikoprotein helminta *A. viteae*, ES-62 stimuliše jaku aktivaciju ERKa i ne aktivira p38 (Goodridge i saradnici, 2005). Povećana produkcija IL-10 i smanjena produkcija IL-12p70 u DC stimulisanim 7C2C5Ag kao i usmeravanje T ćelijskog odgovora ka Th2/Treg tipu može biti posledica povećane aktivnosti ERKa i niske aktivnosti kinaze p38. Pokazano je da

rekombinantni cistatin parazita *Onchocerca volvulus* i *Acanthocheilonema viteae* (AvCistatin) dovodi do kratkotrajne aktivacije ERKa i p38 (Klotz i saradnici, 2011).

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji nesumnjivo su pokazali da sekretorni produkti *T. spiralis* (ESL1) intaktne ugljenohidratne strukture, kao i ispitivane pojedinačne komponente ESL1 mogu u velikoj meri da reprodukuju imunomodulatorne efekte koje ostvaruje infekcija ovim parazitom. Ovi rezultati predstavljaju doprinos definisanju molekula koji učestvuju u kreiranju anti-inflamatorne sredine i koji bi samim tim mogli biti kandidati za nove terapijske pristupe kod autoimunskih bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. Prisustvo intaktnih glikana na ESL1 antigenima *T. spiralis* neophodno je za pokretanje Th2 i anti-inflamatornog imunskog odgovora karakterističnog za hroničnu infekciju *T. spiralis*, dok za polarizaciju ka Th1 i regulatornom tipu imunskog odgovora glikani nemaju značaj.
 - a) Intraperitonealna primena ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom u DA pacove inhibirala je produkciju IL-4 i IL-10 od strane ćelija slezine u poređenju sa efektom nativnog ESL1 i mokESL1 antigena.
 - b) Intraperitonealna primena ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom u DA pacove nije promenila nivo produkcije regulatornog citokina, TGF- β , i pro-inflamatornog citokina, IFN- γ , u poređenju sa efektom ESL1 i mokESL1.
 - c) Intraperitonealna primena ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom u DA pacove nakon 72 sata je inhibirala ekspresiju gena za IL-4 i IL-10 u ćelijama slezine u poređenju sa efektom ESL1 antigen, dok kao i primena nativnog ESL1, nije uticala na ekspresiju gena za TGF- β i IFN- γ .

2. Glikani prisutni na ESL1 antigenima *T. spiralis* su značajni za kreiranje anti-inflamatorne sredine od strane makrofaga, kao komponenti urođenog imunskog odgovora koji se pokreće na infekciju ili primenu produkata parazita. Primena antigena sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom indukovala je pro-inflamatornu aktivnost makrofaga povećanjem produkcije NO i IL-6. S druge strane primena nativnog ESL1 izazvala je suprotan efekat i dovela je do značajnog smanjenja produkcije pro-inflamatornih medijatora, NO i IL-6, i povećanja produkcije anti-inflamatornog, IL-10, od strane peritonealnih makrofaga. Ovo ukazuje da ESL1 delovanjem na makrofage kontrolišu inflamaciju.

3. Intaktni glikani na ESL1 antigenima *T. spiralis* važni su za pokretanje i održavanje anti-inflamatornog odgovora tokom infekcije *T. spiralis*.
 - a) Nativni i ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom indukuju intezivnu proliferaciju T limfocita poreklom iz pacova inficiranih *T. spiralis*.

- b) Nativni ESL1 indukuje povećanu produkciju IL-4, IL-10 i IFN- γ od strane ćelija slezine DA pacova inficiranih *T. spiralis*. S druge strane, ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom indukuje znatno manji nivo IL-10 produkcije od strane tih ćelijama. Ovo ukazuje na značaj glikana za pokretanje i održavanje produkcije ovog citokina. Nivo produkovanog IL-4 od strane tih ćelija je veći od nivoa IL-4 indukovanog nativnim ESL1, što može da znači da su šećeri, prisutni na ESL1, značajni u inicijaciji Th2 odgovora *in vivo*, ali da efektorske T ćelije zadržavaju kapacitet da proizvode IL-4, nezavisno od prisustva ugljenohidratnih struktura na ESL1 antigenima.
4. Ispitivane komponente ESL1 antigena, rTsp53 i 7C2C5Ag, poseduju potencijal da aktiviraju senzibilisane T limfocite, iako ne na nivou nativnog ESL1. Nivo produkcije IL-4 i IFN- γ indukovan ovim antigenima od strane senzibilisanih T ćelija je bio sličan efektu nativnog ESL1, dok im je potencijal da pokrenu produkciju IL-10 bio manji.
5. Stimulacija DĆ antigenima *T. spiralis*: ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag, *in vitro*, dovodi do njihovog nepotpunog sazrevanja.
- a) Navedeni antigeni, ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag indukuju nepotpuno fenotipsko sazrevanje DĆ, okarakterisano značajnim povećanjem ekspresije ICAM-1, blagim povećanjem ekspresije CD86, dok je ekspresija MHC II bila nepromenjena u poređenju sa nestimulisanim DĆ.
- b) Nativni ESL1 je indukovao povećanje produkcije IL-10 i TGF- β i smanjenje IL-12p70 od strane DĆ. U poređenju sa efektom nativnog, ESL1 sa izmenjenom ugljenohidratnom strukturom je smanjio produkciju IL-10 i IL-12p70 od strane DĆ, a nije bilo efekta na produkciju TGF- β .
- c) Komponente ESL1 antigena, rTsp53 i 7C2C5Ag, indukuju produkciju IL-10 i IL-12p70 od strane DĆ kao ESL1, što ukazuje da ovi antigeni učestvuju u efektu nativnog ESL1 na DĆ. rTsp53 nema uticaja na produkciju TGF- β , dok 7C2C5Ag dovodi do statistički značajno povišene produkcije ovog citokina.

6. Stimulisane DĆ antigenima *T. spiralis*, iako nepotpuno zrele, poseduju kapacitet da prezentuju antigene naivnim T limfocitima.
- a) pESL1, 7C2C5Ag i rTsp53 posredstvom DĆ, dovode do značajne proliferacije naivnih T limfocita, ali je proliferativni odgovor T ćelija bio statistički značajno niži u odnosu na proliferativni odgovor T ćelija koji indukuje ESL1 antigen posredstvom DĆ.
 - b) ESL1 antigen posredstvom DĆ indukuje povećanu produkciju IL-4, IL-10 i TGF- β i smanjenu produkciju IFN- γ od strane T limfocita, što govori u prilog uticaja ESL1 na polarizaciju T ćelijskog odgovora u pravcu Th2/Treg tipa u *in vitro* uslovima.
 - c) Promena ugljenohidratne strukture na ESL1 nije uticala na produkciju IL-4 od strane T ćelija ko-kultivisanih *in vitro* sa DĆ/pESL1, koja je bila na nivou produkcije stimulisane sa DĆ/ESL1. Hemijska izmena glikana dovela je do značajnog sniženja produkcije IL-10 u odnosu na DĆ tretirane ESL1 antigenom, iako je ta produkcija značajno prevazilazila kontrole, a onemogućila je pokretanje sinteze TGF- β . Ovi podaci ukazuju na važnost glikana za polarizaciju odgovora T ćelija u anti-inflamatornom i regulatornom pravcu *in vitro*.
 - d) Komponente 7C2C5Ag i rTsp53, kao i ESL1, posredstvom DĆ kod naivnih T limfocita izazivaju sniženu produkciju IFN- γ i povećanu produkciju IL-4 i IL-10. Za razliku od 7C2C5Ag, koji nije indukovao povećanu produkciju regulatornog citokina TGF- β , rTsp53 je indukovao povećanu koncentraciju ovog citokina. 7C2C5Ag i rTsp53, kao i kompletni ESL1 antigen, imaju potencijal da polarizuju T ćelijski odgovor u Th2 i anti-inflamatornom pravcu, a samo rTsp53, u datim uslovima, poseduje kapacitet da izvrši polarizaciju u pravcu Treg.
7. ESL1 antigeni se vezuju za TLR2 i TLR4, što je prvi put pokazano ovim istraživanjima. Takođe je utvrđeno da je ta interakcija zavisna od prisustva intaktnih ugljenohidratnih struktura. 7C2C5Ag se vezuje za TLR2, dok interakcija sa TLR4 izostaje, tako da komponente u okviru ESL1 antigena koje su ligandi za TLR4, ne ulaze u sastav 7C2C5Ag. ESL1, pESL1 i 7C2C5Ag se ne vezuju za TLR3, TLR5, TLR7, NOD1 i NOD2 receptore.

