

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Suzana M. Stanisavljević

**Uloga mikrobiote i limfnog tkiva creva u  
otpornosti pacova soja Albino Oksford na  
indukciju eksperimentalnog  
autoimunskog encefalomijelitisa**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Suzana M. Stanisavljević

**Role of gut microbiota and gut-associated  
lymphoid tissue in resistance of Albino Oxford  
rats to experimental autoimmune  
encephalomyelitis induction**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**Mentor:**

**dr Đorđe Miljković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

**dr Đorđe Miljković**, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

**dr Biljana Božić Nedeljković**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Nataša Golić**, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekata finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 173035 i OI173013). Deo doktorske disertacije vezan za diverzitet i sastav mikrobiote je urađen u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Hvala,

dr Đorđu Miljkoviću, mom mentoru, na uvođenju u naučni svet, na nesebičnom deljenju znanja i stručnih saveta prilikom izrade eksperimenata. Hvala na strpljenju, podsticajima, podršci i ukazanom poverenju. Posebno hvala za razumevanje i mentorstvo koje mi je pružio prilikom izrade ove disertacije.

dr Biljani Božić Nedeljković na predusretljivosti i konstruktivnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

dr Nataši Golić na približavanju znanja iz mikrobiologije, na korisnim sugestijama i ukazanom vremenu prilikom izrade ove disertacije

dr Miljani Momčilović koja me je učila osnovama eksperimentalnog rada.

Nedi i Bokiju na pomoći u eksperimentalnom radu koji su učinili zabavnijim, a naročito na prijateljstvu i van Instituta.

dr Mariji Mostarici-Stojković na stručnom vođenju kroz svet neuroimunologije.

Tanji, Ivani, Tamari, Milici, Dragici, Milici L., Ivanu, Sanji i Neli, Ceci, Tamari i Dijani na kolegijalnosti, pomoći i što su doprineli da se osećam kao deo tima.

Dini, Ivani Mirkov, Marini i Sandri na druženju i prijatnoj atmosferi u 66.

Timu mikrobiologa sa IMGGI-ija koji mi je pomogao u upoznavanju sa mikrobiološkim tehnikama i lepoj saradnji prilikom eksperimentalnog rada.

Mojoj porodici na ljubavi, podršci, veri u mene, bez njih ne bih bila ovde gde jesam.

Veliko hvala mom Milošu koji je bio uz mene u svakom trenutku, pružao neizmernu ljubav, podršku i dao mi snagu da istrajem do kraja.

## **Uloga mikrobiote i limfnog tkiva creva u otpornosti pacova soja Albino Oksford na indukciju eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**

### **Sažetak**

Multipla skleroza je hronična, inflamacijska, neurodegenerativna, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Etiologija multiple skleroze još uvek nije poznata, ali je sve više podataka koji pokazuju ulogu crevne mikrobiote u patogenezi bolesti. Više podataka o značaju crevne mikrobiote u autoimunosti CNS dobijeno je istraživanjima na eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), životinjskom modelu multiple skleroze. U EAE-u se autoimunski odgovor protiv CNS-a pokreće u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije, gde se CD4<sup>+</sup> T ćelije specifične za antigene CNS-a aktiviraju i diferenciraju u Th (engl. T helper) 1 ćelije koje proizvode IFN- $\gamma$  i Th17 ćelije koje proizvode IL-17. Kada dospeju u CNS ove Th ćelije bivaju reaktivirane od strane lokalnih antigen-prezentujućih ćelija. Nakon reaktivacije, encefalitogene Th ćelije pokreću i održavaju inflamaciju unutar CNS-a.

Albino oksford (AO) pacovi su veoma otporni na indukciju EAE-a. S druge strane, Dark Agouti (DA) pacovi razvijaju EAE čak i nakon blage imunizacije. U dosadašnjim istraživanjima je pokazano da se AO pacovi u odnosu na DA pacove razlikuju po slabijoj aktivaciji Th1 i Th17 ćelija u relevantnim limfnim čvorovima u odgovoru na encefalitogenu imunizaciju. Takođe, pokazano je da relativno mali broj encefalitogenih ćelija infiltrira CNS AO pacova. Do sada nije vršeno ispitivanje uloge GALT-a i mikrobiote creva u otpornosti pacova soja AO na indukciju EAE-a.

Sve je više istraživanja koja pokazuju da mikroorganizmi creva imaju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora kroz interakciju sa limfnim tkivom creva (GALT, engl. gut-associated lymphoid tissue). U istraživanjima na EAE-u je pokazano da određeni mikroorganizmi creva pospešuju tok bolesti, dok drugi ostvaruju terapijske efekte modulacijom odnosa Th1 i Th17 encefalitogenih ćelija i regulatornih T ćelija (Treg). Poznato je i da encefalitogene CD4<sup>+</sup> T ćelije migriraju u GALT, uključujući mezenterične limfne čvorove i Pejerove ploče gde se mogu diferencirati u Treg. Smatra

se da značajnu ulogu u ovoj rediferencijaciji imaju crevne bakterije i njihovi produkti. Zbog toga je važno utvrditi koje bakterije u crevima i na koji način ostvaruju ulogu u patogenezi multiple skleroze, kako bi se modulacijom mikrobiote creva omogućila prevencija i tretman bolesti.

Nedavna uporedna istraživanja sastava mikrobiote creva osoba obolelih od multiple skleroze i zdravih osoba pokazuju kod pacijenata povećanu ili smanjenu zastupljenost pojedinih grupa bakterija, uključujući *Clostridia* klaster XIV i IV, *Bacteroides fragilis*, i rodova *Pseudomonas*, *Mycoplana*, *Haemophilus*, *Dorea* i *Blautia*. Međutim, rezultati dosadašnjih istraživanja nisu dovoljni da bi bilo razjašnjeno na koji način mikrobiota creva doprinosi patogenezi multiple skleroze.

Mikrobiota creva i GALT se smatraju važnim učesnicima u pokretanju, propagaciji, ali i u prevenciji autoimunskih procesa u CNS-u. Sastav mikrobiote creva se razlikuje kod pacijenata obolelih od multiple skleroze i zdravih osoba. U skladu sa tim, soj pacova podložan EAE-u, DA, i soj koji je otporan na indukciju EAE-a, AO, pokazali su razlike u sastavu mikrobiote creva u ovom istraživanju. Konkretno, *Turicibacter* sp. i članovi *Lachnospiraceae* familije su identifikovani kao mogući promoteri otpornosti na indukciju EAE-a ili oporavka od EAE-a.

Takođe je pokazano da se ćelijski sastav mezenteričnih limfnih čvorova, kao i ćelijski sastav Pejerovih ploča razlikuje između AO i DA pacova, s tim da DA pacovi imaju više CD4<sup>+</sup> ćelija, ali i više Treg-a. Pored toga, ćelije GALT-a AO soja pacova otpornog na EAE su proizvele manje IFN- $\gamma$  i IL-17 u poređenju sa DA sojem pacova koji je podložan indukciji EAE-a. Produkcija IL-10 kao glavnog imunoregulatornog citokina u crevima koji ispoljava imunosupresivne efekte, razlikovala se između ova dva soja pacova.

Antibiotski tretman je narušio otpornost AO pacova prema indukciji EAE-a, što se ogledalo u pojavi blagih kliničkih simptoma, povećanom broju infiltrata u kičmenoj moždini i povišenom nivou IL-17 u CNS-u. Primena antibiotika je dovela i do promena u drenirajućim limfnim čvorovima. U njima je primećen povećan broj ćelija sa povećanom zastupljenošću CD4<sup>+</sup> T ćelija, koje su, proizvele više proinflamacijskih citokina. Analiza zastupljenosti Treg je pokazala da se procenat Treg razlikuje između sojeva samo u Pejerovim pločama neimunizovanih životinja, dok se nakon imunizacije

smanjuje udeo Treg u drenirajućim limfnim čvorovima, mezenteričnim limfnim čvorovima i Pejerovim pločama kod životinja tretiranih antibioticima. Sastav mikrobiote creva AO pacova se znatno promenio nakon četiri nedelje primene antibiotika, nakon čega su se promene izgubile.

Transferom mikrobiote creva AO pacova u DA pacove došlo je do ublažavanja simptoma EAE-a kod DA pacova. U CNS-u dolazi do smanjenja koncentracije IL-17 kod tako tretiranih DA životinja. Uočena je povećana celularnost u drenirajućim limfnim čvorovima, kao i veća zastupljenost Treg u drenirajućim i mezenteričnim limfnim čvorovima. Transfer mikrobiote je doveo i do značajne promene diverziteta crevne mikrobiote tretiranih DA pacova. Promene se naročito zapažaju u diverzitetu mlečnokiselinskih bakterija.

Rezultati ove doktorske disertacije jasno pokazuju da crevna mikrobiota ima bitnu ulogu u patogenezi autoimunskog procesa prisutnog u CNS-u i da bi njena modulacija mogla biti novi pristup u terapiji multiple skleroze.

**Ključne reči:** eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, Albino Oksford pacovi, mikrobiota creva, limfno tkivo creva.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunobiologija

**UDK broj:**



## **Role of gut microbiota and gut-associated lymphoid tissue in resistance of Albino Oxford rats to experimental autoimmune encephalomyelitis induction**

### **Abstract**

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory neurodegenerative demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Etiology of multiple sclerosis is still unknown, but data are showing that gut microbiota plays an important role in the pathogenesis of this disease. Information about the significance of gut microbiota in CNS autoimmunity has been dominantly obtained in studies in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis. The autoimmune response against CNS starts in lymph nodes draining the site of immunization in EAE. There, CD4<sup>+</sup> T cells are being activated and differentiated into Th1 (helper T cells) and Th17 cells that produce IFN- $\gamma$  and IL-17, respectively. When Th cells arrive in the CNS, they are reactivated by local antigen-presenting cells. After the reactivation, these encephalitogenic T cells initiate and propagate CNS inflammation.

Albino Oxford (AO) rats are highly resistant to EAE induction. On the other hand, Dark Agouti (DA) rats develop EAE even after the mild immunization. In our earlier studies it was shown that AO rats had less activated Th1 and Th17 cells in the relevant lymph nodes in response to encephalitogenic immunization, unlike DA rats. Also, it was shown that relatively small number of encephalitogenic cells infiltrated CNS in AO rats. Up until now, the studies of role of GALT and gut microbiota in resistance of AO rats in EAE induction have not been conducted.

It has been increasingly appreciated that gut microbiota plays an important role in the regulation of the immune response through interaction with the cells of gut-associated lymphoid tissue (GALT). In EAE studies specific gut microorganisms have been proposed to promote the disease, while others have been shown to have therapeutic effects by modulating ratio and activity of encephalitogenic Th1 and Th17 cells and regulatory T cells (Treg). Encephalitogenic cells can also migrate to GALT, including mesenteric lymph nodes and Peyer's patches, where they can be re-differentiated into

Treg. It is considered that intrinsic bacteria and their products play an important role in this re-differentiation. That is why it has become important to determine which bacteria and in what ways are implicated in multiple sclerosis pathogenesis, to prevent and treat the disease by modulating gut microbiota. Recent comparative studies of gut microbiota content of multiple sclerosis patients and healthy individuals have shown increased presence of some groups of bacteria in patients, including *Clostridia* clusters XIV and IV, *Bacteroides fragilis*, and *Pseudomonas*, *Mycoplana*, *Haemophilus*, *Dorea*, *Blautia*. However, the results of previous studies cannot clarify what are the mechanisms of contribution of gut microbiota to pathogenesis of multiple sclerosis.

Gut microbiota and GALT are considered to be important players in initiation, propagation, but also in prevention of CNS autoimmunity. Gut microbiota content differs among multiple sclerosis patients and healthy subjects. In accordance to that, EAE-resistant rat strain and EAE-prone rat strain have different gut microbiota content in our experiments. Specifically, *Turicibacter* sp. and members of *Lachnospiraceae* family are identified as possible promoters of EAE resistance or EAE recovery. Besides, it was demonstrated that mesenteric lymph nodes and Peyer's patches differ between AO and DA rats. DA rats have higher proportion of CD4<sup>+</sup> cells and more Tregs. Further, GALT cells of EAE-resistant rat strain produced less IFN- $\gamma$  and IL-17 in comparison to EAE-prone rat strain. Production of IL-10, major immunoregulatory cytokine, was also different among these rat strains.

Antibiotic treatment disturbed EAE resistance in AO rats. It was observed in the form of mild clinical symptoms, higher number of spinal cord infiltrates and a higher concentration of IL-17 in the CNS. Antibiotic effects were seen in lymph nodes draining the site of immunization; they had higher cellularity, a higher proportion of CD4<sup>+</sup> cells, and higher production of proinflammatory cytokines. Treg analysis showed that there was a difference in Peyer's patches of unimmunized rats. After the immunization, less Treg was observed in draining lymph nodes, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches in antibiotic treated rats. Gut microbiota content of AO rats was significantly changed after four weeks of antibiotic treatment.

Gut microbiota transfer from AO rats into DA rats resulted in milder EAE symptoms in DA rats and lower concentration of IL-17 in CNS. Increased proportion of

Treg was observed in draining lymph nodes in the treated animals. Gut microbiota transfer led to more significant changes in gut microbiota diversity of treated rats, especially in lactic acid bacteria.

Results of this doctoral thesis clearly demonstrate important role of gut microbiota in the pathogenesis of the CNS autoimmunity. They also imply that modulation of gut microbiota could be used as a novel therapeutic approach in multiple sclerosis.

**Key words:** experimental autoimmune encephalomyelitis, Albino Oxford rat, gut microbiota, gut-associated lymphoid tissue.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Immunobiology

**UDK number:**

### **Lista skraćenica:**

AO - Albino Oksford

AhR – aril-hidrokarbonski receptor

Antb – životinje koje su primale tretman antibioticima

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

BSA – goveđi albumin iz seruma (engl. Bovine Serum Albumine)

CNS – centralni nervni sistem

ConA – konkanavalin A

CTL – citotoksični T limfociti

Ctrl – kontrolna životinja

d.p.i. – dan posle imunizacije

DA - Dark Agouti

DLČ – drenirajući limfni čvorovi

DGGE – gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu (engl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Dsc – Dice koeficijent sličnosti (engl. Dice similarity coefficient)

EAE – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

FCS – serum fetusa govečeta (engl. Fetal Calf Serum)

GALT – limfno tkivo creva (engl. Gut Associated Lymphoid Tissue)

Gmbt – transfer crevne mikrobiote (engl. Gut microbiota transfer)

HKM – homogenat kičmene moždine

IFN – interferon

IL – interleukin

k.s. – klinički skor

KFA – kompletni Frojndov adjuvans

MBP – bazni protein mijelina (engl. Myelin Basic Protein)

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

MKB – mlečnokiselinske bakterije

ML – engl. Maximum Likelihood

MLČ – mezenterični limfni čvorovi

MOG – mijelinski oligodendrocitni glikoprotein

neim – neimunizovane životinje

NO – azot-monoksid

NSI – identičnost na nivou sekenci (engl. Nucleotide Sequence Identity)

PB – pufer za permeabilizaciju ćelija (engl. Permeabilization Buffer)

PBS – engl. Phosphate Buffer Saline

PLP – proteolipidni protein

PP – Pejerove ploče

PSA – polisaharid A

RPMI – engl. Roswell Park Memorial Institute

RRMS – relapsno-remitentna multipla skleroza

RS – pacovski serum (engl. Rat Serum)

SCFA – kratkolančane masne kiseline (engl. Short-Chain Fatty Acids)

Th – pomoćničke T ćelije (engl. helper T cells)

TMB - tetrametilbenzidin

TNF – faktor nekroze tumora (engl. Tumor Necrosis Factor)

Treg – regulatorne T ćelije

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Multipla skleroza .....	2
1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis.....	6
1.3. Citokini u multiploj sklerozi i eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu.....	8
1.4. Razlike između sojeva pacova u podložnosti indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa .....	9
1.5. Uloga mikrobiote creva u razvoju multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa .....	10
1.6. Uloga antibiotika u modulaciji mikrobiote creva i uticaj na eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis.....	13
1.7. Primena mikrobiote creva u terapiji multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa .....	14
2. Ciljevi .....	16
3. Materijal i metode.....	19
3.1. Reagensi i rastvori .....	20
3.2. Eksperimentalne životinje .....	21
3.2.1. Indukcija EAE i procena kliničke slike .....	21
3.3. <i>In vivo</i> tretman AO pacova antibioticima.....	22
3.4. Transfer mikrobiote creva AO pacova u DA pacove .....	22
3.5. Izolovanje ćelija mezenteričnih, poplitealnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča .....	23
3.6. Određivanje broja živih ćelija metodom tripan plavo bojenja .....	24
3.7. Merenje produkcije citokina ELISA testom.....	24
3.8. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije.....	25
3.8.1. Analiza fenotipskih markera ćelija .....	25

3.8.2. Detekcija regulatornih T ćelija .....	26
3.9. Priprema histoloških preparata u parafinu.....	27
3.9.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom .....	27
3.10. Analiza mikrobiote .....	28
3.10.1. Priprema uzoraka za analizu.....	28
3.10.2. Izolovanje DNK.....	28
3.10.3. Denaturišuća gradijent gel elektroforeza (DGGE) i sekvenciranje DNK ..	28
3.11. Statistička obrada podataka .....	30
4. Rezultati.....	31
4.1. Razlike između sojeva AO i DA na nivou GALT-a.....	32
4.1.1. Brojnost Pejerovih ploča neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova	33
4.1.2. Brojnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova .....	34
4.1.3. Produkcija IFN- $\gamma$ u ćelijama Pejerovih ploča.....	35
4.1.4. Produkcija IL-17 u ćelijama Pejerovih ploča .....	36
4.1.5. Produkcija IL-10 u ćelijama Pejerovih ploča .....	37
4.1.6. Produkcija IFN- $\gamma$ u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova .....	38
4.1.7. Produkcija IL-17 u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova.....	39
4.1.8. Produkcija IL-10 u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova.....	40
4.1.9. Fenotipska analiza ćelija Pejerovih ploča neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova .....	41
4.1.10. Analiza zastupljenosti Treg u ćelijama Pejerovih pločama neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova .....	42
4.1.11. Fenotipska analiza ćelija mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova .....	43
4.1.12. Analiza zastupljenosti Treg u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova .....	44

4.2. Analiza crevne mikrobiote neimunizovanih životinja.....	45
4.3. Analiza crevne mikrobiote imunizovanih životinja.....	48
4.4. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na otpornost AO pacova na EAE .....	51
4.4.1. Uticaj antibiotskog tretmana na kliničku sliku .....	52
4.4.2. Histološka analiza kičmenih moždina .....	53
4.4.3. Uticaj antibiotskog tretmana na koncentraciju citokina u homogenatima kičmene moždine.....	54
4.4.4. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na brojnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova .....	55
4.4.5. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na brojnost ćelija Pejerovih ploča	56
4.4.6. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na broj ćelija mezenteričnih limfnih čvorova .....	57
4.4.7. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IFN- $\gamma$ u drenirajućim limfnim čvorovima .....	58
4.4.8. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-17 u drenirajućim limfnim čvorovima .....	59
4.4.9. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-10 u drenirajućim limfnim čvorovima .....	60
4.4.10. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IFN- $\gamma$ u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	61
4.4.11. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-17 u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	62
4.4.12. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-10 u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	63
4.4.13. Uticaj tretmana antibioticima na zastupljenost CD4 <sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima .....	64
4.4.14. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost Treg u drenirajućim limfnim čvorovima .....	65



4.4.15. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost CD4 <sup>+</sup> ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	66
4.4.16. Ispitivanje efekta antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	67
4.4.17. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost CD4 <sup>+</sup> ćelija u Pejerovim pločama.....	68
4.4.18. Ispitivanje efekta antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u Pejerovim pločama.....	69
4.4.19. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na sastav mikrobiote creva .....	70
4.5. Ispitivanje uticaja transfera mikrobiote creva na GALT i sastav mikrobiote creva .....	72
4.5.1. Transfer crevne mikrobiote AO pacova ublažava simptome EAE kod DA pacova.....	73
4.5.2. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na koncentraciju citokina u homogenatima kičmenih moždina.....	74
4.5.3. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na brojnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova .....	75
4.5.4. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na brojnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova.....	76
4.5.5. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost CD4 <sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima.....	77
4.5.6. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u drenirajućim limfnim čvorovima.....	78
4.5.7. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost CD4 <sup>+</sup> ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	79
4.5.8. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima .....	80
4.5.9. Uticaj transfera crevne mikrobiote AO pacova na sastav mikrobiote creva DA pacova kojima je izvršen transfer .....	81

4. Diskusija.....	83
5. Zaključci.....	99
7. Literatura .....	103

# **1. Uvod**

## 1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza je hronična, inflamacijska, neurodegenerativna, demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Oko 2 500 000 ljudi u svetu pati od multiple skleroze (Svetska zdravstvena organizacija, 2008), a u nekim zemljama multipla skleroza dostiže prevalencu od čak 291 obolelih na 100 000 ljudi (preuzeto sa sajta Statistika, 2015). Ova bolest zahvata uglavnom populaciju starosti između 20 i 45 godina života (Goldenberg, 2012), ali se može javiti i kod starijih i kod dece. Duplo češće pogađa žene nego muškarace (Sadovnick i Baird, 1982), a sve je više podataka da se taj odnos povećava i dostiže odnos od 3:1 (Bove i Chitnis, 2013). Usled neadekvatog sprovođenja nervnih impulsa dolazi do deficita u motornim, senzornim i kognitivnim funkcijama obolelih, pa su najtipičniji simptomi koji se javljaju kod pacijenata obolelih od multiple skleroze gubitak osećaja, utrnulost (parestezija) ili slabost u udovima, disfunkcija bešike, creva, seksualna disfunkcija, tremor, ataksija, disartrija, delimičan ili kompletan gubitak centralnog vida, kao i zamućeni ili duplirani vid, zamor, vrtoglavica, gubitak sna, bol, depresija (Loma i Heyman, 2011; Goldenberg, 2012; Kister *i sar.*, 2013).

Multipla skleroza se karakteriše različitim tokom bolesti kod pacijenata (Cañellas *i sar.*, 2007; Hawker, 2011). Na osnovu frekvencije ispada (relapsa) i obrazaca progresije bolesti, napravljena je sledeća podela. Najčešći oblik je relapsno-remitentna multipla skleroza (RRMS) kod koje su periodi neuroloških ispada praćeni periodima delimičnog ili potpunog oporavka (remisije). Međutim, kod oko 80% pacijenata sa RRMS dolazi do pogoršanja bolesti kada se neurološke posledice akumuliraju tokom vremena bez perioda oporavka i ovakva forma bolesti se naziva sekundarno progresivna multipla skleroza (Fletcher *i sar.*, 2010). S druge strane kod nekih pacijenata dolazi do progresivnog toka bolesti od početka kliničkih manifestacija pa je takva bolest okarakterisana kao primarno progresivna. Četvrti oblik multiple skleroze je progresivna forma praćena povremenim fazama oporavka i obeležava se kao progresivno-relapsna multipla skleroza (Sospedra i Martin, 2005). Postoje i slučajevi klinički izolovanog sindroma, kada nakon jednog neurološkog ispada ne dolazi do daljeg razvoja multiple skleroze (Miller *i sar.*, 2012). Bolest je heterogena i na osnovu histopatoloških nalaza se može klasifikovati u četiri podtipa multiple skleroze (Lassmann *i sar.*, 2001).

Inflamacijske plake, odnosno demijelinizirajuće lezije, kao patološko obeležje multiple skleroze se mogu naći u različitim delovima bele i sive mase mozga i kičmene moždine (Ochoa-Repáraz i Kasper, 2014). Proces demijelinizacije je praćen narušavanjem integriteta krvno-moždane barijere i inflamacijskom reakcijom koju karakterišu infiltrati sastavljeni uglavnom od T ćelija i makrofaga (Wekerle, 2015). Patološki procesi u beloj masi CNS-a se karakterišu perivaskularnim infiltratima imunskih ćelija i demijelinizacijom, dok se u sivoj masi uočavaju oštećenja aksona i neurona i inflamatorne lezije (Siffrin *i sar.*, 2010). Još uvek nije poznato da li prvo dolazi do autoimunskih ili do neurodegenerativnih procesa u multiploj sklerozi, ali je neosporna uloga imunskog sistema u patologiji multiple skleroze (Miljković i Spasojević, 2013).

Iz ispitivanja u kojima je pokazano prisustvo inflamacijskih ćelija i njihovih produkata u lezijama u mozgu pacijenata obolelih od multiple skleroze, kao i iz ispitivanja na životinjskim modelima proizašla je opšte prihvaćena hipoteza. Smatra se da je multipla skleroza posredovana T limfocitima čiji je odgovor usmeren protiv antigena mijelina, a što je dalje praćeno neurodegenerativnim procesima (Compston i Coles, 2008). Autoreaktivni T limfociti migriraju kroz krvno-moždanu barijeru i posreduju u oštećenjima centralnih neurona i njihovih mijelinskih omotača, a takođe i u oštećenju njihovih aksona (Fletcher *i sar.*, 2010). CD4<sup>+</sup> T limfociti (Th, engl. T helper; pomoćničke T ćelije) se naročito ističu u patogenezi multiple skleroze jer svojom aktivnošću aktiviraju druge ćelije (Weiner, 2009). Th1 ćelije produkcijom interferona (IFN)- $\gamma$  aktiviraju makrofage koji mogu direktno uticati na neurone i oligodendrocite svojim produktima, poput proinflamacijskih citokina interleukina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 i faktora nekroze tumora (TNF, engl. Tumor necrosis factor), kao i reaktivnim vrstama kiseonika i azota (Benveniste, 1997; Shin *i sar.*, 2012). Druga glavna populacija patogenih CD4<sup>+</sup> T ćelija su Th17 ćelije koje produkcijom IL-17 privlače neutrofile (Hofstetter *i sar.*, 2005; Iwakura i Ishigame, 2006). Započeta inflamacijska reakcija u CNS-u, povećava permeabilnost krvno-moždane barijere i regrutuje i druge imunske ćelije koje učestvuju u sledstvenoj neuroinflamaciji i neurodegeneraciji (Grigoriadis, van Pesch i ParadigMS Group, 2015). Tako, CD8<sup>+</sup> citotoksični T limfociti (CTL) oslobađanjem perforina i granzima deluju direktno na oligodendrocite i aksone (Sobottka *i sar.*, 2009). Sa druge strane, B limfociti produkcijom antitela aktiviraju sistem komplementa koji je

odgovoran za lizu mijelinskog omotača (Nicol *i sar.*, 2015). Međutim, i CTL i B limfociti za svoje dejstvo zahtevaju pomoć Th ćelija. Neravnoteža između efektorskih i regulatornih T ćelija (Treg), zbog defekta u Treg ili nedovoljno efikasne u supresiji imunskog odgovora, vodi ka proinflamacijskom miljeu i podstiče demijelinizaciju i oštećenje aksona. U kasnijim fazama bolesti smanjuje se migracija imunskih ćelija sa periferije, ali hronična inflamacija i neurodegeneracija CNS-a se održavaju usled disfunkcije astrocita i mikroglije (Sospedra i Martin, 2005).

Glavna morfološka karakteristika multiple skleroze je primarna demijelinizacija aksona koja dovodi do blokade ili usporavanja provođenja signala na mestima demijelinizacije (Fletcher *i sar.*, 2010). Do razvoja neuroloških simptoma dolazi kada se blokada provođenja signala dešava istovremeno na značajnom broju nervnih vlakana koji učestvuju u određenom signalnom putu (McDonald i Sears, 1970). Tokom kliničkog oporavka, inflamacija i edem CNS-a se smanjuju i smatra se da dolazi do obnavljanja sprovođenja signala u CNS-u usled remijelinizacije. Nasuprot tome, gubitak aksona je nepovratan i najverovatnije je glavni uzročnik neurološke disfunkcije kod hronične multiple skleroze jer korelira sa trajnim neurološkim deficitom (Fletcher *i sar.*, 2010). Takođe, može doći do stvaranja lezija u sivoj masi, odnosno kortikalnih lezija. Do oštećenja aksona može doći usled delovanja CTL i makrofaga, tokom faze demijelinizacije (Ferguson *i sar.*, 1997; Trapp *i sar.*, 1998), ali može biti i nezavisno od demijelinizacije, kada je uzrokovano neadekvatnim funkcionisanjem mitohondrija unutar samog aksona (Bitsch *i sar.*, 2000). Pored toga, do gubitka aksona može doći i usled gubitka trofičke podrške od strane oligodendrocita usled čega aksoni postaju osetljivi na oštećenja (Kornek *i sar.*, 2000). Gubitak aksona u lezijama u kojima ne dolazi do demijelinizacije, pokazuje da proces neurodegeneracije može nastati nezavisno od demijelinizacije i možda joj čak prethoditi. U prilog ovome su nalazi uočeni kod pacijenata sa klinički izolovanim sindromom i u veoma ranim fazama RRMS. Ova heterogenost u histopatološkim nalazima pacijenata obolelih od multiple skleroze je paralelna sa različitim formama manifestacije bolesti, pa se multipla skleroza sve više smatra skupom više različitih bolesti (Sospedra i Martin, 2005; Aharoni, 2013). Zato, ne iznenađuje podatak da većina postojećih terapeutika nije delotvorna kod svih pacijenata.

Trenutno dostupni terapeutici za multiplu sklerozu imaju primarno ulogu u smanjenju broja relapsa i usporavanju progresije bolesti. Većina postojećih terapeutika deluje samo na neke od aspekata patogeneze multiple skleroze, a zbog heterogenosti bolesti nisu podjednako delotvorni kod svih pacijenata (Tanaka, Tanaka i Komori, 2009; Axtell, Raman i Steinman, 2013). Iz tog razloga, važno je otkriti mehanizme koji dovode do nastanka multiple skleroze, što bi dalje omogućilo pronalazak adekvatne terapije za svaku formu bolesti.

Epidemiološki podaci ukazuju da su i genetski i sredinski faktori uključeni u patologiju multiple skleroze (Handel *i sar.*, 2010). Poznato je da neki haplotipovi glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, engl. Major histocompatibility complex), kao i neki aleli gena za citokine i njihove receptori su povezani sa većim rizikom za nastanak multiple skleroze (Gourraud *i sar.*, 2012). Sredinski faktori uključuju infekcije, nedovoljnu izloženost sunčevoj svetlosti i pušenje (Ascherio i Munger, 2008; Handel *i sar.*, 2010). Do sada je pokazana uloga virusnih infekcija u indukciji multiple skleroze, ali je sve više istraživanja koja pokazuju povezanost mikrobiote creva i limfnog tkiva creva (GALT, engl. Gut-Associated Lymphoid Tissue) sa multiplom sklerozom (Newland, Heitkemper i Zhou, 2016). Izmenjena kolonizacija patogenim mikroorganizmima, do koje dolazi usled izmenjenih sredinskih uslova poput produžene upotrebe antibiotika, može dovesti do neravnoteže između inflamacijskih Th1 i Th17 ćelijskih populacija, s jedne strane, i antiinflamacijskih Th2 i Treg s druge strane (Ochoa-Repáraz i Kasper, 2014). Jasno je da su odnosi genetskih i sredinskih faktora složeni, ali je takođe postalo očigledno da se odgovor ne može tražiti samo u CNS-u već i van njega, naročito u crevima.

Iako se autoimunski proces usmeren protiv antigena CNS-a smatra ključnim elementom u patogenezi bolesti, početni koraci autoimunosti nisu još uvek poznati. Na osnovu životinjskih modela multiple skleroze, predloženo je da mikrobiota creva ima ulogu u pokretanju autoimunskih procesa CNS-a (Berer i Krishnamoorthy, 2012; Lee *i sar.*, 2011). Početni korak u autoimunskom procesu je aktivacija CD4<sup>+</sup> T ćelija koje su specijalizovane za tkiva CNS-a, a koje se zatim diferenciraju u Th1 i Th17 ćelije (Targoni *i sar.*, 2001). Smatra se da bi molekulska mimikrija između crevnih mikroorganizama i antigena CNS-a mogla biti odgovorna za aktivaciju i diferencijaciju ovakvih autoreaktivnih T ćelija u GALT-u (Croxford *i sar.*, 2002; Joscelyn i Kasper,

2014). Iako još uvek nedostaju direktni dokazi koji pokazuju ulogu mikrobiote creva u patogenezi autoimunskog odgovora u multiploj sklerozi, postoje korelacione studije koje pokazuju prisustvo disbioze u crevima pacijenata obolelih od multiple skleroze. Novija istraživanja u kojima je nakon urađenog transfera crevne mikrobiote pacijenata obolelih od multiple skleroze u miševu došlo do razvoja autoimunskih procesa u CNS-u (Berer *i sar.*, 2017), pokazuju značaj mikrobiote creva u razvoju multiple skleroze. Identifikovane su i specifične bakterije koje se povezuju sa multiplom sklerozom, a koje regulišu imunski odgovor posredovan T limfocitima i doprinose nastanku proinflamacijske sredine i *in vitro* i *in vivo* uslovima (Berer *i sar.*, 2017).

## **1.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis**

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišćen životinjski model multiple skleroze (Lassmann i Horssen, 2011). Predstavlja autoimunsku demijelinizirajuću bolest CNS-a. Za razliku od multiple skleroze, etiologija i patogeneza EAE-a su dobro istraženi. Upravo iz tog razloga, saznanja dobijena na EAE-u dovela su do razumevanja nekih mehanizama neuroimunskih procesa koji karakterišu patogenezu multiple skleroze (Flügel *i sar.*, 2001; Gold, Linington i Lassmann, 2006). Takođe su ispitivanja EAE-a dovela do razvoja određenih antiinflamacijskih i imunomodulatornih terapija multiple skleroze. Ipak treba pristupiti sa rezervom prilikom tumačenja i translacije rezultata dobijenih na EAE-u na čoveka, jer ovaj model, kao i svi životinjski modeli ima svoja ograničenja i ipak samo oponaša autoimunsku patogenezu multiple skleroze (Steinman i Zamvil, 2005; Gold *i sar.*, 2006; Farooqi *i sar.*, 2010; Buettner i Lochner, 2016). Brojne su razlike između EAE-a i multiple skleroze, poput imunoloških razlika između ljudi i eksperimentalnih životinja u kojima se indukuje EAE (Mestas i Hughes, 2004); multipla skleroza se razvija spontano kod ljudi, dok je EAE indukovan kod životinja; životinje koje se koriste u eksperimentima su genetički visokosrodne (inbredne) i gaje se u strogo kontrolisanim uslovima, pa samim tim nisu izložene sredinskim faktorima koji oblikuju imunski sistem ljudi (Adams *i sar.*, 2003). Međutim, bez obzira na sva ta ograničenja, upotreba



EAE-a je neophodna za proučavanje molekulskih mehanizama odgovornih za patogenezu multiple skleroze.

EAE se kod podložnih eksperimentalnih životinja može indukovati imunizacijom antigenima CNS-a, poput baznog proteina mijelina (MBP), mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina (MOG), proteolipidnog proteina (PLP) ili homogenatom tkiva CNS, pa se EAE indukovan na ovakav način označava kao aktivni EAE. (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009; Miljković, Momčilović, *i sar.*, 2011). Imunizacija se vrši ubrizgavanjem emulzije, koja pored antigena sadrži i adjuvans, koji u sebi ima bakterijske komponente sposobne da aktiviraju urođeni imunski odgovor i omogućuje efikasnu obradu i prezentaciju antigena (Libbey i Fujinami, 2011). Osim toga, EAE se može izazvati i adoptivnim transferom aktiviranih T limfocita izolovanih iz aktivno imunizovanih životinja u singene neimunizovane životinje (pasivni EAE) (Stromnes i Goverman, 2006). EAE može imati akutni monofazni, relapsno-remitentni ili hronično-progresivni tok u zavisnosti od soja eksperimentalnih životinja i imunizacionog protokola (Steinman, 1999; Krishnamoorthy i Wekerle, 2009; Souza-Moreira *i sar.*, 2013).

Iz dosadašnjih istraživanja je poznato da EAE počinje kada nakon imunizacije antigen-prezentujuće ćelije (APĆ), koje se nalaze u koži na mestu injekcije preuzmu i obrade ubrizgane antigene, potom migriraju u drenirajuće limfne čvorove (DLČ) i prezentuju antigene specifičnim T limfocitima. Prezentacija antigena se odigrava u sklopu MHC molekula II klase naivnim autoreaktivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima (Fletcher *i sar.*, 2010). Aktivirani CD4<sup>+</sup> T limfociti zatim proliferišu i diferenciraju se u CD4<sup>+</sup> T limfocite koji proizvode IFN- $\gamma$  ili IL-17 i označene su kao Th1, odnosno Th17 ćelije (Petermann i Korn, 2011; Ciric i Rostami, 2013). Ovakvi T limfociti cirkulacijom odlaze do različitih delova organizma, a deo njih stiže i do CNS-a i prolaze krvno-moždanu barijeru (Hickey *i sar.*, 1991; Furtado *i sar.*, 2008; O'Connor *i sar.*, 2008). CD4<sup>+</sup> T limfociti specifični za antigene CNS-a se zadržavaju u perivaskularnom prostoru (Kuersten i Lehmann, 2011). Tu dolazi do reaktivacije kada T ćelijama bivaju prikazani peptidi mijelina putem MHC molekula II klase koji se nalaze na rezidentnim fagocitima CNS-a. Stimulisane efektorske T ćelije lokalno oslobađaju proinflamacijske medijatore, citokine i hemokine, čime dolazi do privlačenja drugih imunskih ćelija i aktiviranja lokalnih glijalnih ćelija (Becher *i sar.*, 2006). Pokrenuta inflamacija rezultuje

demijelinizacijom i degeneracijom aksona, koji se manifestuju različitim neurološkim deficitima koji oponašaju faze neuroloških ispada kod ljudi obolelih od multiple skleroze (Fletcher *i sar.*, 2010).

### **1.3. Citokini u multiploj sklerozi i eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu**

Interferon (IFN)- $\gamma$ , glavni citokin Th1 ćelija, ima važnu ulogu u imunostimulaciji i u imunomodulaciji. Smatrano je da je IFN- $\gamma$  ključan za indukciju EAE-a. Kod miševa obolelih od EAE-a je detektovan visok nivo IFN- $\gamma$  u CNS, u piku bolesti, ali se njegova koncentracija smanjuje tokom oporavka. Međutim, miševi koji su bili deficitentni za IFN- $\gamma$  ili za njegov receptor su ipak razvijali EAE i čak imali jaču bolest i veću smrtnost (Ferber *i sar.*, 1996; Krakowski i Owens, 1996; Chu, Wittmer i Dalton, 2000). Ovim je pokazano da postoje i drugi faktori, pored IFN- $\gamma$ , koji utiču na autoimunost posredovanu T ćelijama.

Interleukin (IL)-17 je jedan od citokina koje proizvode Th17 ćelije. Kod pacijenata obolelih od MS je povišen nivo IL-17 u krvi i CNS-u, tokom faze relapsa (Matusevicius *i sar.*, 1999). Pored toga, T limfociti koji proizvode IL-17 se nalaze u velikom broju u lezijama u multiploj sklerozi i EAE-u (Tzartos *i sar.*, 2008). Uloga IL-17 u neuroinflamaciji, međutim, još uvek nije dovoljno jasna, jer nije neophodan za razvoj EAE, ali doprinosi razvoju bolesti. IL-17 indukuje sekreciju CCL2, IL-6 i IL-8 i pokreće stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika od strane endotelnih ćelija krvno-moždane barijere (Luchtman *i sar.*, 2014). Takođe, posreduje u narušavanju funkcije krvno-moždane barijere (Kebir *i sar.*, 2007a; Huppert *i sar.*, 2010; Larochelle *i sar.*, 2011) i sekreciji proinflamacijskih medijatora, IL-1 $\beta$  i IL-6 i azot-monoksida, od strane astrocita (Trajkovic *i sar.*, 2001; Ma *i sar.*, 2010). Osim toga, IL-17 aktivira ćelije mikroglije, koje kada su stimulisane proizvode CXCL12 i IL-6. Ovi faktori ostvaruju povratno dejstvo na IL-7 tako što promovišu diferencijaciju Th ćelija adaptivne imunosti ka Th17 fenotipu, čime se povećava inflamacija (Luchtman *i sar.*, 2014).

IL-10 je prototipski regulatorni citokin koji menja i urođeni i adaptivni imunski odgovor i sprečava neodgovarajuću i destruktivnu imunsku aktivnost kakva je u autoimunskim poremećajima (Li i Flavell, 2008). IL-10 se generalno smatra supresivnim, antiinflamacijskim citokinom i povezuje se sa fazom remisije u multiploj sklerozi, kada se primećuje ekspanzija ćelija koje proizvode IL-10 (Kennedy *i sar.*, 1992; Balashov *i sar.*, 2000). Knockout miševi za IL-10 su podložniji indukciji EAE (Bettelli *i sar.*, 1998), dok je pokazano da je IL-10 efikasan u prevenciji nastanka EAE (Rott, Fleischer i Cash, 1994; Cua *i sar.*, 1999). IL-10 se smatra glavnim imunomodulatornim citokinom u interakciji mikrobiote creva i GALT-a (Levast *i sar.*, 2015). Proizvode ga i parenhimske ćelije creva i ćelije GALT-a, uključujući epitelne ćelije, makrofage, T i B ćelije, dendritske ćelije, NK ćelije i limfociti urođene imunosti (Levast *i sar.*, 2015). Važno je napomenuti da je njegova produkcija od strane Treg u GALT-u ključna za antiencefalitogenu aktivnost ovih ćelija u EAE-u (Telesford *i sar.*, 2015).

