

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana D. Mitić

**MODULACIJA EKSPERIMENTALNOG
AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA
PRIMENOM EKSKRETORNO-
SEKRETORNIH ANTIGENA PARAZITA
*TRICHINELLA SPIRALIS***

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Ivana D. Mitic

**MODULATION OF EXPERIMENTAL
AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS
WITH *TRICHINELLA SPIRALIS*-DERIVED
EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

Prof. dr Miloš Marković

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Dr Nataša Ilić

Viši naučni saradnik Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Prof. dr Dušan Popadić

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević

Naučni savetnik Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dragana Vučević

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Izučavanje imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti” (br.173047), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod rukovodstvom N. Sav. dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević.

Iskreno se zahvaljujem:

Dr Nataši Ilić na velikoj pomoći, nesebičnom prenošenju znanja, stručnim savetima, idejama, strpljenju i razumevanju koji su mi bili podrška i ohrabrenje tokom svih godina mog istraživačkog rada i tokom izrade doktorske disertacije.

Dr Ljiljani Sofronić-Milosavljević na ukazanom poverenju i podršci, na prenetom znanju iz njene bogate naučne karijere, na nepresušnoj energiji i želji za novim znanjima koju inspiriše svojim radom i pristupom nauci.

Dr Alisi Gruden-Movsesijan na ohrabrenju, podršci, savetima i nesebičnoj velikoj pomoći u sticanju iskustva u naučnom radu.

Prof. dr Milošu Markoviću na korisnim savetima i sugestijama koje su upotpunile ovu tezu, na usmeravanju, podršci i razumevanju.

Prof. dr Dušanu Popadiću i prof. dr Dragani Vučević na korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove teze.

Najbližim kolegama Jeleni, Saši, Mariji, Blaži, Dudi i Sanji na podršci i pomoći u istraživačkom radu, kao i na druženjima uz jutarnju kafu koja svaki početak radnog dana učine lepšim.

Ostalim kolegama u INEP-u koji su na bilo koji način pomogli i podržali izradu ove doktorske disertacije.

Na kraju, ali uvek na prvom mestu, mojim roditeljima, suprugu Ninoslavu i kćerki Vanji na bezgraničnoj ljubavi, razumevanju i безусловnoj podršci. Vi dajete smisao svemu što radim jer ste moj život i najveća radost!

Modulacija eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita *Trichinella spiralis*

SAŽETAK

Savremena istraživanja na eksperimentalnim modelima autoimunskih bolesti ukazuju da infekcija helmintom *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*), inhibira nastanak ili ublažava simptome autoimunskih poremećaja kao što su eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), eksperimentalni kolitis i dijabetes melitus tip 1. Tokom infekcije parazitom *T. spiralis* ekskretorno-sekretorni metabolički produkti mišićnih larvi (ES L1) su ključni za interakciju sa organizmom domaćina. Stoga je pretpostavka da su upravo ES L1 produkti odgovorni za modulaciju toka autoimunskih oboljenja. Međutim, tačna uloga ES L1 antigena ovog parazita u modulaciji bolesti, kao i mehanizmi te modulacije nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni. Predmet ovog istraživanja bilo je ispitivanje uticaja direktne primene ES L1 produkata kao i dendritskih ćelija (DC) stimulisanih ovim antigenima na tok i modulaciju EAE-a kod DA pacova, sa ciljem da se utvrde mehanizmi imunomodulacije kao i uloga dendritskih ćelija u njima.

Ovde prikazani rezultati, dobijeni u *in vitro* studijama na modelu DC izolovanih iz kostne srži DA pacova, potvrdili su da ES antigeni *T. spiralis* dovode do delimičnog sazrevanja DC koje se mogu označiti kao tolerogene DC koje se odlikuju niskom produkcijom pro-inflamatornog citokina IL-12p70 i povećanom produkcijom anti-inflamatornog citokina IL-10. U ovom radu prvi put je ustanovljeno da primena DC stimulisanih ES L1 antigenima *T. spiralis* (DC/ES L1) ima inhibitorni efekat na razvoj EAE-a kod DA pacova kao i da je ovaj efekat dozno zavisian. Najveći uticaj na smanjenje težine bolesti ostvaren je primenom doze od 5×10^6 DC/ES L1. Mehanizam koji je u osnovi ovog fenomena zasniva se na polarizaciji imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa praćenog povećanom produkcijom Th2 i anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10 i TGF- β), a smanjenom produkcijom pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17. Takođe, dolazi do povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-limfocita (Treg) na sistemskom nivou u slezini i na nivou ciljnog organa, u CNS-u.