8. ESL1, pESL1, rTsp53 i 7C2C5Ag, dovode do aktivacije MAP kinaza ERK1/2 i p38 u signalnom putu koji biva pokrenut interakcijom DĆ ovim *T. spiralis* antigenima. ESL1 indukuje prolaznu, snažnu fosforilaciju ERK1/2 i slabu fosforilaciju p38, što može biti uzrok fenotipskih i funkcionalnih karakteristika DĆ stimulisanih ESL1. Izmena u ugljenohidratnoj strukturi ESL1 dovodi do slabe aktivaciji obe ispitivane MAP kinaze. Komponente ESL1, 7C2C5Ag i rTsp53, na sličan način aktiviraju ERK i p38, odnosno indukuju, kratkotrajnu aktivaciju ERKa u stimulisanim DĆ i nisku aktivaciju p38. Njihov potencijal da aktiviraju MAPK signalne puteve je ipak znatno niži od nativnog ESL1.

7. LITERATURA

1. Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. and Pulendran, B. (2003). Cutting Edge: Different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *The Journal of Immunology*, 171(10), pp.4984-4989.
2. Akira, S. and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), pp.499-511.
3. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), pp.783-801.
4. Aksoy, E., Zouain, C., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B. and Trottein, F. (2005). Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), pp.277-283.
5. Alexopoulou, L., Holt, A., Medzhitov, R. and Flavell, R. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), pp.732-738.
6. Aliprantis, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428), pp.736-739.
7. Allen, J., Lawrence, R. and Maizels, R. (1996). APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. *Int Immunol*, 8(1), pp.143-151.
8. Allen, J. and Loke, P. (2001). Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol*, 23(7), pp.345-352.
9. Allen, J. and Maizels, R. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), pp.375-388.
10. Anderton, S. and Liblau, R. (2008). Regulatory T cells in the control of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Neurology*, 21(3), pp.248-254.

11. Angeli, V., Faveeuw, C., Delerive, P., Fontaine, J., Barrier, Y., Franchimont, N., Staels, B., Capron, M. and Trottein, F. (2001). *Schistosoma mansoni* induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection. *European journal of immunology*, 31(9), pp.2751-61.
12. Anthony, R., Urban, J., Alem, F., Hamed, H., Rozo, C., Boucher, J., Van Rooijen, N. and Gause, W. (2006). Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med*, 12(8), pp.955-960.
13. Appleton, J., Bell, R., Homan, W. and van Knapen, F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*, 7(8), pp.190-192.
14. Appleton, J. and Romaris, F. (2001). A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Veterinary Parasitology*, 101(3-4), pp.249-260.
15. Aranzamendi, C., Fransen, F., Langelaar, M., Franssen, F., van der Ley, P., van Putten, J., Rutten, V. and Pinelli, E. (2012). *Trichinella spiralis* secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells *in vitro*. *Parasite Immunology*. 34(4), pp. 210-23.
16. Arden, S., Smith, A., Booth, M., Tweedie, S., Gounaris, K. and Selkirk, M. (1997). Identification of serine/threonine protein kinases secreted by *Trichinella spiralis* infective larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1), pp.111-119.
17. Arrighi, J., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. and Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *The Journal of Immunology*, 166(6), pp.3837-3845.
18. Arthur, J. and Ley, S. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(9), pp.679-692.

19. Artis, D., Kane, C., Fiore, J., Zaph, C., Shapira, S., Joyce, K., MacDonald, A., Hunter, C., Scott, P. and Pearce, E. (2005). Dendritic cell-intrinsic expression of NF-kappa B1 is required to promote optimal Th2 cell differentiation. *Journal of immunology*, 174(11), pp.7154-9.
20. Artis, D. (2006). New weapons in the war on worms: Identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *International Journal for Parasitology*, 36(6), pp.723-733.
21. Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J., Bare, O., Auron, P., Stevenson, M. and Calderwood, S. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), pp.15028-15034.
22. Ashour, D. (2013a). *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert review of clinical immunology*, 9(7), pp.669-75.
23. Ashour, D., Othman, A., Shareef, M., Gaballah, H. and Mayah, W. (2013b). Interactions between *Trichinella spiralis* infection and induced colitis in mice. *Journal of Helminthology*, 88(02), pp.210-218.
24. Atochina, O., Da'dara, A., Walker, M. and Harn, D. (2008). The immunomodulatory glycan LNFPIII initiates alternative activation of murine macrophages in vivo. *Immunology*, 125(1), pp.111-121.
25. Bai, X., Wu, X., Wang, X., Guan, Z., Gao, F., Yu, J., Yu, L., Tang, B., Liu, X., Song, Y., Wang, X., Radu, B., Boireau, P., Wang, F. and Liu, M. (2012). Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro. *Mol Cell Biochem*, 360(1-2), pp.79-88.
26. Balic, A., Harcus, Y., Holland, M. and Maizels, R. (2004). Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *European Journal of Immunology*, 34(11), pp.3047-3059.
27. Balkow, S., Heinz, S., Schmidbauer, P., Kolanus, W., Holzmann, B., Grabbe, S. and Laschinger, M. (2010). LFA-1 activity state on dendritic cells regulates

- contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood*, 116(11), pp.1885-1894.
28. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18(1), pp.767-811.
 29. Beiting, D., Bliss, S., Schlafer, D., Roberts, V. and Appleton, J. (2004). Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 72(6), pp.3129-3137.
 30. Beiting, D., Gagliardo, L., Hesse, M., Bliss, S., Meskill, D. and Appleton, J. (2007). Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T Cells, and TGF-. *The Journal of Immunology*, 178(2), pp.1039-1047.
 31. Benzel, F., Erdur, H., Kohler, S., Frentsch, M., Thiel, A., Harms, L., Wandinger, K. and Rosche, B. (2012). Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of helminthology*, 86(3), pp. 339-47.
 32. Beutler, B. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood*, 113(7), pp.1399-1407.
 33. Bian, K., Harari, Y., Zhong, M., Lai, M., Castro, G., Weisbrodt, N. and Murad, F. (2001). Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase (NOS-2) during parasite-induced gut inflammation: a path to identify a selective NOS-2 inhibitor. *Molecular pharmacology*, 59(4), pp.939-47.
 34. Bian, K., Zhong, M., Harari, Y., Lai, M., Weisbrodt, N. and Murad, F. (2005). Helminth regulation of host IL-4Ralpha/Stat6 signaling: Mechanism underlying NOS-2 inhibition by *Trichinella spiralis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), pp.3936-3941.
 35. Bien, J., Näreaho, A., Varmanen, P., Gozdzik, K., Moskwa, B., Cabaj, W., Nyman, T. and Savijoki, K. (2012). Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional difference gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteome Sci*, 10(1), p.10.

36. Boireau, P., Vayssier, M., Fabien, J., Perret, C., Calamel, M. and Soule, C. (1997). Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology*, 115(6), pp.641-651.
37. Bolás-Fernandez, F. and Corral Bezara, L. (2006). TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science*, 81(3), pp.297-303.
38. Brière, F., Bendriss-Vermare, N., Delale, T., Burg, S., Corbet, C., Rissoan, M., Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M., Trinchieri, G. and Bates, E. (2002). Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*, 63(12), pp.1081-1093.
39. Brissette-Storkus, C., Kettel, J., Whitham, T., Giezeman-Smits, K., Villa, L., Potter, D. and Chambers, W. (2002). Flt-3 ligand (FL) drives differentiation of rat bone marrow-derived dendritic cells expressing OX62 and/or CD161 (NKR-P1). *Journal of leukocyte biology*, 71(6), pp. 941-9.
40. Bruce, A. and Gounaris, K. (2006). Characterisation of a secreted N-acetyl-beta-hexosaminidase from *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1), pp.84-93.
41. Bruschi, F., Carulli, B., Azzarà, A., Homan, W., Minnucci, S., Rizzuti-Gullaci, A., Sbrana, S. and Angiolini, C. (2000). Inhibitory effects of human neutrophil functions by the 45-kD glycoprotein derived from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 122(1), pp.58-65.
42. Bruschi, F. (2002). The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders*, 2(3), pp.269-280.
43. Bruschi, F. and Chiumiento, L. (2011). *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy?. *Parasites & Vectors*, 4(1), p.42.