#### **1.4. Razlike između sojeva pacova u podložnosti indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**

Poznato je da se različite vrste životinja, kao i različiti sojevi razlikuju po podložnosti razvoju EAE-a u zavisnosti od izbora adjuvansa i proteina mijelina koji se koriste za imunizaciju, ali i od vremena njihove primene. Soj albino Oksford (AO) pacova je inbredni soj koji je veoma otporan na indukciju EAE-a, čak i u uslovima kada se kod drugih relativno otpornih sojeva razvija EAE (Miljkovic *i sar.*, 2006). Nasuprot njima je soj Dark Aguti (DA) pacova koji je jako podložan indukciji EAE-a. DA pacovi razvijaju kliničku bolest nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine čak i bez prisustva adjuvansa (Stosic-Grujicic *i sar.*, 2004). Zato je ispitivanje razlika u imunskom odgovoru usmerenom protiv CNS-a između AO i DA pacova koristan alat u određivanju ćelijskih i molekularnih faktora važnih za patogenezu EAE-a i potencijalno za patogenezu multiple skleroze. U dosadašnjim ispitivanjima razlika između ova dva soja, analizirani su DLČ koji oslikavaju dešavanja u inicijalnoj fazi EAE-a. Zapažena je niža produkcija IL-2 i manji broj ćelija kod AO pacova nego kod DA, što može ukazati

na postojanje ograničavanja proliferacije limfocita kod AO pacova (Vukmanović *i sar.*, 1989; Vukmanović *i sar.*, 1990). Takođe je prisutan veći broj ćelija specifičnih za MBP u DLČ DA pacova i veća produkcija azot monoksida (NO) (Miljković *i sar.*, 2006). Povećana je i produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 u ćelijama DLČ-a koje su stimulisane MBP-om, što ukazuje da su ovi proinflamacijski citokini produkovani upravo od strane ćelija specifičnih za ovaj antigen (Miljković *i sar.*, 2006). S druge strane, nivo ekspresije gena za proinflamacijske citokine u ćelijama slezine je veći kod DA pacova nego kod AO, ali se produkcija IFN- $\gamma$  razlikuje u zavisnosti od tipa adjuvansa korišćenog prilikom imunizacije životinja (Miljković *i sar.*, 2006; Marković *i sar.*, 2009). Na nivou CNS-a su uočeni daleko intenzivniji infiltrati u kičmenim moždinama DA pacova (Miljković, Stanojević, *i sar.*, 2011). Osim toga, pokazan je i veći kapacitet ćelija CNS-a AO pacova da indukuju apoptozu infiltrirajućih autoreaktivnih limfocita u poređenju sa DA pacovima (Vukmanović, Mostarica Stojković i Lukić, 1989; Vukmanović *i sar.*, 1990).

### **1.5. Uloga mikrobiote creva u razvoju multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**

Sve je više istraživanja koja pokazuju uključenost disbioze mikrobiote creva u brojnim bolestima, poput gojaznosti, dijabetesa tipa 2, inflamacijskih bolesti creva (Mielcarz i Kasper, 2015; Budhram *i sar.*, 2017), ali i autoimunskih bolesti kao što su dijabetes tipa 1, reumatoidni artritis i multipla skleroza (Berer i Krishnamoorthy, 2012). Pod pojmom crevne mikrobiote podrazumevaju se svi mikroorganizmi koji nastanjuju digestivni sistem nekog organizma. Ukupan genom mikrobiote creva se označava kao mikrobiom (Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2011). 99% mikrobioma ljudi je bakterijski (Qin *i sar.*, 2010). Ostale grupe mikroorganizama koje sačinjavaju mikrobiotu creva odraslih ljudi su Archaea, virusi i gljive (Bhargava i Mowry, 2014). Generalno se smatra da je crevo fetusa sterilno i da do početne kolonizacije dolazi po rođenju. Međutim, novija istraživanja ukazuju na moguće prisustvo mikrobiote tokom neonatalnog perioda (Jiménez *et al.*, 2008; Collado *et al.*, 2016), ali ove tvrdnje je potrebno detaljnije ispitati. Prvi mikroorganizmi koji naseljavaju creva su poreklom od majke i iz okolne sredine (Falk *i sar.*, 1998). Više faktora utiče na kolonizaciju, uključujući način porođaja,

gestacionu starost, ishranu, higijenu i antibiotike (Bennel i Nord, 1987; Balmer, Hanvey i Wharton, 1994). Do jedne godine starosti bebe imaju jedinstven profil mikrobiote koju sačinjavaju uglavnom bakterije iz razdela Actinobacteria i Proteobacteria (Palmer *i sar.*, 2007; Quigley, 2013). Diverzitet mikrobiote creva dostiže maksimum u adolescenciji, kada postaje stabilan i sastoji se predominantno od razdela Firmicutes i Bacteroidetes (O'Toole i Claesson, 2010; Quigley, 2013). U samim crevima postoji prostorna raspodela različitih bakterijskih vrsta, gde se uočava povećanje diverziteta od želuca ka debelom crevu (Bhargava i Mowry, 2014). Terminalni ileum je regija u kojoj dolazi do prelaza od aerobnih ka predominantno anaerobnim bakterijskim vrstama (Quigley, 2013). Unutar creva se razlikuje zastupljenost bakterija u zavisnosti od toga da li se posmatra lumen creva ili mukozna površina (Swidsinski *i sar.*, 2005; Carroll *i sar.*, 2011). Ovo je bitno iz razloga što bakterije koje su bliže mukoznoj površini mogu imati značajniji uticaj na imunski sistem, dok one vrste koje su u lumenu mogu biti važne za energetske i metaboličke funkcije. Ovo treba uzeti u razmatranje s obzirom da se većina ispitivanja mikrobiote creva zasniva na analizi uzoraka fecesa.

Mikrobiota creva ima važnu ulogu u razvoju imunskog sistema (Lee & Mazmanian, 2010; Maynard *i sar.*, 2012). Neki komensalni mikroorganizmi podstiču nastanak Treg koje proizvode IL-10. Treg dovode do supresije imunskog odgovora na komensalne bakterije. Za razliku od toga, ima bakterija koje omogućavaju sazrevanje Th17 ćelija, što omogućava zaštitu organizma od patogena (Lee *i sar.*, 2011; Atarashi *i sar.*, 2013; Bhargava i Mowry, 2014). Pored modulacije imunskog sistema, crevna mikrobiota ima značajnu ulogu i u metaboličkim funkcijama, poput varenja šećera poreklom iz hrane, dekonjugacije žučnih kiselina, produkcije kratkolančanih masnih kiselina (engl., short chain fatty acids - SCFA) i metabolizma lekova (Bhargava i Mowry, 2014). SCFA, kao što su butirat, propionat i acetat, produkti su fermentacije nesvarljivih ugljenih hidrata i imaju izražene antiinflamacijske efekte. One mogu putem receptora kuplovanih sa G proteinom da deluju na ćelije urođene imunosti, ili da indukuju diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T ćelija u Treg različitim mehanizmima (Arpaia *i sar.*, 2013; Smith *i sar.*, 2013). Slično tome, metaboliti triptofana vezivanjem za AhR (aril-hidrokarbonski receptor) indukuju produkciju IL-22 (Veldhoen *i sar.*, 2008) i na taj način menjaju Th17 odgovor u crevima (Perdew i Babbs, 1991). *Bacteroides fragilis* svojim produktom, polisaharidom A (PSA) deluje na DC koje usmeravaju diferencijaciju T ćelija u Treg (J

Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2010; Bhargava i Mowry, 2014). Lipidi mikroorganizama takođe mogu imati imunoregulatorne efekte (Berer i Krishnamoorthy, 2014). Primer je lipid 654 kojeg proizvode brojne bakterije koje pripadaju *Bacteroides* vrstama, a za koji je pokazano da se nalazi u smanjenoj koncentraciji kod pacijenata obolelih od multiple skleroze u poređenju sa zdravim osobama (Farrokhi *i sar.*, 2013). Još jedan primer bakterijskih produkata koji imaju imunomodulatorno dejstvo je ATP, koji podstiče diferencijaciju Th17 ćelija u crevima (Atarashi *i sar.*, 2008).

Mikrobiota creva je ključan faktor u razvoju ćelijske i humoralne komponente GALT-a (Sommer *i sar.*, 2014), dok je njena disbioza povezana sa raznim bolestima (Carding *i sar.*, 2015). Doprinos mikrobiote creva multiploj sklerozi još uvek nije dovoljno razjašnjen. Uglavnom postoje nalazi iz studija kontrole slučaja koji su od ograničenog značaja za razumevanje patogeneze bolesti (Dendrou *i sar.*, 2015; Mielcarz i Kasper, 2015). Skorije komparativne studije sastava mikrobiote creva pacijenata obolelih od multiple skleroze i zdravih osoba pokazuju da je smanjena zastupljenost *Faecalibacterium* (Cantarel *i sar.*, 2015), *Clostridia* klastera XIVa, IV, *Bacteroides fragilis*, *Sutterella wadsworthensis* (Miyake *i sar.*, 2015), *Butyricimonas* (Jangi *i sar.*, 2016) i *Parabacteroides*, *Adlercreutzia* i *Prevotella* rodova (Chen *i sar.*, 2016) kod pacijenata obolelih od multiple skleroze. Nasuprot tome, pokazano je da je sastav *Methanobrevibacter* i *Akkermansia* (Jangi *i sar.*, 2016), *Psuedomonas*, *Mycoplana*, *Haemophilus*, *Blautia*, i *Dorea* rodova (Chen *i sar.*, 2016) povećan kod pacijenata obolelih od multiple skleroze. Skorije objavljeni izveštaji su ukazali na prisustvo novih rodova bakterija, kao što je *Acinetobacter*, kod pacijenata sa multiplom sklerozom. Nasuprot tome, mikrobiota creva je jasno povezana sa patogeneзом EAE-a. Klinički tok EAE-a se može menjati manipulacijom mikrobiote creva. Na primer, pokazano je da su aksenični miševi (životinje koje se gaje u strogo kontrolisanim sterilnim uslovima i nemaju mikroorganizme ni u gastrointestinalnom traktu, ni na površini kože) otporni na indukciju EAE (Berer *i sar.*, 2011; Lee *i sar.*, 2011). U skladu sa tim, oralni tretman antibioticima kod konvencionalno gajenih miševa je doveo do smanjenja jačine kliničke slike EAE-a (Yokote *i sar.*, 2008; Ochoa-Reparaz *i sar.*, 2009). Ovi podaci podržavaju ideju da disbioza mikrobiote creva aktivno doprinosi razvoju i progresiji multiple skleroze (Ochoa-Reparaz *i sar.*, 2009; Berer *i sar.*, 2011; Lee *i sar.*, 2011). Ipak, mikrobiota creva takođe doprinosi i imunskoj privilegiji CNS-a, s obzirom da se krvno-

moždana barijera i normalna aktivnost mikroglije ne mogu pravilno uspostaviti kod akseničnih miševa (Braniste *i sar.*, 2014; Erny *i sar.*, 2015).

Konačno, u nedavno objavljenim radovima prikazani su rezultati funkcionalnih studija sa mikrobiotom pacijenata obolelih od multiple skleroze (Berer *i sar.*, 2017; Cekanaviciute *i sar.*, 2017). Naime, pokazano je da transfer mikrobiote pacijenata u aksenične miševе omogućava ispoljavanje kliničkih znakova nakon indukcije EAE-a. Otkriće činioca mikrobiote koji su patogeni ili protektivni u multiploj sklerozi, ili otkriće njihovih produkata sa takvim efektima, moglo bi otvoriti nove mogućnosti za dijagnozu i terapiju ove bolesti. Terapija bi se oslanjala na tretman antibioticima i probioticima, kao i na transfer mikrobiote creva iz zdravih donora. Međutim, već je poznato da je mikrobiota creva individualna i teško je efikasno promeniti sastav mikrobiote creva (Lozupone *i sar.*, 2012). Stoga su dalja ispitivanja na eksperimentalnim modelima neophodna.

#### **1.6. Uloga antibiotika u modulaciji mikrobiote creva i uticaj na eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis**

Antibiotici dovode do promene mikrobiote creva. Miševi koji su oralno primali antibiotike su manje podložni razvoju autoimunskih modela bolesti kao što je EAE. U studijama koje su sproveli Ochoa-Reparaz i saradnici, poboljšanje EAE-a je povezano sa smanjenim IFN- $\gamma$  i IL-17, povećanjem IL-13 i IL-10 u mezenteričnim limfnim čvorovima, limfnim čvorovima slezine i cervikalnim limfnim čvorovima, kao i sistemskom stimulacijom Treg i B regulatornih ćelija (Ochoa-Reparaz *i sar.*, 2009; Javier Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2010). Činjenica da antibiotici pomeraju Th1/Th2 ravnotežu ka Th2 smeru je u skladu sa higijenskom hipotezom (Fleming *i sar.*, 2011). U ranijim istraživanjima koje su sproveli Yokote i saradnici, takođe su primećeni smanjeni nivoi proinflamacijskih citokina, uključujući IFN- $\gamma$  i IL-17, u drenirajućim limfnim čvorovima kod životinja sa EAE-om tretiranim antibioticima (Yokote *i sar.*, 2008). Različiti antibiotici su bili korišćeni u ispitivanjima u EAE-u, što može rezultirati različitim profilima mikrobiote creva i može objasniti varijabilnost imunskih mehanizama (Wang i Kasper, 2014). Aktuelne studije podržavaju korisnu ulogu

antibiotskih tretmana u neurološkim poremećajima ponašanja. Osnovni mehanizmi mogu uključiti smanjenje koncentracije luminalnog lipopolisaharida (i samim tim i potencijalno smanjenje hronične inflamacije) i promene u signalu CNS-a, kao što je ekspresija BDNF (engl. Brain Derived Neurotrophic Factor) u hipokampusu (Sandler *i sar.*, 2000; Bercik *i sar.*, 2011; Ait-Belgnaoui *i sar.*, 2012).

Različite kombinacije primenjenih antibiotika mogu ostvariti različite efekte. Oralna primena neapsorbirajućih antibiotika koji se sastojao od kanamicina, kolistina i vankomicina, samo jednu nedelju pre indukcije EAE-a dovela je do smanjenja kliničkih simptoma bolesti. Ovo je bilo praćeno smanjenom produkcijom proinflamacijskih citokina, IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF i IL-6, od strane reaktivnih T ćelija koje su specifične za MOG, u drenirajućim limfnim čvorovima. Ovakav miks antibiotika doveo je i do smanjenja Th17 ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima, ali ne i do promena u FoxP3<sup>+</sup> Treg (Yokote *i sar.*, 2008). Drugačiji tretman antibioticima (ampicilin, vankomicin, neomicin sulfat i metronidazol), pre indukcije EAE-a nije doveo do promena u nastanku EAE-a. Ovo je pripisano povećanju Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima i cervikalnim limfnim čvorovima kod životinja tretiranih antibioticima. Povećanje Treg je najverovatnije uzrokovano povećanjem dendritskih ćelija u Pejerovim pločama i mezenteričnim limfnim čvorovima. DC<sup>+</sup> dovode do povećane konverzije naivnih CD4<sup>+</sup> T ćelija u Treg (Ochoa-Reparaz *i sar.*, 2009). Ukratko, antibiotici mogu promeniti očekivani imunski status koji je oblikovan komensalnim mikroorganizmima i samim tim da dovedu do promene u predispoziciji ka poremećajima CNS-a.

### **1.7. Primena mikrobiote creva u terapiji multiple skleroze i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa**

Zabeleženo je nekoliko uspešnih pokušaja lečenja EAE-a uz pomoć određenih bakterija i njihovih produkata. U brojnim ispitivanjima je pokazano da *Bacteroides fragilis* i njegov kapsularni PSA imaju povoljne efekte na EAE (Mielcarz i Kasper, 2015). Štaviše, terapijski efekti su postignuti i primenom *Salmonella typhimurium* u kojoj su eksprimirane CFA/I fimbrije *E. coli*, ili *Bifidobacterium animalis*, ili



*Lactobacillus* spp. ili drugih mlečnokiselinskih bakterija (MKB) kao i mešavinom probiotika koja se sastojala od *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium bifidum* i *Streptococcus thermophilus* (Mielcarz i Kasper, 2015). Većina ovih ispitivanja pokazuje da su terapijski efekti ostvareni kroz inhibiranje produkcije IL-17 ili IFN- $\gamma$  od strane encefalitogenih Th17 i Th1 ćelija, kao i kroz stimulaciju Treg (Mielcarz i Kasper, 2015). Iako se smatra da Th1 i Th17, kao glavne ćelije koje pokreću autoimunost usmerenu ka CNS-u (Petermann i Korn, 2011; Dendrou *i sar.*, 2015) nastaju u drenirajućim limfnim čvorovima u EAE-u, a da zatim odlaze u CNS, sve više se smatra da deo njih migrira u GALT, uključujući mezenterične limfne čvorove (MLČ) i Pejerove ploče (PP) gde se mogu ponovo diferencirati i postati Treg koje će se boriti protiv bolesti (Esplugues *i sar.*, 2011; Califano *i sar.*, 2014).

Kod pacijenata obolelih od multiple skleroze je takođe primećeno smanjenje bakterija koje proizvode butirat. Ovaj fenomen je primećen i kod infekcije bakterijom *Clostridium difficile*, gde je došlo do antiinflamacijskih promena u mikrobioti creva nakon primene fekalnog transfera, što ukazuje na potencijalnu ulogu i u terapiji multiple skleroze (Borody i Campbell, 2012; Borody i Khoruts, 2012; Evrensel i Ceylan, 2016). Ima pokušaja transplantacije fekalne mikrobiote kod pacijenata obolelih od multiple skleroze, koja se vrši radi tretiranja konstipacije, ali se pokazalo da ima i druge povoljne efekte. Borody i saradnici su primetili povoljne neurološke efekte transplantacije kod tri pacijenta obolela od multiple skleroze. Kod ovih pacijenata je došlo do oporavak funkcije creva i bešike, a takođe im se povratila i sposobnost hodanja (Borody i Khoruts, 2012; Xu *i sar.*, 2015). Međutim, ovi rezultati, iako deluju obećavajuće, nisu dobijeni u kontrolisanoj studiji, pa se samim tim moraju uzeti sa rezervom.

## **2. Ciljevi**

Osnovna hipoteza ovog rada je da GALT i mikrobiota creva imaju ulogu u otpornosti pacova soja AO na indukciju EAE-a, te da modulacija sastava mikrobiote creva i sledstvene promene u sastavu i funkcionisanju GALT-a dovode do prevazilaženja otpornosti AO pacova na EAE. Iz tog razloga su ciljevi ovog istraživanja:

1. Da se ustanove razlike na nivou GALT-a i mikrobiote creva kod AO i DA pacova pre i nakon indukcije EAE-a kako bi se identifikovali potencijalni ćelijski i molekularni faktori koji su važni za otpornost na indukciju EAE-a:
  - Analizom brojnosti ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i Pejerovih kod neimunizovanih AO i DA pacova
  - Analizom produkcije proinflamacijskih citokina, IFN- $\gamma$  i IL-17, i antiinflamacijskog citokina IL-10 u ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča kod neimunizovanih AO i DA pacova
  - Fenotipskom analizom ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča kod neimunizovanih AO i DA pacova
  - Analizom uzoraka fecesa neimunizovanih AO i DA pacova radi utvrđivanja razlika u sastavu crevne mikrobiote
  - Ispitivanjem razlika u celularnosti mezenteričnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča između sojeva nakon imunizacije, u vremenskim tačkama koje odgovaraju induktivnoj fazi, piku bolesti i oporavku kod DA pacova
  - Uporednom analizom produkcije citokina kod pacova sojeva AO i DA nakon imunizacije smešom homogenata kičmene moždine i kompletnog Freundovog adjuvansa
  - Fenotipskom analizom ćelija AO i DA pacova koji su imunizovani
  - Analizom sastava mikrobiote creva u odgovarajućim vremenskim tačkama tokom EAE-a kod AO i DA pacova
  
2. Da se eliminiše otpornost AO pacova na indukciju EAE-a modulacijom sastava mikrobiote creva tretmanom antibioticima širokog spektra u trajanju od četiri nedelje, od rođenja do razdvajanja mladunaca od majke i da se uradi:
  - Praćenje efekta antibiotika na klinički tok EAE-a kod pacova soja AO

- Histološka analiza kičmenih moždina na prisustvo infiltrirajućih ćelija i analiza homogenata kičmene moždine
  - Analiza ćelija drenirajućih limfnih čvorova tokom EAE-a
  - Analiza uzoraka fecesa radi praćenja promena u sastavu mikrobiote creva izazvanih produženim antibiotskim tretmanom, pre i nakon imunizacije životinja
  - Analiza brojnosti i zastupljenosti različitih tipova ćelija u mezenteričnim limfnim čorovima i Pejerovim pločama kod AO pacova koji su bili pod tretmanom antibioticima i kod netretiranih kontrolnih životinja, pre i nakon imunizacije
  - Analiza produkcije citokina u mezenteričnim limfnim čorovima i Pejerovim pločama kod tretiranih i kontrolnih životinja, pre i posle indukcije EAE-a
3. Izvršiti transfer mikrobiote creva AO pacova u DA pacove kako bi se ispitaio njihov potencijalno terapijski efekat:
- Ispitivanjem uticaja transfera mikrobiote creva AO pacova u DA pacove na klinički tok EAE-a
  - Ispitivanjem efekta transfera mikrobiote creva AO pacova određivanjem koncentracije citokina u homogenatima kičmene moždine DA pacova u piku bolesti
  - Ispitivanjem razlika u DLČ tretiranih i kontrolnih DA pacova u induktivnoj fazi bolesti
  - Ispitivanjem uticaja transfera mikrobiote creva na broj ćelija i funkcije mezenteričnih limfnih čvorova tretiranih i kontrolnih DA pacova
  - Ispitivanjem razlika u sastavu mikrobiote creva DA pacova koji su primili mikrobiotu AO pacova i netretiranih DA pacova, u vreme razdvajanja mladunaca od majke, u vreme imunizacije životinja i u različitim fazama tokom EAE-a.

# **3. Materijal i metode**

### 3.1. Reagensi i rastvori

PBS (engl. Phosphate Buffered Saline) rastvor u vodi pravljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (LachNer, Neratovice, Češka), pH = 7,4.

RPMI (engl. Roswell Park Memorial Institute)-1640 (sa 25mM-HEPES i 2mM-L glutaminom) sa dodatkom antibiotika penicilina (100 IU/ml) i gentamicina (100 µg/ml), antimikotika nistatina (10 U/ml), 5 µM β-merkaptioetanolu i 5% FCS ili 2% pacovskog seruma (RS, engl. Rat serum) je korišćen za uzgajanje svih ćelija.

Serum fetusa govečeta (FCS, engl. Fetal Calf Serum) (PAA Laboratories, Pašing, Austrija) je inkubiran 30 min na 56°C kako bi se inaktivirale komponente komplemента, a onda je dodavan u medijum u cilju kultivacije ćelija.

Pacovski serum (RS, engl. Rat serum), gentamicin (Galenika, Beograd, Srbija), penicilin, (Galenika, Beograd, Srbija), kompletni Frojndov adjuvans - KFA (Difco, Detroit, MI, USA), *M.tuberculosis* H37Ra (Difco), MBP (poklon profesora Alexander Flügel, Univerzitet u Getingenu, Nemačka), Neosulfox (Sulfadimidin natrijum 10 %, neomicin sulfat 6 %, oksitetraciklin hidrohlorid 4 %, „Fm Pharm“ d.o.o., Subotica, Srbija), 2,5 g/l Pentrexyl (ampicillin, Galenika, Beograd, Srbija), fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac, Srbija), konkanavalin A (ConA; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), trizol (ThermoScientific, Braunschweig, Nemačka), tripan plavo (Fluka, Buch, Nemačka), Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), avidin konjugovan sa HRP (eBioscience, San Diego, SAD), tetrametilbenzidin (TMB, eBioscience, San Diego, SAD), HCl (Zorka, Šabac, Srbija), goveđi albumin iz seruma (BSA, engl. Bovine Serum Albumine, Applichem, Barcelona, Španija), pufer za permeabilizaciju ćelija (PB, engl. Permeabilization Buffer, eBioscience, San Diego, SAD), Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija), eozin (Molar, Budapest, Mađarska), paraformaldehid (Zorka, Šabac, Srbija), ksilol (Zorka, Šabac, Srbija), DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska), 6xLoading Dyu Solution (Thermo Scientific, Kalifornija, SAD).

### 3.2. Eksperimentalne životinje

Korišćene su ženke pacova genetski visokosrodnih sojeva Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA), starosti do 12 nedelja. Životinje su uzgajane u odgajalištu za životinje Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u standardnim uslovima, sa konstantnim pristupom vodi i hrani. Svi eksperimenti su odobreni od strane etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (Odluka br. 04-04/15). Tri do pet životinja je odgajano u istom kavezu.

#### 3.2.1. Indukcija EAE i procena kliničke slike

Za eksperimente u kojima je praćen klinički tok bolesti životinje su imunizovane sa 100  $\mu$ l smeše, koju su činile jednake zapremine homogenata kičmene moždine (HKM) DA pacova i PBS (engl. phosphate buffered saline) (1g HKM/1 ml PBS) emulgovanom u istoj zapremini KFA suplementiranog sa 5 mg/ml *M.tuberculosis* H37Ra (HKM+KFA). Za praćenje antigen-specifične produkcije citokina u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova, životinje su imunizovane sa 100  $\mu$ l emulzije, koja se sastojala od MBP (50  $\mu$ g/pacovu), emulgovanog u istoj zapremini KFA suplementiranog sa 5 mg/ml *M. tuberculosis* H37Ra (MBP+KFA). Životinjama je 100  $\mu$ l emulzije ubrizgano intradermalno u jednu zadnju šapicu kada su imunizovane sa HKM+KFA, odnosno u obe zadnje šapice kada su imunizovane emulzijom MBP+KFA. Pacovi su svakodnevno posmatrani radi praćenja pojave i razvoja kliničkih simptoma bolesti. Ocene su davane prema sledećoj skali: 0 - bez kliničkih simptoma; 1 - gubitak tonusa u repu, 2 - pareza zadnjih ekstremiteta, 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta, 4 - moribundno stanje ili smrt. Kod pacova soja DA su se razlikovale sledeće faze EAE: početak bolesti, 9.-11. dan posle imunizacije (d.p.i.) (klinički skor 1); vrhunac bolesti, 12.-16. d.p.i. (klinički skor 2-4) i oporavak, 18-22 d.p.i. (klinički skor 1 ili manje). Kumulativni klinički skor (k.s.) je izračunavan kao suma dnevnih k.s. Trajanje označava broj dana tokom kojih su uočeni klinički simptomi kod svakog pacova. Srednji k.s. je izračunavan kao kumulativni k.s. podeljen sa trajanjem. Uzorci AO pacova su analizirani u skladu sa fazama bolesti kod DA pacova.

### **3.3. *In vivo* tretman AO pacova antibioticima**

Pacovi soja AO su primali antibiotski tretman počevši od dana rođenja do četvrte nedelje života kada su mladunci odvajani od majki. Tretman antibioticima se sastojao od primene 2,5 g/l Neosulfox (Sulfadimidin natrijum 10 %, neomicin sulfat 6 %, oksitetraciklin hidrohlorid 4 %), 2,5 g/l Pentrexyl (ampicillin). Antibiotici su davani u pijaćoj vodi i menjani na svaka dva dana. Od trenutka rođenja doza je postepeno povećavana od 0,5 g/l do 2,5 g/l. Najviša doza je dostignuta sedmog dana *postpartum*. Pacovima je voda sa antibioticima bila na raspolaganju da je piju *ad libitum* tokom četiri nedelje, odnosno tokom perioda dojenja, sve do odvajanja mladunaca od majke. Nakon odvajanja mladunaca od majke, od četvrte do osme nedelje života životinje su bile bez ikakvog tretmana. U osmoj nedelji pacovi su imunizovani, nakon čega im je praćen klinički skor bolesti. U određenim vremenskim tačkama koje odgovaraju prethodno navedenim fazama bolesti kod DA pacova, izolovane su ćelije AO pacova i urađene su *ex vivo* analize. Uzorci fecesa su sakupljeni od majki na dan okota, a od mladunaca na dan prestanka antibiotskog tretmana odnosno na dan razdvajanja od majki, nultog d.p.i. (dan imunizacije), sedmog d.p.i. (induktivna faza), 14. d.p.i. (pik bolesti) i u oporavku (35. d.p.i). Kontrolne životinje su uzgajane i analizirane uporedo sa tretiranim životinjama. Kontrolne i tretirane životinje su bile potomci mužjaka i ženki iz istih okota.

### **3.4. Transfer mikrobiote creva AO pacova u DA pacove**

Za analizu transfera crevne mikrobiote (Gmbt, engl. Gut microbiota transfer), sadržaj cekuma dobijen iz zdravih odraslih netretiranih AO pacova starosti dva do četiri meseca je rastvaran u fiziološkom rastvoru (jedan cekum je rastvaran u 40 ml) i filtriran kroz filter papir. Ovo je dalje razblaživano u pijaćoj vodi i davano DA pacovima da piju *ad libitum*. Kontrolni DA pacovi su imali istu količinu fiziološkog rastvora u svojoj pijaćoj vodi. Takođe, feces koji je dobijen od AO pacova nakon presvlačenja je prenošen u čistu prostirku DA pacova. Kombinovani tretman je počinjao nedelju dana pre rođenja mladunaca i trajao je 12 nedelja. Kontrolnim pacovima nije dodavan feces



AO pacova u prostirku niti su pili vodu sa sadržajem cekuma. Pacovi su imunizovani sa osam nedelja starosti. Tretirane i kontrolne životinje su bile potomci mužjaka i ženki iz istih okota. Uzorci fecesa su sakupljeni u obe grupe životinja radi utvrđivanja sastava mikrobiote creva. Životinje su žrtvovane u određenim fazama EAE-a.

### **3.5. Izolovanje ćelija mezenteričnih, poplitealnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča**

Nakon žrtvovanja, sterilnim priborom su izolovani poplitealni limfni čvorovi koji dreniraju zadnje šapice (DLČ) iz životinja imunizovanih emulzijom napravljenom od MBP i KFA. Limfni čvorovi su izolovani četvrtog, sedmog i 14. dana posle imunizacije. Po četiri mezenterična limfna čvora (MLČ) je izolovano iz neimunizovanih životinja, kao i iz imunizovanih životinja na četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. Limfni čvorovi su homogenizovani mehaničkim putem, protiskivanjem kroz metalne mrežice i potom je homogenizovano tkivo filtrirano kroz sterilnu najlonsku filter mrežicu promera 40  $\mu\text{m}$ . Pejerove ploče (PP) su izolovane iz tankog creva neimunizovanih životinja i imunizovanih životinja na četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. Ćelije Pejerovih ploča su izolovane mehaničkim putem, protiskivanjem kroz plastične mrežice promera 70  $\mu\text{m}$ . Izolovane ćelije su taložene na 500g, tri minuta, nakon čega su resuspendovane u odgovarajući medijum. Ćelije su odmah nakon izolovanja korišćene za analizu protočnom citofluorimetrijom ili su gajene u kulturi. Sve ćelijske kulture su gajene u inkubatoru sa vlažnom atmosferom, pri koncentraciji  $\text{CO}_2$  od 5 % i na temperaturi od 37° C (u daljem tekstu inkubacija). MLČĆ (2,5x10<sup>6</sup>/ml) i PPĆ (2x10<sup>6</sup>/ml) su uzgajane u RPMI-1640 medijumu suplementiranom 5% FCS-om u pločama sa 24 bunarića (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) i stimulisane su 2,5 ug/ml ConA. DLČĆ (5x10<sup>6</sup>/ml) su uzgajane u RPMI-1640 medijumu suplementiranim 2% RS-om u pločama sa 24 bunarića (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) i stimulisane 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MBP-om. Ćelije su stimulisane tokom 24h, nakon čega su supernatanti ćelijskih kultura sakupljeni i zamrzavani na -20°C do upotrebe za analizu produkcije citokina. Supernatanti su takođe dobijeni i iz homogenata kičmenih moždina (1g kičmene moždine je homogenizovan u 2 ml PBS-a) nakog taloženja pri brzini od 10000 g u trajanju od 20 minuta.

### **3.6. Određivanje broja živih ćelija metodom tripan plavo bojenja**

Ćelije su nakon izolovanja resuspendovane u PBS-u sa 0,1 % tripan plavog u odnosu 1:10. Broj ćelija je određivan brojanjem pod mikroskopom u komori po Bürker-Türk, pri čemu mrtve ćelije, koje su se bojile plavo usled narušene građe membrane, nisu brojane. Broj ćelija je izračunat po formuli broj ćelija/broj polja x 2,5 i izražen kao broj ćelija/ml.

### **3.7. Merenje produkcije citokina ELISA testom**

Koncentracija citokina je određivana sendvič ELISA metodom. Ploče sa 96 bunarića (MaxiSorp ploče, Nunc, Rothschild, Danska) su oblagane sa 50 ul primarnog antitela i inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi ili na +4° C, po preporuci proizvođača. Zatim su bunarići ispirani rastvorom PBS + 0,01% Tween (tri puta sa 200 µl po bunariću) u cilju uklanjanja nevezanog antitela. Nespecifična mesta vezivanja na primarnom antitelu i plastici bunarića su blokirana sa 100 ul odgovarajućeg rastvora 1h, nakon čega su bunarići ponovo ispirani rastvorom PBS + 0,01% Tween (tri puta sa 200 µl po bunariću), a zatim su nalivani supernatanti uzoraka i rastvori citokina poznate koncentracije (50 µl po bunariću) i inkubirani 2h na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije ploče su ispirane tri puta i dodavano je 50 µl sekundarnog antitela obeleženog biotinom po bunariću. Nakon 1h inkubacije na sobnoj temperaturi i pranja ploča, sipano je 50 µl rastvora avidina konjugovanog sa HRP-om po bunariću i ploče su inkubirane 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije ploče su ispirane tri puta rastvorom za pranje i dodavano je 50 µl supstrata za peroksidazu (TMB) i ploče su držane u mraku. Po pojavi reakcije (plava obojenost rastvora), reakcija razvijanja boje je prekidana sa 50 µl 1M HCl. Finalno su apsorbance uzoraka očitavane pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče, korišćenjem filtera za talasnu dužinu od 450 nm i korigovane za apsorbancu na talasnoj dužini od 670 nm. Koncentracija proteina je određivana korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbancije za serijska razblaženja citokina poznatih koncentracija.

Za detekciju IL-10 pacovski IL-10 DuoSet ELISA je korišćen po preporuci proizvođača (R&D Systems, Minneapolis, MN). Za detekciju IFN- $\gamma$  i IL-17 korišćeni su parovi antitela u skladu sa preporukama proizvođača (eBioscience, San Diego, Kalifornija). Korišćena su sledeća antitela: prečišćeno anti-pacovsko IL-10 mišje monoklonsko antitelo (67232; R&D), biotinizirano anti-pacovsko IL-10 kozje poliklonsko antitelo (R&D), prečišćeno anti-pacovsko IFN- $\gamma$  mišje monoklonsko antitelo (DB1; eBioscience), biotinizirano anti-pacovsko IFN- $\gamma$  zečije poliklonsko antitelo, prečišćeno anti-mišje/pacovsko IL-17 pacovsko monoklonsko antitelo (eBio17CK15A5; eBioscience), biotinom obeleženo anti-mišje/pacovsko IL-17 pacovsko monoklonsko antitelo (eBio17B7; eBioscience). Uzorci su analizirani u duplikatima i rezultati su izračunati na osnovu standardne krive koja je napravljena od poznatih koncentracija rekombinantnih citokina: IL-10 (R&D Systems), IFN- $\gamma$  i IL-17 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).

### **3.8. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije**

Metodom protočne citofluorimetrije moguće je brzo i precizno okarakterisati fluorescentne signale dobijene od pojedinačnih ćelija. Ova metoda omogućava simultanu analizu više površinskih i unutarćelijskih markera koji su obeleženi različitim fluorescentnim bojama. Intenzitet fluorescencije obeleženih uzoraka je detektovan na CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analiziran je korišćenjem softverskog programa FlowMax (Partec, GmbH, Münster, Nemačka).

#### **3.8.1. Analiza fenotipskih markera ćelija**

Priprema ćelija za analizu metodom protočne citofluorimetrije podrazumevala njihovo izlaganje fluorescentno obeleženim antitelima za površinske markere ćelija imunskog sistema. Nakon izolacije  $3 \times 10^5$  ćelija je resuspendovano u rastvoru za bojenje ćelija. Dodavano je antitelo i inkubirano je 30 minuta na  $+4^\circ$  C. Po isteku inkubacije ćelije su taložene na 800g, tri minuta nakon čega su resuspendovane u 2ml PBS-a.

Ćelije su zatim analizirane na protočnom citofluorimetru (Partec, Munster, Nemačka) korišćenjem CyFlow programa. Rezultati citofluorimetrije su prikazani kao procenat ćelija koji je vezao odgovarajuće antitelo. Takođe, određivana je i jačina fluorescencije, mfi (engl., mean fluorescence intensity).

Ćelije su obojene sledećim antitelima: anti-CD4 konjugovano sa PE (mišje monoklonsko OX35; eBioscience, San Diego, CA, SAD), anti-CD8 konjugovano sa FITC (mišje monoklonsko OX8; AbD Serotec, Oxford, UK), anti-CD25 konjugovano sa FITC (mišje monoklonsko NDS601; AbD Serotec), anti-CD80 konjugovano sa PE (mišje monoklonsko 3H5; eBioscience), anti-MHC II konjugovano sa FITC (mišje monoklonsko HIS19; eBioscience). Odgovarajuće izotipske kontrole su korišćene za određivanje granica za pozitivnost ćelijskih markera. Korišćena je i negativna kontrola u kojoj su ćelije inkubirane bez dodatog antitela (neobojene ćelije). Tipično, proporcija ćelija obojenih antitelima izotipske kontrole je bila <1 %.

### **3.8.2. Detekcija regulatornih T ćelija**

Regulatorne ćelije su detektovane analizom površinskih markera CD4 i CD25 i unutarćelijskog transkripcionog faktora FoxP3. Treg su definisane kao populacija ćelija koja eksprimira FoxP3 u okviru populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija. Ćelije su resuspendovane u rastvoru PBS-a sa 1% BSA i dodata su antitela za površinske markere CD4-PE i CD25-FITC po opisanom protokolu. Po isteku inkubacije, ćelije su fiksirane kako bi se zadržala struktura ćelija. Potom su ćelije permeabilizovane rastvorom za permeabilizaciju ćelija kako bi kroz nastale pore u ćelijskoj membrani molekuli unutar ćelije postali dostupni. Ćelije su zatim obojene sa FoxP3 antitelom konjugovanim sa PE-Cy5 (pacovsko monoklonsko antitelo FJK-16s, eBioscience).

Odgovarajuće izotipske kontrole su korišćene za određivanje granica za pozitivnost ćelijskih markera. Tipično, proporcija ćelija obojenih antitelima izotipske kontrole je bila <1 %. Analiza je urađena na Partec CyFlow Space citometru (Partec, Munster, Nemačka). Rezultati citofluorimetrije su prikazani kao proporcija ćelija vezanih za odgovarajuće antitelo.

### **3.9. Priprema histoloških preparata u parafinu**

Kako bi se detektovali inflamatorni infiltrati u kičmenim moždinama imunizovanih životinja, izvršeno je bojenje hematoksilinom i eozinom. Histološka analiza je rađena na imunizovanim AO pacovima koji su primali antibiotski tretman i njihovim kontrolama, kao i na imunizovanim DA pacovima kojima je izvršen transfer mikrobiote creva AO pacova i odgovarajućim kontrolama. Pacovi su žrtvovani na piku bolesti, kičmene moždine su izolovane i fiksirane u 4 % paraformaldehidu rastvorenom u PBS-u, 48h na +4°C. Nakon fiksacije, uzorci su držani dva puta po 30 minuta u 30 % etanolu i dva puta po 30 minuta u 50 % etanolu. Po isteku vremena tkivo je ostavljano u 70 % etanolu u kojem može da stoji i do 6 meseci do dalje analize. Uzorci su držani dva puta po 1h u 96% i 100 % etanolu, a potom dva puta po pet minuta u ksilolu. Tkivo je zatim kalupljeno u otopljenom parafinu i preparati su čuvani na sobnoj temperaturi. Isečci transverzalnog lumbosakralnog dela (L1-L5) debljine 5 µm su stavljeni na ista predmetna stakla SuperFrost (ThermoScientific, Braunschweig, Nemačka).