Takođe, po prvi put je pokazano da direktno davanje različitih doza izolovanih ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima u različitim terminima pre indukcije bolesti može dovesti do modulacije EAE-a. Najveći efekat ostvaren je primenom doze od 250 µg koja je data u dva termina, 14. i 7. dana pre indukcije bolesti, i to u smislu odlaganja početka bolesti, suprimiranja razvoja kliničkih znakova i skraćenja trajanja bolesti. Primena ES L1 antigena indukovala je ubedljiv Th2 odgovor na sistemskom i lokalnom nivou, kao i anti-inflamatorni odgovor na nivou ciljnog tkiva, uz smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, bez značajnog uticaja na promenu produkcije anti-inflamatornih i regulatornih citokina (IL-10 i TGF-β) na sistemskom nivou. Primena izolovanih antigena pokreće ekspanziju Treg ćelija, ali nekonvencionalnog CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ fenotipa i na periferiji i na nivou ciljnog organa.

Danas se zna da evolucijom definisan sistem parazit-domaćin omogućava opstanak oba učesnika pri čemu dolazi do podsticanja tolerancije ne samo prema antigenima parazita već i prema autoantigenima domaćina i sledstvenog ublažavanja i/ili prevencije antiinflatarnog odgovora koji bi štetio domaćinu. Naša istraživanja predstavljaju doprinos razjašnjavanju mehanizama koji postoje u prirodi, a kojima helminti i posebno *T. spiralis* mogu uspešno da modifikuju imunski odgovor domaćina. Pošto infekcija sa *T. spiralis* ne bi mogla da predstavlja metodu izbora u lečenju autoimunskih bolesti, to bi ovde opisano i poželjno imunomodulatorno dejstvo ES L1 produkata moglo značajno da doprinese pronalaženju novih, prihvatljivih pristupa u terapiji autoimunskih bolesti.

Ključne reči: *Trichinella spiralis*; EAE; ES L1; imunski odgovor; dendritske ćelije; regulatorni T limfociti

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK broj:

Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis with *Trichinella spiralis*-derived excretory-secretory antigens

ABSTRACT

Recent studies indicated that *Trichinella spiralis* infection could successfully ameliorate or even prevent a number of autoimmune diseases established in animal models, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), experimental colitis, type 1 diabetes mellitus. During the course of infection parasite *T. spiralis* communicates with the host organism and affects cells of the immune system through excretory-secretory products (ES L1) released from the muscle larvae. Mechanisms by which ES L1 influences polarization of immune response and its role in immunomodulation of autoimmune diseases has not been elucidated yet. In the current study, the potential of *T. spiralis* ES L1 products, injected directly or co-cultivated with dendritic cells (DCs), to promote immune regulation and control EAE development were investigated in order to reveal mechanisms of ongoing immunomodulation and the role of DCs in it.

Results presented here confirmed that *in vitro* stimulation of DCs with *T. spiralis* ES L1 antigens led to partial maturation of these cells, as indicated by expression of the surface markers. Stimulation of DCs from DA rats with *T. spiralis* ES L1 antigens (DCs/ES L1) also resulted in significant reduction in IL-12p70 production and increased production of IL-10. In this study it was shown for the first time that application of DCs/ES L1 was able to reduce the clinical signs and duration of the EAE in a dose-dependent way, with the dose of 5×10^6 cells being most efficient in reduction of disease severity. The analysis of underlying mechanisms indicated that amelioration of EAE in DCs/ES L1 pretreated animals was due to decreased production of pro-inflammatory (IFN- γ and IL-17), increased production of Th2 and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and TGF- β), as well as activation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) both on systemic level in spleen and in target organ, i.e. spinal cord. Another approach included assessment of the immunomodulatory capacity of prophylactic administration of *T. spiralis* ES L1 antigens in DA rats applied in different doses and time points before EAE induction. ES L1 antigens