44. Bruschi, F. and Chiumiento, L. (2012). Immunomodulation in Trichinellosis: Does *Trichinella* really escape the host immune system?. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 12(1), pp.4-15.
45. Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K., Equils, O., Morrison, S., Morrison, R. and Arditi, M. (2002). Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 168(3), pp.1435-1440.
46. Calandra, T. and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(10), pp.791-800.
47. Cambi, A., Koopman, M. and Figdor, C. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cellular Microbiology*, 7(4), pp.481-488.
48. Carvalho, L., Pearce, E. and Scott, P. (2008). Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. *The Journal of Immunology*, 181(9), pp.6473-6480.
49. Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M., Foster, S., Mak, T., Nuñez, G. and Inohara, N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, 4(7), pp.702-707.
50. Chang, L. and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), pp.37-40.
51. Chang, J., Kunkel, S. and Chang, C. (2009). Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), pp.18327-18332.
52. Chiffoleau, E., Kobayashi, T., Walsh, M., King, C., Walsh, P., Hancock, W., Choi, Y. and Turka, L. (2003). TNF receptor-associated factor 6 deficiency during hemopoiesis induces Th2-polarized inflammatory disease. *The Journal of*

- Immunology*, 171(11), pp.5751-5759.
53. Cho, M., Park, M., Kang, S., Choi, S., Ahn, S. and Yu, H. (2012). *Trichinella spiralis* infection suppressed gut inflammation with CD4 + CD25 + Foxp3 + T cell recruitment. *Korean J Parasitol*, 50(4), pp.385-390.
 54. Coelho, P., Klein, A., Talvani, A., Coutinho, S., Takeuchi, O., Akira, S., Silva, J., Canizzaro, H., Gazzinelli, R. and Teixeira, M. (2002). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce *in vivo* leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(5), pp.837-44.
 55. Cooke, A. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: How might infection modulate the onset of type 1 diabetes?. *Immunology*, 126(1), pp.12-17.
 56. Cooper, P. (2009). Interactions between helminth parasites and allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(1), pp.29-37.
 57. Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S. and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *The Journal of Immunology*, 166(7), pp.4312-4318.
 58. de Silva, N., Brooker, S., Hotez, P., Montresor, A., Engels, D. and Savioli, L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology*, 19(12), pp.547-551.
 59. Dea-Ayuela, M. and Bolas-Fernández, F. (1999). *Trichinella* antigens: a review. *Veterinary Research*, 30(6), pp.559-71.
 60. Debouverie, M., Pittion-Vouyovitch, S., Louis, S. and Guillemin, F. (2008). Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. *European Journal of Neurology*, 15(9), pp.916-921.
 61. DeFranco, A., Crowley, M., Finn, A., Hambleton, J. and Weinstein, S. (1998). The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Progress in clinical and biological research*, 397, pp. 119-36.

62. Despommier, D., Gold, A., Buck, S., Capo, V. and Silberstein, D. (1990). *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Experimental Parasitology*, 71(1), pp.27-38.
63. Despommier, D.D. (1997) in *Trichinellosis* (Ortega-Pierres, G. et al. eds), Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis. Centro de Investigacione y de Estudios Avanzados IPN, pp. 157–160, Mexico D. F., Mexico.
64. Despommier, D. (1998). How does *Trichinella spiralis* make itself at home?. *Parasitology Today*, 14(8), pp.318-323.
65. Despommier, D., Gwadz, R.G., Hotez, P. and Knirsch, C. (2005). *Trichinella spiralis* Parasitic diseases. NY: AppleTrees Productions L.L.C. 135-42.
66. Dhanda, S., Gupta, S., Vir, P. and Raghava, G. (2013). Prediction of IL4 inducing peptides. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, pp.1-9.
67. Di Lorenzo, G., Mansueto, P., Pacor, M., Rizzo, M., Castello, F., Martinelli, N., Ditta, V., Lo Bianco, C., Leto-Barone, M., D'Alcamo, A., Di Fede, G., Rini, G. and Ditto, A. (2009). Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), pp.1103-1110.e4.
68. Diebold, S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis, E. and Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), pp.1529-1531.
69. Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S. and Pulendran, B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 172(8), pp.4733-4743.
70. Dong, C., Davis, R. and Flavell, R. (2002). Map kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology*, 20(1), pp.55-72.

71. Donnelly, S., O'Neill, S., Sekiya, M., Mulcahy, G. and Dalton, J. (2005). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and immunity*, 73(1), pp.166-173.
72. Du, C. and Sriram, S. (1998). Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *Journal of leukocyte biology*, 64(1), pp.92-7.
73. Du, L., Tang, H., Ma, Z., Xu, J., Gao, W., Chen, J., Gan, W., Zhang, Z., Yu, X., Zhou, X. and Hu, X. (2011). The Protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci*, 56(10), pp.2810-2817.
74. Du, L., Wei, H., Li, L., Shan, H., Yu, Y., Wang, Y. and Zhang, G. (2014). Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53-kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4Ra *in vitro*. *Cellular Immunology*, 288(1-2), pp.1-7.
75. Dzik, J., Golos, B., Jagielska, E., Zielinski, Z. and Walajtys-Rode, E. (2004). A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*, 26(4), pp.197-205.
76. Dzik, J. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta biochimica Polonica*, 53(1), pp.33-64.
77. Dzik, J. (2014). Evolutionary roots of arginase expression and regulation. *Frontiers in Immunology*, 5, pp. 544.
78. Ebner, F., Hepworth, M., Rausch, S., Janek, K., Niewianda, A., Köhl, A., Henklein, P., Lucius, R., Hamelmann, E. and Hartmann, S. (2014). Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm *Trichuris suis* in allergic disease. *Allergy*, 69(11), pp.1489-1497.
79. Elliott DE, D., Li, J., Blum, A., Metwali, A., Qadir, K., Urban, J. and Weinstock, J. (2003). Exposure to *Schistosoma* eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 84(3), pp.G385-91.

80. Ellis, L., Reason, A., Morris, H., Dell, A., Iglesias, R., Ubeira, F. and Appleton, J. (1994). Glycans as targets for monoclonal antibodies that protect rats against *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*, 4(5), pp.585-592.
81. Ellis, L., McVay, C., Probert, M., Zhang, J., Bundle, D. and Appleton, J. (1997). Terminal beta-linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiology*, 7(3), pp.383-390.
82. Everts, B., Hussaarts, L., Driessen, N., Meevissen, M., Schramm, G., van der Ham, A., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., Pearce, E., Hokke, C., Haas, H., Smits, H. and Yazdanbakhsh, M. (2012). *Schistosoma*-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 209(10), pp.1753-1767.
83. Fabre, M., Beiting, D., Bliss, S. and Appleton, J. (2009a). Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Veterinary Parasitology*, 159(3-4), pp.245-8.
84. Fabre, V., Beiting, D., Bliss, S., Gebreselassie, N., Gagliardo, L., Lee, N., Lee, J. and Appleton, J. (2009b). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *The Journal of Immunology*, 182(3), pp.1577-1583.
85. Fabre, M., Beiting, D., Bliss, S. and Appleton, J. (2009c). Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Veterinary Parasitology*, 159(3-4), pp.245-248.
86. Fadilah, S. and Cheong, S. (2007). Dendritic cell immunobiology and potential roles in immunotherapy. *The Malaysian journal of pathology*, 29(1), pp.1-18.
87. Falcone, F., Dahinden, C., Gibbs, B., Noll, T., Amon, U., Hebestreit, H., Abrahamsen, O., Klauke, J., Schlaak, M. and Haas, H. (1996). Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *European Journal of Immunology*, 26(5), pp.1147-1155.
88. Fang, L., Sun, L., Yang, J., Gu, Y., Zhan, B., Huang, J. and Zhu, X. (2014). Heat

- shock protein 70 from *Trichinella spiralis* induces protective immunity in BALB/c mice by activating dendritic cells. *Vaccine*, 32(35), pp. 4412-9.
89. Fleming, J. (2013). Helminth therapy and multiple sclerosis. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), pp.259-274.
 90. Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research & therapy.*, 8 (Suppl 2:), p.S3.
 91. Gamble, H.R. and Graham, C.E. (1984). Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *American journal of veterinary research*, 45(1), pp.67-74.
 92. Geijtenbeek, T., van Vliet, S., Koppel, E., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C., Appelmek, B. and van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), pp.7-17.
 93. Geijtenbeek, T. and Gringhuis, S. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(7), pp.465-479.
 94. Geurts, N., Opdenakker, G. and Van den Steen, P. (2012). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & therapeutics*, 133(3), pp.257-79.
 95. Girardin, S., Boneca, I., Carneiro, L., Antignac, A., Jéhanho, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A., DiStefano, P., Bertin, J., Sansonetti, P. and Philpott, D. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300 (5625), pp.1584-7.
 96. Girardin, S., Boneca, I., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. and Sansonetti, P. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*, 278(11), pp.8869-72.
 97. Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M. and Terrazas, L.