#### **3.9.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom**

Vršena je deparafinizacija tkivnih isečaka držanjem dva puta po pet minuta u ksilolu, kako bi bili dostupni za bojenje. Nakon toga su preseći rehidratirani u rastvoru etanola smanjujući koncentracije od 100 %, preko 90 % do 70 %, i na kraju u destilovanoj vodi. Preseći su zatim izlagani bojenju hematoksilinom u trajanju od 10 minuta kako bi se obojila ćelijska jedra, a zatim i bojenju eozinom u trajanju od dva minuta čime su bojene proteini citoplazme. Uzorci su sprovedeni sukcesivno kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70 %, 90 %, 100 %) i ksilola u trajanju od po pet minuta. Nakon ksilola, preseći kičmenih moždina su pokriveni pokrovnim staklom korišćenjem DPX-a. Preseći su posmatrani i fotografisani na mikroskopu Leica (Leica Microsystems GmbH), korišćenjem softvera ACDSsee 6. Obojene ćelije su brojane iz pet životinja po grupi. Broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu je izbrojan iz histoloških podataka dobijenih od 120 preseka po grupi.

### **3.10. Analiza mikrobiote**

#### **3.10.1. Priprema uzoraka za analizu**

Uzorci fecesa su sakupljeni i od AO i od DA životinja od majki na dan okota, a od mladunaca u vremenskim tačkama koji su odgovarali danu razdvajanja od majki (četvrta nedelja života), danu imunizacije (osam nedelja starosti), kao i terminima koji odgovaraju fazi indukcije (devet nedelja starosti), vrhunca bolesti (10 nedelja starosti) i oporavka kod pacova soja DA. Po sakupljanju, uzorci su zamrzavani i čuvani na -20° do analize.

#### **3.10.2. Izolovanje DNK**

Bakterijska DNK iz uzoraka tankog creva je izolovana korišćenjem kita za izolaciju DNK iz tkiva (ZR Genomic DNA™ – Tissue MiniPrep; Zymo Research, Irvine, CA, USA). Bakterijska DNK iz zamrznutih uzoraka fecesa je izolovana upotrebom QIAamp DNA stool minikit za izolaciju DNK iz fecesa (Qiagen, Hilden, Nemačka).

#### **3.10.3. Denaturišuća gradijent gel elektroforeza (DGGE) i sekvenciranje DNK**

DGGE je tehnika koja se koristi za separaciju DNK fragmenata na osnovu njihove pokretljivosti pod uslovima povećane denaturacije (uglavnom je povećana koncentracija formamida/uree) (Fischer i Lerman, 1979). Ovo je molekularna metoda koja se često koristi za brzu analizu sastava, raznovrsnosti i dinamike populacije mikroorganizama. Metoda je brza, dostupna i dozvoljava simultanu analizu više uzoraka.

Nakon izolacije DNK sledi priprema PCR (lančana reakcija polimeraze; engl. Polymerase Chain Reaction) produkata za DGGE analizu, priprema gela i puštanje uzoraka na gel, a zatim sekvenciranje DGGE traka. PCR sa izolovanom DNK kao

matricom je postavljen u skladu sa procedurom iz rada Lukic *i sar.*, 2013. Neposredno nakon završetka reakcije, PCR produkti su pomešani sa bojom za nanošenje (6x Loading Dye Solution, Thermo Scientific) u odnosu 1:1 i 10 µl smeše je naneto na gel sa gradijentnom denaturišućeg agensa koji je pripremljen uz pomoć aparata DGGE-2001 (C.B.S. Scientific, Kalifornija, SAD). Gelovi su sadržali 16,25 % rastvor akrilamid:bisakrilamid 19:1 (40 %) i 30 – 60 % gradijent uree i formamida (80 % se odnosi na 5,6 M ureu i 32 % formamid). Uzorci na gelu su razdvajani tokom 16h, pri konstantnoj voltaži od 85 V u 1xTAE pufer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,4, 20 mM sirćetna kiselina) i temperaturi razdvajanja od 56-60°C. Po završetku elektroforeze, gel je pažljivo skinut sa ploča i fiksiran rastvorom 10 % etanola i 0,5 % sirćetna kiselina i obojen u 0,1 % srebro nitratu. Razvijanje je vršeno u rastvoru 1,5 % NaOH, 0,1 % NaBH<sub>4</sub>, i 0,048 % formaldehida, do pojave vidljivih traka. DNK fragmenti od interesa su izolovani sa DGGE gela i usitnjeni, nakon čega je suspenzija inkubirana na +98°C u trajanju od 10 minuta (Lukić *i sar.*, 2013). Nakon inkubacije, suspenzija je taložena kako bi se odvojile čestice gela. Supernatanti (30 µl) su korišćeni za PCR sa setom prajmera specifičnim za *Lactobacillus* sp. i srodne mlečnokiselinske bakterije, Lab-0159f (Metabion International, Martinsried, German), u kombinaciji sa univerzalnim reverznim prajmerom Uni-0515GCr (Metabion International, Martinsried, Germany; Heilig *i sar.*, 2002), kao i sa univerzalnim setom prajmera U-968-GC-f u kombinaciji sa L1401-r, koji su komplementarni 16s rDNK specifičnoj za Eubacteria. Dobijeni produkti PCR su prečišćeni korišćenjem QIAquick PCR purification kit (Qiagen) i ligirani unutar pBluescriptT/A vektora (Uzelac *i sar.*, 2015), odnosno pJET1.2/blunt vektora (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) (20). Ligirani konstrukti su transformisani u Ca<sub>2</sub>-indukovanim kompetentnim DH5α ćelijama (Hanahan, 1983). Transformanti sa ligiranim konstruktima su odabirani kao bele kolonije na Luria-Bertani agar (LA) pločama koje sadrže 100 µg/ml ampicilina i 20 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktozidaza) kao što je preporučeno od proizvođača (Promega, Madison, WI, USA). Za svaku izolovanu traku DNK je odabrana jedna bela kolonija i plazmidi su izolovani upotrebom QIAprep spin miniprep kita (Qiagen). Sekvenciranje izolovanih pBluescriptT/A plazmida koji sadrže insert je urađeno upotrebom M13F/R prajmera u MacroGen Europe Service (Amsterdam, Holandija). Sekvenciranje izolovanih pJET1.2/blunt plazmida koji sadrže insert je urađeno

upotrebom pJET1.2 prajmera u Macrogen Europe Service (Amsterdam, Holandija). Anotacija sekvenci i pretraživanje baza podataka za sličnosti u sekvencama je urađeno pomoću BLAST programa (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **3.10.4. Filogenetska analiza**

Filogenetske interferencije su dobijene korišćenjem programa MEGA verzije 7.0 (Kumar *i sar.*, 2016). Višestruka poravnanja DNK sekvenci su izvršena upotrebom Clustal W sa podrazumevanim parametrima. Konstrukcija DA/AO filogenetskog stabla mikrobiote creva je sprovedena uz pomoć Maximum Likelihood (ML) metode bazirane na Tamura-Nei modelu. Butstrap 1000 kopija je korišćen za zaključivanje ML nivoa stabla. Analiza je uključivala 30 nukleotidnih sekvenci, 16S rRNK gene dobijene uz pomoć DGGE analize.

#### **3.11. Statistička obrada podataka**

Two-way ANOVA praćena Studentovim t testom (two-tailed) ili Mann-Whitney U test su korišćeni za statističku analizu podataka. Statistički značajnom je smatrana p-vrednost manja od 0,05. Za analizu DGGE profila mikrobiote, Fišerov exact test je primenjen. Razlike u DGGE profilu mikrobiote creva kod različitih grupa životinja su izračunavane po Dice koeficijentu sličnosti (Dsc, engl. Dice similarity coefficient). Sličnost između pojedinačnih grupa je određena kao:

$$Dsc = 2j \times 100 / a + b$$

Gde je: a broj DGGE traka u jednoj grupi; b broj DGGE traka u drugoj grupi; j broj istih traka u obe grupe. Dsc = 100 predstavlja potpuno identične DGGE profile, dok Dsc = 0 predstavlja potpuno različite DGGE profile.



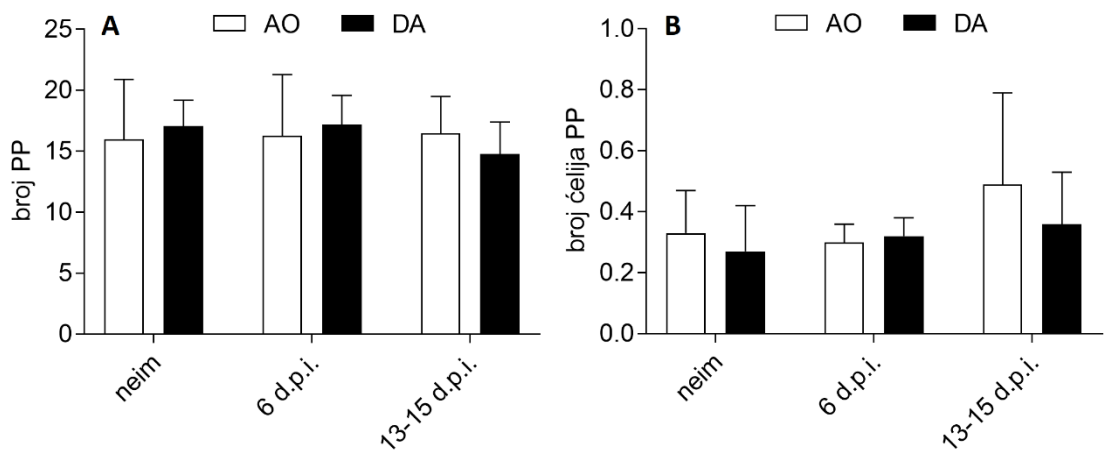
# **4. Rezultati**

#### **4.1. Razlike između sojeva AO i DA na nivou GALT-a**

Sve je veći broj podataka koji ukazuje na značaj GALT-a u patogenezi autoimunosti CNS-a. S obzirom da se AO i DA pacovi razlikuju u podložnosti indukcije EAE, ova dva soja pacova su korišćena u eksperimentima kako bismo ispitivanjem razlika na nivou GALT-a između soja otpornog na EAE i soja podložnog indukciji EAE-a identifikovali potencijalni ćelijski i molekularni faktori koji su važni za otpornost na EAE. EAE je indukovano ubrizgavanjem HKM+KFA emulzije ili, alternativno, MBP+KFA emulzije. Upoređivani su GALT i mikrobiota creva između sojeva. Analize su rađene na neimunizovanim životinjama i imunizovanim pacovima AO i DA soja, u vremenskim tačkama koje odgovaraju induktivnoj fazi i piku bolesti kod DA pacova. Iz pacova AO i DA soja su izolovane i analizirane ćelije MLČ i PP. Upoređivana je brojnost ćelija između sojeva, kao i unutar soja pre i nakon imunizacije. Izolovane ćelije su fenotipski okarakterisane i praćena je produkcija citokina ELISA metodom, kao i ekspresija površinskih markera protočnom citofluorimetrijom.

#### 4.1.1. Brojnost Pejerovih ploča neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

PP su najizraženije limfne strukture creva. Imaju strukturu limfnih folikula i predstavljaju mesta indukcije imunskog odgovora u crevima (Jung, Hugot i Barreau, 2010). Kako bismo ustanovili da li i u kojoj meri GALT ima ulogu u otpornosti AO pacova na indukciju EAE-a, prvo je bilo neophodno utvrditi postojanje bazičnih razlika između sojeva na nivou GALT u *in vitro* eksperimentima urađenim na ćelijama izolovanim iz neimunizovanih pacova sojeva AO i DA. Izolovane su PP tankog creva i upoređivan je broj PP između sojeva, kao i broj ćelija po PP. Nije bilo statistički značajne razlike između ova dva soja pacova kod neimunizovanih životinja. Kako bismo ustanovili šta se dešava tokom EAE-a, životinje su imunizovane HKM+KFA. Broj PP i broj ćelija po PP je upoređivan između sojeva u terminu koji odgovara induktivnoj fazi EAE kod DA pacova (šesti d.p.i.) i piku bolesti (13-15 d.p.i.). Ni u jednom od posmatranih termina nije bilo razlika u broju PP izolovanih iz svake životinje, kao ni u broju PPĆ između sojeva. Brojnost ćelija se nije menjala nakon imunizacije.

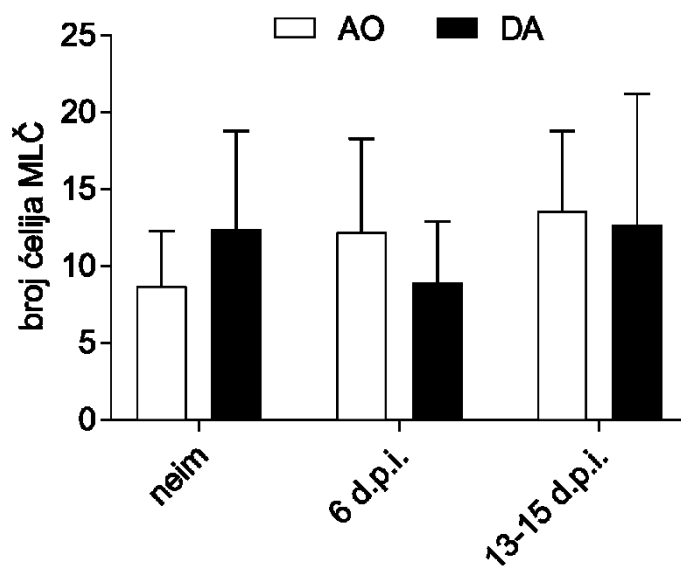


**Grafik 1. Broj PP i broj ćelija u PP kod neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova.**

PP su izolovane iz tankog creva neimunizovanih životinja i životinja imunizovanih HKM+KFA (5mg/ml) u vremenskim tačkama koje odgovaraju induktivnoj fazi kod DA pacova (šesti d.p.i.) i piku bolesti (13.-15. dan) (A). Ćelije PP su izbrojane metodom tripan plavo bojenja, gde su brojane samo žive ćelije (koje se nisu obojile plavo) (B). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta.

#### 4.1.2. Brojnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

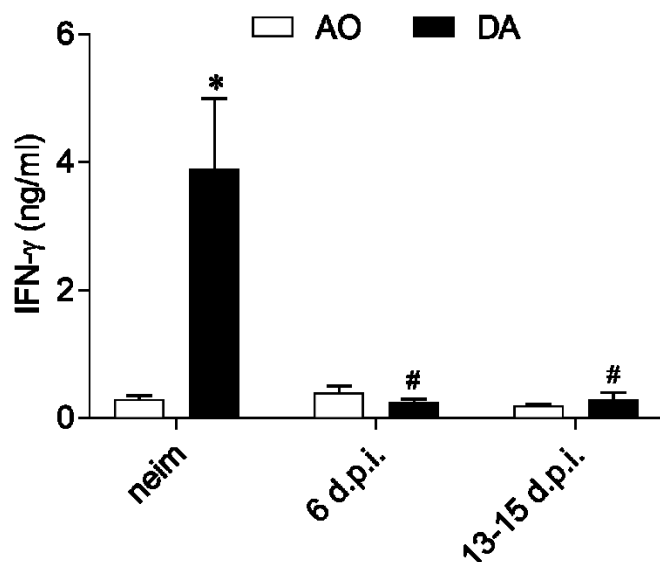
Limfni čvorovi koji dreniraju creva su među najvećim u telu, oslikavajući konstantnu izloženost creva sredinskim faktorima. U MLČ se odigrava diferencijacija efektorskih i Treg koji su poreklom iz različitih delova creva (Ivanov *i sar.*, 2006). Iz tog razloga su MLČ bile sledeće limfne strukture koje smo upoređivali između AO i DA pacova. MLČ su upoređivani između različitih sojeva neimunizovanih životinja i imunizovanih životinja šestog d.p.i. i 13-15 d.p.i. Po četiri MLČ je izolovano iz svake životinje i broj ćelija po MLČ je analiziran. Nije bilo statistički značajne razlike kod neimunizovanih AO i DA pacova. Nakon imunizacije životinja HKM+KFA ni u jednom od posmatranih termina nije uočena razlika u broju MLČ između sojeva, kao ni u odnosu na neimunizovane životinje. Brojnost ćelija se nije razlikovala između sojeva i nije se menjala nakon imunizacije.



**Grafik 2. Broj ćelija MLČ AO i DA soja pacova.** MLČ su izolovane iz neimunizovanih životinja i životinja kojima je EAE indukovano ubrizgavanjem HKM+KFA (5 mg/ml). Ćelije MLČ imunizovanih AO i DA pacova su izolovane u vremenskoj tački koja odgovara induktivnoj fazi kod DA pacova (šesti d.p.i.) i piku bolesti (12-16. dan). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta.

### 4.1.3. Produkcija IFN- $\gamma$ u ćelijama Pejerovih ploča

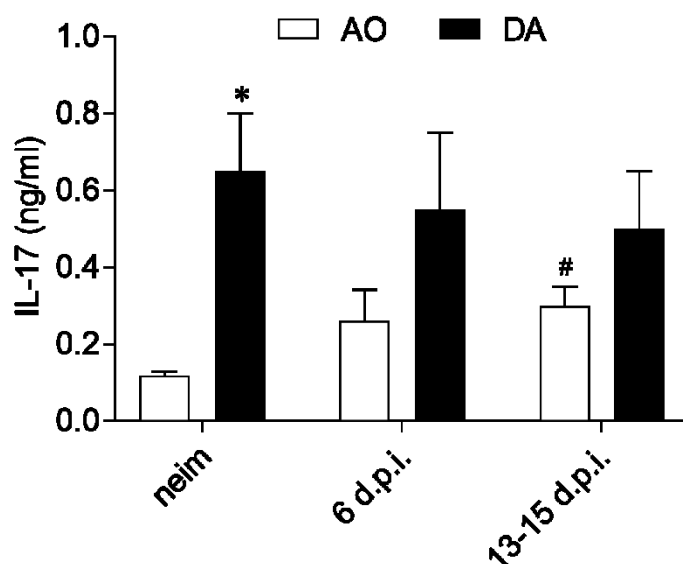
U cilju utvrđivanja razlika u efektorskim funkcijama limfocita važnih za patogenezu EAE-a, upoređivan je nivo IFN- $\gamma$  kao glavnog citokina kog proizvode Th1 ćelije, između različitih sojeva pacova. Ćelije PP su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja i kultivisane u prisustvu ConA. Ćelije PP DA pacova koje su stimulirane ConA, proizvodile su više IFN- $\gamma$  nego ćelije PP AO pacova. Produkcija IFN- $\gamma$  bila je smanjena u PPC oba soja nakon imunizacije i u induktivnoj fazi i u pik EAE-a.



**Grafik 3. Produkcija IFN- $\gamma$  u PPC AO i DA pacova.** PP i ćelije PP su izolovane iz neimunizovanih životinja, šestog d.p.i. (induktivna faza EAE-a) i 13-15 d.p.i. (pik EAE-a). Ćelije PP su nakon izolacije stimulirane ConA. Nakon 24h sakupljeni su supernatanti i ELISA metodom je određivan nivo citokina. Dobijene vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.

#### 4.1.4. Produkcija IL-17 u ćelijama Pejerovih ploča

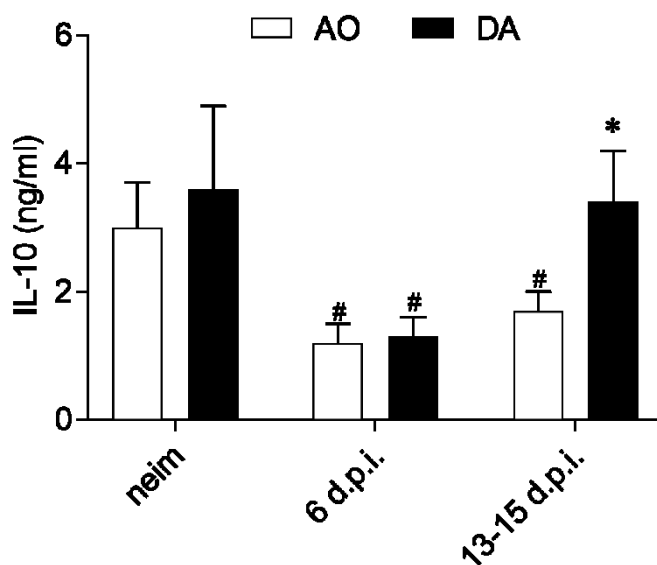
Kako bi se odredila funkcionalnost Th17 ćelija u PP, merena je produkcija proinflamacijskog citokina IL-17. Produkcija IL-17 u ćelijama PP je upoređivana između pacova sojeva AO i DA, kao i unutar soja između neimunizovanih i imunizovanih životinja. Ćelije su gajene u kulturi i stimulisane ConA. Uočeno je da nakon stimulacije ćelija ConA dolazi do značajno veće produkcije IL-17 kod DA pacova u odnosu na stimulisane ćelije AO pacova. Ova razlika između sojeva se gubila nakon imunizacije. Generalno su PPĆ DA pacova produkovale više IL-17 od PPĆ AO pacova.



**Grafik 4. Produkcija IL-17 u PP AO i DA pacova.** Ćelije PP su izolovane iz neimunizovanih životinja i životinja imunizovanih HKM+KFA (5 mg/ml) u dva termina, šestog d.p.i. i 13-15 d.p.i. Nakon izolovanja, ćelije su kultivisane i stimulisane u prisustvu ConA. Nakon 24h inkubacije, supernatanti su sakupljeni i ELISA metodom je određivan nivo IL-17. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.

#### 4.1.5. Produkcija IL-10 u ćelijama Pejerovih ploča

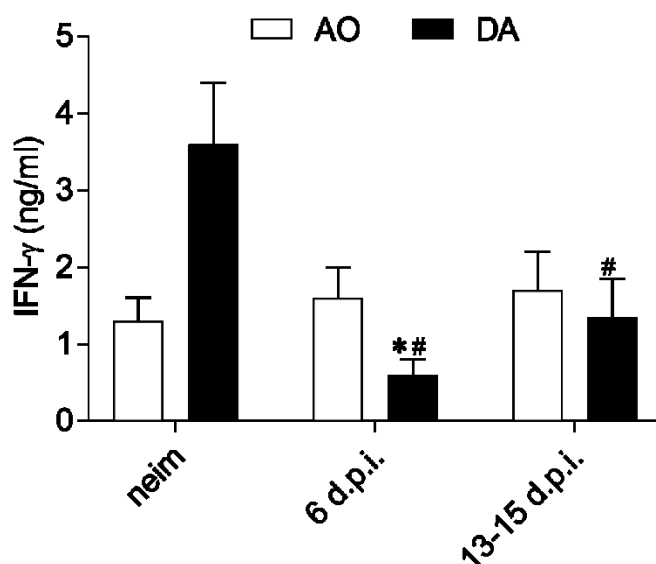
IL-10 je antiinflamacijski citokin koji ima važnu ulogu u interakciji mikrobiote crevna i GALT-a. Njegova produkcija od strane Treg u GALT-u omogućava ovim ćelijama da ostvare antiencefalitogenu aktivnost u EAE-u (Berer i Krishnamoorthy, 2012; Telesford, Ochoa-Repáraz i Kasper, 2014). Zato je bilo važno odrediti da li postoje razlike u produkciji ovog citokina između soja koji je otporan na indukciju EAE-a i soja podložnog na indukciju EAE-a. Produkcija IL-10 je određena u PPĆ izolovanim iz neimunizovanih životinja i imunizovanih šestog i 13-15 d.p.i. Produkcija IL-10 je veća kod neimunizovanih životinja oba soja u odnosu na dan 6 ili 13-15 d.p.i. Jedini izuzetak je uočen kod PPĆ DA pacova u periodu 13.-15. danu, gde je nastanak IL-10 sličan kao kod neimunizovanih životinja. Sojne razlike su uočene samo 13.-15. dana, kada je produkcija IL-10 bila veća kod DA pacova u odnosu na AO pacove.



**Grafik 5. Produkcije IL-10 u PPĆ AO i DA pacova.** Produkcija IL-10 je određivana u kulturi PPĆ dobijenih iz neimunizovanih AO i DA pacova i na danu šest i 13-15 nakon imunizacije. Kultivacija ćelija je trajala 24h u prisustvu ConA. Koncentracija IL-10 je merena ELISA testom iz supernatana ćelijskih kultura. Dobijene vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.

#### 4.1.6. Produkcija IFN- $\gamma$ u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova

Kako bismo odredili ulogu GALT-a u patogenezi EAE-a, određivali smo funkcionalnost Th1 ćelija i u MLČ. U tu svrhu je merena produkcija proinflamacijskog citokina, IFN- $\gamma$ . Upoređivana je produkcija u ćelijama AO i DA pacova izolovanih u različitim terminima, kod neimunizovanih životinja i nakon indukcije EAE-a. Ćelije MLČ neimunizovanih DA pacova produkovale su više IFN- $\gamma$  nego ćelije MLČ AO pacova. Nakon imunizacije došlo je do statistički značajnog smanjenja u produkciji IFN- $\gamma$  u ćelijama MLČ DA pacova. Kao posledica toga, uočava se značajno manja produkcija u ćelijama MLČ DA pacova nego u ćelijama AO pacova šestog d.p.i.

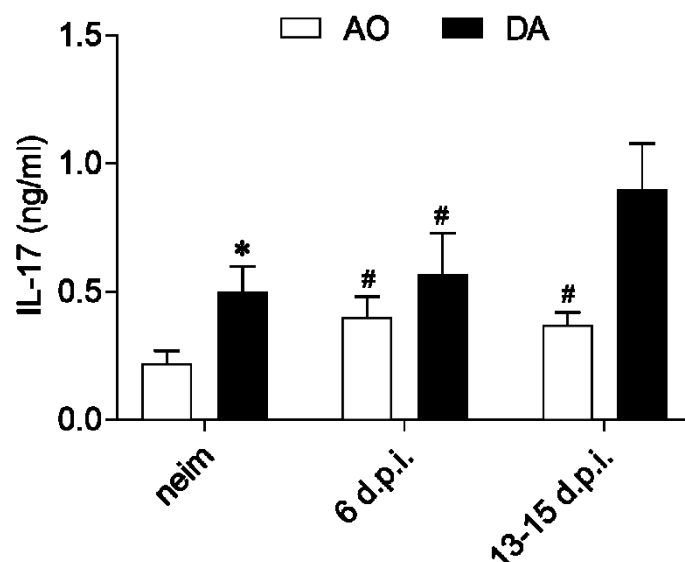


**Grafik 6. Produkcija IFN- $\gamma$  u ćelijama MLČ AO i DA pacova.** Ćelije MLČ su izolovane iz neimunizovanih AO i DA pacova. EAE je indukovao ubrizgavanjem emulzije HKM+KFA (5 mg/ml) u jednu zadnju šapicu. Šestpg d.p.i. i 13-15 d.p.i. izolovano je po četiri MLČ iz kojih su dobijene ćelije. Sve ćelije su kultivisane u prisustvu ConA, tokom 24h, nakon čega je određivana produkcija IFN- $\gamma$  ELISA testom. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.



#### 4.1.7. Produkcija IL-17 u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova

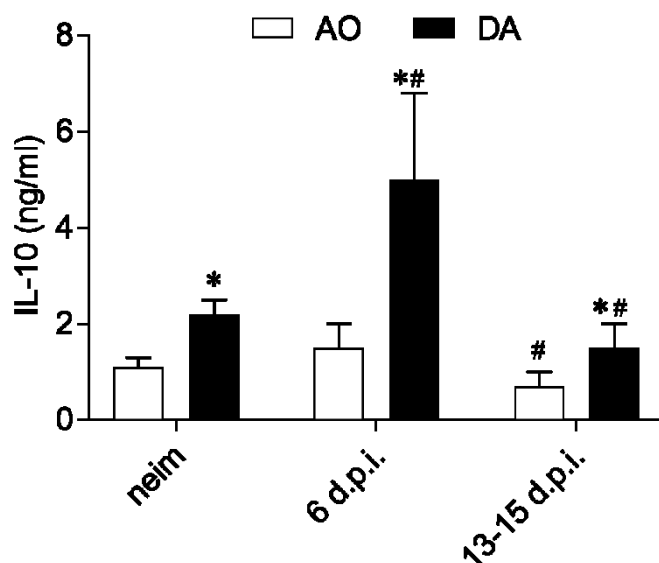
Isto kao i kod PP, i u MLČ smo želeli da ispitamo funkcionalnost još jedne populacije CD4<sup>+</sup> T limfocita bitne za patogenezu EAE, Th17 ćelija. Produkcija IL-17 je merena u ćelijama MLČ AO i DA pacova koji su bili neimunizovani, a zatim i kod životinja kojima je indukovano EAE i to u tačkama koje odgovaraju induktivnoj fazi i piku bolesti. Uočava se značajno veća produkcija IL-17 kod neimunizovanih DA pacova, da bi se ta razlika izgubila nakon imunizacije šestog d.p.i., a zatim je u piku bolesti ponovo došlo do značajno veće produkcije IL-17 kod DA pacova u odnosu na AO pacove.



**Grafik 7. Produkcija IL-17 u MLČĆ AO i DA pacova.** Ćelije MLČ su izolovane iz neimunizovanih AO i DA pacova. EAE je indukovano ubrizgavanjem emulzije HKM+KFA (5 mg/ml) u jednu zadnju šapicu. Šestog d.p.i. i 13-15 d.p.i. izolovano je po četiri MLČ iz kojih su dobijene ćelije. Sve ćelije su kultivisane u prisustvu ConA, tokom 24h, nakon čega je određivana produkcija IL-17 ELISA testom. Dobijeni podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.

#### 4.1.8. Produkcija IL-10 u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova

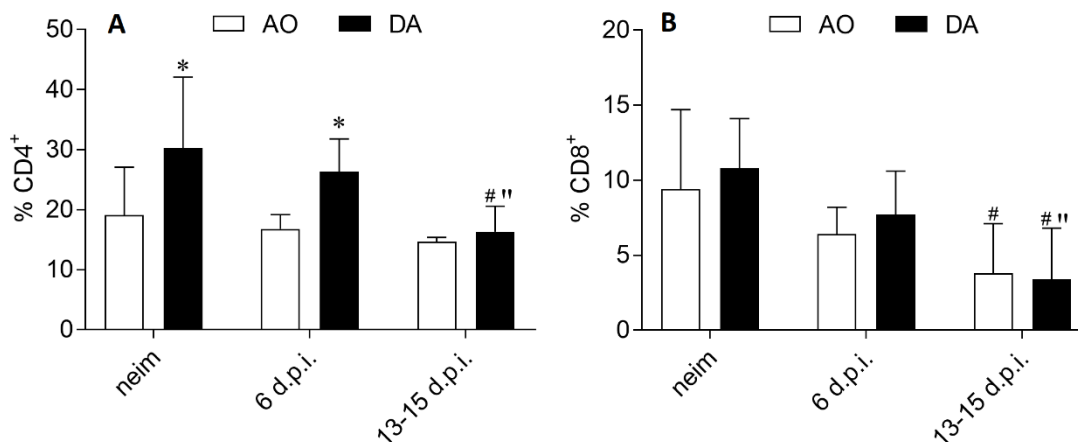
Kao antiinflamacijski citokin, IL-10 ima bitnu ulogu u održavanju imunske homeostaze u crevima. Zato je bilo bitno ispitati kako izgleda profil produkcije IL-10 u ćelijama GALT-a AO i DA pacova koji se razlikuju po podložnosti na indukciju EAE-a. Produkcija IL-10 je određivana u kulturi ćelija MLČ neimunizovanih pacova AO i DA soja, kao i iz imunizovanih pacova oba soja šestog dana i 13-15. dana nakon imunizacije. Oslobođanje IL-10 je bilo slično kod neimunizovanih AO pacova i šestog dana, ali se zatim smanjivalo u terminu 13-15 d.p.i. Nasuprot tome, produkcija IL-10 se povećavala šestog dana kod DA pacova, a zatim se vratila na bazalni nivo, kao kod neimunizovanih životinja, u terminu 13-15 d.p.i. Zanimljivo je da je produkcija IL-10 bila značajno veća kod DA pacova nego kod AO u svim posmatranim vremenskim tačkama.



**Grafik 8. Produkcija IL-10 u MLČĆ AO i DA pacova.** Ćelije MLČ su izolovane iz neimunizovanih AO i DA pacova. EAE je indukovano ubrizgavanjem emulzije HKM+KFA (5 mg/ml) u jednu zadnju šapicu. Šestog d.p.i. i 13-15 d.p.i. izolovano je po četiri MLČ iz kojih su dobijene ćelije. Sve ćelije su kultivisane u prisustvu ConA, tokom 24h, nakon čega je određivana produkcija IL-10 ELISA testom. Dobijeni podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja.

#### 4.1.9. Fenotipska analiza ćelija Pejerovih ploča neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

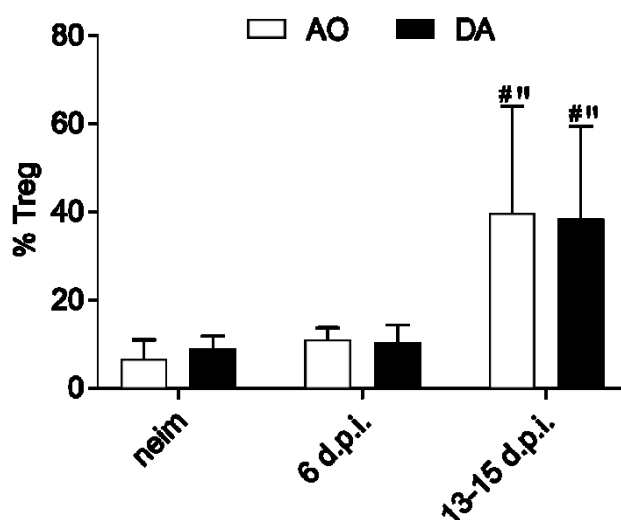
CD4<sup>+</sup> T limfociti, odnosno njihovi podtipovi Th1 i Th17 ćelije se smatraju glavnim ćelijskim populacijama u patogenezi EAE-a. Svojom aktivnošću oni privlače i aktiviraju druge ćelije, među kojima su i CD8<sup>+</sup> T ćelije. Smatra se da pored odlaska u CNS, deo encefalitogenih ćelija migrira i u GALT. Kako bi se odredio procenat T ćelija u PP, ćelije su obojene anti-CD4 i anti-CD8 antitelima. Samo žive ćelije su uključene u analizu. Proporcija CD4<sup>+</sup> T ćelija u PP bila je viša kod neimunizovanih DA pacova nego kod AO pacova, a isti fenomen se uočavao i šestog d.p.i. Nije bilo razlike između sojeva pacova u piku bolesti, međutim dolazilo je do značajnog smanjenja CD4<sup>+</sup> kod DA pacova u piku, i u odnosu na neimunizovane i u odnosu na šesti dan. Zastupljenost CD8<sup>+</sup> T ćelija se značajno smanjivala i kod AO i kod DA u piku u odnosu na neimunizovane. Nije bilo razlike između sojeva u zastupljenosti CD8<sup>+</sup> T ćelija ni kod neimunizovanih životinja, ni kod imunizovanih životinja. Kod DA je uočeno značajno smanjenje CD8<sup>+</sup> na piku u odnosu na šesti dan.



**Grafik 9. Analiza fenotipskih markera T ćelija u PP AO i DA pacova.** PPC su izolovane iz neimunizovanih AO i DA pacova, kao i iz životinja kojima je indukovano EAE, šestog i 13-15 d.p.i. Odmah nakon izolovanja, ćelije su obeležene fluorescentnim antitelima i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Procenti CD4<sup>+</sup> (A) i CD8<sup>+</sup> (B) ćelija su prikazani kao srednje vrednosti ± SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \*p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. #p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja. "p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između šestog i 13-15 d.p.i. unutar soja.

#### 4.1.10. Analiza zastupljenosti Treg u ćelijama Pejerovih pločama neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

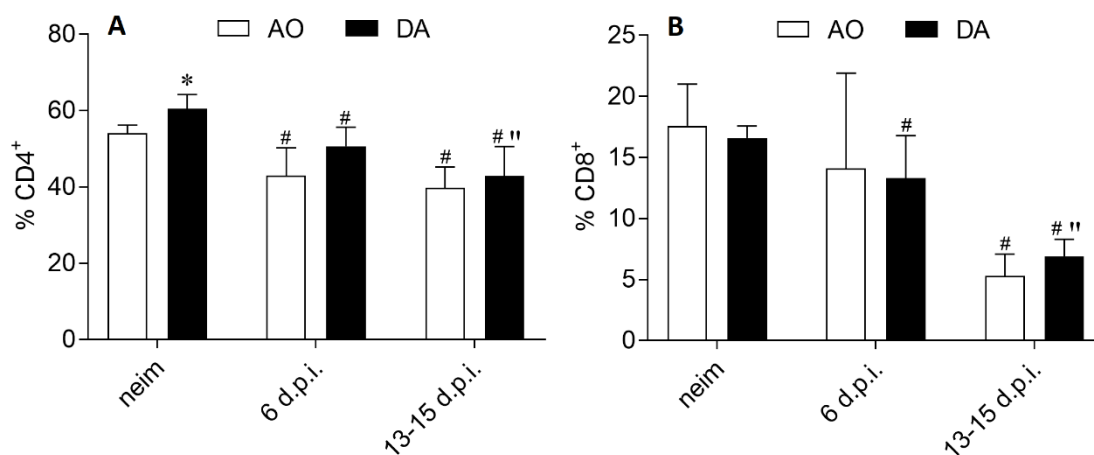
Treg su ključne za održavanje mutualizma sa mikrobiotom u crevima (Craig L. Maynard *i sar.*, 2012). Osim toga, primećeno je da Treg u GALT-u ima važnu ulogu i u regulaciji autoimunosti CNS-a. Produkcijom IL-10, ove ćelije dovode do ublažavanja simptoma EAE-a (Berer i Krishnamoorthy, 2012). Kako bi se identifikovale Treg, proporcija FoxP3<sup>+</sup> ćelija je određivana unutar populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija u okviru PP. Kod neimunizovanih životinja nije bilo razlike u zastupljenosti Treg između sojeva, i ovaj fenomen se zadržao i nakon imunizacije. Kod oba soja, AO i DA, pacova postojalo je značajno povećanje u piku bolesti i u poređenju sa neimunizovanim životinjama istog soja i u poređenju sa imunizovanim životinjama istog soja u induktivnoj fazi.



**Grafik 10. Prisustvo Treg u PP AO i DA pacova.** Razlike u Treg između sojeva su određivane u neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova. AO i DA pacovi su imunizovani emulzijom HKM+KFA i životinje su žrtvovane šestog i 13-15 d.p.i. Ćelije PP su izolovane i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Na osnovu procenta FoxP3<sup>+</sup> ćelija unutar populacije živih ćelija koje su ekspimirale površinske markere CD4 i CD25, određivana je zastupljenost Treg unutar PPĆ. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \*p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja. "p<0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između 6 i 13-15 d.p.i. unutar soja.

#### 4.1.11. Fenotipska analiza ćelija mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

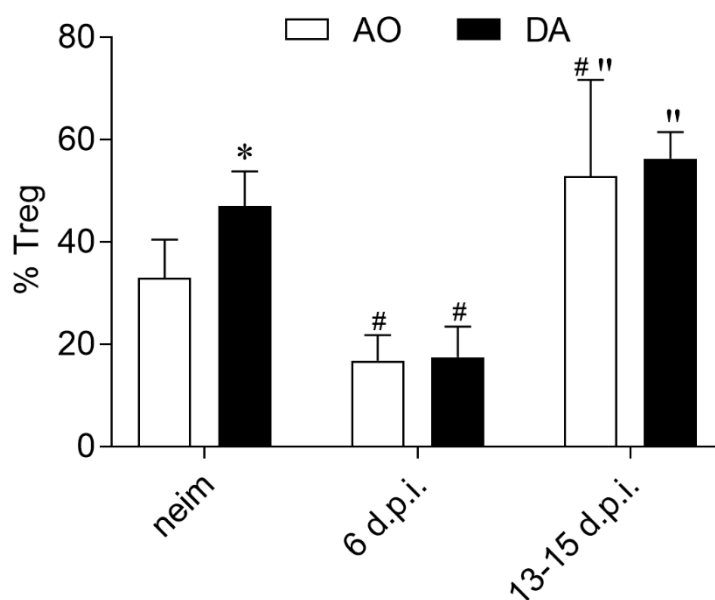
MLČ su analizirani kako bi se odredila zastupljenost različitih tipova ćelija u njima. Ćelije MLČ su analizirane kod neimunizovanih životinja i kod imunizovanih u induktivnoj fazi i u piku bolesti. Procenat CD4<sup>+</sup> ćelija bio je veći kod neimunizovanih pacova DA soja. Nakon imunizacije nije bilo razlike između sojeva u procentu CD4<sup>+</sup> ćelija ni u jednom terminu. Nakon imunizacije se smanjivao procenat CD4<sup>+</sup> ćelija kod oba soja pacova u oba posmatrana termina. Između neimunizovanih AO i DA pacova nije bilo statistički značajne razlike u procentu CD8<sup>+</sup> T ćelija. Šestog dana se smanjila zastupljenost CD8<sup>+</sup> T ćelija kod pacova AO soja u odnosu na neimunizovane životinje. U piku bolesti je uočen smanjen procenat CD8<sup>+</sup> T ćelija kod životinja oba soja u poređenju sa neimunizovanim životinjama. Kod AO pacova bilo je značajnog smanjenja u procentu CD8<sup>+</sup> T ćelija u piku bolesti u odnosu na induktivnu fazu.



**Grafik 11. Fenotipska analiza T ćelija MLČ AO i DA pacova.** MLČ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova u vremenskim tačkama koje odgovaraju induktivnoj fazi kod DA pacova (šesti d.p.i.) i piku bolesti (12-16. dan). Ćelije su analizirane na protočnom citofluorimetru. Dobijeni podaci su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja. ## $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između šestog i 13-15 d.p.i. unutar soja.