caused significant reduction of EAE, as reflected in the lower maximal clinical score and cumulative index, as well as shorter duration of disease in ES L1-treated animals. The dose of 250 µg given twice at weekly intervals, 14 and 7 days before EAE induction, had the strongest effect on disease course. The capacity of *T. spiralis* ES L1 antigens to modulate the immune response in EAE-induced animals was demonstrated by a shift to the Th2-type of response in the periphery and CNS. This could explain the observed suppression of pro-inflammatory Th1 cytokine production and activation of the regulatory mechanisms in the CNS. At the same time, no significant impact on the production of anti-inflammatory and regulatory cytokines (IL-10 and TGF-β) was observed in the periphery. ES L1 treatment also facilitated induction/expansion of Treg cells with predominance of unconventional CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells, which persisted in increased numbers both in the CNS and spleen of treated rats throughout the course of the disease.

The host-parasite system, as established during the evolution, enables the survival of both participants and influence the development of tolerance not only to the antigens of the parasite but also to host autoantigens with consequent mitigation and/or prevention of anti-inflammatory responses that could be harmful to the host. Our findings represent a contribution to the elucidation of mechanisms that exists in nature, by which helminths and *T. spiralis* in particular, modulate the immune response of the host. Since the application of live parasite does not represent an optimal treatment method, the immunomodulatory capacity of ES L1 antigens demonstrated in this study, could provide an additional value for the development of new therapeutic approaches to autoimmune disorders.

Key words: *Trichinella spiralis*; EAE; ES L1; immune response; dendritic cells; regulatory T lymphocytes

Research area: Medicine

Area of special interest: Immunology

UDC number:

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Autoimunost i infekcija helmintima.....	1
1.1.1. Tolerancija na sopstveno.....	1
1.2. Multipla skleroza.....	5
1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model multiple skleroze	9
1.4. Parazit <i>Trichinella spiralis</i>	16
1.5. Antigeni parazita <i>Trichinella spiralis</i>	19
1.6. Imunski odgovor na infekciju parazitom <i>T. spiralis</i>	22
1.7. Uloga dendritskih ćelija u infekciji helmintima	25
2. CILJEVI.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1. Eksperimentalne životinje.....	29
3.2. Parazit <i>Trichinella spiralis</i>	29
3.2.1. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) parazita <i>T. spiralis</i>	29
3.2.2. Dobijanje ekskretorno-sekretornih (ES) produkata L1 larvi parazita <i>T. spiralis</i>	30
3.3. Dobijanje i gajenje dendritskih ćelija poreklom iz kostne srži DA pacova.....	30
3.4. Određivanje ekspresije površinskih markera na dendritskim ćelijama	31
3.5. Aplikovanje DC stimulisanih ES L1 antigenima parazita <i>T. spiralis</i> DA pacovima	32
3.6. Aplikovanje ES L1 antigena parazita <i>T. spiralis</i> DA pacovima.....	32
3.7. Indukcija EAE-a.....	33
3.8. Izolovanje i gajenje ćelija iz slezine.....	34
3.9. Gajenje ćelija infiltrata kičmene moždine.....	35
3.10. Određivanje koncentracije citokina primenom ELISA testa.....	35
3.11. Određivanje broja Foxp3+ T regulatornih ćelija.....	36
3.12. Statističke analize.....	36
4. REZULTATI.....	37
4.1. Karakterizacija dendritskih ćelija stimulisanih ES L1 antigenima parazita <i>T. spiralis</i>	37
4.2. Aplikacija dendritskih ćelija stimulisanih ES L1 antigenima parazita <i>T. spiralis</i> i njihov uticaj na pojavu i tok EAE-a - Efekat različitih doza.....	39