- (2006). Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research*, 99(4), pp.440-448.
98. Gomez-Morales, M., Ludovisi, A., Amati, M., Cherchi, S., Pezzotti, P. and Pozio, E. (2008). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(11), pp.1723-1729.
99. Goodridge, H., Wilson, E., Harnett, W., Campbell, C., Harnett, M. and Liew, F. (2001). Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *The Journal of Immunology*, 167(2), pp.940-945.
100. Goodridge, H., Marshall, F., Else, K., Houston, K., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F., Harnett, W. and Harnett, M. (2005). Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *The Journal of Immunology*, 174(1), pp.284-293.
101. Goodridge, H., McGuinness, S., Houston, K., Egan, C., Al-Riyami, L., Alcocer, M., Harnett, M. and Harnett, W. (2007). Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol*, 29(3), pp.127-137.
102. Gordon, S., Plüddemann, A. and Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*, 262(1), pp.36-55.
103. Grabitzki, J. and Lochnit, G. (2009). Immunomodulation by phosphocholine-Biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Molecular Immunology*, 47(2-3), pp.149-163.
104. Granucci, F., Zanoni, I. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2008). Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), pp.1683-1697.
105. Grauer, O., Wohlleben, G., Seubert, S., Weishaupt, A., Kämpgen, E. and Gold,

- R. (2002). Analysis of maturation states of rat bone marrow-derived dendritic cells using an improved culture technique. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(4), pp.351-362.
106. Gregory, W. and Maizels, R. (2008). Cystatins from filarial parasites: Evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6-7), pp.1389-1398.
107. Grecis, R.K., Riedlinger, J. and Wakelin, D. (1985). L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology*, 56(2), pp. 213-8.
108. Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesely und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12(1), pp.426-428.
109. Gringhuis, S., den Dunnen, J., Litjens, M., van het Hof, B., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- κ B. *Immunity*, 26(5), pp.605-616.
110. Gringhuis, S., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S. and Geijtenbeek, T. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nature Immunology*, 10(2), pp.203-213.
111. Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2002). Lectin blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Parasitology Research*, 88(11), pp.1004-7.
112. Gruden-Movsesijan, A. and Milosavljevic, L. (2006). The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), pp.57-67.
113. Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., Milic, M. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2008). *Trichinella spiralis*:

- Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Experimental Parasitology*, 118(4), pp.641-647.
114. Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., Milic, M. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2010). Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunology*, 32(6), pp.450-459.
115. Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Colic, M., Majstorovic, I., Vasilev, S., Radovic, I. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2011). The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5), pp.429-439.
116. Guiliano, D., Oksov, Y., Lustigman, S., Gounaris, K. and Selkirk, M. (2009). Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology*, 39(5), pp.515-524.
117. Haak, S., Gylveszi, G. and Becher, B. (2009). Th17 cells in autoimmune disease: changing the verdict. *Immunotherapy*, 1(2), pp.199-203.
118. Hajjar, A., O'Mahony, D., Ozinsky, A., Underhill, D., Aderem, A., Klebanoff, S. and Wilson, C. (2001). Cutting edge: functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *The Journal of Immunology*, 166(1), pp.15-19.
119. Hamilton, C., Dowling, D., Loscher, C., Morphew, R., Brophy, P. and O'Neill, S. (2009). The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infection and immunity*, 77(6), pp.2488-2498.
120. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y. and Nagata, S. (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science*, 304(5674), pp.1147-1150.
121. Harn, D., McDonald, J., Atochina, O. and Da'dara, A. (2009). Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunological Reviews*, 230(1), pp.247-257.
122. Harnett, W., McInnes, I. and Harnett, M. (2004). ES-62, a filarial nematode-

- derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunology Letters*, 94(1-2), pp.27-33.
123. Harnett, W. and Harnett, M. (2006). Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunol*, 28(10), pp.535-543.
 124. Harnett, W. and Harnett, M. (2009). Immunomodulatory activity and therapeutic potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. *Adv Exp Med Biol*, 666, pp. 88-94.
 125. Harnett, W. and Harnett, M. (2010). Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill?. *Nature Reviews Immunology*, 10(4), pp.278-284.
 126. Harnett, W. (2014). Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2), pp.130-136.
 127. Harris, N. and Ronchese, F. (1999). The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol*, 77(4), pp.304-311.
 128. Hartmann, S. and Lucius, R. (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International Journal for Parasitology*, 33(11), pp.1291-1302.
 129. Hayashi, F., Smith, K., Ozinsky, A., Hawn, T., Yi, E., Goodlett, D., Eng, J., Akira, S., Underhill, D. and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 410(6832), pp.1099-103.
 130. Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H. and Lipford, G. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European journal of immunology*, 33(11), pp.2987-97.
 131. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663),

pp.1526-1529.

132. Helmbj, H. and Grecis, R. (2003a). Essential role for TLR4 and MyD88 in the development of chronic intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology*, 33(11), pp.2974-2979.
133. Helmbj, H. and Grecis, R. (2003b). Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. *European Journal of Immunology*, 33(9), pp.2382-2390.
134. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), pp.740-5.
135. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88 dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 3(2), pp.196-200.
136. Herbert, D., Höscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P. and Mossman, H. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during Schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20(5), pp.623-635.
137. Herbert, D., Orekov, T., Roloson, A., Ilies, M., Perkins, C., O'Brien, W., Cederbaum, S., Christianson, D., Zimmermann, N., Rothenberg, M. and Finkelman, F. (2010). Arginase I suppresses il-12/il-23p40-driven intestinal inflammation during acute Schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, 184(11), pp.6438-6446.
138. Hernandez, S., Romaris, F., Acosta, I., Gutierrez, P. and Ubeira, F. (1995). Ultrastructural colocalization of phosphorylcholine and a phosphorylcholine-associated epitope in first-stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 81(8), pp.643-650.
139. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR

- Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotechnol*, 11(9), pp.1026-1030.
140. Hirschfeld, M., Weis, J., Toshchakov, V., Salkowski, C., Cody, M., Ward, D., Qureshi, N., Michalek, S. and Vogel, S. (2001). Signaling by Toll-Like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and immunity*, 69(3), pp.1477-1482.
141. Hocke, A., Ermert, M., Althoff, A., Brell, B., Nguessan, P., Suttorp, N. and Ermert, L. (2006). Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL-10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans. *Cytokine*, 33(4), pp.199-211.
142. Huang, L., Gebreselassie, N., Gagliardo, L., Ruyechan, M., Lee, N., Lee, J. and Appleton J. (2014). Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *The Journal of Immunology*, 193(8), pp. 4178-87.
143. Huang, L., Gebreselassie, N., Gagliardo, L., Ruyechan, M., Lee, N., Lee, J. and Appleton J. (2015). Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *The Journal of Immunology*, 194(1), pp. 283-90.
144. Ilic, N., Petrovic, M., Djordjevic, M. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2004). A novel dot blot test for *Trichinella spiralis* antigen detection. *Acta veterinaria*, 54(4), pp.301-310.
145. Ilic, N., Colic, M., Gruden-Movsesijan, A., Majstorovic, I., Vasilev, S. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2008). Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by *Trichinella spiralis* antigens. *Parasite Immunology*, 30(9), pp.491-495.
146. Ilic, N., Worthington, J., Gruden-Movsesijan, A., Travis, M., Sofronic-Milosavljevic, L. and Grecis, R. (2011). *Trichinella spiralis* antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3+ T cells in vitro. *Parasite Immunology*, 33(10), pp.572-582.
147. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase,

- K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S., Moran, A., Fernandez-Luna, J. and Nunez, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), pp.5509-5512.
148. Ishikawa, N., Goyal, P., Mahida, Y., Li, K. and Wakelin, D. (1998). Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology*, 93(2), pp.257-263.
149. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), pp.987-995.
150. Janelidze, S., Enell, K., Visse, E., Darabi, A., Salford, L. and Siesjö, P. (2005). Activation of purified allogeneic CD4+ T cells by rat bone marrow-derived dendritic cells induces concurrent secretion of IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *Immunology Letters*, 101(2), pp.193-201.
151. Jang, J. and Nair, M. (2013). Alternatively activated macrophages revisited: new insights into the regulation of immunity, inflammation and metabolic function following parasite infection. *Current Immunology Reviews*, 9(3), pp.147-156.
152. Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., Hisaeda, H., Troye-Blomberg, M., Cui, L. and Udomsangpetch, R. (2008). *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 38(10), pp.2697-2705.
153. Jasmer, D., Bohnet, S. and Prieur, D. (1991). *Trichinella spp.*: Differential expression of acid phosphatase and myofibrillar proteins in infected muscle cells. *Experimental Parasitology*, 72(3), pp.321-331.
154. Jasmer, D. (1993). *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 121(4), pp.785-793.
155. Jasmer, D. and Kwak, D. (2006). Fusion and differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells that express *Trichinella spiralis* p43 protein. *Experimental*

- Parasitology*, 112(2), pp.67-75.
156. Johnson, G., Brunn, G., Kodaira, Y. and Platt, J. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 168(10), pp.5233-5239.
 157. Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology*, 3(6), pp.499-499.
 158. Kaiser, F., Cook, D., Papoutsopoulou, S., Rajsbaum, R., Wu, X., Yang, H., Grant, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Tschlis, P., Ley, S. and O'Garra, A. (2009). TPL-2 negatively regulates Interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 206(9), pp.1863-1871.
 159. Kane, C., Cervi, L., Sun, J., McKee, A., Masek, K., Shapira, S., Hunter, C. and Pearce, E. (2004). Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *The Journal of Immunology*, 173(12), pp.7454-7461.
 160. Kanneganti, T., Lamkanfi, M. and Nuñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 27(4), pp.549-559.
 161. Kapsenberg, M. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), pp.984-993.
 162. Kawai, T. and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4), pp.317-337.
 163. Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), pp.373-384.
 164. Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K. and Nishijima, M. (2000). Mouse Toll-like receptor 4. MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by taxol. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp.2251-2254.