#### 4.1.12. Analiza zastupljenosti Treg u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih i imunizovanih AO i DA pacova

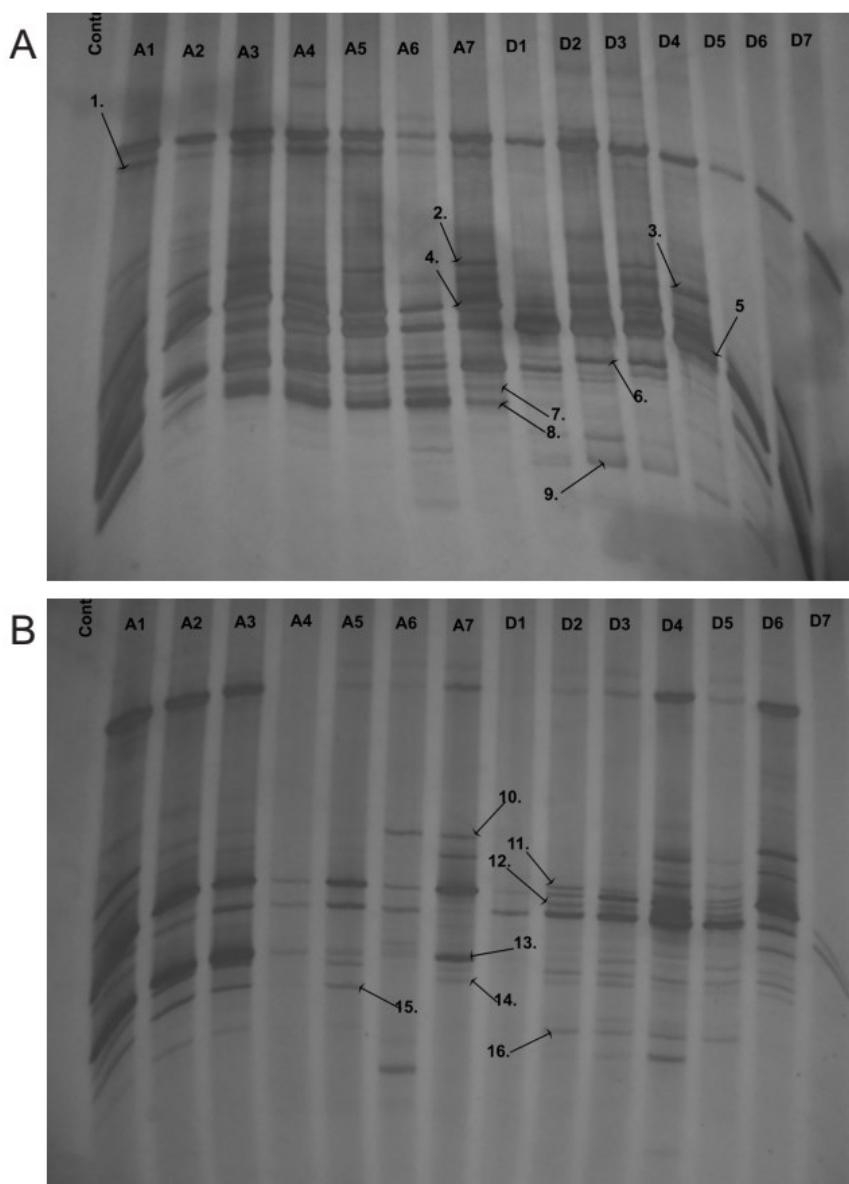
MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja. Treg su identifikovane kao  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  ćelije unutar ćelija MLČ. Procenat Treg kod neimunizovanih životinja je bio veći kod pacova soja DA nego kod pacova soja AO. Nakon imunizacije ćelije MLČ su analizirane u induktivnoj fazi i u piku bolesti. Nije bilo razlike između sojeva ni u jednom terminu. Značajno smanjenje se uočava i kod AO i kod DA u induktivnoj fazi u odnosu na neimunizovane. Kod AO i DA pacova u piku bolesti dolazi do značajnog povećanja zastupljenosti Treg u odnosu na induktivnu fazu, a kod DA pacova je povećanje na piku značajno i u odnosu na neimunizovane.



**Grafik 12. Prisustvo Treg u MLČĆ AO i DA pacova.** Ćelije MLČ su izolovane iz neimunizovanih AO i DA pacova, kao i iz životinja kojima je indukovano EAE imunizacijom HKM+KFA emulzijom. Protočnom citofluorimetrijom, unutar populacije  $CD4^+CD25^+$  ćelija određivan je procenat  $FoxP3^+$  ćelija, koje su okarakterisane kao Treg. Procenti Treg ćelija unutar MLČĆ prikazani su kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz četiri nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između AO i DA pacova. # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku u odnosu na neimunizovane životinje istog soja. " $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između 6 i 13-15 d.p.i. unutar soja.

## 4.2. Analiza crevne mikrobiote neimunizovanih životinja

Mikrobiota creva ima ulogu u razvoju struktura GALT-a. Takođe, može ostvarivati protektivne ili štetne efekte u različitim bolestima. Smatra se da disbioza mikrobiote creva ima ulogu u patogenezi autoimunosti CNS-a. Iz tog razloga smo upoređivali sastav mikrobiote creva sojeva pacova koji se razlikuju u podložnosti na EAE. Kako bismo odredili da li se pacovi sojeva AO i DA razlikuju po sastavu mikrobiote creva, diverzitet vrsta roda *Lactobacillus* je ispitan DGGE analizom amplikona rDNK korišćenjem prajmera specifičnih za *Lactobacillus* sp. Za ovu analizu, DNK je izolovana iz uzoraka fecesa ili tkiva tankog creva (završni deo ileuma).



Slika 1. DGGE profil rDNK amplifikona dobijenih korišćenjem prajmera specifičnih za *Lactobacillus* sp. 16 jedinstvenih traka DNK fragmenata, 9 poreklom iz fecesa (A) i 7 iz uzorka tkiva (D), klonirano je i sekvencirano.

Analiza sekvenci je pokazala da većina traka (14 od 16) pripada vrstama roda *Lactobacillus* (99,23- 100 % identičnosti na nivou nukleotidnih sekvenci). Među 16 analiziranih sekvenci, najzastupljenije su bile sekvence vrste *Lactobacillus murinus* (12 od 16), ukazujući na dominantnost ove bakterijske vrste kod pacova oba soja.

**Tabela 1. Klonovi sekvenciranih traka AO i DA pacova poreklom iz uzoraka fecesa (f) i tkiva tankog creva (t), sa procentima identičnosti u odnosu na poznate sekvence u BLAST bazi podataka.**

Uzorak	N <sup>o</sup> klonova (Slika 13)	Bakterijske vrste <sup>a</sup>	NSI (%)
AO (f)	1	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%
AO (f)	2	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.49%
AO (f)	4	<i>L. johnsonii</i> soj NCC 533 (NR_075064.1)	99.74%
AO (f)	7	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%
AO (f)	8	<i>Turicibacter sanguinis</i> soj MOL361 (NR_028816.1)	94.93%
DA (f)	3	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%
DA (f)	5	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.23%
DA (f)	6	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%
AO (t)	10	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	100.00%
AO (t)	13	<i>L. intestinalis</i> soj TH4 16S (NR_117071.1)	100.00%
AO (t)	14	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.23%
AO (t)	15	<i>Atopostipes suicloacalis</i> soj PPC79 (NR_028835.1)	96.65%
DA (t)	9	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	100.00%
DA (t)	11	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%
DA (t)	12	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.23%
DA (t)	16	<i>L. murinus</i> soj NBRC 14221 (NR_112689.1)	99.74%

<sup>a</sup>vrste su imenovane u odnosu na najrodnije bakterijske vrste. NSI-identičnost na nivou nukleotidne sekvence.



Kako bi se uporedile razlike u prisustvu specifičnih traka u DGGE profilu pacova soja AO i DA, upotrebljen je Fisher-ov egzakti test. Samo trake koje su jasno vidljive i nisu zamagljene su uključene u brojanje. Rezultati ovog testa su otkrili da je kod AO pacova detektovano statistički značajno više predstavnika vrste *L.murinus*, što se vidi po trakama 1 i 2. Generalno, AO pacovi imali su veći diverzitet *Lactobacillus* vrsta. Osim toga, prisustvo specifičnih traka uočeno je kod AO, ali ne i kod DA pacova (trake 8 i 15). Sekvenciranje trake 8 je pokazalo najveću identičnost sa rodom *Turicibacter* (94,93% *Turicibacter sanguinis* soj MOL361) u uzorku fecesa, a sekvenciranje trake broj 15 je pokazalo najveću identičnost sa rodom *Atopostipes* (96,65% *Atopostipes suicloacalis* soj PPC79) u uzorku tkiva creva.

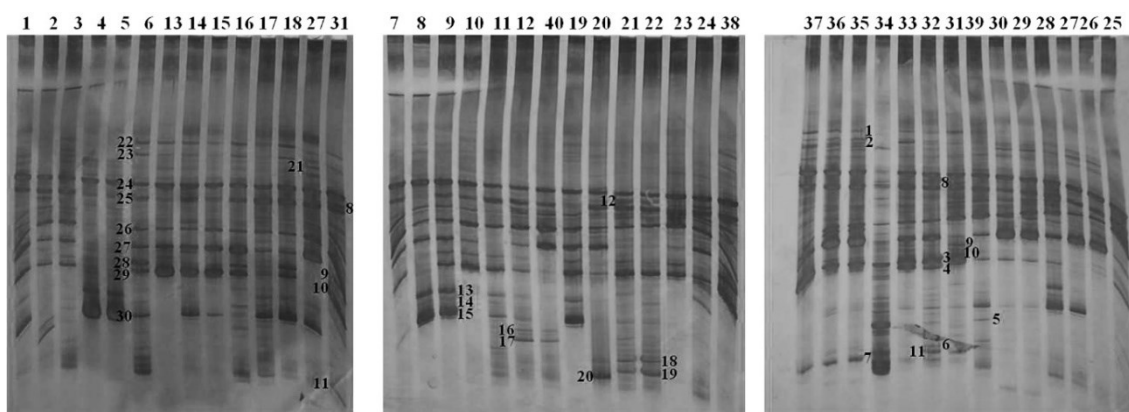
**Tabela 2. Rezultati Fišerove egzaktne analize prisustva specifičnih traka na DGGE profilu AO i DA pacova.**

Broj traka	Broj uzoraka koji su sadržali ispitivane trake		p (Fišerov egzakti test)
	AO pacovi	DA pacovi	
1	7	1	0.005 *
2	6	1	0.029 *
3	4	4	1.000
4	7	5	0.462
5	6	6	1.000
6	1	3	0.559
7	5	1	0.103
8	7	0	0.001 *
9	0	4	0.070
10	5	1	0.103
11	0	4	0.070
12	0	3	0.192
13	6	3	0.266
14	1	3	0.559
15	4	0	0.070
16	3	4	1.000

\*statistički značajna razlika između AO i DA pacova ( $p < 0,05$ )

### 4.3. Analiza crevne mikrobiote imunizovanih životinja

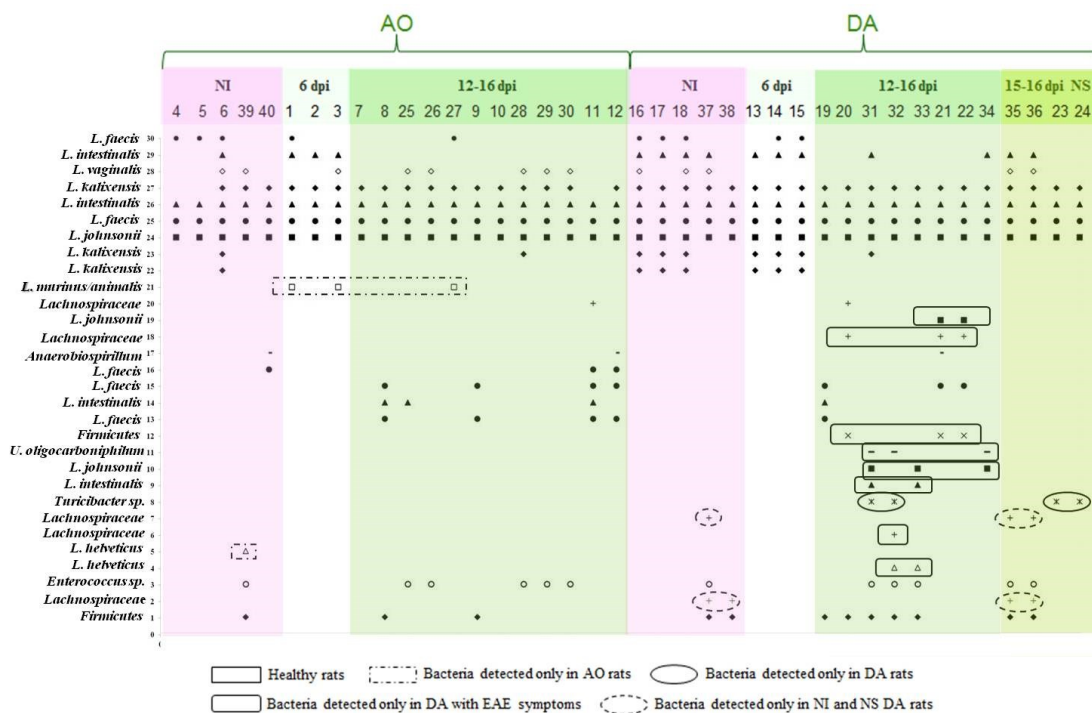
Da bismo odredili potencijalne mikroorganizme odgovorne za ublažavanje simptoma EAE-a kod DA pacova kao i kod AO pacova koji su otporni na indukciju EAE-a, diverzitet mikrobiote creva je okarakterisan DGGE analizom rDNK amplicona upotrebom DNK iz uzoraka fecesa koji su uzorkovani u različitim fazama bolesti kod DA pacova. Analiza sekvenci je pokazala da većina traka (19 od 30) pripada vrstama roda *Lactobacillus*. Među tim sekvencama, najzastupljenije su bile vrste *Lactobacillus kalixensis*, *L. johnsonii*, *L. intestinalis* i *L. faecalis* koji su detektovani u svim uzorcima, verovatno čineći osnovnu mikrobiotu (engl. „core microbiota“) koja je merljiva ovom metodom. *L. helveticus*, *L. murinus/animalis* i *L. vaginalis*, kao i vrste roda *Enterococcus* su bile sporadično prisutne kod AO i DA pacova, i kod zdravih i kod životinja koje su razvile simptome EAE-a.



**Slika 2. DGGE profili rDNK amplicona dobijenih korišćenjem prajmera specifičnih za rod *Lactobacillus* iz bakterijske DNK izolovane iz uzoraka fecesa AO i DA pacova.** Uzorci fecesa su sakupljeni u različitim fazama EAE. Klonirano je i sekvencirano ukupno 30 jedinstvenih DNK fragmenata-traka, 16 izolovanih iz fecesa AO pacova i 14 iz fecesa DA pacova.

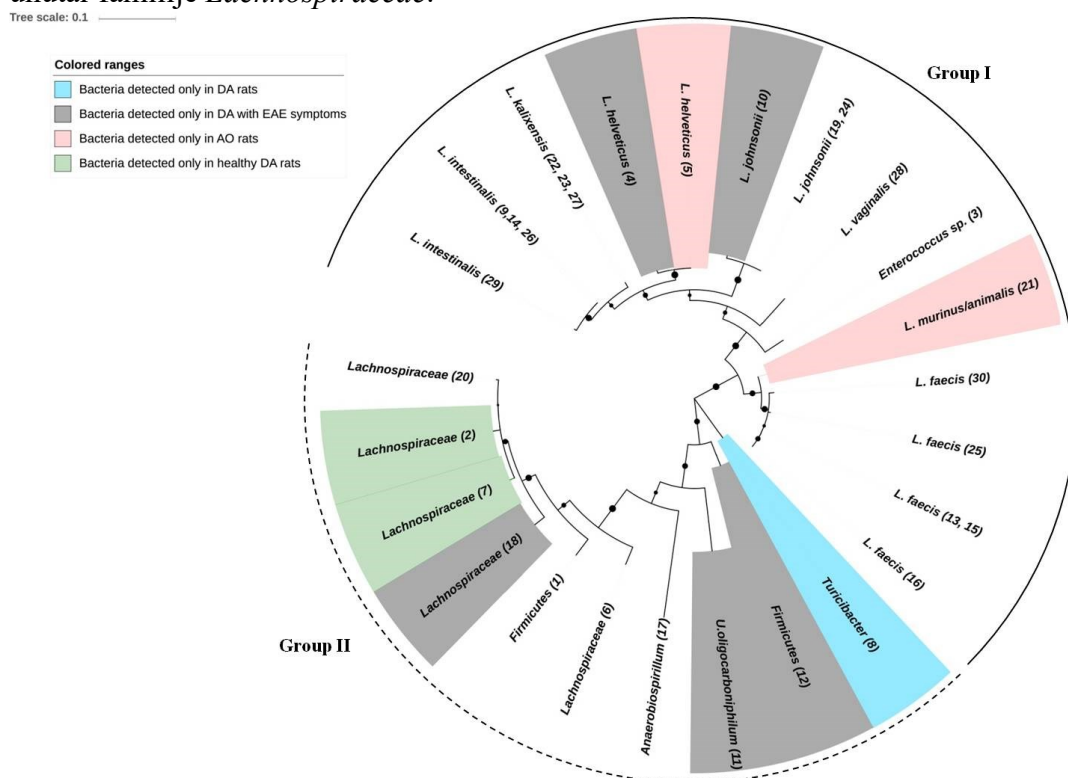
Dalje, prisustvo specifičnih traka na DGGE profilu AO i DA pacova je procenjeno korišćenjem Fišerovog egzaktnog testa gde su uračunate samo jasno vidljive trake. Rezultati Fišerovog egzaktnog testa su otkrili prisustvo predstavnika familije *Lachnospiraceae* isključivo kod DA pacova, nezavisno od imunizacije, i kod zdravih pacova i kod pacova kod kojih su se razvili simptomi EAE-a. Slično tome, bakterije koje pripadaju rodu *Turicibacter* su detektovane kod imunizovanih DA

pacova, kako kod onih koji su bili bez simptoma, tako i kod životinja koje su imale simptome EAE, ali nisu detektovane kod neimunizovanih DA pacova. S druge strane, jedna grupa bakterija koja pripada filumu *Firmicutes* i bakterije koje pripadaju filumu *Proteobacteria* (*Burkholderiales*, *Undibacterium oligocarboniphilum*) detektovane su samo kod DA pacova na piku bolesti (12-15. d.p.i.). Generalno, kod pacova soja AO, koji je otporan na indukciju EAE-a uočeno je prisustvo samo lactobacila i enterokoka, osim u slučaju dva AO pacova (jedan neimunizovani i jedan na 16. d.p.i.) gde je detektovan predstavnik roda *Anaerobiospirillum* kao i kod imunizovanih DA pacova (15 d.p.i.).



**Slika 3. Identitet rDNK klonova dobijenih iz DGGE traka kod AO i DA pacova.** Uzorci fecesa AO i DA pacova su sakupljeni iz neimunizovanih životinja i životinja kojima je indukovano EAE, u terminima koji odgovaraju induktivnoj fazi bolesti (šesti d.p.i.) i piku bolesti (12-16 d.p.i.). Brojevi 1-30 na y-osi koreliraju sa brojevima izolovanih traka, dok brojevi na x-osi odgovaraju brojevima uzoraka sa slike 2. dobijenih iz pojedinačnih pacova. Unutar svakog soja analizirano je po 5 uzoraka neimunizovanih životinja (NI), 3 uzorka sa 6 d.p.i. i 12 uzoraka sa 12-16 dp.i. Bilo je DA pacova koji nisu imali simptome EAE (NS - no symptoms) (4 uzorka).

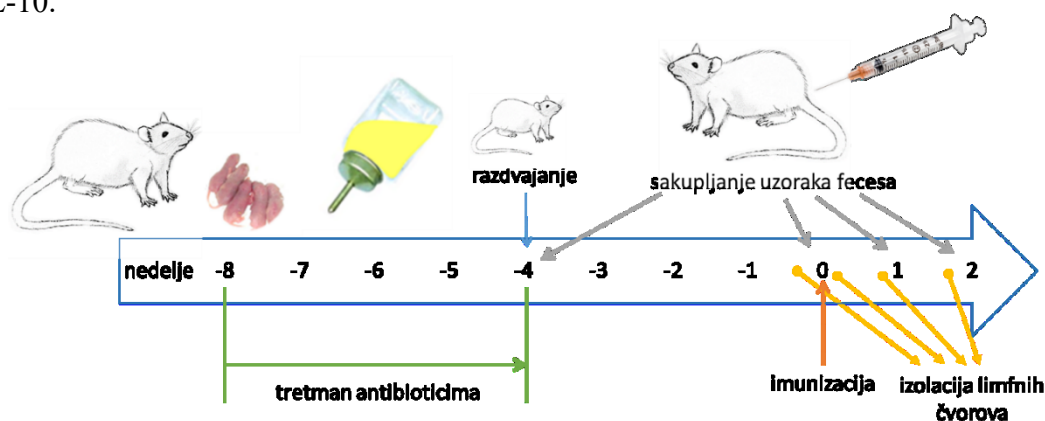
Konačno, ML filogenetske analize su razdvojile DA/AO crevnu mikrobiotu u dve zasebne grupe. Veća grupa, Grupa I uključuje filum *Firmicutes* i bakterije iz familija *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* i *Turicibacteraceae*. Manja i manje konzervirana grupa, grupa II se sastoji od bakterija koje pripadaju filumima *Firmicutes* i *Proteobacteria*, uključujući familije *Lachnospiraceae*, *Oxalobacteraceae* i *Succinivibrionaceae*. Zanimljivo je da su rezultati ML filogenetskih analiza otkrili prisustvo klonova 2 i 7 samo kod zdravih DA pacova, kao i da ovi klonovi pripadaju istoj filogenetskoj grupi unutar familije *Lachnospiraceae*, a moguće i istoj vrsti. Nasuprot tome, klonovi 6 i 18 koji su detektovani samo kod DA pacova sa simptomima EAE-a prema ovoj filogenetskoj analizi najverovatnije pripadaju različitim vrstama unutar familije *Lachnospiraceae*.



**Slika 4. Filogenetska interferencija 16s rRNK gena između bakterija izolovanih iz uzoraka fecesa AO i DA pacova.** Filogenetsko stablo 16s rRNK gena je konstruisano metodom ML (maximal likelihood) korišćenjem Tamura-Nei modela matriksa distance. Brojevi u zagradama odgovaraju brojevima izolovanih, kloniranih i sekvenciranih DGGE traka. Punom linijom je označena Grupa I kojoj pripadaju bakterije iz filuma *Firmicutes*, i bakterije iz familija *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* i *Turicibacteraceae*. Isprekidanom linijom je označena grupa II kojoj pripadaju bakterije iz filuma *Firmicutes* i *Proteobacteria*, uključujući familije *Lachnospiraceae*, *Oxalobacteriaceae* i *Succinivibrionaceae*.

#### 4.4. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na otpornost AO pacova na EAE

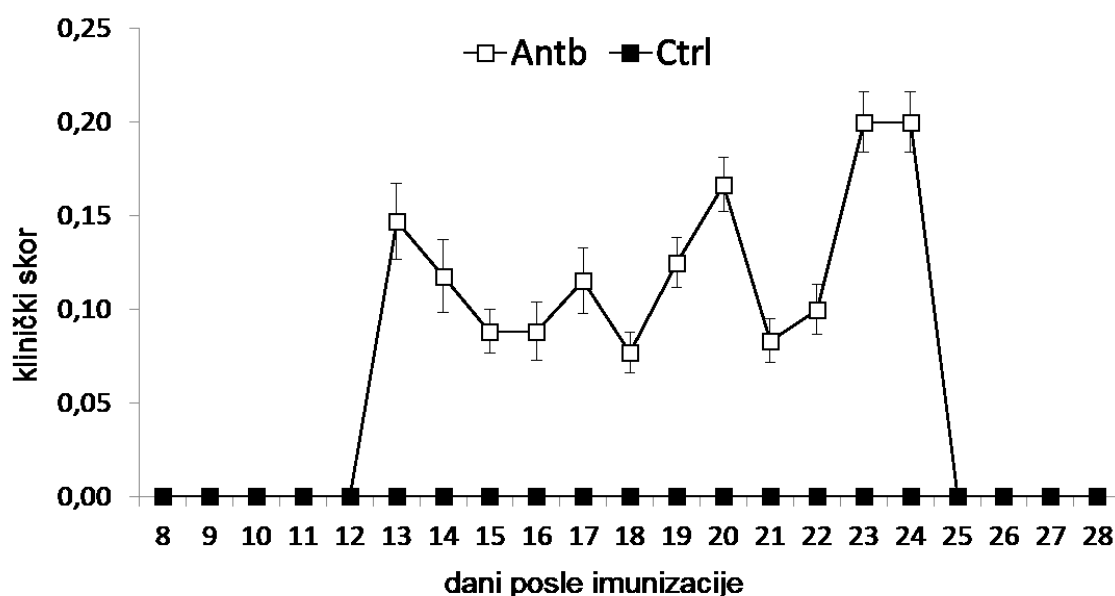
Nakon utvrđivanja razlika između AO i DA pacova na nivou GALT-a i crevne mikrobiote, pristupili smo modulaciji crevne mikrobiote AO primenom antibiotika kako bismo pokušali da narušimo njihovu otpornost na EAE. Mešavina antibiotika je rastvarana u vodi i primenjivana svakog drugog dana od rođenja pacova pa sve do četvrte nedelje starosti kada su mladunci odvajani od majki. Kontrolne životinje su bile iste starosti kao i tretirane i nisu primale nikakav tretman. Kada su dostigli osam nedelja starosti, pacovi su imunizovani i dalje analizirani. Kako bismo ustanovili da li su posmatrane promene u crevnoj mikrobioti i GALT-a kod životinja koje su tretirane antibioticima od značaja za patogenezu EAE-a, tretirane i kontrolne životinje su imunizovane HKM+KFA emulzijom. Pacovi su svakodnevno posmatrani radi utvrđivanja pojave simptoma EAE-a, posmatrani su histološki preseki kičmenih moždina i određivana je koncentracija proinflamacijskih citokina u supernatantima homogenata kičmene moždine. Uticaj antibiotskog tretmana je ispitivan na ćelijama DLČ, MLC i PP, izolovanim iz neimunizovanih životinja i iz imunizovanih životinja, četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. Ispitivana je celularnost, zastupljenost CD4<sup>+</sup> T ćelija i Treg, kao i produkcija proinflamacijskih citokina, IFN- $\gamma$  i IL-17, i antiinflamacijskog citokina, IL-10.



**Slika 5. Antibiotiski tretman AO pacova.** AO pacovi su tretirani antibioticima kako bi im se narušio sastav mikrobiote. Tretman je počeo na dan rođenja i trajao je četiri nedelje, do trenutka odvajanja od majki. Na taj način su mladunci bili posredno izloženi antibioticima, preko majki. Uzorci fecesa su sakupljeni u više vremenskih tačaka, na dan razdvajanja, na dan imunizacije, kao i nakon imunizacije u induktivnoj fazi i u vreme kliničke manifestacije bolesti. Imunizacija je izvršena HKM+KFA emulzijom.

#### 4.4.1. Uticaj antibiotskog tretmana na kliničku sliku

Pacovi soja AO i DA su imunizovani HKM+KFA emulzijom. Klinički skor je praćen tokom 40 dana kako bismo odredili kliničke i histološke manifestacije bolesti. Za razliku od kontrolnih netretiranih pacova koji su svi bili bez kliničkih znakova bolesti tokom čitavog perioda posmatranja, više od 50% životinja koje su tretirane antibioticima je pokazalo blage simptome EAE-a.



**Grafik 13. Uticaj antibiotskog tretmana na kliničku sliku EAE kod AO pacova.** Kontrolnim (Ctrl) i AO pacovima tretiranim antibioticima (Antb) je indukovao EAE. Svakodnevno su praćeni klinički znaci bolesti. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Rezultati su dobijeni od ukupno 20 Ctrl i 17 Antb pacova, iz 2 nezavisna eksperimenta.

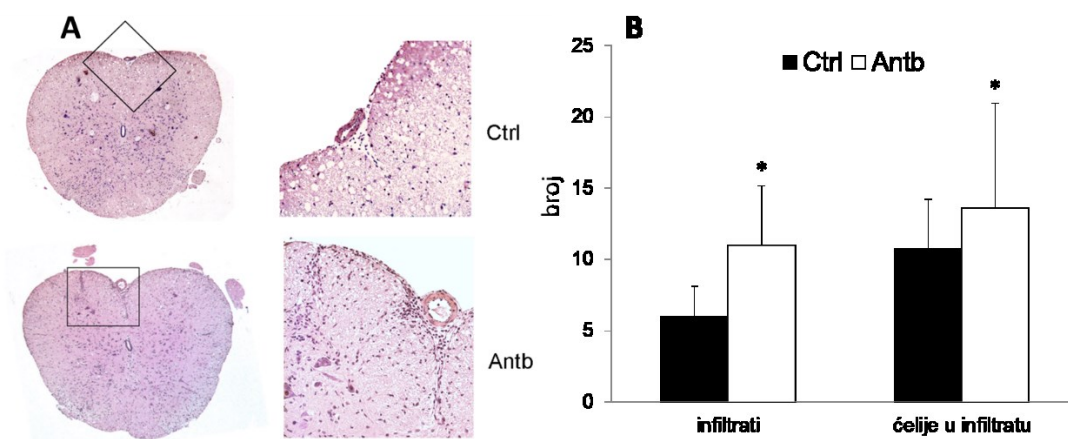
**Tabela 3. Efekat antibiotskog tretmana na klinički tok EAE-a kod AO pacova.**

	incidenca	početak bolesti	kumulativni k.s.	trajanje	prosečni ks	maksimalni k.s.
Ctrl	0/20	/	0	0	0	0
Antb	9/17	19,4 $\pm$ 4,2*	1,4 $\pm$ 1,8*	2,4 $\pm$ 2,8*	0,3 $\pm$ 0,3*	0,4 $\pm$ 0,4*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između kontrolnih (Ctrl) i životinja tretiranih antibioticima (Antb).

#### 4.4.2. Histološka analiza kičmenih moždina

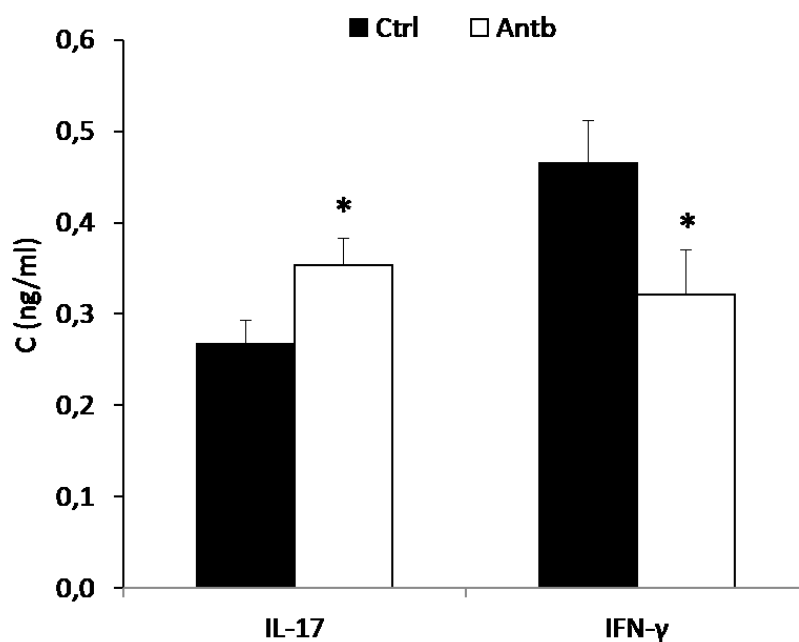
Imunizovani pacovi soja AO koji su tretirani antibioticima, kao i njihove kontrole, žrtvovani su u piku bolesti i izolovane su kičmene moždine. Histološki preseki kičmenih moždina su posmatrani radi utvrđivanja efekata antibiotika na infiltraciju. U našim eksperimentima se uočava značajno veći broj infiltrata i veći broj ćelija u infiltratima kod životinja koje su tretirane antibioticima. Ovo ukazuje da je gubitak otpornosti na EAE, praćen brojnijim infiltratima u kičmenoj moždini i povećanim brojem ćelija u infiltratima, što je u skladu sa pojavom kliničkih znakova EAE-a kod ovih životinja.



**Slika 6. Uticaj antibiotskog tretmana na infiltraciju ćelija u kičmenu moždinu.** Kičmene moždine su izolovane 15 d.p.i. i obojene hematoksilinom i eozinom. Prikazani su i odabrani preseki kičmenih moždina. (A) Broj infiltrata i broj ćelija po infiltratu su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta, iz ukupno 120 histoloških preseka dobijenih iz pet pacova po grupi. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova. (B)

#### 4.4.3. Uticaj antibiotskog tretmana na koncentraciju citokina u homogenatima kičmene moždine

U piku bolesti kada su izolovane kičmene moždine za histološku analizu, utvrđivana je i koncentracija citokina u homogenatima kičmenih moždina. Nivo IL-17 je bio značajno viši u supernatantima homogenata kičmenih moždina dobijenih iz AO pacova koji su primali antibiotski tretman. Zanimljivo je da je kod ovih životinja nivo IFN- $\gamma$  bilo značajano smanjen.

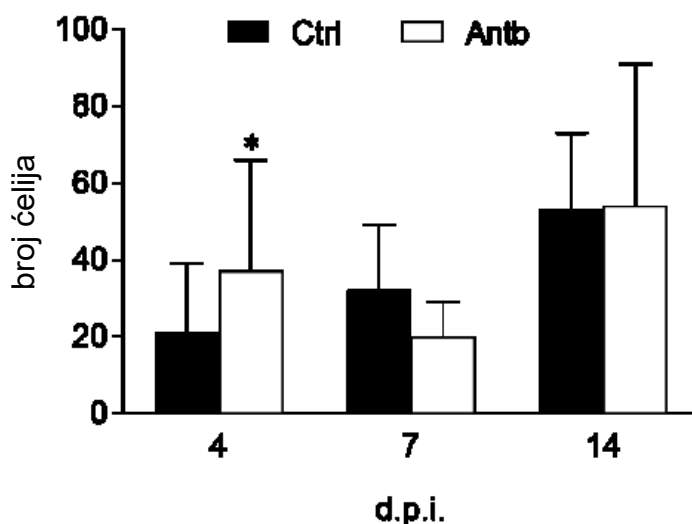


**Grafik 14. Uticaj antibiotskog tretmana na koncentraciju proinflamacijskih citokina u homogenatima kičmenih moždina.** AO pacovi koji su tretirani antibioticima (Antb) i netretirani pacovi (Ctrl) su imunizovani i žrtvovani u piku bolesti. U supernatantima dobijenim taloženjem homogenata kičmenih moždina određena je koncentracija IFN- $\gamma$  i IL-17. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.



#### 4.4.4. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na brojnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova

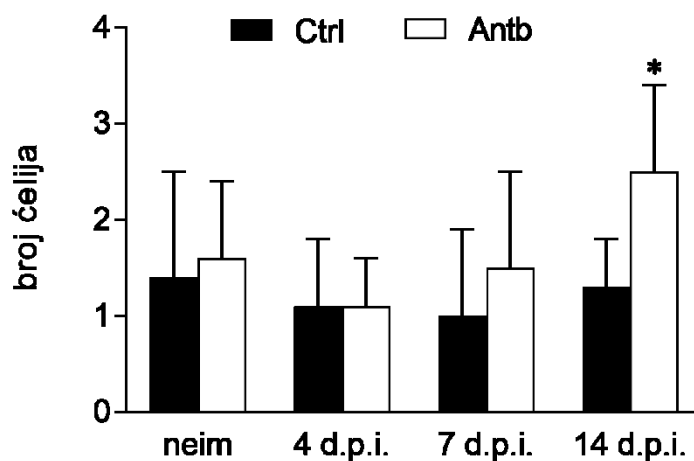
U EAE-u imunski odgovor započinje u limfnim čvorovima koji dreniraju mesto imunizacije. U njima T limfociti po prvi put susreću antigene na koje postaju reaktivni. Zato je bilo važno ispitati kako je tretman antibioticima delovao na ćelije DLČ. Celularnost DLČ je upoređivana između životinja koje su primale antibiotski tretman i kontrolnih AO pacova u različitim vremenskim tačkama nakon imunizacije. Broj ćelija po DLČ bio je značajno veći kod antibiotski tretiranih pacova četvrtog d.p.i., ali ne i sedmog i 14. d.p.i.



**Grafik 15. Uticaj antibiotskog tretmana na brojnost ćelija DLČ.** Netretirani AO pacovi (Ctrl) i pacovi tretirani antibioticima (Antb) su imunizovani HKM+KFA. DLČ su izolovani četvrtog, sedmog i 14 d.p.i.. Upoređivana je brojnost ćelija DLČ između tretiranih i netretiranih životinja, kao i između različitih termina. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.5. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na brojnost ćelija Pejerovih ploča

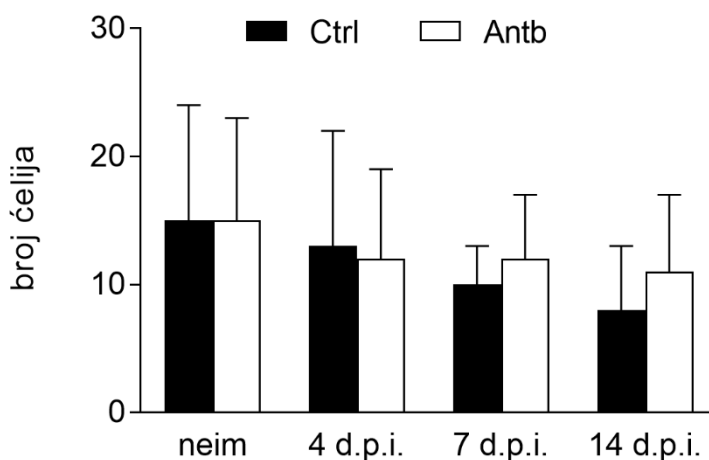
Kako bi se ispitaio efekat primene antibiotika na GALT analizirane su ćelije PP. PP su izolovane iz tankog creva kontrolnih i antibioticima tretiranih neimunizovanih i imunizovanih AO pacova, u različitim vremenskim tačkama (četvrti d.p.i., sedmi d.p.i. i 14. d.p.i). Broj PP, kao i celularnost PP, bili su bez statistički značajne razlike kada su posmatrane ove dve grupe životinja u svim vremenskim tačkama, osim na 14 d.p.i. kada se uočavao značajno veći broj ćelija kod životinja tretiranih antibioticima.



**Grafik 16. Uticaj antibiotskog tretmana na broj PPĆ.** Ćelije PP su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih pacova koji su bili tretirani antibioticima (Antb) ili su bili bez tretmana (Ctrl). Životinje su imunizovane HKM+KFA i ćelije su izolovane četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.6. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na broj ćelija mezenteričnih limfnih čvorova

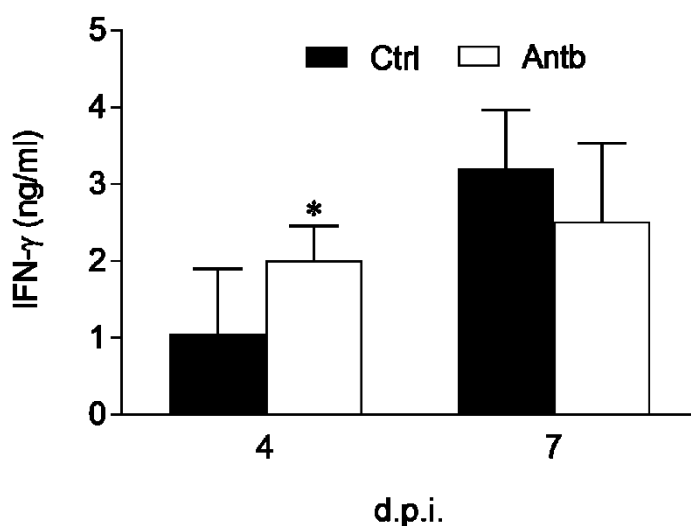
Kako bi se ispitao efekat primene antibiotika na GALT, osim PP analizirane su i ćelije MLČ. Upoređivanjem životinja tretiranih antibioticima sa kontrolnim životinjama koje su bile bez tretmana, nije uočena statistički značajna razlika ni kod neimunizovanih životinja, a ni nakon imunizacije.