4.2.1. Ispitivanje uticaja tretmana sa 5×10^6 DC/ES L1 na razvoj i tok EAE-a na model sistemu DA pacova.....	42
4.2.2. Uticaj primene DC stimulisanih ES L1 antigenima na imunski odgovor na nivou slezinskih ćelija u toku EAE-a	44
4.2.3. Uticaj primene DC stimulisanih ES L1 antigenima na imunski odgovor na nivou ćelija infiltrata kičmenih moždina u toku EAE-a.....	49
4.2.4. Uticaj tretmana sa 5×10^6 DC/ES L1 na indukciju populacije regularnih T ćelija u toku EAE-a.....	54
4.3. Direktna, in vivo primena ES L1 antigena parazita T. spiralis u imunomodulatorne svrhe	57
4.3.1. Efekat direktne primene ES L1 antigena T. spiralis na pojavu i tok EAE-a kod DA pacova	58
4.3.2. Uticaj direktne primene ES L1 antigena pre indukcije EAE-a na imunski odgovor na nivou ćelija slezine u toku bolesti	62
4.3.3. Uticaj direktne primene ES L1 antigena pre indukcije EAE-a na imunski odgovor na nivou infiltrata kičmenih moždina u toku bolesti.....	66
4.3.4. Uticaj direktnog davanja ES L1 antigena parazita T. spiralis DA pacovima pre indukcije EAE-a na populaciju regulatornih T ćelija u toku bolesti	72
5.DISKUSIJA.....	74
6. ZAKLJUČCI.....	87
7. LITERATURA.....	89

1.UVOD

1.1. Autoimunost i infekcija helmintima

1.1.1. Tolerancija na sopstveno

Imunski sistem vertebrata je tokom evolucije razvio izuzetno složene mehanizme urođene i stečene odbrane od infektivnih agenasa. Važno svojstvo imunskog sistema je i odsustvo odgovora na specifične antigene, prevashodno sopstvene, tzv. imunološka tolerancija. Tokom sazrevanja u timusu i kostnoj srži T-limfociti i B-limfociti uče kako da prilikom prepoznavanja antigena razlikuju sopstveno od stranog. U timusu T-limfociti koji snažno reaguju sa antigenima domaćina umiru putem apoptoze u procesu negativne selekcije. Takođe, u kostnoj srži nezreli B-limfociti koji snažno prepoznaju antigene domaćina podležu procesu negativne selekcije ili procesu promene specifičnosti svog receptora (preuređenje receptora). S obzirom da antigen-prezentujuće ćelije u centralnim limfnim organima ne prezentuju sve periferne antigene, mnogi autoreaktivni limfociti ne bivaju uklonjeni. U perifernim tkivima oni postaju funkcionalno neaktivni ili dolazi do njihove eliminacije putem apoptoze usled ponavljane aktivacije autoantigenima. Takođe, na periferiji su mehanizmi periferne tolerancije posredovani dendritskim i regulatornim ćelijama koje deluju na autoreaktivne limfocite.

Dendritske ćelije (DC) su antigen-prezentujuće ćelije koje, pored ključne uloge u izazivanju imunskog odgovora, predstavljaju i medijatore T-ćelijske tolerancije (Granucci i sar., 2008). U zavisnosti od inicijalnog stimulusa i stepena zrelosti, DC počinju da luče različite citokine i hemokine čime stimulišu T-ćelije da se diferenciraju u pravcu Th1, Th2, Th17 ili Treg ćelija (MacDonald i Maizels, 2008). U početku se smatralo da samo nezrele i neaktivne DC automatski indukuju stvaranje regulatornih T-ćelija dok zrele DC najčešće indukuju Th1 ili Th17 ćelije, ali je ubrzo ovaj koncept promenjen i ukazano je na postojanje trećeg stadijuma razvoja DC - delimično zrele ćelije (Lutz, 2012). Ovaj koncept se uglavnom odnosi na DC poreklom od mijeloidne loze ćelija, tj. DC poreklom iz kostne srži, Langerhansove ćelije i DC poreklom iz humanih monocita. Signali za sazrevanje DC međusobno se jako razlikuju i neki od njih (npr. helmintski antigeni) indukuju delimično

sazrevanje DC - tzv. tolerogene DC, a drugi (npr. lipopolisaharid - LPS) potpuno sazrevanje DC (White i Artavanis-Tsakonas, 2012).