165. Khan, W., Blennerhasset, P., Varghese, A., Chowdhury, S., Omsted, P., Deng, Y. and Collins, S. (2002). Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infection and Immunity*, 70(11), pp.5931-5937.
166. Klaver, E., Kuijk, L., Laan, L., Kringel, H., van Vliet, S., Bouma, G., Cummings, R., Kraal, G. and van Die, I. (2013). *Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), pp.191-200.
167. Klotz, C., Ziegler, T., Figueiredo, A., Rausch, S., Hepworth, M., Obsivac, N., Sers, C., Lang, R., Hammerstein, P., Lucius, R. and Hartmann, S. (2011). A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. *PLoS Pathogens*, 7(1), p.e1001248.
168. Knight, P., Brown, J. and Pemberton, A. (2008). Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 135(06).
169. Ko, R. and Fan, L. (1996). Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Parasitology*, 112(01), p.89.
170. Kobayashi, K., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G. and Flavell, R. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 307(5710), pp.731-734.
171. Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M. and Takeuchi, T. (2010). Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. *Advances in immunology*, 108, pp.21-44.
172. Kreider, T., Anthony, R., Urban, J. and Gause, W. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), pp.448-453.
173. Krivokapich, S., Pozio, E., Gatti, G., Gonzalez Prous, C., Ribicich, M., Marucci, G., La Rosa, G. and Confalonieri, V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *International Journal for Parasitology*, 42(10), pp.903-910.

174. Kubiczekova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R. and Sevcikova, S. (2012). TGF- β -an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*, 10(1), p.183.
175. Kuijk, L. and van Die, I. (2010). Worms to the rescue: Can worm glycans protect from autoimmune diseases?. *IUBMB Life*, 62(4), pp. 303-12.
176. Kuijk, L., Klaver, E., Kooij, G., van der Pol, S., Heijnen, P., Bruijns, S., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H., Dijkstra, C., Bouma, G. and van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular immunology*, 51(2), pp. 210-8.
177. Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009a). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), pp.621-625.
178. Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. (2009b). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.*, 420(1), pp.1-16.
179. Kurt-Jones, E., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L., Jones, L., Tripp, R., Walsh, E., Freeman, M., Golenbock, D., Anderson, L. and Finberg, R. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology*, 1(5), pp. 398-401.
180. Langelaar, M., Aranzamendi, C., Franssen, F., Van der Giessen, J., Rutten, V., Van der Ley, P. and Pinelli, E. (2009). Suppression of dendritic cell maturation by *Trichinella spiralis* excretory/secretory products. *Parasite Immunology*, 31(10), pp.641-645.
181. Lawrence, C., Paterson, Y., Wright, S., Knight, P. and Miller, H. (2004). Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterology*, 127(1), pp.155-165.
182. Lee, D., Ko, R., Yi, X. and Yeung, M. (1991). *Trichinella spiralis*: antigenic epitopes from the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host. *Parasitology*, 102(01), p.117.

183. Lee, K. and Ko, R. (2006). Cell-mediated response at the muscle phase of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* infections. *Parasitology Research*, 99(1), pp.70-77.
184. Lee, K., Park, H., Jeong, H., Park, S., Lee, S., Choi, S., Cho, M., Ock, M., Hong, Y. and Yu, H. (2008). Immunization of proteins from *Toxascaris leonina* adult worm inhibits allergic specific Th2 response. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4), pp.216-225.
185. Leech, M. and Grecis, R. (2006). Induction of enhanced immunity to intestinal nematodes using IL-9-producing dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 176(4), pp.2505-2511.
186. Li, X., Yao, J., Pan, A., Liu, W., Hu, X., Wu, Z. and Zhou, X. (2013). An antigenic recombinant serine protease from *Trichinella spiralis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Parasitology Research*, 112(9), pp.3229-3238.
187. Liao, C., Liu, M., Bai, X., Liu, P., Wang, X., Li, T., Tang, B., Gao, H., Sun, Q., Liu, X., Zhao, Y., Wang, F., Wu, X., Boireau, P. and Liu, X. (2014). Characterisation of a plancitoxin-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), p.e3097.
188. Liu, Y., Kanzer, H., Soumelis, V. and Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature immunology*, 2(7), pp.585-9.
189. Liu, M., Wu, X., Wang, X., Yu, Y., Wang, W., Chen, Q., Boireau, P. and Liu, M. (2008). The functions of deoxyribonuclease II in immunity and development. *DNA and Cell Biology*, 27(5), pp.223-228.
190. Lun, H., Ko, C. and Mak, R. (2003). Characterization and cloning of metallo-proteinase in the excretory/secretory products of the infective-stage larva of *Trichinella spiralis*. *Parasitology research.*, 90(1), pp.27-37.
191. MacDonald, A., Straw, A., Bauman, B. and Pearce, E. (2001). CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *The Journal of Immunology*, 167(4), pp.1982-1988.

192. MacDonald, A. and Maizels, R. (2008). Alarming dendritic cells for Th2 induction. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), pp.13-17.
193. Macen, J., Upton, C., Nation, N. and McFadden, G. (1993). SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by *Myxoma* virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation. *Virology*, 195(2), pp. 348-63.
194. Machado, D., Horton, D., Harrop, R., Peachell, P. and Helm, B. (1996). Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. *European Journal of Immunology*, 26(12), pp.2972-2980.
195. Magalhães, K., Almeida, P., Atella, G., Maya-Monteiro, C., Castro-Faria-Neto, H., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Bozza, M. and Bozza, P. (2010). *Schistosomal*-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(9), pp.1369-1379.
196. Maizels, R., Gomez-Escobar, N., Gregory, W., Murray, J., Zang X. (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *International journal for parasitology*, 31(9), pp. 889-98.
197. Maizels, R. (2009). Exploring the immunology of parasitism - from surface antigens to the hygiene hypothesis. *Parasitology*, 136(12), p.1549.
198. Maizels, R., Pearce, E., Artis, D., Yazdanbakhsh, M. and Wynn, T. (2009). Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *Journal of Experimental Medicine*, 206(10), pp.2059-2066.
199. Mak, C. and Ko, R. (1999). Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *European Journal of Biochemistry*, 260(2), pp.477-481.
200. Mak, C., Chung, Y. and Ko, R. (2000). Single-stranded endonuclease activity in the excretory-secretory products of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology*, 120(5), pp.527-533.
201. Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J. and Moser, M. (2001). Cytokines regulate the capacity of CD8 α + and CD8 α - dendritic cells to prime

- Th1/Th2 cells in vivo. *The Journal of Immunology*, 167(8), pp.4345-4350.
202. Manickasingham, S., Edwards, A., Schulz, O. and Sousa, C. (2003). The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *European Journal of Immunology*, 33(1), pp.101-107.
203. Maron, R., Palanivel, V., Weiner, H. and Harn, D. (1998). Oral administration of *Schistosoma* egg antigens and insulin B-chain generates and enhances Th2-type responses in NOD mice. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 87(1), pp.85-92.
204. Martinez, F., Helming, L. and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.451-483.
205. Martinez, F. and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep*, 6, pp.13.
206. Massari, P., Henneke, P., Ho, Y., Latz, E., Golenbock, D. and Wetzler, L. (2002). Cutting edge: immune stimulation by *Neisseria* porins is Toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *The Journal of Immunology*, 168(4), pp.1533-1537.
207. McKay, D. (2009). The therapeutic helminth?. *Trends in Parasitology*, 25(3), pp.109-114.
208. McSorley, H., Hewitson, J. and Maizels, R. (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), pp.301-310.
209. McVay, C., Tsung, A. and Appleton, J. (1998). Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 66(5), pp.1941-5.
210. McVay, C., Bracken, P., Gagliardo, L. and Appleton, J. (2000). Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 68(4), pp.1912-1918.

211. Means, T., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. and Fenton, M. (1999). Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of immunology*, 163(7), pp.3920-7.
212. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), pp.135-145.
213. Medzhitov, R. and Janeway, C. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566), pp.298-300.
214. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), pp.819-826.
215. Mellman, I. (2013). Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunology Research*, 1(3), pp.145-149.
216. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, 31, pp.563-604.
217. Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M., de Vries, I., Figdor, C. and Adema, G. (2009). DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(3), pp.518-525.
218. Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun*, 2(6), pp.349-355.
219. Mikhalkovich, N., Becknell, B., Caligiuri, M., Bates, M., Harvey, R. and Zheng, W. (2006). Responsiveness of naive CD4 T cells to polarizing cytokine determines the ratio of Th1 and Th2 cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 176(3), pp.1553-1560.
220. Moczon, T. and Wranicz, M. (1999). *Trichinella spiralis*: proteinases in the larvae. *Parasitology research*, 85(1), pp.47-58.