**Grafik 17. Uticaj antibiotskog tretmana na broj MLČĆ.** AO pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili tretirani antibioticima (Antb). Životinje su imunizovane HKM+KFA. MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih životinja i imunizovanih životinja četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. Upoređivan je broj ćelija između životinja sa i bez tretmana, kao i između neimunizovanih i imunizovanih životinja. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.7. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IFN- $\gamma$ u drenirajućim limfnim čvorovima

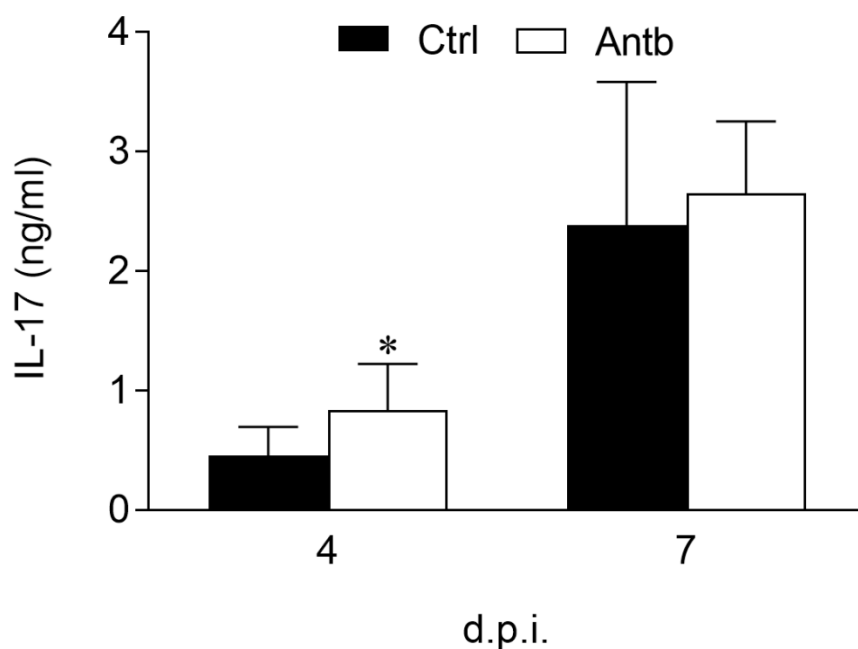
Efekat antibiotskog tretmana je ispitivan i na produkciju citokina u DLČ koji oslikavaju dešavanja u inicijalnoj fazi EAE-a. Produkcija IFN- $\gamma$  je merena u ćelijama DLČ netretiranih AO pacova i pacova tretiranih antibioticima u induktivnoj fazi EAE-a, četvrtog i sedmog d.p.i. IFN- $\gamma$  je bio značano veći kod tretiranih pacova četvrtog d.p.i., dok sedmog d.p.i. nije bilo razlike između grupa. S obzirom da smo pokazali da tretman antibioticima dovodi po pojavljivanja blage kliničke slike, povećanje koncentracije IFN- $\gamma$  u ranoj induktivnoj fazi govori u prilog da pod uticajem antibiotika dolazi do pokretanja jačeg autoimunskog odgovora.



**Grafik 18. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IFN- $\gamma$  u DLČĆ.** Netretirani (Ctrl) i AO pacovi tretirani antibioticima (Antb) su žrtvovani četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. (HKM+MBP). DLČĆ su izolovane i gajene u kulturi 24h u prisustvu MBP. Nivo IFN- $\gamma$  je određen ELISA testom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.8. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-17 u drenirajućim limfnim čvorovima

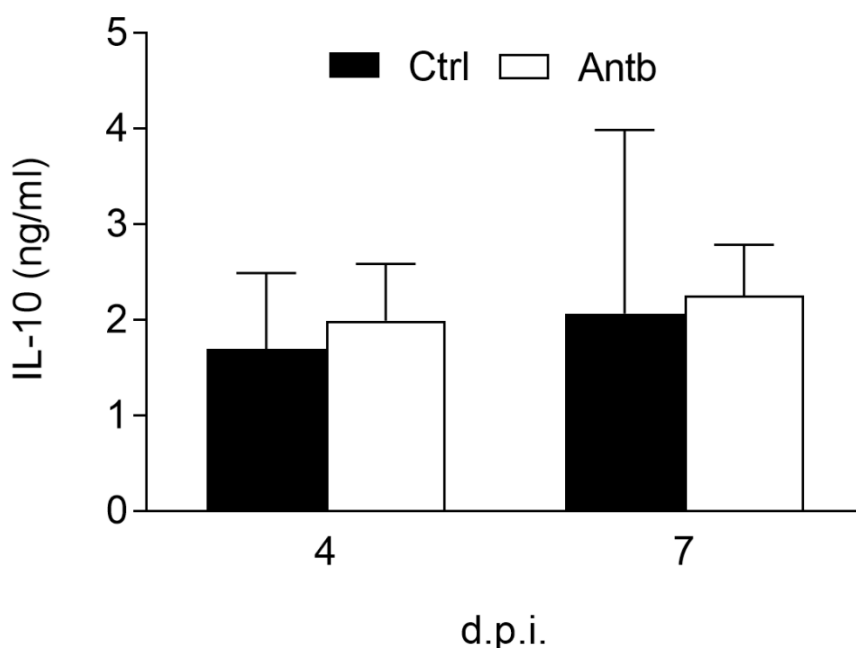
Produkcija IL-17 je određivana ELISA testom na ćelijama DLČ stimulisanim MBP četvrtog i sedmog d.p.i. Upoređivana je produkcija citokina između AO pacova koji nisu bili tretirani i pacova koji su primali antibiotski tretman. Zapaža se isti fenomen kao i kod produkcije IFN- $\gamma$ . Produkcija IL-17 se razlikovala između tretiranih i netretiranih životinja četvrtog d.p.i., gde se uočavalo povećanje produkcije usled primene antibiotika. Sedmog d.p.i nije bilo promena u produkciji IL-17 usled antibiotskog tretmana.



**Grafik 19. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IL-17 u DLČĆ.** AO pacovi koji su tretirani antibioticima (Antb) ili su bili netretirani (Ctrl), imunizovani su HKM+MBP. Ćelije su izolovane četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. i kultivisane u prisustvu MBP. Rezultati dobijeni ELISA testom su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.9. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-10 u drenirajućim limfnim čvorovima

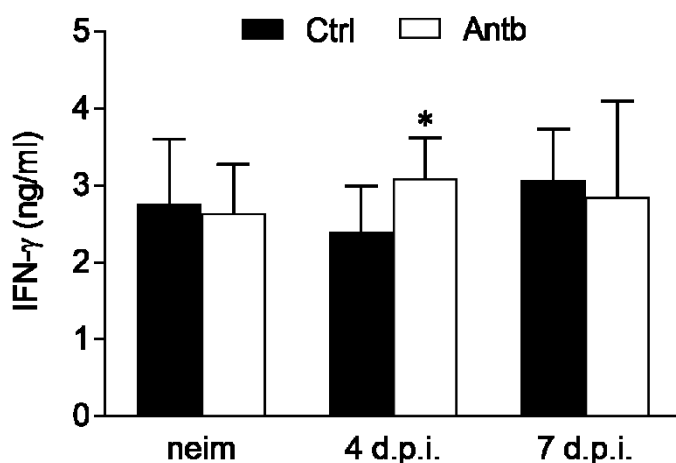
Produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10 je merena u kulturi DLČĆ stimulisanih MBP. AO pacovi koji su bili sa ili bez antibiotskog tretmana su imunizovani HKM+MBP. Čelije DLČ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. kako bi se ispitali efekti antibiotika na rana dešavanja u EAE-u. Ni u jednoj od posmatranih tačaka nije bilo statistički značajne razlike između životinja koje su primale antibiotski tretman i kontrolnih životinja.



**Grafik 20. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IL-10 u DLČĆ.** AO pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili tretirani antibioticima (Antb) i imunizovani sa HKM+MBP. DLČĆ su izolovane iz pacova četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. Produkcija IL-10 je određivana ELISA metodom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.10. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IFN- $\gamma$ u mezenteričnim limfnim čvorovima

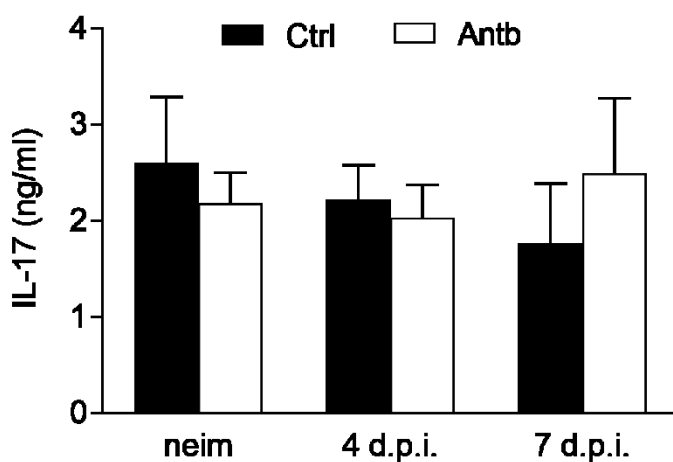
Produkcija proinflamacijskog citokina koji proizvode Th1 ćelije, IFN- $\gamma$  je ispitivana kod neimunizovanih životinja i u dve vremenske tačke nakon imunizacije, četvrtog i sedmog d.p.i. u MLČĆ kod netretiranih AO pacova i pacova tretiranih antibioticima. Kod neimunizovanih životinja, kao i sedmog d.p.i. nije bilo razlike između tretiranih i netretiranih životinja. Statistički značajna razlika između grupa vidljiva je samo četvrtog d.p.i. gde je produkcija IFN- $\gamma$  veća kod antibioticima tretiranih pacova.



**Grafik 21. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IFN- $\gamma$  u MLČĆ.** AO pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primali tretman antibioticima (Antb). MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja, četvrtog i sedmog d.p.i. (HKM+KFA) i određivana je produkcija IFN- $\gamma$ . Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.11. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-17 u mezenteričnim limfnim čvorovima

Produkcija IL-17 u ćelijama MLČ je bila bez statistički značajne razlike između grupe životinja tretiranih antibioticima i kontrolnih životinja, u svakoj od posmatranih vremenskih tačaka. Dakle, tretman antibioticima nije uticao na produkciju IL-17 u MLČ.

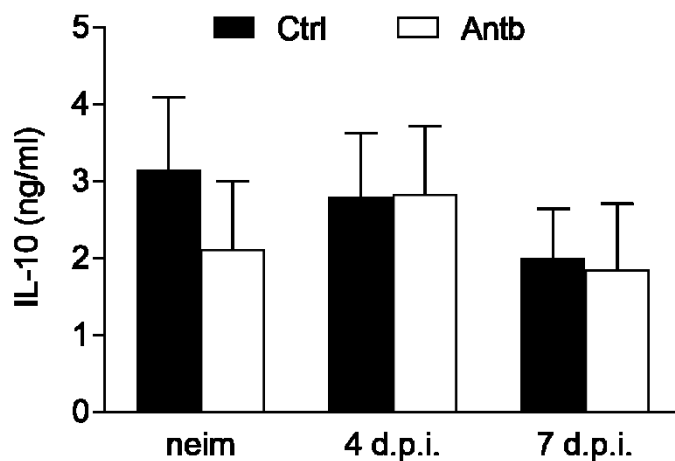


**Grafik 22. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IL-17 u MLČĆ.** AO pacovi su bili sa (Antb) ili bez (Ctrl) tretmana antibioticima. Životinje su imunizovane emulzijom HKM+KFA. U MLČĆ izolovanim iz neimunizovanih i imunizovanih životinja u dve vremenske tačke, četvrtog i sedmog d.p.i. merena je produkcija IL-17. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.



#### 4.4.12. Ispitivanje uticaja antibiotika na produkciju IL-10 u mezenteričnim limfnim čvorovima

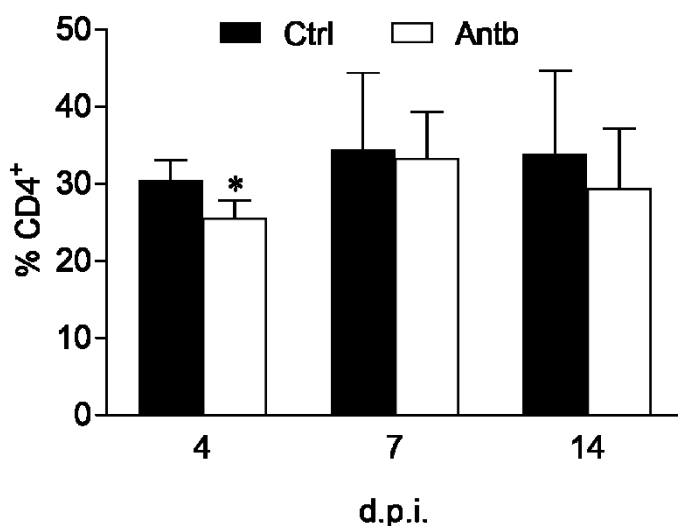
Nakon tretmana antibioticima, kao i u slučaju IL-17, u MLČĆ nije dolazilo do značajnih promena u produkciji IL-10 ni u jednoj od posmatranih vremenskih tačaka.



**Grafik 23. Efekat tretmana antibioticima na produkciju IL-10 u MLČĆ.** AO pacovi bez tretmana (Ctrl) i pacovi koji su primali tretman antibioticima (Antb) su imunizovani HKM+KFA. MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja u dve vremenske tačke, četvrtog i sedmog d.p.i.. Produkcija IL-10 određivana je ELISA metodom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.13. Uticaj tretmana antibioticima na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima

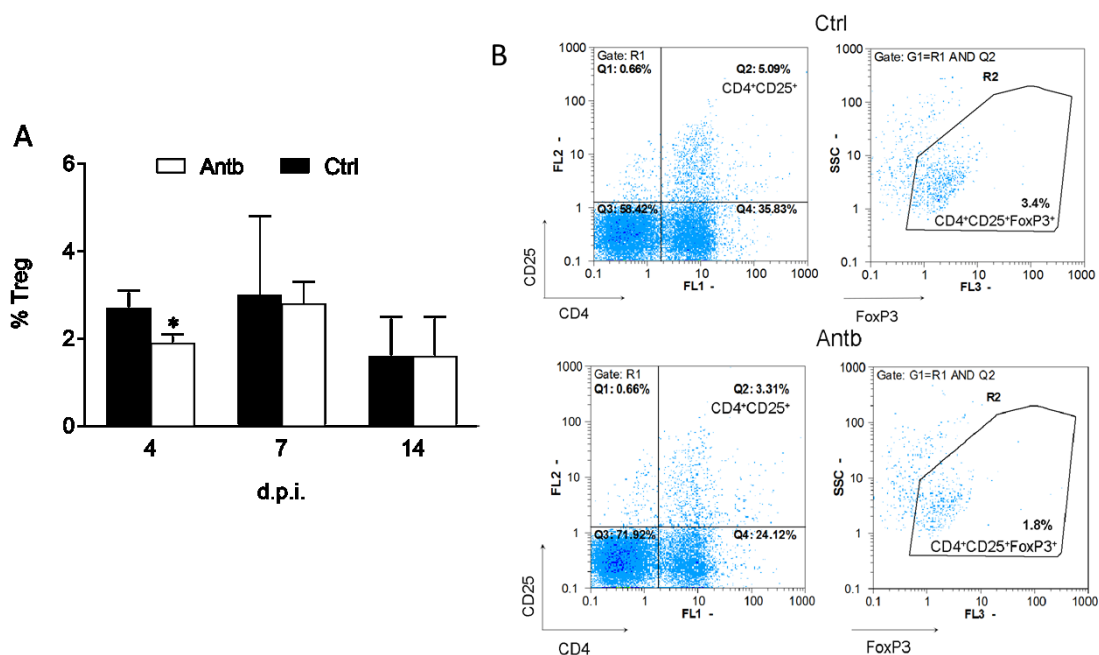
Sledeći korak je bio analiza zastupljenost ćelijskih populacija u DLČ i kako tretman antibioticima deluje na zastupljenost CD4<sup>+</sup> T ćelija u DLČ. Ispitivane su DLČ u grupi životinja koje su primale antibiotski tretman i grupi onih koje su bile bez tretmana. Životinje su imunizovane HKM+KFA i analizirane u tri termina, četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. Statistički značajna razlika između grupa u udelu CD4<sup>+</sup> T ćelija postoji samo četvrtog d.p.i., kada se uočava smanjena zastupljenost kod tretiranih životinja.



**Grafik 24. Uticaj tretmana antibioticima na ekspresiju fenotipskih markera DLČĆ. Ćelije su izolovane iz DLČ pacova koji su imunizovani HKM+KFA, četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. Pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su tretirani antibioticima (Antb). Ćelije su analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \*p< 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.**

#### 4.4.14. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost Treg u drenirajućim limfnim čvorovima

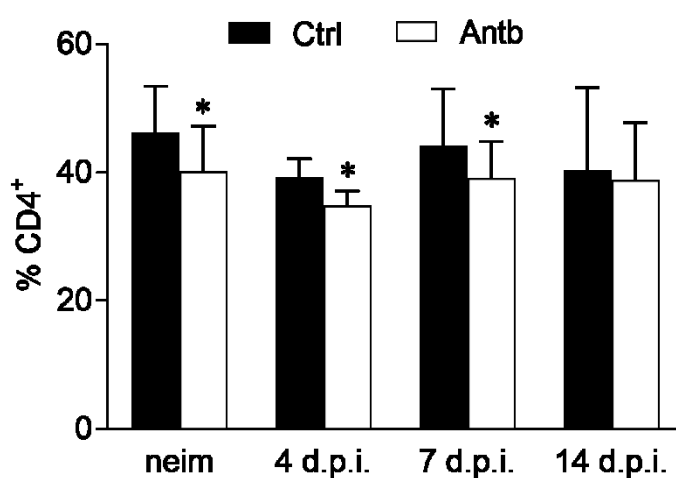
Dalje nas je zanimalo da ispitamo kako tretman antibioticima utiče na zastupljenost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatornih T ćelija. Pokazano je da je smanjen procenat Treg u DLČ kod AO pacova tretiranih antibioticima u odnosu na kontrolne životinje četvrtog d.p.i., dok sedmog i 14. d.p.i. nije bilo razlike između grupa.



**Slika 7. Ispitivanje efekta antibiotiskog tretmana na Treg u DLČ.** AO pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili tretirani antibioticima (Antb) i imunizovani HKM+MBP. DLČC su izolovane četvrtog, sedmog i 14 d.p.i. i analizirane na protočnom citofluorimetru. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD (A). Na reprezentativnim plotovima dobijenim četvrtog d.p.i. je prikazana strategija ograničavanja na Treg za Ctrl i Antb životinje (B). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \*p< 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.15. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima

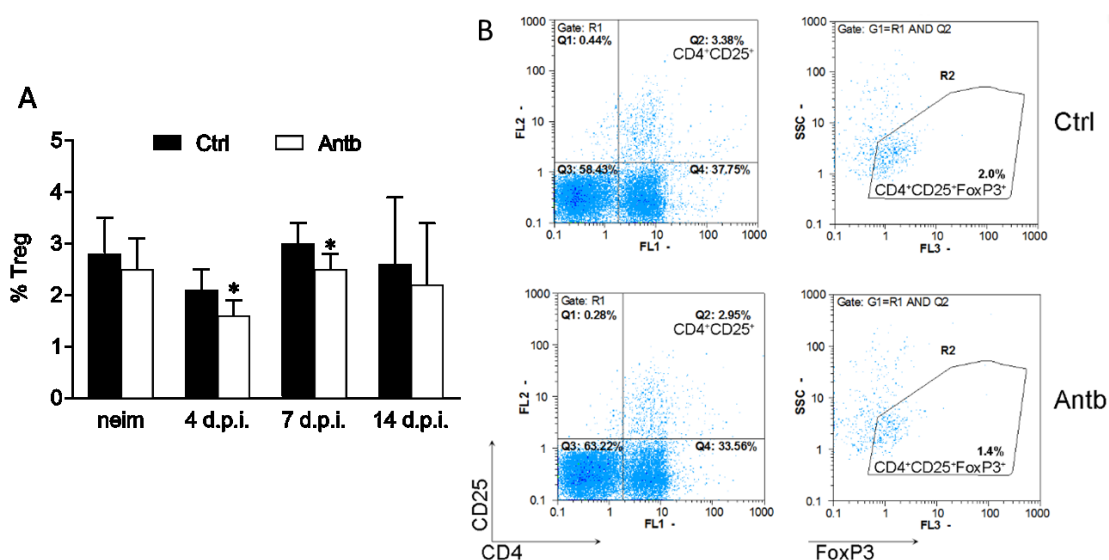
Kao i prilikom ispitivanja DLČ, želeli smo da ispitamo efekat antibiotskog tretmana na procenat CD4<sup>+</sup> ćelija u MLČ. Zapaženo je smanjenje procenta CD4<sup>+</sup> ćelija u MLČ AO pacova koji su primali antibiotski tretman. Diskretno, ali statistički značajno smanjenje se uočava i pre imunizacije, ali i nakon imunizacije četvrtog i sedmog d.p.i. Do statistički značajne promene ne dolazi samo 14. d.p.i.



**Grafik 25. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> T ćelija u MLČ nakon tretmana životinja antibioticima.** AO pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primali tretman antibioticima (Antb). MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja u tri vremenske tačke, četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. (HKM+KFA) i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.16. Ispitivanje efekta antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima

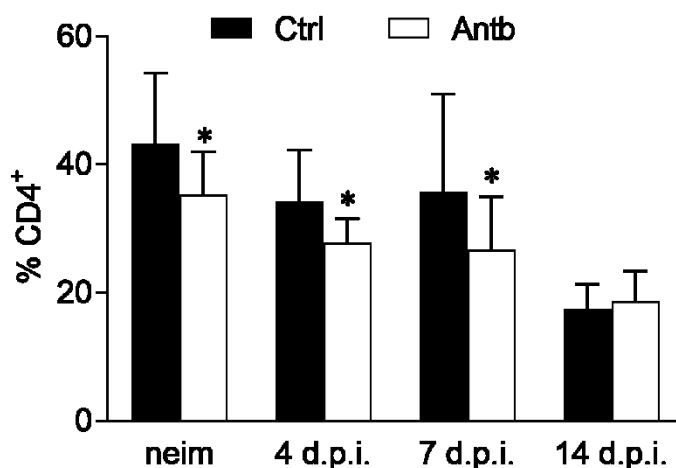
Sledeći cilj nam je bio da ispitamo efekat antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u MLČ. Stoga su MLČĆ izolovane iz neimunizovanih pacova i pacova koji su imunizovani HKM+KFA. Upoređivane su dve grupe životinja, netretirane i životinje koje su primale antibiotski tretman tokom prve četiri nedelje života. Pokazano je da je procenat Treg manji u MLČ pacova tretiranih antibioticima u odnosu na kontrolne, četvrtog i sedmog d.p.i. Pre imunizacije i u piku bolesti nije bilo razlike između tretiranih i netretiranih životinja.



**Slika 8. Efekat antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u MLČ.** MLČĆ su izolovane iz neimunizovanih ili imunizovanih (četvrtog, sedmog i 14. d.p.i.) AO pacova. Pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primale antibiotski tretman (Antb). Izolovane ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (A). Na reprezentativnim plotovima dobijenim četvrtog d.p.i. je prikazana strategija ograničavanja na Treg za Ctrl i Antb životinje (B). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.17. Ispitivanje uticaja antibiotika na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u Pejerovim pločama

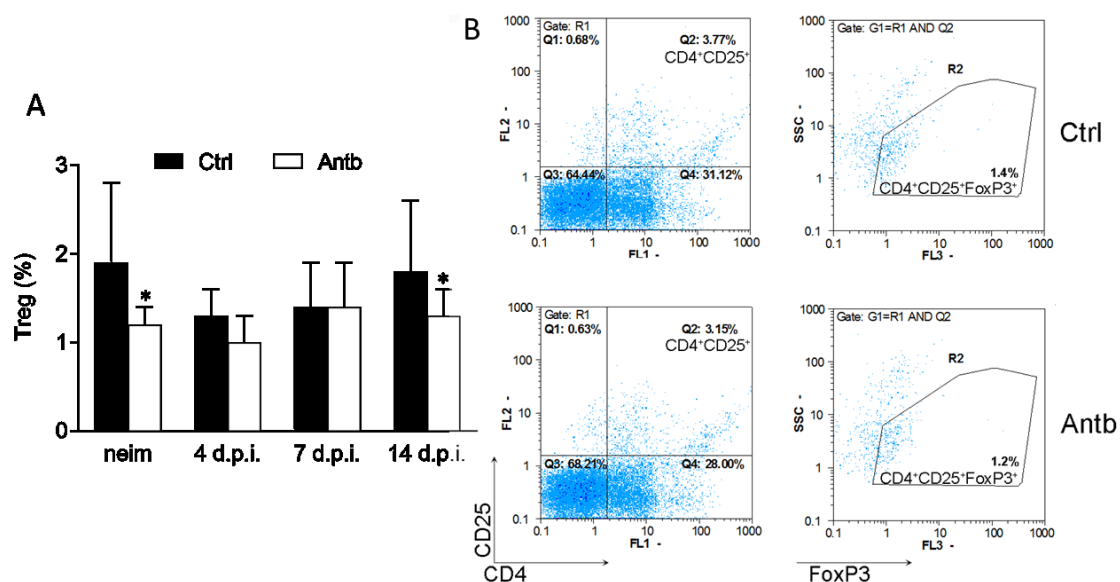
Dalje smo želeli da istražimo kako je dejstvo antibiotika delovalo na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u PP. AO pacovi su primali antibiotike od rođenja do četvrte nedelje starosti, ili su bili bez tretmana. Životinje su imunizovane HKM+KFA i analizirane u tri vremenske tačke. U skladu sa pretpostavkom da mikrobiota utiče na razvoj limfnih struktura creva i na zastupljenost ćelija u njima su i dobijeni rezultati koji pokazuju da usled deplecije mikrobiote antibioticima dolazi do značajnog smanjenja u zastupljenosti CD4<sup>+</sup> ćelija. Statistički značajne razlike nije bilo samo na 14 d.p.i.



**Grafik 26. Zastupljenost CD4<sup>+</sup> T ćelija u PP nakon antibiotskog tretmana.** AO pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili tretirani antibioticima (Antb) i imunizovani HKM+KFA. PPĆ su izolovane izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja u tri vremenske tačke, četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. i analizirane na protočnom citofluorimetru. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \*p< 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.18. Ispitivanje efekta antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u Pejеровim pločama

Da bismo istražili da li je tretman antibioticima doveo do promena u zastupljenosti Treg u PP, identifikovali smo FoxP3<sup>+</sup> ćelije unutar populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ćelija. Procenat Treg u PP je manji kod neimunizovanih antibioticima tretiranih životinja. Kada su životinje tretirane antibioticima upoređivane sa kontrolnim životinjama nakon imunizacija, uočavalo se značajno smanjenje Treg usled antibiotskog tretmana četvrtog i 14 d.p.i., dok sedmog d.p.i. nije bilo razlike.

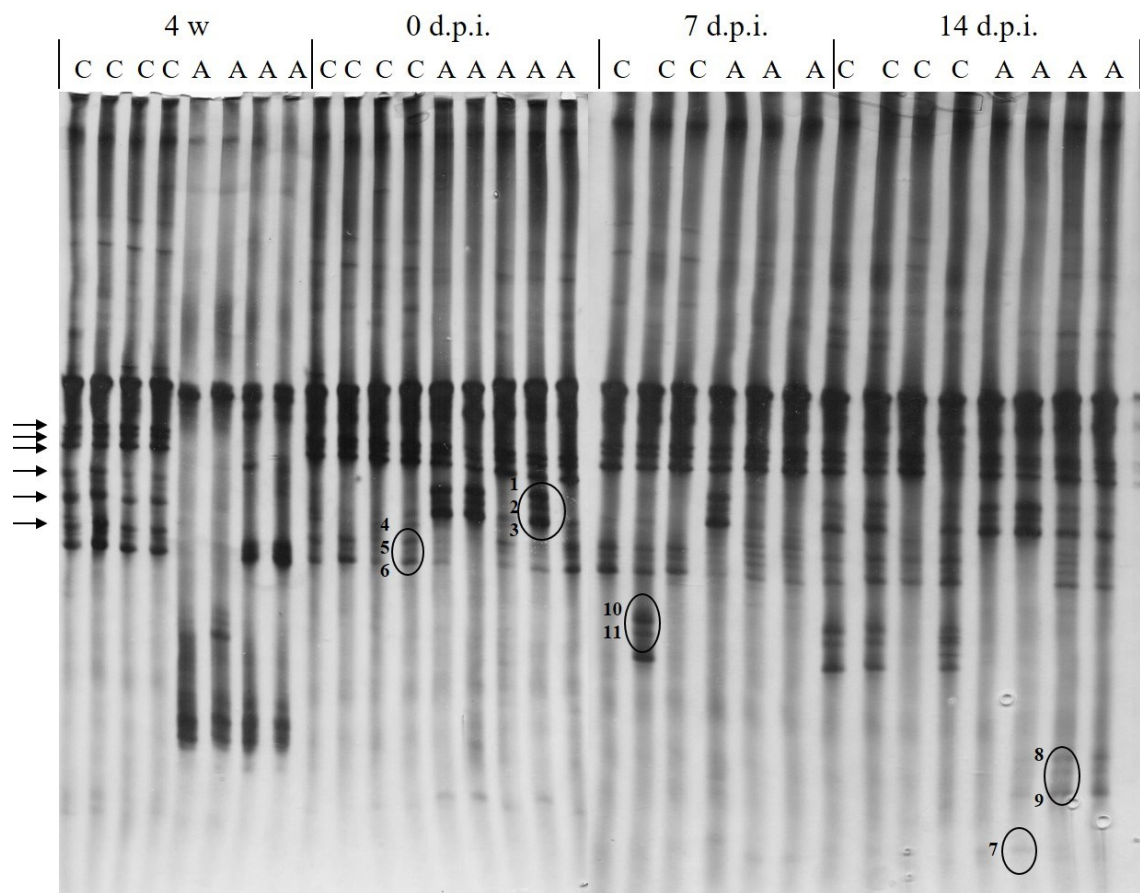


**Slika 9. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na zastupljenost Treg u PP.** AO pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primali tretman antibioticima (Antb). PPĆ su izolovane iz neimunizovanih i imunizovanih životinja u tri vremenske tačke, četvrtog, sedmog i 14. d.p.i. (HKM+KFA) i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD (A). Na reprezentativnim plotovima dobijenim četvrtog d.p.i. je prikazana strategija ograničavanja na Treg za Ctrl i Antb životinje (B). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \*p< 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između Antb i Ctrl pacova.

#### 4.4.19. Ispitivanje uticaja antibiotskog tretmana na sastav mikrobiote creva

AO pacovi su tretirani antibioticima kako bi im se narušila crevna mikrobiota. Tretman je počeo na dan okota i trajao je 4 nedelje, tako da su mladunci bili indirektno izloženi antibioticima preko majki. Uzorci fecesa su sakupljeni u trenutku razdvajanja mladunaca što odgovara periodu prekida antibiotskog tretmana (četiri nedelja starosti), u vreme imunizacije (nultog d.p.i., osam nedelja starosti), nakon imunizacije sa HKM+KFA u induktivnoj fazi EAE (sedmog d.p.i., deet nedelja starosti) i u vreme pika bolesti (14 d.p.i., 10 nedelja starosti). Urađena je DGGE analiza rDNK umnožaka korišćenjem DNK izolovane iz uzoraka fecesa. Tretman je doveo do promena u DGGE profilu crevne mikrobiote u četvrtoj nedelji, gde se može uočiti da su specifične trake na DGGE gelu koje predstavljaju glavnu mikrobiotu (engl. „core microbiota“) u kontrolnim uzorcima, kao što su na primer *L. murinus* i *L. intestinalis*, odsutne u uzorcima pacova tretiranih antibioticima. Međutim, promene su manje izražene u osmoj, devetoj i 10. nedelji života, usled relativne heterogenosti uzoraka. Stoga se može zaključiti da je tretman antibioticima doveo do prolaznih promena u sastavu crevne mikrobiote AO pacova. Prisustvo *L. murinus* kod tretiranih pacova i *L. intestinalis* kod kontrolnih pacova na 0 d.p.i. sugerise da se kolonizacija bakterijom *L. murinus* odigrava oportunistički, kada je zastupljenost drugih bakterija sa kojima su u kompeticiji smanjena. Ipak, razlike u prisustvu *L. intestinalis* se gube na 14 d.p.i. Zanimljivo je da se *Roseburia* sp., komensalna bakterija koja produkuje butirrat, i *L. gasseri* uočavaju isključivo kod tretiranih pacova sedmog i 14 d.p.i.

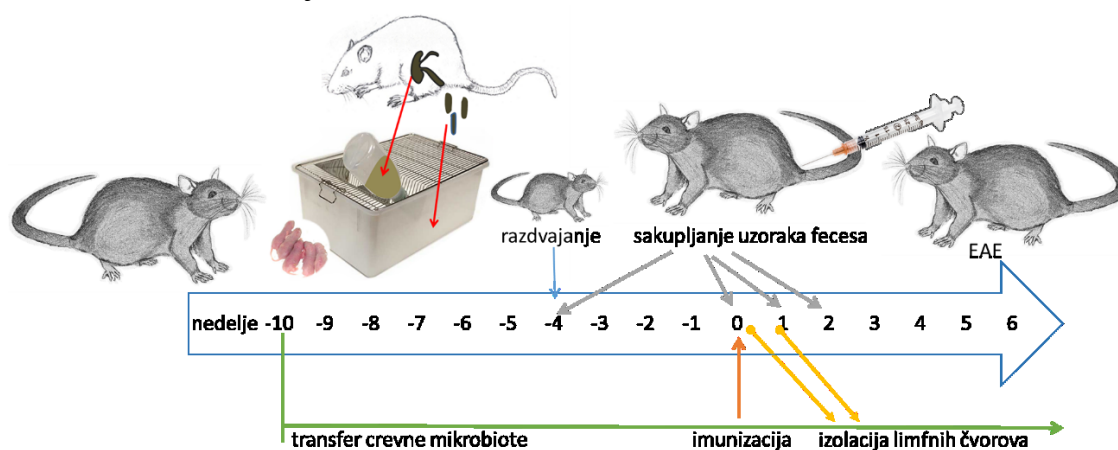




**Slika 10. Uticaj antibiotikskog tretmana na sastav crevne mikrobiote AO pacova.** Netretirani (C) i AO pacovi tretirani antibioticima (A) su imunizovani HKM+KFA. Uzorci fecesa su sakupljani na dan razdvajanja mladunaca od majke (4w), na dan imunizacije (0 d.p.i.) i u vreme koje odgovara induktivnoj fazi EAE-a (sedmi d.p.i.) i piku EAE (14 d.p.i.). DGGE profil rDNK amplikona je dobijen korišćenjem prajmera specifičnih za *Lactobacillus* sp, i bakterijske DNK izolovane iz fecesa kao matrice. Svaki uzorak predstavlja pojedinačnog pacova. Strelice pokazuju DGGE trake koje su prisutne kod kontrolnih uzoraka i kojih nije bilo kod tretiranih životinja u četvrtoj nedelji starosti. Brojevima su obeležene DGGE trake koje su sekvencirane.

#### 4.5. Ispitivanje uticaja transfera mikrobiote creva na GALT i sastav mikrobiote creva

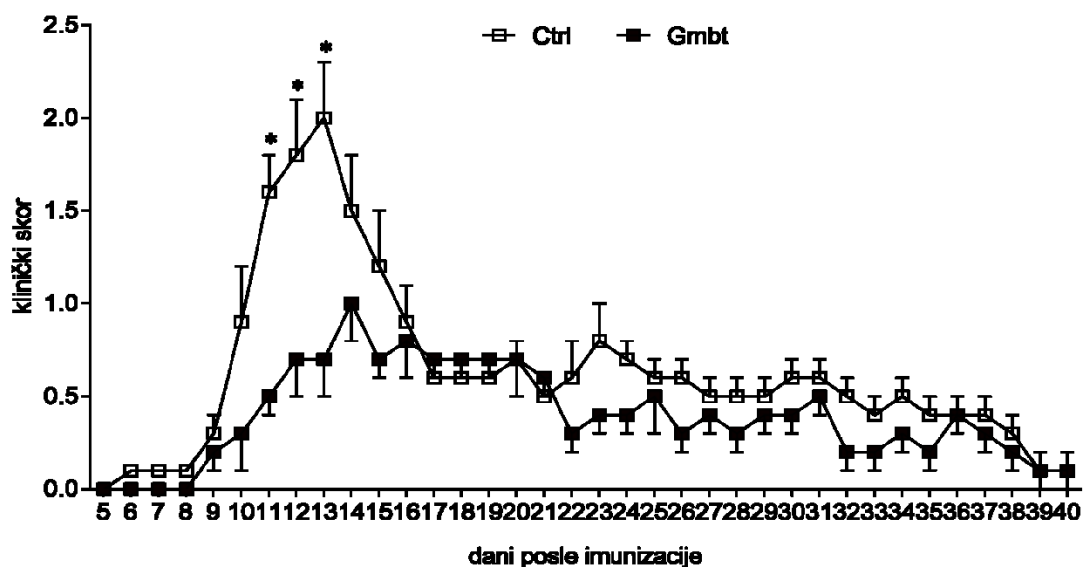
Poslednja grupa eksperimenata je rađena na DA pacovima kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote AO pacova, kako bismo utvrdili da li se njihova mikrobiota može primenjivati kao terapija u EAE-u. Tretman je započet dve nedelje pre rođenja i trajao je 12 nedelja. Tretman se sastojao od davanja sadržaja cekuma AO pacova rastvorenog u fiziološkom rastvoru koji je zatim dodatno razblažen pijaćom vodom i fecesa AO pacova koji je stavljan u čistu prostirku kod DA pacova. Transfer je rađen dva puta nedeljno. Donori crevne mikrobiote i fecesa su bile zdrave netretirane AO životinje, starosti dva do četiri meseca. Kontrolnim životinjama je davan fiziološki rastvor u pijaćoj vodi u istoj količini kao i tretiranoj grupi. Sa osam nedelja starosti, životinjama je indukovano EAE i praćeni su klinički znaci. U ispitivanju efekta transfera crevne mikrobiote AO pacova u DA pacove, analizirane su ćelije DLČ i MLC. Analizirana je njihova brojnost, zastupljenost određenih populacija ćelija i produkcija citokina u ranoj fazi bolesti. Uzorci fecesa su sakupljeni u svim grupama životinja radi utvrđivanja sastava mikrobiote creva. Životinje su žrtvovane u određenim fazama EAE-a. Kičmene moždine su izolovane za histološka bojenja, a u homogenatima kičmenih moždina je određivana koncentracija citokina ELISA testom.



**Slika 11. Transfer crevne mikrobiote AO pacova u DA pacove.** DA pacovi su kontinuirano bili izloženi crevnoj mikrobioti AO pacova od rođenja. EAE je indukovano HKM+KFA kada su pacovi bili osam nedelja stari. Uzorci fecesa su sakupljeni u više vremenskih tačaka (četvrta nedelja), na dan razdvajanja, na dan imunizacije (nulti d.p.i.), u induktivnoj fazi (sedam d.p.i., devet nedelja starosti) i u vreme kliničke manifestacije bolesti (14 d.p.i., 10 nedelja starosti).

#### 4.5.1. Transfer crevne mikrobiote AO pacova ublažava simptome EAE kod DA pacova

Kako bi se ispitao povoljan efekat crevne mikrobiote AO pacova, urađen je njen transfer u DA pacove koji su podložni indukciji EAE-a. DA pacovi su kontinuirano izlagani crevnoj mikrobioti AO pacova od rođenja do 12. nedelje života. EAE je indukovano pacovima sa osam nedelja starosti, ubrizgavanjem HKM+KFA. Praćenjem simptoma bolesti uočeno je da dolazi do ublažavanja EAE-a kod DA pacova koji su primali crevnu mikrobiotu AO pacova u odnosu na netretirane kontrolne životinje.



**Grafik 27. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote AO pacova na EAE kod DA pacova.** DA pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili su tretirani crevnom mikrobiotom AO pacova (Gmbt). Životinje su imunizovane HKM+KFA i klinički skorovi su praćeni svakodnevno. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SE. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

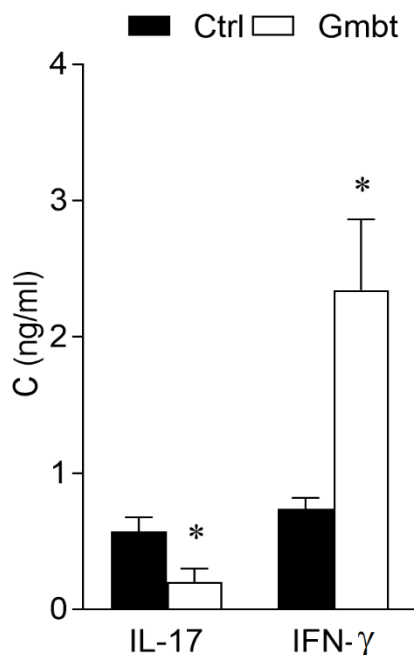
**Tabela 4. Efekat transfera crevne mikrobiote AO pacova na EAE kod DA pacova.**

	incidenca	početak bolesti	Kumulativni k.s.	trajanje (dani)	prosečni ks	maksimalni k.s.
Ctrl	15/15	9,9 $\pm$ 1,1	22,6 $\pm$ 9,6	23,6 $\pm$ 6,5	0,9 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 1,0
Gmbt	13/13	12,2 $\pm$ 5,3	14,2 $\pm$ 8,2*	18,6 $\pm$ 7,6	0,7 $\pm$ 0,2*	1,6 $\pm$ 0,7*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između kontrolnih (Ctrl) i životinja kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote (Gmbt).

#### 4.5.2. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na koncentraciju citokina u homogenatima kičmenih moždina

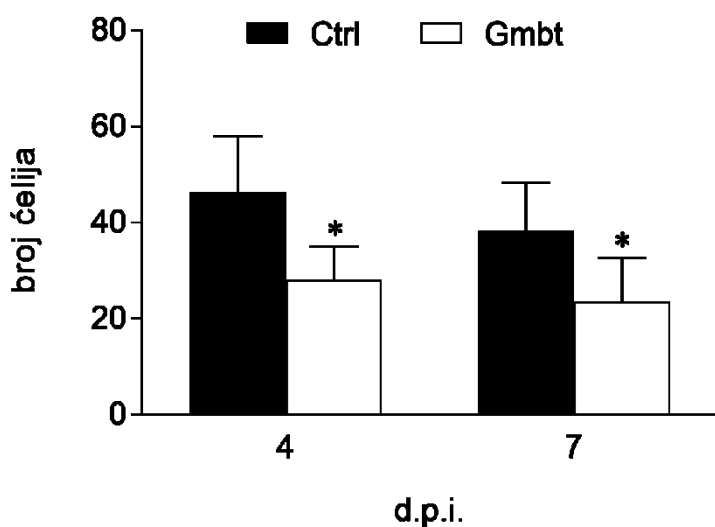
DA pacovima je izvršen transfer crevne mikrobiote AO pacova. Tretirani i netretirani DA pacovi su imunizovani i na piku bolesti su analizirani homogenati kičmenih moždina. S obzirom da se Th1 i Th17 ćelije smatraju glavnim patogenim ćeijskim populacijama u EAE-u i da je uočena povećana koncentracija njihovih proinflamacijskih citokina u CNS-u DA pacova koji su podložni na indukciju EAE-a, rezultat da je koncentracija IL-17 smanjena u homogenatima kičmenih moždina pacova kojima je transferom mikrobiote ublažen EAE je očekivan. Za razliku od toga, neobično je da je došlo do povećanja koncentracije IFN- $\gamma$  kod tretiranih životinja.



**Grafik 28. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na koncentraciju citokina u HKM.** DA pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primali tretman crevnom mikrobiotom AO pacova (Gmbt). Životinje su imunizovane HKM+KFA i 14. d.p.i. su izolovane kičmene moždine. Nivo citokina je meren u supernatantima dobijenim taloženjem homogenata kičmenih moždina. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### 4.5.3. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na brojnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova

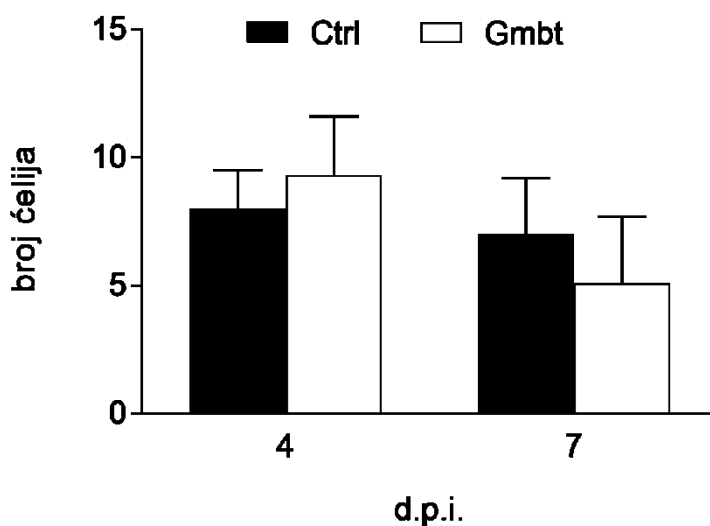
Zatim smo želeli da vidimo da li poboljšanje u kliničkoj slici prate i promene u DLČ. DA pacovi koji su bili bez tretmana ili su primali mikrobiotu AO pacova su imunizovani i DLČ su izolovani četvrtog i sedmog d.p.i. U skladu sa očekivanjima su dobijena smanjenja brojnosti ćelija DLČ u induktivnoj fazi bolesti, i četvrtog i sedmog d.p.i. kod životinja kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote.



**Grafik 29. Efekat transfera crevne mikrobiote na brojnost DLČĆ.** DLČ su izolovani iz DA pacova koji su bili bez tretmana (Ctrl) ili tretirani crevnom mikrobiotom AO pacova (Gmbt), četvrtog i sedmog d.p.i. (HKM+KFA). Brojnost ćelija je upoređivana između tretirane i netretirane grupe životinja, kao i pre i nakon imunizacije. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### 4.5.4. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na brojnost ćelija mezenteričnih limfnih čvorova

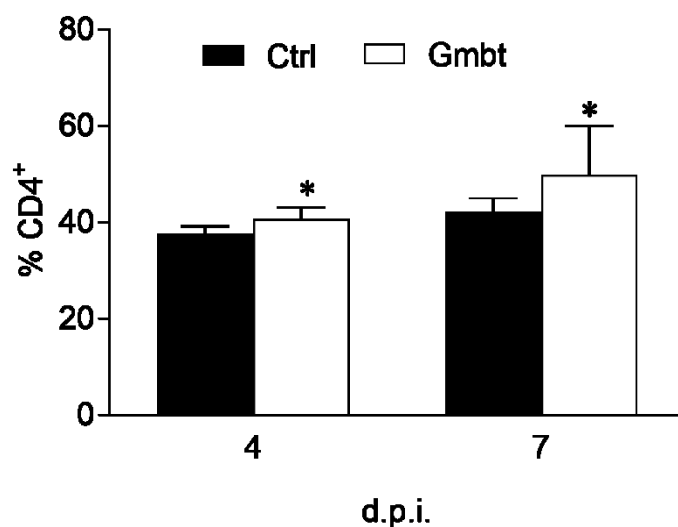
Dalje smo želeli da utvrdimo da li do sličnih promena dolazi i na nivou GALT-a, pa su u tu svrhu analizirani MLČ. Celularnost MLČ je ispitivana kod DA pacova kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote AO pacova i odgovarajućih kontrola. Životinje su imunizovane HKM+KFA i četvrtog i sedmog d.p.i. su rađene analize. Za razliku od DLČ, nije bilo statistički značajne razlike u celularnosti MLČ ni u jednom od posmatranih termina.



**Grafik 30. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na brojnost ćelija MLČ.** DA pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili im je izvršen transfer crevne mikrobiote AO pacova (Gmbt). Životinje su imunizovane HKM+KFA. MLČ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. Broj ćelija je predstavljen kao srednja vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### 4.5.5. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima

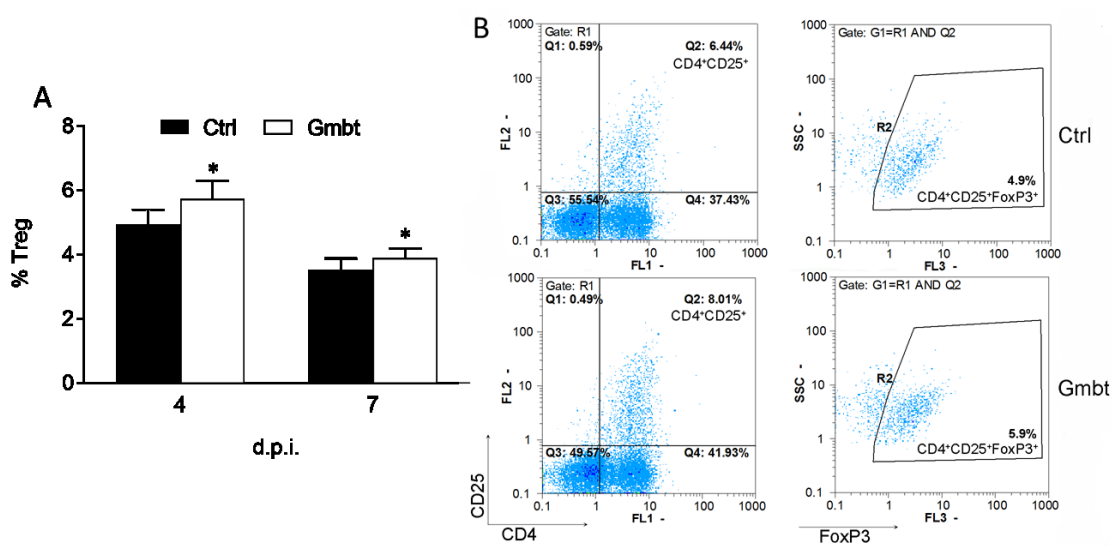
Kako bi se ispitao uticaj transfera crevne mikrobiote na zastupljenost CD4<sup>+</sup> T limfocita, ćelije DLČ su analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Posmatrane su dve vremenske tačke, četvrti i sedmi d.p.i. Uočeno je da nije bilo razlike u udelu CD4<sup>+</sup> T u DLČ između grupa.



**Grafik 31. Uticaj transfera crevne mikrobiote na ekspresiju fenotipskih markera DLČĆ.** DA pacovi koji nisu bili tretirani (Ctrl) ili im je urađen transfer crevne mikrobiote AO pacova (Gmbt) su imunizovani HKM+KFA. DLČĆ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. i analizirane na protočnom citofluorimetru. Podaci su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### 4.5.6. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u drenirajućim limfnim čvorovima

Pošto smo dobili smanjenje kliničkih simptoma EAE nakon transfera crevne mikrobiote, zanimalo nas je da li je do takvog efekta došlo usled povećane zastupljenosti Treg u DLČ. Procenat Treg u DLČ je je ispitivan detekcijom CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ćelija. Analize su rađene nakon imunizacije ćelija, u induktivnoj fazi bolesti (četvrti i sedmi d.p.i.). Upoređivanjem ćelija DLČ tretiranih i netretiranih pacova, primećeno je da je procenat Treg veći kod tretiranih životinja u svakoj posmatranoj vremenskoj tački, kao što je i očekivano.

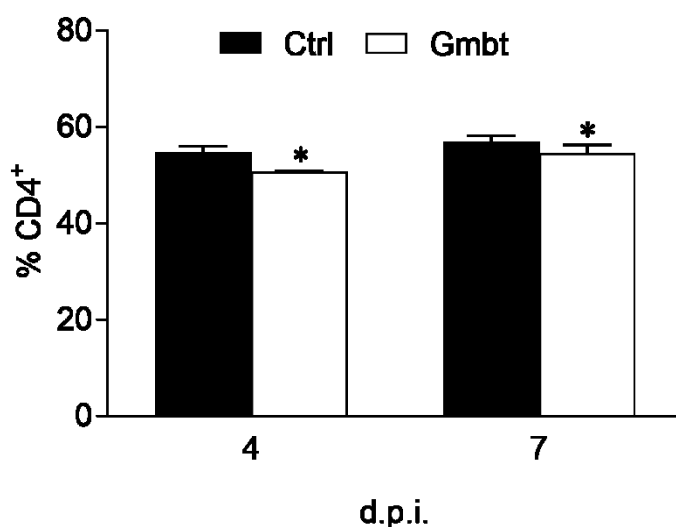


**Slika 12. Uticaj transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u DLČ.** DA pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su tretirani crevnom mikrobiotom AO pacova (Gmbt). DLČ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. (HKM+KFA) i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (A). Na reprezentativnim plotovima dobijenim četvrtog d.p.i. je prikazana strategija ograničavanja na Treg za Ctrl i Antb životinje (B). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.



#### 4.5.7. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost CD4<sup>+</sup> ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima

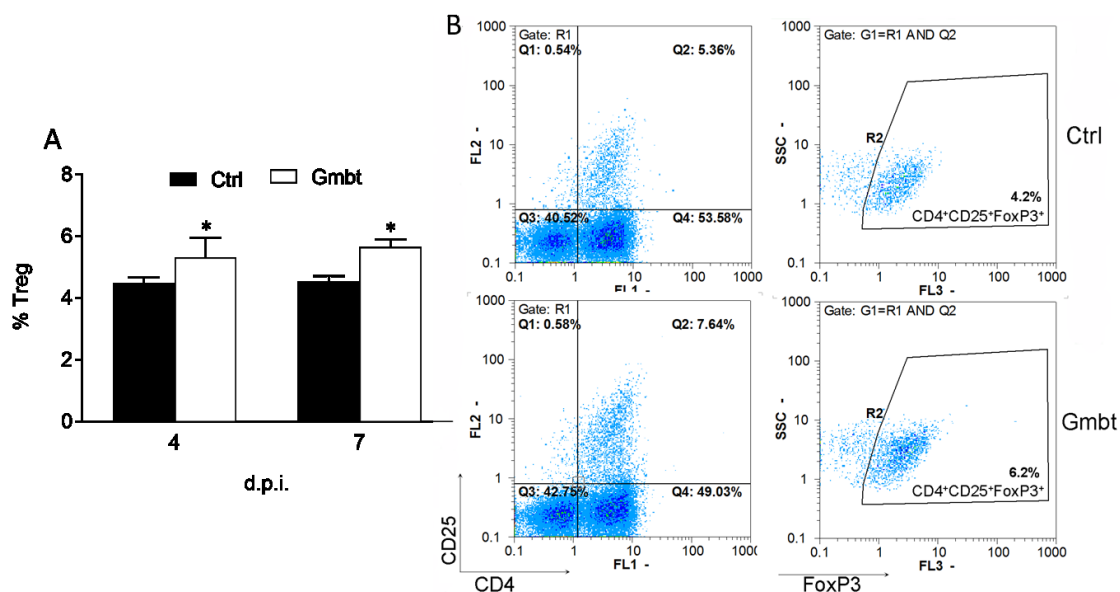
Efekte transfera crevne mikrobiote želeli smo da ispitamo i u GALT-u. Ispitivana je zastupljenost CD4<sup>+</sup> T limfocita u ćelijama MLČ metodom protočne citofluorimetrije. Ćelije netretiranih i tretiranih pacova su posmatrane u dve vremenske tačke, četvrtog i sedmog d.p.i. Ni u jednom terminu nije došlo do statistički značajne promene u zastupljenosti CD4<sup>+</sup> T između grupa.



**Grafik 32. Fenotipska analiza ćelija MLČ nakon transfera crevne mikrobiote.** DA pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili im je urađen transfer crevne mikrobiote AO pacova (Gmbt). Životinje su imunizovane HKM+KFA. MLČĆ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. i analizirane na metodom protočne citofluorimetrije. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### 4.5.8. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima

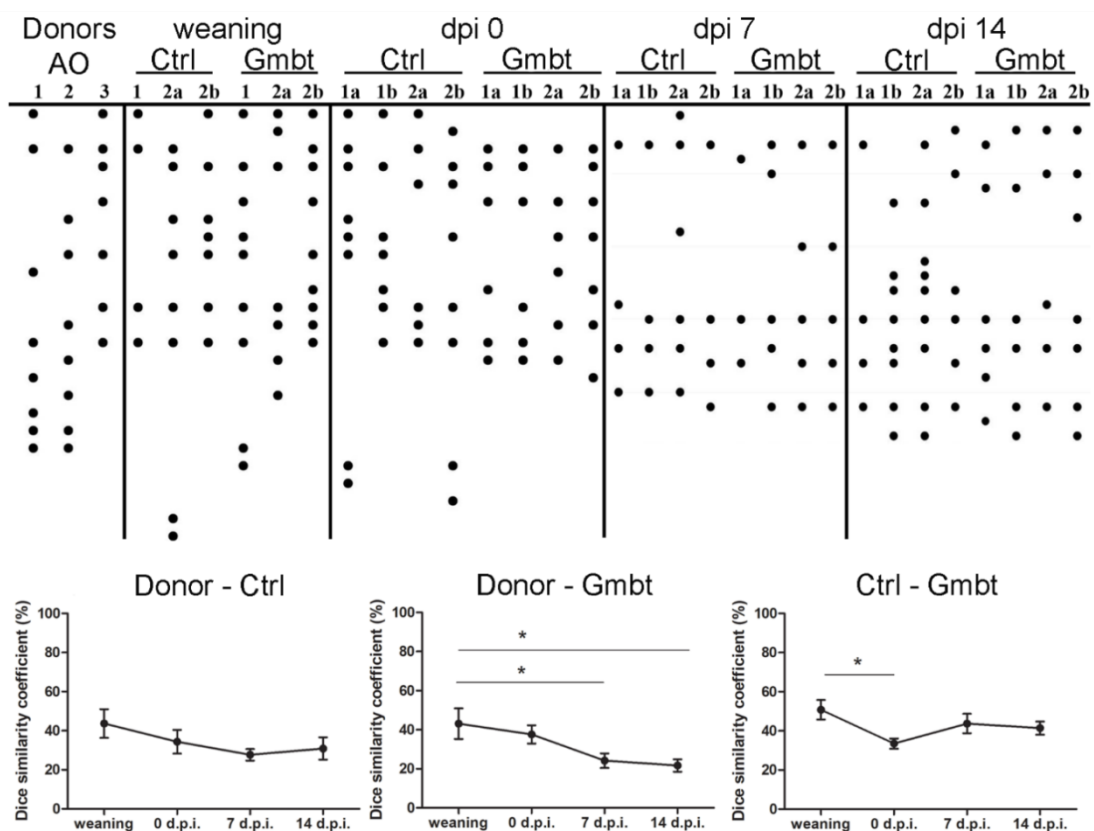
Zastupljenost Treg u MLČ životinja koje su tretirane crevnom mikrobiotom soja pacova otpornog na EAE i netretiranih životinja je takođe upoređivan. MLČ su izolovane u dva termina nakon imunizacije životinja, četvrtog i sedmog d.p.i. U skladu sa pretpostavkom, transfer crevne mikrobiote je doveo do povećanja procenta Treg u MLČ u obe vremenske tačke (4 i 7 d.p.i.).



**Slika 13. Efekat transfera crevne mikrobiote na zastupljenost Treg u MLČ.** DA pacovi su bili bez tretmana (Ctrl) ili su primali crevnu mikrobiotu AO pacova (Gmbt) i imunizovani su HKM+KFA. MLČ su izolovane četvrtog i sedmog d.p.i. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SD (A). Na reprezentativnim plotovima dobijenim četvrtog d.p.i. je prikazana strategija ograničavanja na Treg za Ctrl i Antb životinje (B). Rezultati su dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Gmbt i Ctrl pacova.

#### **4.5.9. Uticaj transfera crevne mikrobiote AO pacova na sastav mikrobiote creva DA pacova kojima je izvršen transfer**

Transfer crevne mikrobiote AO pacova u DA pacove je značajno uticao na diverzitet crevne mikrobiote tretiranih pacova. Naročito je izmenjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija DA pacova nakon transfera u poređenju sa kontrolnim životinjama, u periodu od odvajanja od majki do imunizacije (četiri do osam nedelja starosti). U isto vreme Dice koeficijent je statistički značajno veći kod tretiranih pacova, što ukazuje na uspešnu transplantaciju MKB sojeva iz AO u DA pacove kojima je izvršen transfer. Četiri nedelje nakon odvajanja od majki, sličnost u MKB sojevima između AO i DA tretiranih pacova se smanjivao, ali u isto vreme koeficijent je rastao između kontrolne i tretirane grupe ukazujući na vraćanje sastava MKB na sastav kakav je kod kontrolnih životinja. Osim toga, sličnosti u sastavu MKB između ove dve grupe počinjao je ponovo da raste na 14 d.p.i., što je verovatno efekat imunskih mehanizama na sastav mikrobiote. Slično, ukupan sastav crevne mikrobiote tretiranih DA pacova se statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolne životinje u periodu od nultog d.p.i. do sedmog d.p.i., dok je sličnost između AO i kontrolnih DA pacova bila najmanja na sedmom d.p.i., ukazujući da bi ova razlika mogla biti ključna za prognozu bolesti.



**Slika 14. Ispitivanje uticaja transfera crevne mikrobiote AO pacova na sastav crevne mikrobiote DA pacova.** DA pacovi su bili netretirani (Ctrl) ili tretirani mikrobiotom AO pacova (Gmbt). Životinje su imunizovane HKM+KFA. Uzorci fecesa su sakupljeni u vreme razdvajanja od majke (weaning), na dan imunizacije (0 d.p.i.) i nakon imunizacije sedmog i 14. d.p.i. DGGE profili su dobijeni korišćenjem prajmera specifičnih za *Lactobacillus* iz bakterijske DNK izolovane iz AO pacova (donor), DA pacova kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote (Gmbt) i kontrolnih DA pacova koji su bili bez tretmana (Ctrl). DGGE trake koje su bile jasno vidljive na gelu su prikazane šematski. Svaka kolona predstavlja pojedinačnu životinju, a svaka tačka predstavlja pojedinačnu traku na DGGE gelu. Prikazani box-plot dijagrami su zasnovani na Dice koeficijentu sličnosti. \* $p < 0,05$  se smatra statistički značajnom razlikom.

# **4. Diskusija**

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da pacovi soja AO, koji su otporni na indukciju EAE, imaju manje CD4<sup>+</sup> T limfocita u GALT-u i da ove ćelije proizvode manje proinflamacijskih citokina, IFN- $\gamma$  i IL-17 u poređenju sa DA pacovima koji su podložni indukciji EAE-a. Nakon imunizacije životinja smanjen je procenat CD4<sup>+</sup> T ćelija u MLČ kod oba soja, a takođe je smanjen i procenat CD8<sup>+</sup> T ćelija u GALT-u u terminu koji odgovara piku EAE-a. AO pacovi imaju manju zastupljenost Treg u MLČ u odnosu na DA pacove. U oba soja pacova u induktivnoj fazi EAE-a je procenat ovih ćelija smanjen, a zatim se ponovo povećava. U PP nema razlike u zastupljenosti Treg između sojeva, što se održava i nakon imunizacije. U terminu koji odgovara piku EAE-a povećan je procenat Treg u PP i AO i DA pacova. Oslobođanje IL-10 prati trend Treg, manje je kod AO pacova u svim ispitivanim terminima u poređenju sa DA. Razlike između sojeva se uočavaju i u sastavu mikrobiote creva. Kod neimunizovanih AO pacova se uočava prisustvo vrsta rodova *Turicibacter* i *Atopostipes*, kojih kod DA pacova nema. Razlike postoje i nakon imunizacije životinja i ogledaju se u većem diverzitetu bakterijskih grupa kod DA pacova, dok su kod AO pacova identifikovane *Lachnospiraceae* kao grupa bakterija koja bi mogla da moduliše EAE.

Kako bismo potvrdili hipotezu da je za otpornost AO pacova na EAE zaslužan GALT i crevna mikrobiota, modulirali smo sastav mikrobiote produženom primenom antibiotika. Zapaža se da nakon tretmana antibioticima dolazi do pojave blagih simptoma EAE-a kod AO pacova, do povećane infiltracije ćelija u kičmenu moždinu i povećane koncentracije IL-17 u homogenatima kičmenih moždina. Promene se uočavaju i u DLČ, gde se detektuje povećana produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17, ali ne i antiinflamacijskog citokina IL-10 kod životinja tretiranih antibioticima. Promene u GALT-u se ogledaju u specifičnim promenama zastupljenosti Treg. Pre imunizacije se zapaža manji procenat Treg kod tretiranih AO pacova, dok do smanjenja zastupljenosti Treg u MLČ dolazi nakon imunizacije. Tretman AO pacova antibioticima utiče i na sastav crevne mikrobiote. Najizraženije promene se uočavaju u četvrtoj nedelji života, odnosno u periodu kada je antibiotski tretman prekinut i životinje su odvojene od majki.

Za kraj smo želeli da proverimo da li je mikrobiota creva AO pacova odgovorna za omogućavanje otpornosti na indukciju EAE-a, pa smo u tu svrhu izvršili transfer mikrobiote AO pacova u DA pacove koji su podložni indukciji EAE-a. Prvo smo posmatrali do kakvih promena ovaj transfer dovodi u CNS-u, a zatim i u GALT-u. DA

pacovi kojima je izvršen transfer crevne mikrobiote AO pacova pokazuju blaže simptome EAE-a i imaju manju koncentraciju IL-17 u homogenatima kičmenih moždina. Transfer mikrobiote dovodi do smanjene celularnosti DLČ, ali do povećanja procenta Treg u ovim limfnim čvorovima. Na nivou GALT-a takođe dolazi do promena u Treg, gde se zapaža povećanje njihove zastupljenosti u MLC kod tretiranih životinja. Transferom crevne mikrobiote je izmenjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija u periodu odvajanja mladunaca od majki.

T limfociti se smatraju ključnim u patogenezi multiple skleroze i EAE-a (Petermann i Korn, 2011). Naročito se ističe uloga autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita koji se u perifernim limfnim organima diferenciraju u Th1 i Th17 ćelije (Dendrou i sar. 2015). Kako bi ostvarile encefalitogenu funkciju, Th1 i Th17 ćelije moraju da migriraju u CNS. U EAE-u, ove ćelije potiču iz limfnih čvorova koji dreniraju mesto imunizacije, a zatim se diseminuju kroz telo u potrazi za APC koje prikazuju antigene CNS-a i koje su sposobne da restimulišu encefalitogene ćelije (Sosa i Forsthuber, 2011), nakon čega dolazi do njihove ekspanzije. Takve APC su prisutne unutar CNS-a imunizovanih životinja, kao i u CNS-a pacijenata obolelih od multiple skleroze (Sosa i Forsthuber, 2011; Chastain *i sar.*, 2012). Nakon restimulacije imunske ćelije vrše masivnu invaziju CNS-a (Bartholomäus *i sar.*, 2009), dolazi do intenzivne produkcije proinflamacijskih citokina koji dovode do narušavanja krvno-moždane barijere, što sve rezultuje inflamacijom i oštećenjem tkiva. Međutim, skoro je pokazano da encefalitogene ćelije takođe u velikom broju migriraju ka GALT-u gde se mogu rediferencirati u Treg (Esplugues *i sar.*, 2011; Califano *i sar.*, 2014). Iz tog razloga se čini da je GALT važan u patogenezi autoimunskih procesa u CNS-u. Naši rezultati jasno pokazuju da se MLC i PP soja koji je otporan na indukciju EAE-a i soja koji je podložan indukciji EAE-a razlikuju. Iako nije uočena razlika u apsolutnom broju ćelija po MLC ili po PP, udeo CD4<sup>+</sup> T ćelija je varijabilan između sojeva. Naime, veći udeo CD4<sup>+</sup> T ćelija je primećen kod DA pacova i u MLC i u PP. Takođe, ovaj udeo je smanjen u MLC oba soja nakon imunizacije, dok se uočava povećanje u PP kod DA u piku bolesti. Štaviše, udeo CD8<sup>+</sup> T ćelija je smanjen u MLC i PP kod oba soja u piku bolesti. Stoga, apsolutni broj T ćelija je smanjen u MLC i PP nakon imunizacije kod oba soja. Imajući u vidu da su Th1, Th17 i Treg ćelije od ključnog značaja za patogenezu EAE-a, razumljivo je da ova

zapažanja mogu biti bitna za razliku u podložnosti na indukciju EAE-a kod AO i DA pacova.

Citokini su uključeni u patogenezu multiple skleroze tokom čitavog njenog toka, od inicijalne diferencijacije patogenih T ćelija na periferiji, pa do rezultujuće inflamacije i tkivnog oštećenja u CNS-u (Palle *i sar.*, 2017). IFN- $\gamma$  i IL-17 su glavni citokini koje proizvode Th1 i Th17 ćelije (Fletcher *i sar.*, 2010; Nicol *i sar.*, 2015). Štaviše, ovi citokini ispoljavaju različite efektorske funkcije u autoimunskim procesima u CNS-u. Većinom deluju stimulacijom drugih ćelija, kao što su makrofagi i neutrofili, koji dovode do destrukcije tkiva CNS-a, ali je uočeno i da oni sami imaju i direktne efekte na rezidentne ćelije CNS-a (Kurschus, 2015). Na primer, pokazano je da IFN- $\gamma$  ima sposobnost indukcije ćelijske smrti oligodendrocita (Vartanian *i sar.*, 1995), a da IL-17 promovira disfunkciju krvno-moždane barijere (Kebir *i sar.*, 2007b). Prethodno je pokazano da je produkcija IFN- $\gamma$  i IL-17 smanjena u GALT-u i CNS-u kod akseničnih miševa koji su otporni na indukciju EAE-a u poređenju sa miševima slobodnim od specifičnih patogena, koji su podložni razvoju EAE-a (Lee *i sar.*, 2011). U skladu sa tim je i zapažanje da je niži nivo oba ova citokina u kulturama MLČĆ i PPĆ AO pacova u poređenju sa DA pacovima. Takođe, smanjena produkcija ovih citokina u CNS-u AO pacova u odnosu na CNS DA pacova je prethodno pokazana od strane našeg tima (Miljković, Stanojević, *i sar.*, 2011). Stoga, može se reći da obrazac produkcije IFN- $\gamma$  i IL-17 u crevima prati obrazac produkcije ovih citokina u CNS-u kod životinja otpornih na EAE.

Zanimljivo je da je produkcija IFN- $\gamma$  u GALT-u DA pacova viša kod neimunizovanih životinja, ali da opada nakon imunizacije. Ovaj pad u produkciji IFN- $\gamma$  može delimično biti objašnjen smanjenjem udela CD4<sup>+</sup> T ćelija u MLČ i PP, do kog takođe dolazi nakon imunizacije. Pad u udelu CD4<sup>+</sup> T ćelija je manji u odnosu na smanjenje produkcije IFN- $\gamma$ . Takođe, produkcija drugog citokina tipičnog za CD4<sup>+</sup> T ćelije, IL-17 nije smanjena. Moguće je da je broj ćelija koje proizvode IFN- $\gamma$  smanjen ili da je produkcija ovog citokina po ćeliji ograničena. Zanimljivo je da takvo smanjenje nije uočeno kod AO pacova. Zato možemo pretpostaviti da nakon imunizacije Th17 ćelije dominiraju u GALT-u životinja podložnih na indukciju EAE-a, ali ne i u GALT-u životinja otpornih na indukciju EAE-a. Predloženo je da crevni komensali pružaju adjuvantni efekat i da promoviraju Th17 ćelijski odgovor (Berer i Krishnamoorthy,



2014). U skladu sa tim su ispitivanja u kojima je pokazano da crevna mikrobiota i njihovi metaboliti doprinose usmeravanju ćelija ka Th17 fenotipu u modelu EAE-a. Prethodno je pokazano da otpornost na indukciju EAE-a kod B10.S miševa zavisi od sekvestracije Th17 ćelija u crevu (Berer, Boziki i Krishnamoorthy, 2014). Uočeni obrazac produkcije IL-17 u MLČ i PP AO i DA pacova ne podrazumeva da se sekvestracija Th17 ćelija odigrava kod soja pacova otpornog na EAE. Ipak, treba naglasiti da je proliferacija Th17 ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima znatno manja kod AO pacova nego kod DA pacova (Miljkovic *i sar.*, 2006). Iz tog razloga je upitno da li je očekivani broj Th17 ćelija koje su migrirale u GALT AO pacova dovoljno veliki da bi se promene u IL-17 detektovale ELISA testom.

FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg su T ćelije koje nastaju u timusu ili njihov nastavak biva indukovana na periferiji. Treg imaju bitnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (Fontenot, Gavin i Rudensky, 2003; Hori i Sakaguchi, 2004). U velikom broju su zastupljene u GALT-u, koje je konstantno izloženo antigenima poreklom iz hrane i mikrobiotom. Treg imaju važnu ulogu i u sprečavanju i ograničavanju autoimunskih procesa u CNS-u, s tim što još uvek nije najjasnije na koji način su uključene u patogenezu bolesti. U ispitivanjima EAE-a indukovanog MOG je pokazano da deplecijom Treg dolazi do povećane podložnosti životinja na EAE (Kohm, Carpentier i Miller, 2003). Takođe, u eksperimentima rađenim na miševima je pokazano da transfer Treg iz naivnih miševa dovodi do ublažavanja simptoma kod aktivno indukovanog EAE-a (Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2007). U našim eksperimentima se primećuje pad u udelu Treg unutar MLČ kod oba soja pacova nakon imunizacije u induktivnoj fazi EAE-a. Ipak, povećanje udela Treg u MLČ i PP se zapaža kod AO i DA pacova u vremenskoj tački koja odgovara piku bolesti kod DA pacova. GALT je poznato mesto dolaska i indukcije Treg (Berer i Krishnamoorthy, 2012). Ranije je pokazano da je oralna tolerancija na različite antigene CNS-a ključno određena indukcijom Treg u PP (Santos *i sar.*, 1994; Song *i sar.*, 2008). Osim toga, predloženo je da simbiotske bakterije indukuju CD39<sup>+</sup> na Treg u GALT-u i da su na ovaj način Treg usmerene ka CNS-u gde sprečavaju ili smanjuju inflamaciju (Wang *i sar.*, 2014). Stoga, posmatrano smanjenje udela Treg u PP nakon imunizacije kod DA pacova, ali ne i kod AO pacova može biti ključan element u otpornosti na EAE AO pacova. S druge strane, uočeno povećanje zastupljenosti Treg u MLČ i PP kod DA pacova u piku EAE-a može biti od značaja za

ograničavanje inflamacije u CNS-u i pokretanje procesa koji će konačno dovesti do oporavka pacova od EAE-a.

Smatra se da Treg suprimiraju imunski odgovor putem nekoliko mehanizama. Dominantan mehanizam dejstva Treg u crevima je produkcijom antiinflamacijskog citokina IL-10 (Maynard *i sar.*, 2012). Poznato je da u EAE-u IL-10 inhibira ekspresiju gena za citokine u T ćelijama, makrofagima i monocitima (Fiorentino *i sar.*, 1991; Matsuda *i sar.*, 1994; Ito *i sar.*, 1999). IL-10 ograničava proliferaciju Th1 ćelija, ali ne ispoljava sličan efekat i na Th17 ćelije i CD8<sup>+</sup> T ćelije (Rohrer *i sar.*, 1995; Groux *i sar.*, 1996). Osim toga, IL-10 deluje i na APĆ, gde dovodi do smanjenja ekspresije proteina bitnih za prezentaciju antigena, poput MHC II, kostimulatornih molekula i adhezivnih molekula, čime se smanjuje aktivacioni status APĆ (Rohrer *i sar.*, 1995; Groux *i sar.*, 1996). U ispitivanjima u kojima je IL-10 primenjivan u terapijske svrhe, njegova primena je dovela do sprečavanja i ublažavanja EAE-a (Rott, Fleischer i Cash, 1994; Rohrer *i sar.*, 1995; Groux *i sar.*, 1996).

Nedavno je pokazano da IL-10 kao jedan od glavnih regulatornih citokina imunskog sistema ima bitnu ulogu i u imunoregulaciji u GALT-u (Rie Gaboriau-Routhiau, Lé i Cerf-Bensussan, 2011; Levast, Li i Madrenas, 2015) pod uticajem mikrobiote. Pokazano je da nativni mikroorganizmi creva kod ljudi, naročito klasteri IV i XIVa roda *Clostridium* stimulišu akumulaciju Treg u crevima (Atarashi *i sar.*, 2011). Štaviše, čini se da IL-10 koji su proizvele ćelije GALT-a ima važnu ulogu u regulaciji autoimunskih procesa u CNS-u. Naime, pokazano je da su Treg koje proizvode IL-10 dominantne u ublažavanju EAE-a kod miševa tretiranih kapsularnim PSA poreklom od *Bacteroides fragilis* (Telesford *i sar.*, 2015). Vredi napomenuti da su klasteri roda *Clostridium*, XIVa i IV, koji su identifikovani kao dominantni u indukciji crevnih Treg koje proizvode IL-10, pronađeni u smanjenom broju kod pacijenata obolelih od multiple skleroze (Miyake *i sar.*, 2015). Iako se makrofagi i B ćelije smatraju najpotentnijim proizvođačima IL-10 u GALT-u, čini se da IL-10 koji su proizvele regulatorne T ćelije, bilo FoxP3<sup>+</sup> ili Tr1 ćelije, ima dominantnu ulogu u izgradnji regulatorne sredine u tkivu creva (Guo, 2016). U skladu sa tim, nedostatak receptora za IL-10 na makrofagima, a ne deficijencija IL-10 indukuje inflamaciju u crevima (Shouval *i sar.*, 2014; Zigmond *i sar.*, 2014). Takođe, pokazano je da regulatorne B ćelije koje proizvode IL-10 i nastaju pod uticajem promena u mikrobioti,

a koje se nalaze u slezini i limfnim čvorovima udaljenim od creva, sprečavaju razvoj EAE-a (Javier Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2010). Stoga, je nastala potreba da se detaljnije istraže Treg koje proizvode IL-10 u crevima kako bi se ispitala protektivna uloga crevne mikrobiote u multiploj sklerozi.

Detaljna analiza produkcije IL-10 u CNS-u AO i DA pacova je prethodno urađena od strane naše grupe i smatra se da oslobađanje IL-10 unutar ciljnog tkiva može biti bitno za oporavak DA pacova od EAE-a (Blaževski *i sar.*, 2013). Takođe, veća produkcija IL-10 je zapažena u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova u poređenju sa AO pacovima šestog dana nakon imunizacije (Blaževski *i sar.*, 2013). Slični rezultati su primećeni i kod MLČ u ovom istraživanju. Uočeno je veće otpuštanje IL-10 kod DA pacova pre imunizacije, kao i u šestom danu i 13.-16. dana nakon imunizacije. Zapravo, produkcija IL-10 kod AO pacova je ostala na bazalnom nivou nakon imunizacije, dok se kod DA pacova povećala šestog dana a zatim opala 13.-16. dana. Zanimljivo je da produkcija IL-10 opada nakon imunizacije u PPC kod DA pacova, a zatim raste ka bazalnom nivou 13.-16. dana. Ovo ukazuje da se možda odigrava redistribucija ćelija koje proizvode IL-10 između PP i MLČ ili čak drenirajućih limfnih čvorova, kod DA pacova nakon indukcije EAE-a. Drugo objašnjenje je da neki faktori koji promovišu IL-10 mogu da deluju unutar MLČ, a neki elementi koji inhibiraju IL-10 da deluju unutar PP imunizovanih DA pacova. Ova dva mehanizma ne mora da se isključuju i mogu delovati u saradnji kako bi modulirali oslobađanje IL-10 u GALT-u.

Mikrobiota creva ima značajne efekte na razvoj i održavanje imunskog sistema. Sve je više istraživanja u kojima se ispituje uloga mikrobiote u razvoju bolesti creva, ali i drugih bolesti. U ispitivanjima na životinjama je pokazano da crevna mikrobiota ima ulogu u progresiji demijelinizirajućih bolesti i da modulacijom mikrobiote može doći ili do pogoršanja bolesti ili do ublažavanja simptoma (Ezendam i van Loveren, 2008; Ezendam *i sar.*, 2008; Berer *i sar.*, 2011; Lee *i sar.*, 2011). U našim eksperimentima, izvršili smo uporednu molekularnu analizu diverziteta crevnih bakterija, konkretno diverziteta *Lactobacillus* spp., kod AO i DA pacova koji se razlikuju po podložnosti za indukciju EAE-a. Interesantno je da je veća zastupljenost *L. johnsonii* i *L. intestinalis* detektovana kod neimunizovanih AO pacova u poređenju sa DA pacovima. *L. johnsonii* NCC 533 je humani izolat koji je intenzivno ispitan zbog svojih probiotskih

aktivnosti, uključujući imunomodulaciju (Haller, Blum, *i sar.*, 2000; Haller, Bode, *i sar.*, 2000; Ibnou-Zekri *i sar.*, 2003). Pokazano je da neutrališe aktivnost *E. coli* koja sprečava preuzimanje butirata od strane crevnih epitelnih ćelija (Kumar, Stecher i Tamura, 2016). *L. intestinalis* je često izolovan iz miševa kao rezidentni stanovnik mikrobiote (Peña *i sar.*, 2004; Buhnik-Rosenblau, Danin-Poleg i Kashi, 2011). Stoga je funkcionalna analiza doprinosa ovih bakterija otpornosti EAE-a opravdana. Još zanimljiviji pronalazak je da su bakterije rodova *Turicibacter* i *Apostipes* prisutne kod neimunizovanih AO pacova, ali ne i u crevima neimunizovanih DA pacova. Obe bakterije su relativno nove i nedovoljno istražene. *Turicibacter sanguinis* je anaerobna, štapičasta, Gram-pozitivna bakterija sa malim sadržajem guanina i citozina. Predloženo je da *Turicibacter* spp. spada u bakterije koje normalno naseljavaju crevo miševa i da su njene kvantitativne varijacije povezane sa genotipom domaćina (Benson *i sar.*, 2010). *Turicibacter* je povećan u crevnom sadržaju koza na ishrani bogatoj žitaricama (Liu *i sar.*, 2014), kao i kod pacova koji su hranjeni ječmenim slalom (Zhong, Nyman i Fåk, 2015). Ishrana u kojoj su zastupljena vlakna smanjuje hroničnu inflamaciju kao i inflamaciju CNS, delimično produkcijom SCFA od strane crevne mikrobiote (Maslowski *i sar.*, 2009; Erny *i sar.*, 2015). Zanimljivo je da je porast bakterija roda *Turicibacter* kod pacova koji su hranjeni ječmenim slalom u uzajamnoj vezi sa porastom buterne kiseline (Zhong, Nyman i Fåk, 2015). Ova SCFA dokazano reguliše imunski odgovor, stimuliše metabolizam domaćina i funkciju CNS-a (Bienenstock, Kunze i Forsythe, 2015). Antiinflamacijski efekti bakterija roda *Turicibacter* su predloženi kod miševa koji su bili na ishrani bez gvožđa (Werner *i sar.*, 2011) kao i kod knockout miševa za CD8 T ćelije koji su otporni na razvoj kolitisa (Presley *i sar.*, 2010). Stoga, primamljivo je pretpostaviti da *Turicibacter* doprinosi otpornosti pacova soja AO na indukciju EAE-a. *Atopostipes suicloacale* je fakultativno anaerobna, katalaza-negativna, asporogena, štapičasta bakterija koja pripada Clostridium podfilumu Gram pozitivnih bakterija sa niskim sastavom guanina i citozina (Cotta *i sar.*, 2004). Za razliku od roda *Turicibacter*, nema podataka o efektima bakterija roda *Atopostipes* na imunski sistem. Zanimljivo je da je kod imunizovanih životinja zapažena korelacija između prisustva *Turicibacter* sp. i veće produkcije IL-10 kod DA pacova u piku bolesti. Porast *Turicibacter* sp. u sadržaju creva korelira sa povećanjem buterne kiseline, SCFA sa imunomodulatornim potencijalom (Zhong, Nyman i Fåk, 2015).