221. Mogensen, T. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), pp.240-273.
222. Moothoo, D. and Naismith, J. (1998). Concanavalin A distorts the beta-GlcNAc-(1-->2) - Man linkage of beta-GlcNAc-(1-->2)-alpha-Man-(1-->3)-[beta-GlcNAc-(1-->2)-alpha-Man -(1-->6)]-Man upon binding. *Glycobiology*, 8 (2), pp.173–181.
223. Morelle, W., Haslam, S., Morris, H. and Dell, A. (2000). Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109(2), pp.171-177.
224. Mosmann, T. (1991). Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunologic Research*, 10(3-4), pp.183-188.
225. Motomura, Y., Wang, H., Deng, Y., El-Sharkawy, R., Verdu, E. and Khan, W. (2009). Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 155(1), pp.88-95.
226. Murphy, L., Smith, S., Chen, R., Fingar, D. and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology*.
227. Muthana, M., Fairburn, B., Mirza, S., Slack, L. and Pockley, A. (2004). Systematic evaluation of the conditions required for the generation of immature rat bone marrow-derived dendritic cells and their phenotypic and functional characterization. *Journal of Immunological Methods*, 294(1-2), pp.165-179.
228. Muthana, M., Fairburn, B., Mirza, S., Slack, L., Hopkinson, K. and Pockley, A. (2006). Identification of a rat bone marrow-derived dendritic cell population which secretes both IL-10 and IL-12: Evidence against a reciprocal relationship between IL-10 and IL-12 secretion. *Immunobiology*, 211(5), pp.391-402.
229. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of Toll-like

- receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 164(11), pp.5998-6004.
230. Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E. and Takahashi, Y. (1999). Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 29(7), pp.1113-1120.
231. Nagano, I., Wu, Z., Nakada, T., Matsuo, A. and Takahashi, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase inhibitor from *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 123(01).
232. Nagano, I., Wu, Z. and Takahashi, Y. (2009). Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitology Research*, 104(2), pp.197-207.
233. Nakada, T., Nagano, I., Wu, Z. and Takahashi, Y. (2005). Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 96(6), pp.354-360.
234. Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H. and Furue, M. (2006). Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *Journal of Dermatological Science*, 42(1), pp.1-11.
235. Niborski, V., Vallée, I., Fonseca-Liñán, R., Boireau, P., Enciso, A., Ortega-Pierres, G. and Yépez-Mulia, L. (2004). *Trichinella spiralis*: Stimulation of mast cells by TSL-1 antigens trigger cytokine mRNA expression and release of IL-4 and TNF through an Ig-independent pathway. *Experimental Parasitology*, 108(3-4), pp.101-108.
236. Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M. and Puzo, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *The Journal of Immunology*, 166(12), pp.7477-7485.
237. Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000). Cutting edge: Heat Shock Protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-Like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164(2), pp.558-561.

238. Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E., Young, D., Ishizaka, S., Rose, J., Chow, J. and Strauss, J. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), pp.10229-10233.
239. Okano, M., Satoskar, A., Nishizaki, K., Abe, M. and Harn, D. (1999). Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Journal of immunology*, 163,(12), pp.6712-7.
240. O'Neill, S., Mills, K. and Dalton, J. (2001). *Fasciola hepatica* cathepsin L cysteine proteinase suppresses *Bordetella pertussis*-specific interferon-gamma production *in vivo*. *Parasite Immunol*, 23(10), pp.541-547.
241. Opitz, B., Schroder, N., Spreitzer, I., Michelsen, K., Kirschning, C., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U. and Schumann, R. (2001). Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kB Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), pp.22041-22047.
242. Ortega-Pierres, M., Yopez-Mulia, L., Homan, W., Gamble, H., Lim, P., Takahashi, Y., Wassom, D. and Appleton, J. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol*, 18(6), pp.273-284.
243. Osada, Y., Shimizu, S., Kumagai, T., Yamada, S. and Kanazawa, T. (2009). *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *International Journal for Parasitology*, 39(4), pp.457-464.
244. Osborne, J. and Devaney, E. (1998). The L3 of *Brugia* induces a Th2-polarized response following activation of an IL-4-producing CD4-CD8-alpha-beta T cell population. *International Immunology*, 10(10), pp.1583-1590.
245. Oshiro, T., Macedo, M. and Macedo-Soares, M. (2005). Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm. res.*, 54(1), pp.17-21.
246. Ottow, M., Klaver, E., van der Pouw Kraan, T., Heijnen, P., Laan, L., Kringel,

- H., Vogel, D., Dijkstra, C., Kooij, G. and van Die, I. (2014). The helminth *Trichuris suis* suppresses TLR4-induced inflammatory responses in human macrophages. *Genes Immun*, 15(7), pp.477-486.
247. Ozinsky, A., Underhill, D., Fontenot, J., Hajjar, A., Smith, K., Wilson, C., Schroeder, L. and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp.13766-13771.
248. Park, H., Cho, M., Choi, S., Kim, Y. and Yu, H. (2011). *Trichinella spiralis*: Infection reduces airway allergic inflammation in mice. *Experimental Parasitology*, 127(2), pp.539-544.
249. Park, J., Park, S., Cho, M., Park, M., Kang, S., Kim, D. and Yu, H. (2012). Molecular characterization of 45 kDa aspartic protease of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology* 190(3-4), pp.510-8.
250. Patel, N., Kreider, T., Urban, J. and Gause, W. (2009). Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal for Parasitology*, 39(1), pp.13-21.
251. Pemberton, A., Knight, P., Gamble, J., Colledge, W., Lee, J., Pierce, M. and Miller, H. (2004). Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*: inducible expression of a novel goblet cell lectin, intelectin-2, and its natural deletion in C57BL/10 mice. *The Journal of Immunology*, 173(3), pp.1894-1901.
252. Perrigoue, J., Marshall, F. and Artis, D. (2008). On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*, 10(9), pp.1757-1764.
253. Perteguer, M., Rodriguez, E., Romaris, F., Escalante, M., Bonay, P., Ubeira, F. and Garate, M. (2004). Minor interspecies variations in the sequence of the gp53 TSL-1 antigen of *Trichinella* define species-specific immunodominant epitopes. *Molecular Immunology*, 41(4), pp.421-433.

254. Peters P, J., Gagliardo, L., Sabin, E.A., Betchen, A., Ghosh, K., Oblak, J., Appleton, J.(1999). Dominance of immunoglobulin G2c in the antiphosphorylcholine response of rats infected with *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 67(9), pp. 4661-7.
255. Pineda, M., McGrath, M., Smith, P., Al-Riyami, L., Rzepecka, J., Gracie, J., Harnett, W. and Harnett, M. (2012). The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites. *Arthritis & Rheumatism*, 64(10), pp.3168-3178.
256. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science*, 282(5396), pp.2085-2088.
257. Polvere, R., Kabbash, C., Capo, V., Kadan, I. and Despommier, D. (1997). *Trichinella spiralis*: Synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Experimental Parasitology*, 86(3), pp.191-199.
258. Pozio, E. and La Rosa, G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animals and human samples. *Methods in Molecular Biology*, 216, pp. 299–309.
259. Pozio, E. (2007). World distribution of *Trichinella spp.* infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), pp.3-21.
260. Prasanphanich, N., Mickum, M., Heimbürg-Molinaro, J. and Cummings, R. (2013). Glycoconjugates in host-helminth interactions. *Frontiers in Immunology*, 4.
261. Puig-Kröger, A., Relloso, M., Fernández-Capetillo, O., Zubiaga, A., Bernabéu, C. and Corbí, A. (2001). Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*, 98(7), pp.2175-2182.

262. Pulendran, B., Tang, H. and Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce Th2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*, 11(8), pp.647-655.
263. Radovic, I., Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Cvetkovic, J., Mojsilovic, S., Devic, M. and Sofronic-Milosavljevic, L. (2015). Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens. *Immunologic Research*, 61(3), pp.312-325.
264. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. and Forsthuber, T. (2014). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*.
265. Rassa, J., Meyers, J., Zhang, Y., Kudaravalli, R. and Ross, S. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), pp.2281-2286.
266. Rau J., Beaulieu L., Huntington J., Church F. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. (2007). *Journal of thrombosis and haemostasis*. 5 (Suppl 1), pp.102-15
267. Reason, A., Ellis, L., Appleton, J., Wisnewski, N., Grieve, R., McNeil, M., Wassom, D., Morris, H. and Dell, A. (1994). Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N -glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*, 4(5), pp.593-603.
268. Redpath, S., Fonseca, N. and Perona-Wright, G. (2014). Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance. *Parasite Immunol*, 36(6), pp.233-252.
269. Reece, J., Siracusa, M. and Scott, A. (2006). Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infection and immunity*, 74(9), pp.4970-4981.
270. Richez, C., Blanco, P., Rifkin, I., Moreau, J. and Schaefferbeke, T. (2011). Role for Toll-like receptors in autoimmune disease: The example of systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine*, 78(2), pp.124-130.

271. Riedlinger, J., Grecis, R.K. and Wakelin, D. (1986). Antigen specific T-cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* in vivo. *Immunology*, 58(1), pp. 57-61.
272. Robinson, M. and Connolly, B. (2005). Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics*, 5(17), pp.4525-4532.
273. Robinson, M., Greig, R., Beattie, K., Lamont, D. and Connolly, B. (2007a). Comparative analysis of the excretory-secretory proteome of the muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology*, 37(2), pp.139-148.
274. Robinson, M., Massie, D. and Connolly, B. (2007b). Secretion and processing of a novel multi-domain cystatin-like protein by intracellular stages of *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 151(1), pp.9-17.
275. Rodriguez-Sosa, M., Satoskar, A., Calderon, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R. and Terrazas, L. (2002). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low Interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and immunity*, 70(7), pp.3656-3664.
276. Rogers, N., Slack, E., Edwards, A., Nolte, M., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D., Gordon, S., Tybulewicz, V., Brown, G. and Reis e Sousa, C. (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 22(4), pp.507-517.
277. Romarís, F., Escalante, M., Lorenzo, S., Bonay, P., Gárate, T., Leiro, J. and Ubeira, F. (2002). Monoclonal antibodies raised in Btk^{xid} mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 125(1-2), pp.173-183.
278. Rothfuchs, A., Bafica, A., Feng, C., Egen, J., Williams, D., Brown, G. and Sher, A. (2007). Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *The Journal of*

Immunology, 179(6), pp.3463-3471.

279. Ruysers, N., De Winter, B., De Man, J., Loukas, A., Herman, A., Pelckmans, P. and Moreels, T. (2008). Worms and the treatment of inflammatory bowel disease: are molecules the answer?. *Clinical and Developmental Immunology*, 2008, pp.1-7.
280. Sabin, E., Kopf, M. and Pearce, E. (1996). *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), pp.1871-1878.
281. Saenz, S., Noti, M. and Artis, D. (2010). Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends in Immunology*, 31(11), pp.407-413.
282. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis research*, Suppl 3:S127-32.
283. Sanmartin, M., Iglesias, R., Santamarina, M., Leiro, J. and Ubeira, F. (1991). Anatomical location of phosphorylcholine and other antigens on encysted *Trichinella* using immunohistochemistry followed by Wheatley's trichrome stain. *Parasitology Research*, 77(4), pp.301-306.
284. Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), pp.170-181.
285. Sato, K., Yang, X., Yudate, T., Chung, J., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R., Underhill, D., Cruz, P. and Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor γ chain to induce innate immune responses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), pp.38854-38866.
286. Saunders, K., Raine, T., Cooke, A. and Lawrence, C. (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and immunity*, 75(1), pp.397-407.
287. Schabussova, I., Amer, H., van Die, I., Kosma, P. and Maizels, R. (2007). O-methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in

- human and animal infections. *International Journal for Parasitology*, 37(1), pp.97-109.
288. Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), pp.17406-17409.
289. Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C. and Stevenson, M. (2007). Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: A potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *European Journal of Immunology*, 37(7), pp.1887-1904.
290. Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M. and Fabry, Z. (2003). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology*, 15(1), pp.59-69.
291. Shaw, J., Grund, V., Durling, L., Crane, D. and Caldwell, H. (2002). Dendritic cells pulsed with a recombinant chlamydial major outer membrane protein antigen elicit a CD4⁺ Type 2 rather than Type 1 immune response that is not protective. *Infection and immunity*, 70(3), pp.1097-1105.
292. Silva, S., Jacysyn, J., Macedo, M. and Faquim-Mauro, E. (2006). Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *European Journal of Immunology*, 36(12), pp.3227-3237.
293. Smiley, S., King, J. and Hancock, W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167(5), pp.2887-2894.
294. Smith, P., Mangan, N., Walsh, C., Fallon, R., McKenzie, A., van Rooijen, N. and Fallon, P. (2007). Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. *The Journal of Immunology*, 178(7), pp.4557-4566.
295. Sofronic-Milosavljevic, Lj., Radovic, I., Ilic, N., Majstorovic, I., Cvetkovic, J. and Gruden-Movsesijan, A. (2013). Application of dendritic cells stimulated

- with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Medical microbiology and immunology*, 202(3), pp. 239-49.
296. Steinman, R., Hawiger, D. and Nussenzweig, M. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp.685-711.
297. Stephen, S., Freestone, K., Dunn, S., Twigg, M., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J., Wheatcroft, S. and Ponnambalam, S. (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *International Journal of Hypertension*, 2010, pp. 646929.
298. Strahan, J. (1989). 'The great debate'. *British dental journal*, 166(7), pp.243.
299. Summers, R., Elliott, D., Urban, J., Thompson, R. and Weinstock, J. (2005a). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54(1), pp.87-90.
300. Summers, R., Elliott, D., Urban, J., Thompson, R. and Weinstock, J. (2005b). *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128(4), pp.825-832.
301. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors*, 3(8), pp.276-284.
302. Svensson-Frej, M. (2011). Immunobiology of intestinal eosinophils - a dogma in the changing?. *J Innate Immun*, 3(6), pp.565-576.
303. Takahashi, Y., Homan, W. and Lim, P. (1993). Ultrastructural localization of the phosphorylcholine-associated antigen in *Trichinella spiralis*. *The Journal of Parasitology*, 79(4), p.604.
304. Takahashi, Y. (1997). Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Today*, 13(3), pp.104-106.
305. Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp.335-376.
306. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T.,

- Takeda, K. and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4), pp.443-451.
307. Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P., Morr, M., Radolf, J., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*, 13(7), pp.933-940.
308. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. and Akira, S. (2002). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *The Journal of Immunology*, 169(1), pp.10-14.
309. Talmor, M., Mirza, A., Turley, S., Mellman, I., Hoffman, L. and Steinman, R. (1998). Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *European journal of immunology*. 28(3), pp. 811-7.
310. Tang, Q. and Bluestone, J. (2008). The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*, 9(3), pp.239-244.
311. Tang, D., Kang, R., Coyne, C., Zeh, H. and Lotze, M. (2012). PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, 249(1), pp.158-175.
312. Tawill, S., Le Goff, L., Ali, F., Blaxter, M. and Allen, J. (2004). Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infection and immunity*, 72(1), pp.398-407.
313. Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J. (2002). Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like Receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 195(1), pp.99-111.
314. Terrazas, C., Gómez-García, L. and Terrazas, L. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for

- carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International Journal for Parasitology*, 40(9), pp.1051-1062.
315. Terrazas, C., Sánchez-Muñoz, F., Mejía-Domínguez, A., Amezcua-Guerra, L., Terrazas, L., Bojalil, R. and Gómez-García, L. (2011). Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *International Journal of Biological Sciences*, pp.1391-1400.
316. Terrazas, C., Alcantara-Hernandez, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. and Satoskar, A. (2013). Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *The FASEB Journal*, 27(11), pp.4547-4560.
317. Terrazas, C., Alcantara-Hernandez, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. and Satoskar, A. (2013). Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *The FASEB Journal*, 27(11), pp.4547-4560.
318. Terrazas, L., Walsh, K., Piskorska, D., McGuire, E. and Harn, D. (2001). The *Schistosoma* oligosaccharide lacto-n-neotetraose expands Gr1+ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4+ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *The Journal of Immunology*, 167(9), pp.5294-5303.
319. Thomas, P., Carter, M., Atochina, O., Da'Dara, A., Piskorska, D., McGuire, E. and Harn, D. (2003). Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 171(11), pp.5837-5841.
320. Thomas, P. and Harn, D. (2004). Immune biasing by helminth glycans. *Cellular Microbiology*, 6(1), pp.13-22.
321. Thomas, P., Carter, M., Da'dara, A., DeSimone, T. and Harn, D. (2005). A helminth glycan induces APC maturation via alternative NF-kappa B activation independent of I kappa B degradation. *The Journal of Immunology*, 175(4), pp.2082-2090.