Pored toga, ranije su već predloženi mogući antiinflamacijski efekti *Turicibacter* sp. (Presley *i sar.*, 2010; Werner *i sar.*, 2011; Suchodolski *i sar.*, 2012). Uzimajući u obzir da *Turicibacter* sp. mogu doprineti otpornosti AO pacova na indukciju EAE-a, može se pretpostaviti da neki faktori domaćina stimulišu *Turicibacter* sp. kod DA pacova u piku bolesti dovodeći do ublažavanja simptoma bolesti. Nedavno je pokazano da mikro RNK (miRNK) u fecesu omogućava kontrolu domaćina nad mikrobiotom creva preko transspecijske regulacije gena u bakterijama (Liu *i sar.*, 2015). Bilo bi jako interesantno ispitati da li miRNK regulišu nivo *Turicibacter* sp. u neimunizovanim i imunizovanim AO i DA pacovima

Osim toga, rezultati dobijeni na imunizovanim životinjama su otkrili da članovi familije *Lachnospiraceae* mogu biti povezani sa ublažavanjem simptoma EAE-a. Prethodno je pokazano da su bakterije koje pripadaju familiji *Lachnospiraceae* dominantno prisutne u crevnoj mikrobioti životinja sa blagim simptomima bolesti (Reeves *i sar.*, 2011). Autori su postavili hipotezu da članovi familije *Lachnospiraceae* omogućavaju delimično obnovljenu kolonizaciju koja dovodi do otpornosti na *Clostridium difficile* u crevima miševa. Dalje, uočena je smanjena rasprostranjenost *Lachnospiraceae* u crevnoj mikrobioti pacijenata sa inflamatornom bolesti creva (Frank *i sar.*, 2007). *Lachnospiraceae* su Gram-pozitivne obligatorne anaerobne bakterije koje uglavnom ne formiraju spore (Cotta i Forster, 2006). Zanimljivo je da su klonovi 2, 7 i 20 identifikovani kao članovi *Lachnospiraceae* familije, pokazali veću sličnost sa redom *Clostridiales*. Takson *Clostridiales* je red bakterija razdela *Firmicutes* sa važnom ulogom u fermentaciji dijetarnih vlakana u debelom crevu (Chinda *i sar.*, 2004). Štaviše, bakterije koje pripadaju redu *Clostridiales*, naročito članovi familije *Lachnospiraceae*, identifikovane su kao najaktivniji članovi mikrobiote u crevima zdravih odraslih osoba koji u velikoj meri doprinose produkciji SCFA u crevu (Chinda *i sar.*, 2004; Peris-Bondia *i sar.*, 2011). SCFA, naročito butirata, ispoljavaju povoljne aktivnosti za intestinalnu mukozu, dok je smanjenje koncentracije SCFA povezano sa različitim patologijama (Leonel i Alvarez-Leite, 2012). Stoga, može se pretpostaviti da je povećanje *Clostridiales* i *Lachnospiraceae* kod zdravih DA pacova povezano sa povećanom produkcijom butirata u crevu koja se, opet, povezuje sa boljim zdravstvenim statusom (Säemann *i sar.*, 2000; Bourassa *i sar.*, 2016; Tremlett *i sar.*, 2016).

Može se reći da je sastav mikrobiote creva AO pacova stabilniji, dok rezultati dobijeni iz DA pacova ukazuju na veći diverzitet bakterijskih grupa, naročito u piku bolesti. Međutim, veći diverzitet bakterija kod DA pacova može biti rezultat nižeg broja laktobacila kao dominantne grupe kod DA pacova. Stoga, druge mikrobiološke grupe preovladavaju usled nedostatka laktobacila. Produkcija IL-10 u MLČ je stabilnija kod AO pacova koji takođe imaju i stabilniju crevnu mikrobiotu. Ova stabilnost može predstavljati bitan faktor u otpornosti AO pacova na EAE. S druge strane, „nestabilnost“ crevne mikrobiote DA pacova može dovesti do podložnosti EAE-a. Iz tog razloga smo uradili eksperimente u kojima smo remetili crevnu mikrobiotu AO pacova primenom antibiotika, kako bismo ispitali posledice koje ovakav tretman ima na otpornost u autoimunosti CNS-a. Od ranije je poznato da antibiotici mogu da promovišu autoimunost. Pokazano je da kod NOD miševa sa Guillain Barré sindromom indukovanoj infekcijom primena antibiotika je pogoršala neurološke znake i lezije (St Charles *i sar.*, 2017). Takođe, tretman antibioticima je favorizovao prajming dijabetogenih T ćelija, promovišući tako progresiju bolesti kod NOD miševa (Sun *et al.*, 2015). U našim eksperimentima smo pokazali da se primenom antibiotika narušava otpornost AO pacova na EAE. Naime, tretirane životinje su ispoljile blage kliničke simptome i imale veći broj infiltrata i povećan broj ćelija u infiltratima u kičmenim moždinama. Analizom homogenata kičmenih moždina dobijen je povišen nivo proinflamacijskog citokina, IL-17, ali je zato nivo IFN- $\gamma$  bio smanjen kod životinja tretiranih antibioticima. Diferencijalni doprinos ćelija koje proizvode IL-17 i IFN- $\gamma$  autoimunskim procesima u CNS-u je ranije potvrđen. Različiti regioni CNS-a su preferencijalno pod uticajem ćelija koje proizvode ili IL-17 ili IFN- $\gamma$  i kao posledica su zapaženi različiti klinički ishodi (Fletcher *et al.*, 2010; B.Ciric i A.Rostami, 2013). Iako su Th17 ćelije bile dominantne u inflamaciji mozga ali ne i kičmene moždine kod miševa, suprotno je primećeno kod ljudi (Simmons *i sar.*, 2013). Naši rezultati sugerišu da su pacovi sličniji ljudima nego miševima po tom pitanju. Takođe je predloženo da IFN- $\gamma$  ima regulatorna svojstva u mozgu miševa, ali ne i u kičmenoj moždini (Pierson *i sar.*, 2012). Ipak, relativno visok odnos IL-17 i IFN- $\gamma$  u kičmenoj moždini se čini obeležjem kliničke manifestacije EAE-a kod AO pacova, dok se suprotan odnos primećuje kod ublažavanja EAE-a kod DA pacova, pa se može naslutiti da bi IFN- $\gamma$

mogao imati važnu antiinflamacijsku i neuroprotektivnu ulogu u kičmenoj moždini pacova.

S razlogom se može pretpostaviti da je mehanizam koji stoji iza efekata antibiotika koji podstiču EAE, a koji su zapaženi kod AO pacova funkcionalna posledica promena u sastavu mikrobiote koja je poremetila regulaciju imunskog odgovora posredovanog Th1 i Th17 ćelijama. Ćelije drenirajućih limfnih čvorova pacova koji su tretirani antibioticima proizvode više IFN- $\gamma$  i IL-17, citokina koji su markeri Th1 i Th17. Ovo je možda posledica smanjenog delovanja Treg s obzirom da je mali udeo Treg zapažen u DLČ nakon imunizacije. Ova hipoteza je u skladu sa prethodnim izveštajima o efektima crevne mikrobiote na EAE. Na primer, jedna grupa je pokazala da se povoljni efekti mikrobiote creva na EAE ostvaruju kroz stvaranje Treg koji sprečavaju encefalitogenu funkciju pomoćničkih T ćelija (Kwon *i sar.*, 2013). Promene na nivou GALT-a nakon oralne primene antibiotika su upravo najizraženije u pogledu zastupljenosti Treg. Kod neimunizovanih životinja se zapaža smanjenje procenta Treg u PP nakon primene antibiotika, a nakon imunizacije se uočava smanjenje udela ovih ćelija i u PP i u MLC. Do sada je pokazano da se primenom kapsularnog PSA komensalne bakterije *Bacteroides fragilis* postiže ublažavanje simptoma EAE. Kod ovih životinja je zapaženo smanjenje udela ćelija koje proizvode IL-17 i povećanje zastupljenosti ćelija koje proizvode IL-10. Protektivni efekti ovih bakterija su povezani sa povećanjem broja Treg u cervikalnim limfnim čvorovima (Bhargava i Mowry, 2014; Ochoa-Repáraz i Kasper, 2014; Mielcarz i Kasper, 2015). Takođe, u studiji u kojoj su miševi tretirani bakterijom *Salmonella typhimurium* došlo je do smanjenja kliničkog skora EAE-a (Jun *i sar.*, 2005, 2012; Ochoa-Repáraz *i sar.*, 2007). Ovaj tretman je doveo do povećanja zastupljenosti Treg i smanjenja Th1 i Th17 ćelija. Još jedan primer smanjenja kliničkog skora EAE-a je tretman probiotskim bakterijama vrste roda *Lactobacillus* usled povećanja Treg koje su proizvele IL-10 (Lavasani *i sar.*, 2010; Takata *i sar.*, 2011). Ovo sugeriše da, iako bi potencijalno i drugi faktori, poput genetskih ili hormonskih, mogli biti zaduženi za otpornost AO pacova na indukciju EAE-a zapaženu u našim prethodnim eksperimentima, posmatrani gubitak otpornosti usled antibiotskog tretmana govori u prilog crevne mikrobiote kao bitnog faktora u otpornosti AO pacova. Ipak, ni efekti antibiotika na podložnost AO pacova na indukciju EAE-a koji su nezavisni od mikrobiote ne mogu biti isključeni. Međutim,

značajne modifikacije crevne mikrobiote AO pacova koje su uočene nakon antibiotskog tretmana omogućavaju nam da pretpostavimo da su primećeni efekti antibiotika na podložnost AO pacova na EAE-a, bar delimično, posredovani mikrobiotom. Ovi efekti su u vezi sa smanjenjem Treg i pojačanom regulacijom proinflamacijskih komponenti u limfnim organima i unutar CNS-a, u ranoj induktivnoj fazi bolesti (četvrti d.p.i.), u vreme kada nastaje autoimunski odgovor. Međutim, takve jasne razlike u crevnoj mikrobioti nisu uočene u periodu kada su detektovani efekti na Treg, ukazujući da bi efekti na imunski sistem koji su zapaženi četvrtog d.p.i. mogli biti posledica disbioze crevne mikrobiote indukovane antibioticima u ranom periodu života (do četvrte nedelje starosti). Sve se više smatra da rana kolonizacija creva mikroorganizmima ima dugoročno dejstvo na zdravlje kroz interakciju sa imunskim sistemom, dok nedostatak odgovarajuće imunološke modulacije i indukcije imunološke tolerance može rezultovati razvojem autoimunskih bolesti.

Mikrobiota creva i GALT se smatraju važnim učesnicima u pokretanju, propagaciji, ali takođe i u sprečavanju razvoja autoimunskih procesa u CNS-u (Lee i Mazmanian, 2010; Bhargava i Mowry, 2014; Mielcarz i Kasper, 2015). Sastav crevne mikrobiote se razlikuje kod pacijenata obolelih od multiple skleroze i zdravih osoba (Cantarel *i sar.*, 2015; Miyake *i sar.*, 2015; Chen *i sar.*, 2016; Jangi *i sar.*, 2016), a kao što smo pokazali u ovoj disertaciji i između soja pacova koji su podložni i soja pacova koji su otporni na indukciju EAE-a. Ima dosta izveštaja o efektima tretmana antibioticima na razvoj EAE-a u kojima nije fokus na mikrobioti creva, već su primenjivali antibiotike kako bi delovali na druge komponente koje su u vezi sa patogenezom EAE-a. Ipak, ima i izveštaja čiji je fokus mikrobiota creva, a koji su značajno doprineli našem razumevanju uloge mikrobiote u EAE-u. Oni svi prikazuju povoljne efekte tretmana antibioticima na EAE-a. Naši rezultati pokazuju da antibiotici mogu imati i štetno dejstvo za autoimunske procese u CNS-u, s obzirom da su AO pacovi koji su otporni na razvoj EAE-a klinički ispoljili bolest nakon antibiotskog tretmana. Ovi suprotstavljeni rezultati mogu biti objašnjeni na više načina. Na primer, podaci koji pokazuju da antibiotici ostvaruju efekte ublažavanja bolesti se zasnivaju na tretmanu odraslih životinja, dok se efekti promovisanja bolesti koji su pokazani u našim eksperimentima u kojima su primenjivani antibiotici rezultirali primenom antibiotika od neonatalnog perioda. Zaista, slični rezultati su dobijeni u eksperimentalnoj psorijazi kod



miševa koji su tokom neonatalnog perioda bili tretirani antibioticima, što je dovelo do povećane podložnosti za razvoj bolesti, dok je isti tretman kod odraslih životinja ublažio simptome bolesti (Zanvit *i sar.*, 2015). Takođe, brojna ispitivanja su otkrila da različiti antibiotici dovode do različitih promena u crevnoj mikrobioti (Ferrer *i sar.*, 2017), što posledično može rezultovati različitim modulacijama imunskog odgovora. Pokazano je da tretman neomicinom rezultuje sprečavanjem razvoja autoimunskog dijabetesa, dok primena vankomicina pokreće dijabetogeni odgovor kod NOD miševa (Hu *i sar.*, 2016). Zbog toga se razlike u ishodu antibiotskog tretmana, kao što su ublažavanje EAE koje su drugi primetili u odnosu na prekid otpornosti na indukciju EAE-a koji je dobijen u našim eksperimentima, mogu delimično pripisati upotrebi različitih kombinacija antibiotika. Nedavno je predloženo od strane Qinghui i saradnika, koji su radili na modulaciji mikrobiote creva u životinjskom modelu sistemskog lupusa eritematozusa da je odgovarajući izbor antibiotika koji selektivno ciljaju bakterije od ključne važnosti za ublažavanje bolesti. Ono što je važno je da bolest nije bila izmenjena kod akseničnih miševa, pokazujući da potpuno odsustvo crevne mikrobiote nije imalo efekta na bolest koja nalikuje lupusu (Qinghui, Husen i Xin, 2015). U našim istraživanjima produženi tretman antibioticima je doveo do značajnih promena u crevnoj mikrobioti, sa odsustvom većih bakterijskih grupa, slično kao kod akseničnih životinja. Konkretno, pripadnici roda *Roseburia* su detektovani kod pacova tretiranih antibioticima 14. d.p.i. Pokazano je da promene u zastupljenosti *Roseburia* spp. koreliraju sa brojnim bolestima, uključujući sindrom iritabilnog creva, dijabetesa tipa 2, oboljenja nervnog sistema i alergije, dok prisustvo *Roseburia* spp. ispoljava blagotvorne efekte kao probiotik za obnavljanje povoljnih mikroorganizama (Tamanai-Shacoori *i sar.*, 2017). Zanimljivo, diverzitet crevne mikrobiote je uglavnom obnovljen u periodu nakon primene antibiotika, iako neke određene bakterijske grupe nisu izmenjene u poređenju sa kontrolnom grupom. Uzimajući u obzir prisustvo simptoma bolesti kod AO pacova, inače otpornih na indukciju EAE-a, može se zaključiti da izmenjena mikrobiota koja ima veću zastupljenost bakterija koje su u vezi sa patogeneom EAE-a korelira sa promocijom autoimunskog procesa i simptoma bolesti.

Naši rezultati su dobijeni kod pacova tretiranih antibioticima od rođenja do četvrte nedelje života, što je vremenski dosta udaljeno od imunizacije (u osmoj nedelji starosti). Ovo sugerše da narušavanje crevne mikrobiote rano u detinjstvu može stvoriti

predispoziciju za razvoj autoimunskih procesa CNS-a koja mogu biti pokrenuti nezavisnim stimulusima u kasnijoj dobi. Zaista, razlike u crevnoj mikrobioti su bile istaknute na kraju antibiotskog tretmana (četiri nedelja starosti), ali su skoro u potpunosti izostali u vreme imunizacije (osam nedelja starosti). Ovo implicira da se efekti antibiotika koji promovišu EAE postižu kroz perturbaciju crevne mikrobiote tokom ranog perioda u životu, moguće preko efekata na razvoj adaptivnog imunskog sistema. Shodno tome, bilo je manje Treg u PP kod ovih pacova. Da bi se utvrdilo da li primena antibiotika u ranom detinjstvu može biti predisponirajući faktor za razvoj multiple skeroze, neophodna su detaljnija istraživanja efekata antibiotika primenjenih u ranom postnatalnom periodu na GALT, kao i detaljne korelativne studije na pacijentima. Važno je naglasiti da je antibioticima uzrokovana disbioza kod dece već predložena kao mogući predisponirajući faktor za razvoj različitih bolesti, uključujući i autoimunske bolesti (Molloy, Bouladoux i Belkaid, 2012; Mueller *i sar.*, 2015).

Vredno pažnje je da je crevna mikrobiota ne samo doprinela otpornosti AO pacova za indukciju autoimunskih procesa u CNS-u, već je i njen transfer u DA pacove ublažio simptome EAE-a kod primalaca. Ovo je u skladu sa idejom da modulacija sastava i funkcije crevne mikrobiote može predstavljati dragocen terapijski pristup u terapiji multiple skleroze. U skladu sa tim je dokumentovano da lekovi koji modulišu multiplu sklerozu menjaju sastav crevne mikrobiote, npr. potenciraju zastupljenost rodova *Prevotella* i *Sutterella*, a smanjuju udeo roda *Sarcina* kod pacijenata obolelih od multiple skleroze koji su primali tretman (Jangi *i sar.*, 2016). Isto tako, suplementacija vitaminom D je dovela do povećanja vrsta rodova *Akkermansia*, *Faecalibacterium* i *Coprococcus* kod pacijenata (Cantarel *i sar.*, 2015). Tek treba ustanoviti da li su ove promene u sastavu crevne mikrobiote važne za ostvarivanje povoljnih efekata ovih agenasa u multiploj sklerozi ili samo koreliraju sa izmenjenom patogenezi bolesti. Štaviše, funkcionalna ispitivanja ciljaju na izmenu crevne mikrobiote kao na primarno sredstvo za smanjenje encefalitogenog imunskog odgovora u multiploj sklerozi, ako bude neophodno.

Povoljni efekat transfera mikrobiote creva AO pacova u DA pacove je bio paralelan sa smanjenjem IL-17, a ne IFN- $\gamma$  u kičmenoj moždini. Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima kod životinja tretiranih antibioticima kod kojih je antibiotski tretman doveo do povećanja IL-17 u odnosu na kontrolne životinje koje nisu razvile

EAE. Pored toga, kao i kod antibiotskog tretmana, i nakon transfera crevne mikrobiote dolazi do najizraženijih promena na nivou Treg. Naime, povećana proporcija Treg se uočava u DLČ i MLČ DA pacova nakon imunizacije kao posledica transfera crevne mikrobiote soja pacova otpornog na EAE. U skladu sa tim, povećanje potencijala Treg i posledično smanjenje encefalitogene aktivnosti Th1/Th17 su najverovatniji mehanizmi za uočene povoljne efekte transfera crevne mikrobiote AO pacova u DA pacove.

Iako je sličnost u sastavu MKB između AO i DA pacova kojima je izvršen transfer crevne mikrobio, najmanja sedmog d.p.i kada se uočava ublažavanje bolesti kod DA pacova kojima je izvršen transfer u poređenju sa kontrolnim životinjama, to bi moglo uputiti da se pozitivan uticaj transfera mikrobiote creva AO pacova u DA pacove ostvaruje u prvim danima života. Uspeh transfera crevne mikrobiote iz pacova otpornih na indukciju EAE-a u pacove koji su podložni razvoju EAE-a nagoveštava da bi slična terapija mogla biti primenjena i u terapiji multiple skleroze. Buduća ispitivanja treba da ustanove da li je efekat crevne mikrobiote koji dovodi do otpornosti na EAE specifičan za AO pacove ili se sličan efekat može postići i transferom mikrobiote creva nekog drugog soja pacova ili možda čak autologim transferom crevne mikrobiote. Takođe, predstojeća istraživanja treba da ispitaju da li crevna mikrobiota AO pacova ima povoljne efekte u terapiji drugih autoimunskih bolesti i hroničnih inflamacijskih bolesti. Transfer crevne mikrobiote se čini obećavajućim pristupom za tretman bolesti koje su povezane sa crevima, uključujući i multiplu sklerozu (Evrensel i Ceylan, 2016). Ipak, u našim eksperimentima DA pacovi su bili izloženi mikrobioti creva AO pacova od samog rođenja pa sve do posle indukcije EAE-a, što nije moguće na isti način primeniti kod ljudi. Transfer mikrobiote creva na taj način bi mogao biti izvodljiv kod ljudi samo u preventivne svrhe kada bi bili utvrđeni genetički markeri koji predisponirajućim faktori za multiplu sklerozu. Jedna od glavnih prepreka za uspešan transfer crevne mikrobiote je otpornost uspostavljene crevne mikrobiote na promene (Sommer *i sar.*, 2014). Dok otpornost „zdrave“ crevne mikrobiote doprinosi sprečavanju nastanka bolesti koje su posledica disbioze, otpornost crevne mikrobiote koja je već u disbiozi sprečava uspešno uvođenje poželjnih mikroba u zajednicu. Treba naglasiti da je nedavno pokazano da kratak tretman antibioticima praćen kratkotrajnim transferom crevne mikrobiote (oba tretmana u trajanju od samo dva dana), a koji su sprovedeni tri dana nakon imunizacije, štiti miševе od razvoja EAE-a (Chitralla *i sar.*, 2017). Takav kratkotrajan a efikasan

tretman kod ljudi bi predstavljao revolucionarni napredak u terapiji. Naravno, efikasnost procedure bi trebalo proveriti u različitim modelima multiple skleroze pre primene kod ljudi.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj tezi pokazuju da se AO soj pacova koji je otporan na indukciju EAE-a i DA soj pacova koji je podložan indukciji EAE-a razlikuju u ćelijskom sastavu GALT-a, u produkciji citokina od strane ćelija GALT-a i u mikroorganizmima koji čine njihove crevne mikrobiote. Naši rezultati ukazuju da zapažene razlike imaju značajnu ulogu u ispitivanim sojevima pacova na indukciju EAE-a. Ovi rezultati mogu biti od značaja za razumevanje patogeneze multiple skleroze i podložnosti ovoj bolesti. Stoga su neophodna dalja istraživanja, kao što su funkcionalna disekcija specifičnosti GALT-a svakog od sojeva, kao i izolacija, propagacija i istraživanje imunomodulatornih osobina bakterija koje su povezane sa otpornošću na indukciju EAE-a. Naša ispitivanja doprinose stanovištu da crevna mikrobiota predstavlja bitan faktor u autoimunskim procesima u CNS-u. Takođe, ona potkrepljuju ideju da modulacija crevne mikrobiote može biti iskorišćena u terapiji multiple skleroze.

# **5. Zaključci**

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije, a na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata proizašli su sledeći zaključci:

- AO i DA pacovi se ne razlikuju po brojnosti ćelija mezenteričnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča ni u jednom od posmatranih termina.
- Soj pacova otporan na EAE ima manje CD4<sup>+</sup> T ćelija u GALT-u i ove ćelije proizvode manje IFN- $\gamma$  i IL-17 u poređenju sa sojem pacova koji je podložan indukciji EAE-a.
- Bakterije rodova *Turicibacter* i *Atopostipes* su prisutne isključivo u gastrointestinalnom traktu neimunizovanih pacova koji su otporni na indukciju EAE-a.
- Nakon imunizacije, udeo CD4<sup>+</sup> T ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima se smanjuje kod oba soja, dok se u Pejerovim pločama povećava kod DA pacova u piku bolesti.
- Proporcija CD8<sup>+</sup> T ćelija je smanjena u GALT-u i AO i DA pacova u terminu koji odgovara piku EAE-a kod DA pacova (13-15 d.p.i.).
- Produkcija IFN- $\gamma$  u GALT-u DA pacova opada nakon imunizacije, za razliku od IL-17 čija se produkcija ne menja značajno. Produkcija proinflamacijskih citokina se ne menja u GALT-u AO pacova sa imunizacijom.
- Kod neimunizovanih životinja procenat Treg u mezenteričnim limfnim čvorovima je veći kod DA pacova nego kod AO pacova, a u induktivnoj fazi EAE udeo Treg se smanjuje u oba soja, da bi se ponovo povećao u piku bolesti. U Pejerovim pločama nema razlike između sojeva u zastupljenosti Treg, ni pre a ni posle imunizacije, s tim da dolazi do povećanja u piku bolesti i kod AO i kod DA pacova.
- Produkcija IL-10 od strane ćelija mezenteričnih limfnih čvorova je veća kod DA pacova, pre imunizacije, ali i u induktivnoj fazi (šesti d.p.i.) i u piku (13-16 d.p.i.). U Pejerovim pločama dolazi do smanjene produkcije IL-10 nakon imunizacije kod DA pacova, da bi se u piku bolesti vratila na bazalni nivo.
- Kod neimunizovanih AO pacova je veća zastupljenost *Lactobacillus* spp. nego kod DA pacova. Takođe je primećeno prisustvo vrste roda *Turicibacter* i

*Atopostipes* isključivo kod AO. Nakon imunizacije sastav crevne mikrobiote ova dva soja se i dalje razlikuje, s tim što se kod AO pacova uočava stabilnija mikrobiota, dok je kod DA veći diverzitet bakterijskih grupa, naročito u piku bolesti. Predstavnici familije *Lachnospiraceae* su identifikovani kao još jedna grupa bakterija koja bi mogla da bude odgovorna za modulaciju toka EAE-a.

- Modulacijom crevne mikrobiote AO pacova dolazi do narušavanja njihove otpornosti na EAE. U kičmenim moždinama se uočava povećan broj infiltrata, a u homogenatima kičmenih moždina viši nivo IL-17, dok je nivo IFN- $\gamma$  smanjen.
- Brojnost ćelija drenirajućih limfnih čvorova je znatno veća kod pacova tretiranih antibioticima u odnosu na netretirane, ali samo u ranoj induktivnoj fazi (četvrti d.p.i.). Za razliku od toga, brojnost ćelija u GALT-u se ne razlikuje između grupa ni u jednom posmatranom terminu.
- Zastupljenost CD4<sup>+</sup> T limfocita u ćelijama GALT-a je bez statistički značajne razlike između grupa, u svim posmatranim vremenskim tačkama.
- Ćelije drenirajućih limfnih čvorova AO pacova tretiranih antibioticima proizvode više IFN- $\gamma$  i IL-17, ali ne i IL-10. U ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova neimunizovanih životinja nema razlike u produkciji citokina, dok se na 7 d.p.i. produkcija IFN- $\gamma$  povećava kod tretiranih životinja, a promena u IL-17 i IL-10 nema.
- Kod životinja tretiranih antibioticima ima manje Treg u Pejerovim pločama, nego u Pejerovim pločama kontrolnih životinja pre imunizacije. Nakon imunizacije dolazi do smanjenja udela Treg u drenirajućim limfnim čvorovima (četvrtog d.p.i.), mezenteričnim limfnim čvorovima (četvrtog i sedmog d.p.i.) i Pejerovim pločama (četvrtog i 14 d.p.i.) usled primene antibiotika.
- Sastav mikrobiote AO pacova se značajno menja antibiotskim tretmanom. Promena je najuočljivija u četvrtoj nedelji života, kada je prekinuto davanje antibiotika. Promene su manje izražene u kasnijim nedeljama, što ukazuje da su promene u sastavu mikrobiote izazvane antibioticima prolazne.

- Nakon izvršenog transfera mikrobiote creva AO pacova u DA pacove dolazi do ublažavanja simptoma EAE-a kod DA pacova. Koncentracija IL-17 je smanjena u homogenatima kičmenih moždina pacova kojima je izvršen transfer, dok se koncentracija IFN- $\gamma$  ne razlikuje između tretirane i kontrolne grupe.
- Uočava se razlika u celularnosti drenirajućih limfnih čvorova između grupa, gde je transfer mikrobiote doveo do smanjenja brojnosti ćelija u induktivnoj fazi bolesti.
- Udeo Treg je veći u drenirajućim limfnim čvorovima i mezenteričnim limfnim čvorovima tretiranih životinja u svakom posmatranom vremenskom terminu.
- Transfer crevne mikrobiote iz AO u DA pacove je značajno izmenio diverzitet crevne mikrobiote tretiranih pacova. Naročito je izmenjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija u periodu od odvajanja od majki, da bi u vreme imunizacije došlo do smanjenja sličnosti između AO pacova i DA pacova kojima je izvršen transfer. U piku bolesti, sličnost ponovo raste, što je verovatno usled dejstva imunskih mehanizama na sastav mikrobiote.

Osnovna hipoteza ove doktorske disertacije je da se GALT i mikrobiota creva razlikuju kod sojeva pacova kod kojih postoji suprotnost u podložnosti na indukciju EAE-a, a da se modulacijom mikrobiote creva i sledstvenim promenama u sastavu i funkcionisanju GALT-a može prevazići otpornost AO pacova na EAE-a. Na osnovu dobijenih rezultata nedvosmisleno se može zaključiti da postoje razlike na nivou GALT-a i mikrobiote creva između AO pacova koji su otporni na indukciju EAE-a i DA pacova koji su podložni indukciji EAE-a. Osim toga, modulacija mikrobiote creva primenom antibiotika je dovela do narušavanja otpornosti AO pacova na EAE-a. Promene u crevnoj mikrobioti su praćene i promenama u CNS-u, drenirajućim limfnim čvorovima i GALT-u. Ovo neosporno ukazuje na značaj crevne mikrobiote u autoimunskim procesima u CNS-u. S druge strane je u eksperimentima u kojima je urađen transfer crevne mikrobiote AO pacova, koji su otporni na indukciju EAE-a, u DA pacove, koji su podložni indukciji EAE-a, pokazano da crevna mikrobiota može dovesti do ublažavanja simptoma EAE-a. Iz ovoga se može predložiti modulacija mikrobiote creva u terapiji multiple skleroze kao nov i obećavajući pristup.



# **7. Literatura**

- Adams, A. B., Williams, M. A., Jones, T. R., Shirasugi, N., Durham, M. M., Kaech, S. M., Wherry, E. J., Onami, T., Lanier, J. G., Kokko, K. E., Pearson, T. C., Ahmed, R. and Larsen, C. P. (2003) 'Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance', *Journal of Clinical Investigation*, 111(12), pp. 1887–1895. doi: 10.1172/JCI17477.
- Aharoni, R. (2013) 'New findings and old controversies in the research of multiple sclerosis and its model experimental autoimmune encephalomyelitis', *Expert Review of Clinical Immunology*, 9(5), pp. 423–440. doi: 10.1586/eci.13.21.
- Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamene, H., Ferrier, L., Houdeau, E., Fioramonti, J., Bueno, L. and Theodorou, V. (2012) 'Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats', *Psychoneuroendocrinology*, 37(11), pp. 1885–1895. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.03.024.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J. and Rudenski, A. Y. (2013) 'Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation', *Nature*, 504(7480), pp. 451–455. doi: 10.1038/nature12726.
- Ascherio, A. and Munger, K. (2008) 'Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention', *Seminars in Neurology*, 28(1), pp. 017–028. doi: 10.1055/s-2007-1019126.
- Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K. and Takeda, K. (2008) 'ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation', *Nature*. Nature Publishing Group, 455(7214), pp. 808–812. doi: 10.1038/nature07240.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Ollé, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M. and Honda, K. (2013) 'Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota', *Nature*, 500(7461), pp. 232–236. doi: 10.1038/nature12331.

- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K. and Honda, K. (2011) 'Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species', *Science*, 331(6015), pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469.
- Axtell, R. C., Raman, C. and Steinman, L. (2013) 'Type I Interferons: Beneficial in Th1 and Detrimental in Th17 Autoimmunity', *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 44(2), pp. 114–120. doi: 10.1007/s12016-011-8296-5.
- B.Ciric and A.Rostami (2013) 'Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination.', *Journal of Neurobiological Sciences*, (333), pp. 1-676–87. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening.
- Balashov, K. E., Comabella, M., Ohashi, T., Khoury, S. J. and Weiner, H. L. (2000) 'Defective regulation of IFN $\gamma$  and IL-12 by endogenous IL-10 in progressive MS.', *Neurology*, 55(2), pp. 192–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908889> (Accessed: 27 April 2018).
- Balmer, S. E., Hanvey, L. S. and Wharton, B. A. (1994) 'Diet and faecal flora in the newborn: nucleotides.', *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 70(2), pp. F137-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8154906> (Accessed: 28 April 2018).
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J. W., Klinkert, W. E. F., Flügel-Koch, C., Issekutz, T. B., Wekerle, H. and Flügel, A. (2009) 'Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions.', *Nature*, 462(November), pp. 94–98. doi: 10.1038/nature08478.
- Becher, B., Bechmann, I. and Greter, M. (2006) 'Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain', *Journal of Molecular Medicine*, 84(7), pp. 532–543. doi: 10.1007/s00109-006-0065-1.
- Bennel, R. and Nord, C. E. (1987) 'Development of the faecal anaerobic microflora after Caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants', *Infection*. Springer-Verlag, 15(5), pp. 332–336. doi: 10.1007/BF01647733.

- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P. L., Nehrenberg, D., Hua, K., Kachman, S. D., Moriyama, E. N., Walter, J., Peterson, D. A. and Pomp, D. (2010) 'Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(44), pp. 18933–8. doi: 10.1073/pnas.1007028107.
- Benveniste, E. N. (1997) 'Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 75(3), pp. 165–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106073> (Accessed: 27 April 2018).
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F. and Collins, S. M. (2011) 'The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice', *Gastroenterology*, 141(2), p. 599–609.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.052.
- Berer, K., Boziki, M. and Krishnamoorthy, G. (2014) 'Selective accumulation of pro-inflammatory T cells in the intestine contributes to the resistance to autoimmune demyelinating disease', *PLoS ONE*, 9(2), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0087876.
- Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S. E., Kümpfel, T., Hohlfeld, R., Krishnamoorthy, G. and Wekerle, H. (2017) 'Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), pp. 10719–10724. doi: 10.1073/pnas.1711233114.
- Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., Liu, C., Klotz, L., Stauffer, U., Baranzini, S. E., Kümpfel, T., Hohlfeld, R., Krishnamoorthy, G. and Wekerle, H. (2017) 'Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy

of Sciences, 114(40), pp. 10719–10724. doi: 10.1073/pnas.1711233114.

- Berer, K. and Krishnamoorthy, G. (2012) ‘Commensal gut flora and brain autoimmunity: A love or hate affair?’, *Acta Neuropathologica*. doi: 10.1007/s00401-012-0949-9.
- Berer, K. and Krishnamoorthy, G. (2014) ‘Microbial view of central nervous system autoimmunity’, *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.007.
- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z. A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H. and Krishnamoorthy, G. (2011) ‘Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination - with comments’, *Nature*. Nature Publishing Group, 479(7374), pp. 538–541. doi: 10.1038/nature10554.
- Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A. and Kuchroo, V. K. (1998) ‘IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(7), pp. 3299–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759845> (Accessed: 27 April 2018).
- Bhargava, P. and Mowry, E. M. (2014) ‘Gut Microbiome and Multiple Sclerosis’, *Current Neurology and Neuroscience Reports*. doi: 10.1007/s11910-014-0492-2.
- Bienenstock, J., Kunze, W. and Forsythe, P. (2015) ‘Microbiota and the gut–brain axis’, *Nutrition Reviews*, 73(suppl 1), pp. 28–31. doi: 10.1093/nutrit/nuv019.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T. and Brück, W. (2000) ‘Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation.’, *Brain : a journal of neurology*, 123 ( Pt 6), pp. 1174–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825356> (Accessed: 27 April 2018).
- Blaževski, J., Petković, F., Momčilović, M., Jevtic, B., Miljković, D. and Mostarica Stojković, M. (2013) ‘High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Immunobiology*, 218(9), pp. 1192–1199. doi: 10.1016/j.imbio.2013.04.004.

- Borody, T. J. and Campbell, J. (2012) ‘Fecal Microbiota Transplantation’, *Gastroenterology Clinics of North America*, 41(4), pp. 781–803. doi: 10.1016/j.gtc.2012.08.008.
- Borody, T. J. and Khoruts, A. (2012) ‘Fecal microbiota transplantation and emerging applications’, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(2), pp. 88–96. doi: 10.1038/nrgastro.2011.244.
- Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J. and Ratan, R. R. (2016) ‘Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health?’, *Neuroscience Letters*. Elsevier, 625, pp. 56–63. doi: 10.1016/J.NEULET.2016.02.009.
- Bove, R. and Chitnis, T. (2013) ‘Sexual disparities in the incidence and course of MS’, *Clinical Immunology*, 149(2), pp. 201–210. doi: 10.1016/j.clim.2013.03.005.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Kundu, P., Gulyas, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B. and Pettersson, S. (2014) ‘The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice’, *Science Translational Medicine*, 6(263). doi: 10.1126/scitranslmed.3009759.
- Budhram, A., Parvathy, S., Kremenutzky, M. and Silverman, M. (2017) ‘Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis’, *Multiple Sclerosis*, 23(5), pp. 628–636. doi: 10.1177/1352458516682105.
- Buettner, M. and Lochner, M. (2016) ‘Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon’, *Frontiers in Immunology*, 7(SEP), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2016.00342.
- Buhnik-Rosenblau, K., Danin-Poleg, Y. and Kashi, Y. (2011) ‘Predominant effect of host genetics on levels of *Lactobacillus johnsonii* bacteria in the mouse gut.’, *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 77(18), pp. 6531–8. doi: 10.1128/AEM.00324-11.
- Califano, D., Sweeney, K. J., Le, H., VanValkenburgh, J., Yager, E., O’Connor, W., Kennedy, J. S., Jones, D. M. and Avram, D. (2014) ‘Diverting T helper cell

trafficking through increased plasticity attenuates autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), pp. 174–187. doi: 10.1172/JCI70103.

Cañellas, A. R., Gols, A. R., Izquierdo, J. R., Subirana, M. T. and Gairin, X. M. (2007) 'Idiopathic inflammatory-demyelinating diseases of the central nervous system', *Neuroradiology*, 49(5), pp. 393–409. doi: 10.1007/s00234-007-0216-2.

Cantarel, B. L., Waubant, E., Chehoud, C., Kuczynski, J., DeSantis, T. Z., Warrington, J., Venkatesan, A., Fraser, C. M. and Mowry, E. M. (2015) 'Gut Microbiota in Multiple Sclerosis', *Journal of Investigative Medicine*, 63(5), pp. 729–734. doi: 10.1097/JIM.0000000000000192.

Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M. and Owen, L. J. (2015) 'Dysbiosis of the gut microbiota in disease.', *Microbial ecology in health and disease*. Taylor & Francis, 26, p. 26191. doi: 10.3402/MEHD.V26.26191.

Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Keku, T. O., Chang, Y.-H., Packey, C. D., Sartor, R. B. and Ringel, Y. (2011) 'Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(5), pp. G799–G807. doi: 10.1152/ajpgi.00154.2011.

Cekanaviciute, E., Yoo, B. B., Runia, T. F., Debelius, J. W., Singh, S., Nelson, C. A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y. K., Hauser, S. L., Crabtree-Hartman, E., Sand, I. K., Gacias, M., Zhu, Y., Casaccia, P., Cree, B. A. C., Knight, R., Mazmanian, S. K. and Baranzini, S. E. (2017) 'Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(40), pp. 10713–10718. doi: 10.1073/pnas.1711235114.

Chastain, E. M. L., Duncan, D. A. S., Rodgers, J. M. and Miller, S. D. (2012) 'NIH Public Access', 1812(2), pp. 265–274. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.008.The.

Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., Luckey, D. H., Marietta, E. V, Jeraldo, P. R., Chen, X., Weinshenker, B. G., Rodriguez, M.,

- Kantarci, O. H., Nelson, H., Murray, J. A. and Mangalam, A. K. (2016) 'Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls.', *Scientific reports*, 6. doi: 10.1038/srep28484.
- Chinda, D., Nakaji, S., Fukuda, S., Sakamoto, J., Shimoyama, T., Nakamura, T., Fujisawa, T., Terada, A. and Sugawara, K. (2004) 'The Fermentation of Different Dietary Fibers Is Associated with Fecal Clostridia Levels in Men', *The Journal of Nutrition*, 134(8), pp. 1881–1886. doi: 10.1093/jn/134.8.1881.
- Chitralla, K. N., Guan, H., Singh, N. P., Busbee, B., Gandy, A., Mehrpouya-Bahrami, P., Ganewatta, M. S., Tang, C., Chatterjee, S., Nagarkatti, P. and Nagarkatti, M. (2017) 'CD44 deletion leading to attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis results from alterations in gut microbiome in mice', *European Journal of Immunology*, 47(7), pp. 1188–1199. doi: 10.1002/eji.201646792.
- Chu, C. Q., Wittmer, S. and Dalton, D. K. (2000) 'Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis.', *The Journal of experimental medicine*, 192(1), pp. 123–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880533> (Accessed: 28 April 2018).
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E. and Salminen, S. (2016) 'Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 23129. doi: 10.1038/srep23129.
- Compston, A. and Coles, A. (2008) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 372(9648), pp. 1502–1517. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Collins, M. D. and Lawson, P. A. (2004) 'Atopostipes suicloacale gen. nov., sp. nov., isolated from an underground swine manure storage pit', *Anaerobe*. Academic Press, 10(3), pp. 191–195. doi: 10.1016/J.ANAEROBE.2004.04.001.
- Cotta, M. and Forster, R. (2006) 'The Family Lachnospiraceae, Including the Genera Butyrivibrio, Lachnospira and Roseburia', in *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, pp. 1002–1021. doi: 10.1007/0-387-30744-3\_35.