322. Todorova, V., Knox, D., Kennedy, M. (1995). Proteinases in the excretory/secretory products (ES) of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 111(Pt 2), pp. 201-8.
323. Todorova, V. (2000). Proteolytic enzymes secreted by larval stage of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Folia Parasitologica*, 47(2), pp.141-145.
324. Travis, M. and Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annual review of immunology*, 32, pp. 51-82.
325. Trujillo-Vargas, C., Werner-Klein, M., Wohlleben, G., Polte, T., Hansen, G., Ehlers, S. and Erb, K. (2007). Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(4), pp.336-344.
326. Tundup, S., Srivastava, L. and Harn Jr., D. (2012). Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253(1), pp.E1-E13.
327. Underhill, D., Ozinsky, A., Hajjar, A., Stevens, A., Wilson, C., Bassetti, M. and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755), pp.811-5.
328. Vabulas, R., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C., Issels, R. and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/Interleukin-1 receptor signal pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), pp.15107-15112.
329. Valencia-Pacheco, G., Loria-Cervera, E., Sosa-Bibiano, E., Canche-Pool, E., Vargas-Gonzalez, A., Melby, P. and Andrade-Narvaez, F. (2014). *In situ* cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ) and chemokines (MCP-1, MIP-1 α) gene expression in human *Leishmania (Leishmania) mexicana* infection. *Cytokine*, 69(1), pp.56-61.
330. Vallance, B., Matthaei, K., Sanovic, S., Young, I. and Collins, S. (2000). Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defence against challenge *Trichinella spiralis* infections. *Parasite Immunol*, 22(10), pp.487-492.
331. van Beelen, A., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E., Muller, F., Hommes, D.,

- Zaat, S., Kapsenberg, M. and de Jong, E. (2007). Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 27(4), pp.660-669.
332. van den Steen, P., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 96(8), pp.2673-81.
333. van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J., Kruize, Y., Schmitz, M., Kurt-Jones, E., Espevik, T., de Jong, E., Kapsenberg, M., Golenbock, D., Tielens, A. and Yazdanbakhsh, M. (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk: *Schistosoma* lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp.48122-48129.
334. van Die, I. and Cummings, R. (2010). Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response?. *Glycobiology*, 20(1), pp.2-12.
335. van Kooyk, Y. and Rabinovich, G. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 9(6), pp.593-601.
336. van Liempt, E., van Vliet, S., Engering, A., Garcia-Vallejo, J., Bank, C., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y. and van Die, I. (2007). *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Molecular Immunology*, 44(10), pp.2605-2615.
337. van Riet, E., Hartgers, F. and Yazdanbakhsh, M. (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 212(6), pp.475-490.
338. van Stijn, C., Meyer, S., van den Broek, M., Bruijns, S., van Kooyk, Y., Geyer, R. and van Die, I. (2010). *Schistosoma mansoni* worm glycolipids induce an inflammatory phenotype in human dendritic cells by cooperation of TLR4 and DC-SIGN. *Molecular Immunology*, 47(7-8), pp.1544-1552.

339. van Vliet, S., Dunnen, J., Gringhuis, S., Geijtenbeek, T. and van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of dendritic cell immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), pp.435-440.
340. Vanhoutte, F., Breuilh, L., Fontaine, J., Zouain, C., Mallevaey, T., Vasseur, V., Capron, M., Goriely, S., Faveeuw, C., Ryffel, B. and Trottein, F. (2007). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology. *Microbes and Infection*, 9(14-15), pp.1606-1613.
341. Velupillai, P., Secor, W.E., Horauf A.M. and Harn D.A. (1997). B-1 cell (CD51B2201) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars. *Journal of immunology*, 158 (1), pp.338-44.
342. Vermeire, J., Cho, Y., Lolis, E., Bucala, R. and Cappello, M. (2008). Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. *Trends in Parasitology*, 24(8), pp.355-363.
343. Viala, J., Chaput, C., Boneca, I., Cardona, A., Girardin, S., Moran, A., Athman, R., Mémet, S., Huerre, M., Coyle, A., DiStefano, P., Sansonetti, P., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. and Ferrero, R. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immunology*, 5(11), pp.1166-1174.
344. Wakelin, D. (1993). *Trichinella spiralis*: immunity, ecology, and evolution. *The Journal of Parasitology*, 79(4), p.488.
345. Wakelin, D., Goyal, P. K., Gehlawi, M. S. and Hermanek, J. (1994). Immune responses to *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* in mice. *Immunology*, 81(3), pp.470-475.
346. Wang, L., Wang, Z., Hu, D. and Cui, J. (2013). Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *BioMed Research International*, 2013, pp.1-7.
347. Wang, L., Cui, J., Hu, D., Liu, R. and Wang, Z. (2014). Identification of early

- diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. *Parasites & Vectors*, 7(1), p.40.
348. Watters, T., Kenny, E. and O'Neill, L. (2007). Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol*, 85(6), pp.411-419.
349. Werts, C., Tapping, R., Mathison, J., Chuang, T., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D., Godowski, P., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D., Kirschning, C., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. and Ulevitch, R. (2001). *Leptospiral* lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology*, 2(4), pp.346-52.
350. Whelan, M., Harnett, M., Houston, K., Patel, V., Harnett, W. and Rigley, K. (2000). A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *The Journal of Immunology*, 164(12), pp.6453-6460.
351. Wiethe, C., Debus, A., Mohrs, M., Steinkasserer, A., Lutz, M. and Gessner, A. (2008). Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, 180(7), pp.4371-4381.
352. Wu, L. and Dakic, A. (2004). Development of dendritic cell system. *Cellular & molecular immunology.*, 1(2), pp.112-8.
353. Wu, X., Fu, B., Wang, X., Yu, L., Yu, S., Deng, H., Liu, X., Boireau, P., Wang, F. and Liu, M. (2009). Identification of antigenic genes in *Trichinella spiralis* by immunoscreening of cDNA libraries. *Veterinary Parasitology*, 159(3-4), pp.272-275.
354. Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I. and Takahashi, Y. (2001). Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology*, 123(01).
355. Wu, Z., Nagano, I., Nakada, T. and Takahashi, Y. (2002). Expression of

- excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. *Parasitology International*, 51(2), pp.155-161.
356. Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T. and Takahashi, Y. (2007). Thermally induced and developmentally regulated expression of a small heat shock protein in *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 101(1), pp.201-12.
357. Wu, Z., Sofronic-Milosavljevic, L., Nagano, I. and Takahashi, Y. (2008). *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasites & Vectors*, 1(1), p.27.
358. Wyllie, D., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S., Boussouf, S., Segal, D., Duff, G. and Dower, S. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *The Journal of Immunology*, 165(12), pp.7125-7132.
359. Xia, C. and Kao, K. (2003). Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(1), pp.23-32.
360. Yopez-Mulia, L., Hernandez-Bello, R., Arizmendi-Puga, N., Fonseca-Linan, R. and Ortega-Pierres, g. (2007). Contributions to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Parasite Immunol*, 29(12), pp.661-670.
361. Yilmaz, V., Yentur, S. and Saruhan-Direskeneli, G. (2005). IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*, 30(4), pp.188-194.
362. Zaccane, P., Burton, O. and Cooke, A. (2008). Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity. *Trends in Parasitology*, 24(1), pp.35-42.
363. Zaccane, P. and Cooke, A. (2013). Vaccine against autoimmune disease: can helminths or their products provide a therapy?. *Current Opinion in Immunology*, 25(3), pp.418-423.
364. Zang, X. and Maizels, R. (2001). Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends in Biochemical Sciences*,

26(3), pp.191-197.

365. Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M., Greenblatt, M., Bussey, C., Flavell, R. and Ghosh, S. (2004). A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663), pp.1522-1526.

BIOGRAFIJA

Jelena (Dragan) Cvetković rođena je 20. jula 1981. godine u Vranju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2000/2001. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija i isti završila jula 2007. godine sa prosečnom ocenom 8.99 i ocenom 10 na diplomskom radu. Doktorske studije na smeru Imunologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisala 2010/2011 godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 10.

Jelena se 2008. godine zapošljava kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Instituta za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu, na međunarodnom FP6 projektu: "Reinforcement of the Serbian Centre for Parasitic Zoonoses" (INCO-CT-2006-043702-SERBPARTOON-2007-2009) pod rukovodstvom Dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević. Od 2010. do 2011. godine bila je angažovana na nacionalnom projektu: "Ćelijski i molekularni mehanizmi imunskog odgovora i imunoregulacije u sistemu parazit-domaćin" (br.B143047) finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik stiče maja 2011. godine. Trenutno je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: "Izučavanje imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti" (br.B173047) pod rukovodstvom Dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević. Bila je na stručnom usavršavanju u Evropskoj Referentnoj Laboratoriji za Parazite (European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanita, Rome), Dr Edoarda Pozia u Rimu. Takođe, Jelena Cvetković je boravila tri meseca 2014. godine u Nacionalnom Institutu za javno zdravlje i okolinu (National Institute for Public Health and the Environment–RIVM) u Bilthovenu, Holandiji, gde je bila uključena u istraživanju interakcije antigena *T. spiralis* i receptora za molekulske obrasce na površini patogena, pod rukovodstvom Dr Elene Pinelli. Do sada je učestvovala kao autor/koautor na sedam radova u časopisima sa SCI liste, i ima 13 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена Цветковић _____

број индекса _____ Б3902/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање улоге компоненти ES L1 антигена *Trichinella spiralis* у
обликовању имунског одговора Dark Agouti пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2015.godine

Jelena Cvetković

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Јелена Цветковић _____
Број индекса _____ Б3902/2009 _____
Студијски програм _____ Биологија; Имунобиологија _____
Наслов рада Испитивање улоге компоненти ES L1 антигена *Trichinella spiralis* у
обликовању имунског одговора Dark Agouti пацова
Ментор _____ др Алиса Груден-Мовсесијан и др Биљана Божић _____

Потписани/а _____ Јелена Цветковић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2015.godine

Jelena Cvetkovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање улоге компоненти ES L1 антигена *Trichinella spiralis* у обликовању имунског одговора Dark Agouti пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.05.2015.godine

Jelena Bektović