- Croxford, J. L., Olson, J. K. and Miller, S. D. (2002) 'Epitope spreading and molecular mimicry as triggers of autoimmunity in the Theiler's virus-induced demyelinating disease model of multiple sclerosis.', *Autoimmunity reviews*, 1(5), pp. 251–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848977> (Accessed: 27 April 2018).
- Cua, D. J., Groux, H., Hinton, D. R., Stohlman, S. A. and Coffman, R. L. (1999) 'Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis.', *The Journal of experimental medicine*, 189(6), pp. 1005–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075984> (Accessed: 27 April 2018).
- Dendrou, C. a., Fugger, L. and Friese, M. a. (2015) 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Immunology*, 15(9). doi: 10.1038/nri3871.
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahoi, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I. and Prinz, M. (2015) 'Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS.', *Nature neuroscience*, 18(7). doi: 10.1038/nn.4030.
- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A. E., Town, T., Wan, Y. Y., O'Connor, W., Rongvaux, A., Van Rooijen, N., Haberman, A. M., Iwakura, Y., Kuchroo, V. K., Kolls, J. K., Bluestone, J. A., Herold, K. C. and Flavell, R. A. (2011) 'Control of TH17 cells occurs in the small intestine', *Nature*. Nature Publishing Group, 475(7357), pp. 514–518. doi: 10.1038/nature10228.
- Evrensel, A. and Ceylan, M. E. (2016) 'Fecal Microbiota Transplantation and Its Usage in Neuropsychiatric Disorders.', *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 14(3), pp. 231–7. doi: 10.9758/cpn.2016.14.3.231.
- Ezendam, J., de Klerk, A., Gremmer, E. R. and van Loveren, H. (2008) 'Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents', *Clinical & Experimental Immunology*, 154(3),

pp. 424–431. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03788.x.

- Ezendam, J. and van Loveren, H. (2008) ‘Lactobacillus casei Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice’, *British Journal of Nutrition*, 99(1), pp. 83–90. doi: 10.1017/S0007114507803412.
- Falk, P. G., Hooper, L. V, Midtvedt, T. and Gordon, J. I. (1998) ‘Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology.’, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 62(4), pp. 1157–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841668> (Accessed: 28 April 2018).
- Farooqi, N., Gran, B. and Constantinescu, C. S. (2010) ‘Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis?’, *Journal of Neurochemistry*, 115(4), pp. 829–844. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06982.x.
- Farrokhi, V., Nemati, R., Nichols, F. C., Yao, X., Anstadt, E., Fujiwara, M., Grady, J., Wakefield, D., Castro, W., Donaldson, J. and Clark, R. B. (2013) ‘Bacterial lipopeptide, Lipid 654, is a microbiome-associated biomarker for multiple sclerosis’, *Clinical & Translational Immunology*. Wiley-Blackwell, 2(11), p. e8. doi: 10.1038/cti.2013.11.
- Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D. and Fathman, C. G. (1996) ‘Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(1), pp. 5–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598493> (Accessed: 28 April 2018).
- Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M. and Perry, V. H. (1997) ‘Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions.’, *Brain : a journal of neurology*, 120 ( Pt 3), pp. 393–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126051> (Accessed: 27 April 2018).
- Ferrer, M., Méndez-García, C., Rojo, D., Barbas, C. and Moya, A. (2017) ‘Antibiotic

use and microbiome function’, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 134, pp. 114–126. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.007.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O’Garra, A. (1991) ‘IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(11), pp. 3815–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1940369> (Accessed: 28 April 2018).

Fischer, S. G. and Lerman, L. S. (1979) ‘Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis.’, *Cell*, 16(1), pp. 191–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/369706> (Accessed: 5 May 2018).

Fleming, J., Isaak, A., Lee, J., Luzzio, C., Carrithers, M., Cook, T., Field, A., Boland, J. and Fabry, Z. (2011) ‘Probiotic helminth administration in relapsing–remitting multiple sclerosis: a phase 1 study’, *Multiple Sclerosis Journal*, 17(6), pp. 743–754. doi: 10.1177/1352458511398054.

Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. and Mills, K. H. G. (2010) ‘T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Clinical & Experimental Immunology*, 162(1), pp. 1–11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x.

Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H. and Wekerle, H. (2001) ‘Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis.’, *Immunity*, 14(5), pp. 547–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371357> (Accessed: 27 April 2018).

Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003) ‘Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells’, *Nature Immunology*, 4(4), pp. 330–336. doi: 10.1038/ni904.

Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. and Pace, N. R. (2007) ‘Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.’, *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(34), pp. 13780–5. doi: 10.1073/pnas.0706625104.

- Furtado, G. C., Marcondes, M. C. G., Latkowski, J.-A., Tsai, J., Wensky, A. and Lafaille, J. J. (2008) ‘Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(7), pp. 4648–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802067> (Accessed: 28 April 2018).
- Gold, R., Linington, C. and Lassmann, H. (2006) ‘Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research’, *Brain*, 129(8), pp. 1953–1971. doi: 10.1093/brain/awl075.
- Goldenberg, M. M. (2012) ‘Multiple sclerosis review.’, *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. MediMedia, USA, 37(3), pp. 175–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22605909> (Accessed: 16 April 2018).
- Gourraud, P.-A., Harbo, H. F., Hauser, S. L. and Baranzini, S. E. (2012) ‘The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review’, *Immunological Reviews*, 248(1), pp. 87–103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x.
- Grigoriadis, N., van Pesch, V. and ParadigMS Group (2015) ‘A basic overview of multiple sclerosis immunopathology’, *European Journal of Neurology*, 22, pp. 3–13. doi: 10.1111/ene.12798.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. (1996) ‘Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells.’, *The Journal of experimental medicine*, 184(1), pp. 19–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691133> (Accessed: 28 April 2018).
- Guo, B. (2016) ‘IL-10 Modulates Th17 Pathogenicity during Autoimmune Diseases.’, *Journal of clinical & cellular immunology*. NIH Public Access, 7(2). doi: 10.4172/2155-9899.1000400.
- Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W. P. and Schiffrin, E. J. (2000) ‘Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro:

evidence of NK cells as primary targets.’, *Infection and immunity*, 68(2), pp. 752–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639443> (Accessed: 28 April 2018).

Haller, D., Bode, C., Hammes, W. P., Pfeifer, A. M., Schiffrin, E. J. and Blum, S. (2000) ‘Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures.’, *Gut*, 47(1), pp. 79–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861268> (Accessed: 28 April 2018).

Hanahan, D. (1983) ‘Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids’, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 166(4), pp. 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.

Handel, A. E., Giovannoni, G., Ebers, G. C. and Ramagopalan, S. V. (2010) ‘Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis’, *Nature Reviews Neurology*, 6(3), pp. 156–166. doi: 10.1038/nrneurol.2010.1.

Hawker, K. (2011) ‘Progressive Multiple Sclerosis: Characteristics and Management’, *Neurologic Clinics*, 29(2), pp. 423–434. doi: 10.1016/j.ncl.2011.01.002.

Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D. L. and de Vos, W. M. (2002) ‘Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA.’, *Applied and environmental microbiology*, 68(1), pp. 114–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772617> (Accessed: 27 April 2018).

Hickey, W. F., Hsu, B. L. and Kimura, H. (1991) ‘T-lymphocyte entry into the central nervous system’, *Journal of Neuroscience Research*, 28(2), pp. 254–260. doi: 10.1002/jnr.490280213.

Hofstetter, H. H., Ibrahim, S. M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V. and Gold, R. (2005) ‘Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Cellular Immunology*, 237(2), pp. 123–130. doi: 10.1016/j.cellimm.2005.11.002.

Hori, S. and Sakaguchi, S. (2004) ‘Foxp3: a critical regulator of the development and

function of regulatory T cells’, *Microbes and Infection*, 6(8), pp. 745–751. doi: 10.1016/j.micinf.2004.02.020.

Hu, Y., Jin, P., Peng, J., Zhang, X., Wong, F. S. and Wen, L. (2016) ‘Different immunological responses to early-life antibiotic exposure affecting autoimmune diabetes development in NOD mice’, *Journal of Autoimmunity*, 72, pp. 47–56. doi: 10.1016/j.jaut.2016.05.001.

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H. J., Waisman, A. and Kuhlmann, C. R. W. (2010) ‘Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption’, *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology, 24(4), pp. 1023–1034. doi: 10.1096/fj.09-141978.

Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schifffrin, E. J. and von der Weid, T. (2003) ‘Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro.’, *Infection and immunity*, 71(1), pp. 428–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496193> (Accessed: 28 April 2018).

Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Lerner, A. C. and Finbloom, D. S. (1999) ‘Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1.’, *Blood*, 93(5), pp. 1456–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029571> (Accessed: 28 April 2018).

Ivanov, I. I., Diehl, G. E. and Littman, D. R. (2006) ‘Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity.’, *Current topics in microbiology and immunology*, 308, pp. 59–82. doi: 10.1007/3-540-30657-9\_3.

Iwakura, Y. and Ishigame, H. (2006) ‘The IL-23/IL-17 axis in inflammation’, *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1218–1222. doi: 10.1172/JCI28508.

Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M. A., Liu, S., Glanz, B. L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topçuoğlu, B. D., Holden, J., Kivisäkk, P., Chitnis, T., De Jager, P. L., Quintana, F. J., Gerber, G. K., Bry, L. and Weiner, H. L. (2016) ‘Alterations of

the human gut microbiome in multiple sclerosis.’, *Nature communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms12015.

Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J. M. (2008) ‘Is meconium from healthy newborns actually sterile?’, *Research in Microbiology*, 159(3), pp. 187–193. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.007.

Joscelyn, J. and Kasper, L. H. (2014) ‘Digesting the emerging role for the gut microbiome in central nervous system demyelination’, *Multiple Sclerosis Journal*, 20(12), pp. 1553–1559. doi: 10.1177/1352458514541579.

Jun, S., Gilmore, W., Callis, G., Rynda, A., Haddad, A. and Pascual, D. W. (2005) ‘A live diarrheal vaccine imprints a Th2 cell bias and acts as an anti-inflammatory vaccine.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(10), pp. 6733–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272329> (Accessed: 28 April 2018).

Jun, S., Ochoa-Repáraz, J., Zlotkowska, D., Hoyt, T. and Pascual, D. W. (2012) ‘Bystander-mediated stimulation of proteolipid protein-specific regulatory T (Treg) cells confers protection against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) via TGF- $\beta$ ’, *Journal of Neuroimmunology*, 245(1–2), pp. 39–47. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.003.

Jung, C., Hugot, J.-P. and Barreau, F. (2010) ‘Peyer’s Patches: The Immune Sensors of the Intestine.’, *International journal of inflammation*. Hindawi Limited, 2010, p. 823710. doi: 10.4061/2010/823710.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B. and Prat, A. (2007a) ‘Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation’, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B. and Prat, A. (2007b) ‘Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system

inflammation', *Nature Medicine*, 13(10), pp. 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651.

Kennedy, M. K., Torrance, D. S., Picha, K. S. and Mohler, K. M. (1992) 'Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(7), pp. 2496–505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527389> (Accessed: 27 April 2018).

Kister, I., Bacon, T. E., Chamot, E., Salter, A. R., Cutter, G. R., Kalina, J. T. and Herbert, J. (2013) 'Natural History of Multiple Sclerosis Symptoms', *International Journal of MS Care*, 15(3), pp. 146–156. doi: 10.7224/1537-2073.2012-053.

Kohm, A. P., Carpentier, P. A. and Miller, S. D. (2003) 'Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.', *Novartis Foundation symposium*, 252, pp. 45-52–4, 106–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609211> (Accessed: 28 April 2018).

Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M. and Lassmann, H. (2000) 'Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis', *The American Journal of Pathology*, 157(1), pp. 267–276. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64537-3.

Krakowski, M. and Owens, T. (1996) 'Interferon- $\gamma$  confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis', *European Journal of Immunology*, 26(7), pp. 1641–1646. doi: 10.1002/eji.1830260735.

Krishnamoorthy, G. and Wekerle, H. (2009) 'EAE: An immunologist's magic eye', *European Journal of Immunology*, 39(8), pp. 2031–2035. doi: 10.1002/eji.200939568.

Kuerten, S. and Lehmann, P. V. (2011) 'The Immune Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Lessons Learned for Multiple Sclerosis?', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(12), pp. 907–916. doi: 10.1089/jir.2011.0072.



- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Kurschus, F. (2015) 'T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms', *Biomedical Journal*, 38(3), p. 183. doi: 10.4103/2319-4170.155590.
- Kwon, H.-K., Kim, G.-C., Kim, Y., Hwang, W., Jash, A., Sahoo, A., Kim, J.-E., Nam, J. H. and Im, S.-H. (2013) 'Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by probiotic mixture is mediated by a shift in T helper cell immune response', *Clinical Immunology*, 146(3), pp. 217–227. doi: 10.1016/j.clim.2013.01.001.
- Larochelle, C., Alvarez, J. I. and Prat, A. (2011) 'How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?', *FEBS Letters*. Wiley-Blackwell, 585(23), pp. 3770–3780. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.066.
- Lassmann, H., Brück, W. and Lucchinetti, C. (2001) 'Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy.', *Trends in molecular medicine*, 7(3), pp. 115–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286782> (Accessed: 16 April 2018).
- Lassmann, H. and Horssen, J. Van (2011) 'The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 585(23), pp. 3715–3723. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.004.
- Lavasani, S., Dzhambazov, B., Nouri, M., Fåk, F., Buske, S., Molin, G., Thorlacius, H., Alenfall, J., Jeppsson, B. and Weström, B. (2010) 'A Novel Probiotic Mixture Exerts a Therapeutic Effect on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mediated by IL-10 Producing Regulatory T Cells', *PLoS ONE*. Edited by D. Unutmaz, 5(2), p. e9009. doi: 10.1371/journal.pone.0009009.
- Lee, Y. K. and Mazmanian, S. K. (2010) 'Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?', *Science*, 330(6012), pp. 1768–1773. doi: 10.1126/science.1195568.Has.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. and Mazmanian, S. K. (2011)

‘Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement\_1), pp. 4615–4622. doi: 10.1073/pnas.1000082107.

Leonel, A. J. and Alvarez-Leite, J. I. (2012) ‘Butyrate’, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(5), pp. 474–479. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835665fa.

Levast, B., Li, Z. and Madrenas, J. (2015) ‘The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance’, *Cytokine*, 75(2), pp. 291–301. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.027.

Li, M. O. and Flavell, R. A. (2008) ‘Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Interleukin-10’, *Immunity*, 28(4), pp. 468–476. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.003.

Libbey, J. E. and Fujinami, R. S. (2011) ‘Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines’, *Vaccine*, 29(17), pp. 3356–3362. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.103.

Liu, J., Xu, T., Zhu, W. and Mao, S. (2014) ‘High-grain feeding alters caecal bacterial microbiota composition and fermentation and results in caecal mucosal injury in goats’, *British Journal of Nutrition*, 112(3), pp. 416–427. doi: 10.1017/S0007114514000993.

Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R. and Weiner, H. L. (2016) ‘The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA’, *Cell Host and Microbe*, 19(1). doi: 10.1016/j.chom.2015.12.005.

Loma, I. and Heyman, R. (2011) ‘Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment’, *Current Neuropharmacology*, 9(3), pp. 409–416. doi: 10.2174/157015911796557911.

Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. and Knight, R. (2012) ‘Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota.’, *Nature*. NIH Public Access, 489(7415), pp. 220–30. doi: 10.1038/nature11550.

- Luchtman, D. W., Ellwardt, E., Larochele, C. and Zipp, F. (2014) 'IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments', *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd, 25(4), pp. 403–413. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.013.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L. and Begovic, J. (2013) 'Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with Rat Colonic Mucosa: Implications for Colitis Induction', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), pp. 5735–5744. doi: 10.1128/AEM.01807-13.
- Ma, X., Reynolds, S. L., Baker, B. J., Li, X., Benveniste, E. N. and Qin, H. (2010) 'IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 184(9), pp. 4898–906. doi: 10.4049/jimmunol.1000142.
- Markovic, M., Miljkovic, D., Momcilovic, M., Popadic, D., Miljkovic, Z., Savic, E., Ramic, Z. and Mostarica Stojkovic, M. (2009) 'Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with TH1 and TH17-inducing cytokine profiles', *Molecular Immunology*, 47(1), pp. 141–146. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.012.
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M. and Mackay, C. R. (2009) 'Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43', *Nature*, 461(7268), pp. 1282–1286. doi: 10.1038/nature08530.
- Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P., Zhang, Q. J., Masucci, M. G. and Kiessling, R. (1994) 'Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 180(6), pp. 2371–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964510> (Accessed: 28 April 2018).
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Özenci, V., Fredrikson, S. and Link, H. (1999) 'Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear

cells is augmented in multiple sclerosis’, *Multiple Sclerosis Journal*, 5(2), pp. 101–104. doi: 10.1177/135245859900500206.

Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. and Weaver, C. T. (2012) ‘Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system’, *Nature*, 489(7415), pp. 231–241. doi: 10.1038/nature11551.

Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. and Weaver, C. T. (2012) ‘Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system.’, *Nature*, 489(7415), pp. 231–41. doi: 10.1038/nature11551.

McDonald, W. I. and Sears, T. A. (1970) ‘The effects of experimental demyelination on conduction in the central nervous system.’, *Brain : a journal of neurology*, 93(3), pp. 583–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4319185> (Accessed: 24 April 2018).

Mestas, J. and Hughes, C. C. W. (2004) ‘Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), pp. 2731–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978070> (Accessed: 27 April 2018).

Mielcarz, D. W. and Kasper, L. H. (2015) ‘The Gut Microbiome in Multiple Sclerosis’, *Current Treatment Options in Neurology*, 17(4). doi: 10.1007/s11940-015-0344-7.

Miljković, D., Momčilović, M., Stanojević, Ž., Rašić, D. and Mostarica-Stojković, M. (2011) ‘It is still not for the old iron: adjuvant effects of carbonyl iron in experimental autoimmune encephalomyelitis induction’, *Journal of Neurochemistry*, 118(2), pp. 205–214. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07303.x.

Miljković, D. and Spasojević, I. (2013) ‘Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities’, *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(18), pp. 2286–2334. doi: 10.1089/ars.2012.5068.

Miljković, D., Stanojević, Ž., Momčilović, M., Odoardi, F., Flügel, A. and Mostarica-Stojković, M. (2011) ‘CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford

rats', *Immunobiology*, 216(9), pp. 979–987. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.013.

Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Markovic, M., Momcilovic, M., Ramic, Z., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Popadic, D., Cvetkovic, I. and Mostarica-Stojkovic, M. (2006) 'Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide', *Journal of Neuroscience Research*, 84(2), pp. 379–388. doi: 10.1002/jnr.20883.

Miller, D. H., Chard, D. T. and Ciccarelli, O. (2012) 'Clinically isolated syndromes', *The Lancet Neurology*, 11(2), pp. 157–169. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70274-5.

Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S. W., Morita, H., Hattori, M. and Yamamura, T. (2015) 'Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters', *PLoS ONE*, 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0137429.

Molloy, M. J., Bouladoux, N. and Belkaid, Y. (2012) 'Intestinal microbiota: Shaping local and systemic immune responses', *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd, 24(1), pp. 58–66. doi: 10.1016/j.smim.2011.11.008.

Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z. and Dominguez-Bello, M. G. (2015) 'The infant microbiome development: Mom matters', *Trends in Molecular Medicine*. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.002.

Newland, P. K., Heitkemper, M. and Zhou, Y. (2016) 'The Emerging Role of the Gut Microbiome in Adult Patients With Multiple Sclerosis.', *The Journal of neuroscience nursing: journal of the American Association of Neuroscience Nurses*, 48(6), pp. 358–364. doi: 10.1097/JNN.0000000000000252.

Nicol, B., Salou, M., Laplaud, D. A. and Wekerle, H. (2015) 'The autoimmune concept of multiple sclerosis', *Presse Medicale*. Elsevier Masson SAS, 44(4), pp. e103–e112. doi: 10.1016/j.lpm.2015.02.009.

O'Connor, R. A., Prendergast, C. T., Sabatos, C. A., Lau, C. W. Z., Leech, M. D.,

- Wraith, D. C. and Anderton, S. M. (2008) ‘Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), pp. 3750–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768826> (Accessed: 28 April 2018).
- O’Toole, P. W. and Claesson, M. J. (2010) ‘Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly’, *International Dairy Journal*. Elsevier, 20(4), pp. 281–291. doi: 10.1016/J.IDAIRYJ.2009.11.010.
- Ochoa-Repáraz, J. and Kasper, L. H. (2014) ‘Gut microbiome and the risk factors in central nervous system autoimmunity’, *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.024.
- Ochoa-Repáraz, J. and Kasper, L. H. (2014) ‘Gut microbiome and the risk factors in central nervous system autoimmunity’, *FEBS Letters*, 588(22), pp. 4214–4222. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.024.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Begum- Haque, S. and Kasper, L. H. (2011) ‘Gut, bugs, and brain: Role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease’, *Annals of Neurology*, 69(2), pp. 240–247. doi: 10.1002/ana.22344.
- Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Foureau, D. M., Haque-Begum, S. and Kasper, L. H. (2009) ‘Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis’, *Journal of Immunology*, 183(10), pp. 6041–6050. doi: 10.4049/jimmunol.0900747.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Haque-Begum, S. and Kasper, L. H. (2010) ‘Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora’, *Gut Microbes*, 1(2), pp. 103–108. doi: 10.4161/gmic.1.2.11515.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D. L. and Kasper, L. H. (2010) ‘A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease’, *Mucosal Immunology*, 3(5), pp. 487–495. doi: 10.1038/mi.2010.29.

- Ochoa-Repáraz, J., Riccardi, C., Rynda, A., Jun, S., Callis, G. and Pascual, D. W. (2007) 'Regulatory T cell vaccination without autoantigen protects against experimental autoimmune encephalomyelitis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(3), pp. 1791–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237429> (Accessed: 28 April 2018).
- Palle, P., Monaghan, K. L., Milne, S. M. and Wan, E. C. K. (2017) 'Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications', *Medical Sciences*, 5(4), p. 23. doi: 10.3390/medsci5040023.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. and Brown, P. O. (2007) 'Development of the Human Infant Intestinal Microbiota', *PLoS Biology*. Edited by Y. Ruan, 5(7), p. e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.
- Peña, J. A., Li, S. Y., Wilson, P. H., Thibodeau, S. A., Szary, A. J. and Versalovic, J. (2004) 'Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 70(1), pp. 558–68. doi: 10.1128/AEM.70.1.558-568.2004.
- Perdew, G. H. and Babbs, C. F. (1991) 'Production of *ah* receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol', *Nutrition and Cancer*. Taylor & Francis Group, 16(3–4), pp. 209–218. doi: 10.1080/01635589109514159.
- Peris-Bondia, F., Latorre, A., Artacho, A., Moya, A. and D'Auria, G. (2011) 'The Active Human Gut Microbiota Differs from the Total Microbiota', *PLoS ONE*. Edited by M. M. Heimesaat. Public Library of Science, 6(7), p. e22448. doi: 10.1371/journal.pone.0022448.
- Petermann, F. and Korn, T. (2011) 'Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 585(23), pp. 3747–3757. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.064.
- Pierson, E., Simmons, S. B., Castelli, L. and Goverman, J. M. (2012) 'Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity.', *Immunological reviews*. NIH Public Access, 248(1), pp. 205–15. doi:

10.1111/j.1600-065X.2012.01126.x.

- Presley, L. L., Wei, B., Braun, J. and Borneman, J. (2010) 'Bacteria Associated with Immunoregulatory Cells in Mice', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), pp. 936–941. doi: 10.1128/AEM.01561-09.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D., Wang, J., Blottiere, H., Borruel, N., Bruls, T., Casellas, F., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Forte, M., Friss, C., Guchte, M. van de, Guedon, E., Haimet, F., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Kleerebezem, M., Knol, J., Kristensen, M., Layec, S., Roux, K. Le, Leclerc, M., Maguin, E., Minardi, R. M., Oozeer, R., Rescigno, M., Sanchez, N., Tims, S., Torrejon, T., Varela, E., Vos, W. de, Winogradsky, Y., Zoetendal, E., Bork, P., Ehrlich, S. D. and Wang, J. (2010) 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7285), pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qinghui, M., Husen, Z. and Xin, M. L. (2015) 'SLE: Another Autoimmune Disorder Influenced by Microbes and Diet?', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 6, p. 608. doi: 10.3389/fimmu.2015.00608.
- Quigley, E. M. M. (2013) 'Gut bacteria in health and disease.', *Gastroenterology & hepatology*. Millenium Medical Publishing, 9(9), pp. 560–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729765> (Accessed: 28 April 2018).
- Reeves, A. E., Theriot, C. M., Bergin, I. L., Huffnagle, G. B., Schloss, P. D. and Young, V. B. (no date) 'The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of Clostridium difficile Infection.', *Gut microbes*, 2(3), pp. 145–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804357>



(Accessed: 27 April 2018).

- Rie Gaboriau-Routhiau, V., Lé, E. and Cerf-Bensussan, N. (no date) 'Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses'. doi: 10.1097/MOG.0b013e32834bb82b.
- Rohrer, J. W., Coggin, J. H., Vries, J. E. de and Roncarolo, M.-G. (1995) 'CD8 T cell clones inhibit antitumor T cell function by secreting IL-10.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, American Association of Immunologists, 155(12), pp. 5719–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499859> (Accessed: 28 April 2018).
- Rott, O., Fleischer, B. and Cash, E. (1994) 'Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats', *European Journal of Immunology*, 24(6), pp. 1434–1440. doi: 10.1002/eji.1830240629.
- Sadovnick, A. D. and Baird, P. A. (1982) 'Sex Ratio in Offspring of Patients with Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 306(18), pp. 1114–1115. doi: 10.1056/NEJM198205063061821.
- SÄEMANN, M. D., BÖHMIG, G. A., ÖSTERREICHER, C. H., BURTSCHER, H., PAROLINI, O., DIAKOS, C., STÖCKL, J., HÖRL, W. H. and ZLABINGER, G. J. (2000) 'Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production', *The FASEB Journal*, 14(15), pp. 2380–2382. doi: 10.1096/fj.00-0359fje.
- Sandler, R. H., Finegold, S. M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P., Väisänen, M.-L., Nelson, M. N. and Wexler, H. M. (2000) 'Short-Term Benefit From Oral Vancomycin Treatment of Regressive-Onset Autism', *Journal of Child Neurology*, 15(7), pp. 429–435. doi: 10.1177/088307380001500701.
- Santos, L. M. B., Al-Sabbagh, A., Londono, A. and Weiner, H. L. (1994) 'Oral Tolerance to Myelin Basic Protein Induces Regulatory TGF- $\beta$ -Secreting T Cells in Peyer's Patches of SJL Mice', *Cellular Immunology*, 157(2), pp. 439–447. doi: 10.1006/cimm.1994.1240.
- Shin, T., Ahn, M. and Matsumoto, Y. (2012) 'Mechanism of experimental autoimmune

encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages.’, *Anatomy & cell biology*. Korean Association of Anatomists, 45(3), pp. 141–8. doi: 10.5115/acb.2012.45.3.141.

Shouval, D. S., Biswas, A., Goettel, J. A., McCann, K., Conaway, E., Redhu, N. S., Mascanfroni, I. D., Al Adham, Z., Lavoie, S., Ibourk, M., Nguyen, D. D., Samsom, J. N., Escher, J. C., Somech, R., Weiss, B., Beier, R., Conklin, L. S., Ebens, C. L., Santos, F. G. M. S., Ferreira, A. R., Sherlock, M., Bhan, A. K., Müller, W., Mora, J. R., Quintana, F. J., Klein, C., Muise, A. M., Horwitz, B. H. and Snapper, S. B. (2014) ‘Interleukin-10 Receptor Signaling in Innate Immune Cells Regulates Mucosal Immune Tolerance and Anti-Inflammatory Macrophage Function’, *Immunity*, 40(5), pp. 706–719. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.011.

Siffrin, V., Vogt, J., Radbruch, H., Nitsch, R. and Zipp, F. (2010) ‘Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy.’, *Trends in neurosciences*. Elsevier, 33(4), pp. 202–10. doi: 10.1016/j.tins.2010.01.002.

Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y. and Goverman, J. M. (2013) ‘Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals.’, *Trends in immunology*. NIH Public Access, 34(8), pp. 410–22. doi: 10.1016/j.it.2013.04.006.

Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N. and Garrett, W. S. (2013) ‘The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis’, *Science*, 341(6145), pp. 569–573. doi: 10.1126/science.1241165.

Sobottka, B., Harrer, M. D., Ziegler, U., Fischer, K., Wiendl, H., Hünig, T., Becher, B. and Goebels, N. (2009) ‘Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss.’, *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 175(3), pp. 1160–6. doi: 10.2353/ajpath.2009.090340.

Sommer, F., Adam, N., Johansson, M. E. V, Xia, L., Hansson, G. C. and Bäckhed, F. (2014) ‘Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture.’, *PloS one*. Edited by Y. Sanz, 9(1), p. e85254. doi: 10.1371/journal.pone.0085254.

- Song, F., Wardrop, R. M., Gienapp, I. E., Stuckman, S. S., Meyer, A. L., Shawler, T. and Whitacre, C. C. (2008) 'The Peyer's patch is a critical immunoregulatory site for mucosal tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)', *Journal of Autoimmunity*, 30(4), pp. 230–237. doi: 10.1016/j.jaut.2007.10.002.
- Sosa, R. A. and Forsthuber, T. G. (2011) 'The Critical Role of Antigen-Presentation-Induced Cytokine Crosstalk in the Central Nervous System in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(10), pp. 753–768. doi: 10.1089/jir.2011.0052.
- Sospedra, M. and Martin, R. (2005) 'Immunology of Multiple Sclerosis \*', *Annu. Rev. Immunol*, 23, pp. 683–747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
- Souza-Moreira, L., Morell, M., Delgado-Maroto, V., Pedreno, M., Martinez-Escudero, L., Caro, M., O'Valle, F., Luque, R., Gallo, M., de Lecea, L., Castano, J. P. and Gonzalez-Rey, E. (2013) 'Paradoxical Effect of Cortistatin Treatment and Its Deficiency on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*, 191(5), pp. 2144–2154. doi: 10.4049/jimmunol.1300384.
- St Charles, J. L., Bell, J. A., Gadsden, B. J., Malik, A., Cooke, H., Van de Grift, L. K., Kim, H. Y., Smith, E. J. and Mansfield, L. S. (2017) 'Guillain Barré Syndrome is induced in Non-Obese Diabetic (NOD) mice following *Campylobacter jejuni* infection and is exacerbated by antibiotics', *Journal of Autoimmunity*, 77, pp. 11–38. doi: 10.1016/j.jaut.2016.09.003.
- Steinman, L. (1999) 'Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy.', *Neuron*, 24(3), pp. 511–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10595504> (Accessed: 28 April 2018).
- Steinman, L. and Zamvil, S. S. (2005) 'Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis', *Trends in Immunology*, 26(11), pp. 565–571. doi: 10.1016/j.it.2005.08.014.
- Stosic-Grujicic, S., Ramic, Z., Bumbasirevic, V., Harhaji, L. and Mostarica-Stojkovic, M. (2004) 'Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant', *Clinical and Experimental Immunology*, 136(1), pp. 49–55. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02418.x.

- Stromnes, I. M. and Goverman, J. M. (2006) 'Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1952–1960. doi: 10.1038/nprot.2006.284.
- Suchodolski, J. S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K. and Toresson, L. (2012) 'The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease', *PLoS ONE*. Edited by M. M. Heimesaat, 7(12), p. e51907. doi: 10.1371/journal.pone.0051907.
- Sun, J., Furio, L., Mecheri, R., van der Does, A. M., Lundeberg, E., Saveanu, L., Chen, Y., van Endert, P., Agerberth, B. and Diana, J. (2015) 'Pancreatic  $\beta$ -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota', *Immunity*, 43(2), pp. 304–317. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.013.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L. P. and Lochs, H. (2005) 'Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 43(7), pp. 3380–9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005.
- Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T., Honorat, J. A., Sugimoto, T., Kumanogoh, A., Kayama, H., Takeda, K., Sakoda, S. and Nakatsuji, Y. (2011) 'The Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* Suppresses Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing IL-10-Producing Regulatory T Cells', *PLoS ONE*. Edited by H. M. Ashour, 6(11), p. e27644. doi: 10.1371/journal.pone.0027644.
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Bonneure-Mallet, M. and Jolivet-Gougeon, A. (2017) '*Roseburia* spp.: a marker of health?', *Future Microbiology*, 12(2), pp. 157–170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130.
- Tanaka, M., Tanaka, K. and Komori, M. (2009) 'Interferon-beta(1b) treatment in neuromyelitis optica.', *European neurology*, 62(3), pp. 167–70. doi: 10.1159/000227277.

- Targoni, O. S., Baus, J., Hofstetter, H. H., Hesse, M. D., Karulin, A. Y., Boehm, B. O., Forsthuber, T. G. and Lehmann, P. V (2001) 'Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(7), pp. 4757–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254738> (Accessed: 27 April 2018).
- Telesford, K. M., Yan, W., Ochoa-Reparaz, J., Pant, A., Kircher, C., Christy, M. A., Begum-Haque, S., Kasper, D. L. and Kasper, L. H. (2015) 'A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells and T<sub>reg</sub> function', *Gut Microbes*, 6(4), pp. 234–242. doi: 10.1080/19490976.2015.1056973.
- Telesford, K., Ochoa-Repáraz, J. and Kasper, L. H. (2014) 'Gut Commensalism, Cytokines, and Central Nervous System Demyelination', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(8), pp. 605–614. doi: 10.1089/jir.2013.0134.
- Trajkovic, V., Stosic-Grujicic, S., Samardzic, T., Markovic, M., Miljkovic, D., Ramic, Z. and Mostarica Stojkovic, M. (2001) 'Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes.', *Journal of neuroimmunology*. Elsevier, 119(2), pp. 183–91. doi: 10.1016/S0165-5728(01)00391-5.
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mörk, S. and Bö, L. (1998) 'Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 338(5), pp. 278–285. doi: 10.1056/NEJM199801293380502.
- Tremlett, H., Fadrosch, D. W., Faruqi, A. A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., Graves, J., Lynch, S., Waubant, E. and US Network of Pediatric MS Centers (2016) 'Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case–control study', *European Journal of Neurology*, 23(8), pp. 1308–1321. doi: 10.1111/ene.13026.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M. and Fugger, L. (2008) 'Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis', *The American Journal of Pathology*, 172(1), pp. 146–155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690.

- Uzelac, G., Miljkovic, M., Lozo, J., Radulovic, Z., Tosic, N. and Kojic, M. (2015) 'Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator', *Microbiological Research*, 179, pp. 45–53. doi: 10.1016/j.micres.2015.06.011.
- Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M. and Stefansson, K. (1995) 'Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis.', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(7), pp. 732–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612196> (Accessed: 27 April 2018).
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C. and Stockinger, B. (2008) 'The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins', *Nature*, 453(7191), pp. 106–109. doi: 10.1038/nature06881.
- Vukmanović, S., Mostarica-Stojković, M., Zalud, I., Ramić, Z. and Lukić, M. L. (1990) 'Analysis of T cell subsets after induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in susceptible and resistant strains of rats.', *Journal of neuroimmunology*, 27(1), pp. 63–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2318958> (Accessed: 27 April 2018).
- Vukmanović, S., Mostarica Stojković, M. and Lukić, M. L. (1989) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis in "low" and "high" interleukin 2 producer rats. I. Cellular basis of induction.', *Cellular immunology*, 121(2), pp. 237–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786757> (Accessed: 27 April 2018).
- Vukmanović, S., Mostarica-stojković, M., Zalud, I. and Rami, Z. (1990) 'Analysis of T cell subsets after induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in susceptible and resistant strains of rats', 27, pp. 63–69.
- Wang, Y., Begum-Haque, S., Telesford, K. M., Ochoa-Repáraz, J., Christy, M., Kasper, E. J., Kasper, D. L., Robson, S. C. and Kasper, L. H. (2014) 'A commensal bacterial product elicits and modulates migratory capacity of CD39<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T regulatory subsets in the suppression of neuroinflammation', *Gut Microbes*, 5(4), pp. 552–561. doi: 10.4161/gmic.29797.
- Wang, Y. and Kasper, L. H. (2014) 'The role of microbiome in central nervous system

disorders’, *Brain, Behavior, and Immunity*. doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.015.

- Weiner, H. L. (2009) ‘The challenge of multiple sclerosis: How do we cure a chronic heterogeneous disease?’, *Annals of Neurology*, 65(3), pp. 239–248. doi: 10.1002/ana.21640.
- Wekerle, H. (2015) ‘Nature plus nurture: the triggering of multiple sclerosis.’, *Swiss medical weekly*, 145(October). doi: 10.4414/smww.2015.14189.
- Werner, T., Wagner, S. J., Martinez, I., Walter, J., Chang, J.-S., Clavel, T., Kisling, S., Schuemann, K. and Haller, D. (2011) ‘Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn’s disease-like ileitis’, *Gut*, 60(3), pp. 325–333. doi: 10.1136/gut.2010.216929.
- Xu, M. Q., Cao, H. L., Wang, W. Q., Wang, S., Cao, X. C., Yan, F. and Wang, B. M. (2015) ‘Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders’, *World Journal of Gastroenterology*, 21(1). doi: 10.3748/wjg.v21.i1.102.
- Yokote, H., Miyake, S., Croxford, J. L., Oki, S., Mizusawa, H. and Yamamura, T. (2008) ‘NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora’, *The American Journal of Pathology*, 173(6), pp. 1714–1723. doi: 10.2353/ajpath.2008.080622.
- Zanvit, P., Konkel, J. E., Jiao, X., Kasagi, S., Zhang, D., Wu, R., Chia, C., Ajami, N. J., Smith, D. P., Petrosino, J. F., Abbatiello, B., Nakatsukasa, H., Chen, Q., Belkaid, Y., Chen, Z.-J. and Chen, W. (2015) ‘Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 8424. doi: 10.1038/ncomms9424.
- Zhong, Y., Nyman, M. and Fåk, F. (2015) ‘Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt’, *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(10), pp. 2066–2076. doi: 10.1002/mnfr.201500187.
- Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K.-W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Müller, W. and Jung, S. (2014)

‘Macrophage-Restricted Interleukin-10 Receptor Deficiency, but Not IL-10 Deficiency, Causes Severe Spontaneous Colitis’, *Immunity*, 40(5), pp. 720–733. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.012.

Countries with the highest prevalence rates of multiple sclerosis as of 2015 (per 100,000 people) (2015). Retrived from <https://www.statista.com/statistics/372361/prevalence-rate-of-ms-in-select-countries/>



## BIOGRAFIJA AUTORA

Suzana Stanisavljević je rođena 4. novembra 1989. godine u Požarevcu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2008/2009. godine, studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija i isti završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 7,91. Master studije na smeru Imunobiologija, upisane školske 2013/2014. godine na Biološkom fakultetu univerziteta u Beogradu završila je 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,83. Master rad pod naslovom: „Imunomodulatorni efekat etil pirogroždane kiseline na BV-2 ćelije mikroglije“, pod mentorstvom dr Đorđa Miljkovića, odbranila je sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisala 2014/2015. godine, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,82.

Suzana se 2016. godine zaposlila kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI173035) pod rukovodstvom dr Đorđa Miljkovića. Od momenta diplomiranja do zasnivanja radnog odnosa volontirala je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Zvanje istraživač-saradnik stiče februara 2017. godine. Suzana Stanisavljević je do sada učestvovala kao autor/koautor na jedanaest radova u međunarodnim časopisima, ima dva saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i tri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja.

Član je Društva imunologa Srbije, Društva za neuronauke Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, a ovim putem i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS), Federacije evropskih neuronaučnih društava (Federation of European Neuroscience Societies, FENS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Suzana Stanisavljević je učestvovala u organizaciji i realizaciji projekta promocije imunologije u Srbiji, u sklopu proslave svetskog dana imunologije (29.04.2016.), na poziv IUIS (International Union of Immunological Societies), a na temu: „Imunoterapija“. Kampanja je nagrađena od strane IUIS kao kampanja sa najboljom temom.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Сузана Станисављевић

број индекса Б3014/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса»

- 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, 04.05.2018.

---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сузана Станисављевић

Број индекса Б3014/2014

Студијски програм Биологија- имунобиологија

Наслов рада «Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса»

Ментор др Ђорђе Миљковић

Потписани/а \_\_\_\_\_

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, 04.05.2018.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

«Улога микробиоте и лимфног ткива црева у отпорности пацова соја Албино Оксфорд на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса»

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, 04.05.2018.

---

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

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

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

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

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

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