Regulatorni T-limfociti (Treg) kao nezaobilazni učesnici svakog imunskog odgovora, imaju ulogu u aktivnoj supresiji autoreaktivnih ćelija. Treg limfociti se dele na dve populacije ćelija koje imaju različitu specifičnost i efektorski mehanizam delovanja. Prvu populaciju čine prirodne (urođene, profesionalne) Treg ćelije koje pored CD4 ekspimiraju i CD25 molekul, a nastaju u timusu od nezrelih T-limfocita uz učešće Foxp3 transkripcionog faktora koji je za sada njihov najbolje definisani marker (Sakaguchi i sar., 2008). Svoje regulatorne funkcije stiču i ispoljavaju u timusu i ne menjaju ih na periferiji. Njihova uloga u nastanku autoimunosti pokazana je u eksperimentima u kojima je nakon delecije ovih limfocita došlo do nekontrolisane proliferacije autoreaktivnih ćelija i nastanka organ specifičnih autoimunskih oboljenja kod miševa (Sakaguchi i sar., 1995). Isto se dešava i kod imunodeficientnih primalaca nakon adoptivnog transfera CD4⁺ T-limfocita iz kojih su prethodno uklonjene CD25⁺ pozitivne T-ćelije (Sakaguchi i sar., 1995). Međutim, rekonstitucija odgovarajućim CD4⁺CD25⁺ ćelijama 10 dana nakon transfera CD25⁻ ćelija sprečava razvoj autoimunskih bolesti (Sakaguchi, 2005).

Drugu populaciju čine adoptivne (inducibilne) Treg ćelije u koje spadaju Tr1 ćelije koje produkuju interleukin (IL)-10, Th3 ćelije koje produkuju transformišući faktor rasta β (TGF- β) i podgrupe CD8⁺ Treg ćelija (Roncarolo i sar., 2001; Weiner, 2001). Ove ćelije mogu nastati iz konvencionalnih T-limfocita *in vivo* ili *in vitro* pod specifičnim uslovima kao što je suboptimalno izlaganje antigenima i/ili kostimulacija delovanjem tolerogenih dendritskih ćelija, infektivnih agenasa, itd (Maldonado i von Andrian, 2010). Ove ćelije kontrolišu odgovor na strane antigene. Osnovna razlika između urođenih i inducibilnih Treg limfocita je da su urođene ćelije potpuno spremne za svoju funkciju u momentu migracije iz timusa, dok je inducibilnim ćelijama neophodna dodatna stimulacija u toku razvoja specifičnog imunskog odgovora, kao i prisustvo TGF- β koji aktivira signalni molekul STAT5 i transkripcioni faktor Foxp3. Inducibilni Treg limfociti ispoljavaju supresorsku aktivnost uglavnom posredstvom citokina, dok je delovanje urođenih Treg limfocita zavisi i od direktnog kontakta sa drugim ćelijama. S obzirom da imaju značajnu ulogu u održanju periferne imunotolerancije Treg ćelije su potencijalno jedna od

najznačajnijih linija odbrane organizma od autoimunskih bolesti, usled čega su u fokusu savremenih istraživanja (Oukka, 2007).

Ako otkazu mehanizmi imunološke tolerancije imunski sistem će napasti ćelije i tkiva organizma domaćina. Ovaj fenomen se zove autoimunost i predstavlja uzrok autoimunskih bolesti. Na razvoj autoimunosti utiču kako genetska predispozicija, tako i faktori spoljašnje sredine u koje spadaju i različiti infektivni agensi (Vojdani, 2014). U toku infekcije dolazi do zapaljenske reakcije koja uzrokuje oštećenje tkiva domaćina i oslobađanje sopstvenih antigena koji potom stimulišu dalji imunski odgovor i nastavljaju započeto oštećenje tkiva (širenje epitopa). Pokrenut urođeni imunski odgovor na mestu infekcije povećava ekspresiju kostimulatornih molekula na tkivnim antigen-prezentujućim ćelijama koje luče pro-inflamatorne citokine i mogu da stimulišu do tada anergične ili neaktivirane autoreaktivne limfocite („bystander” aktivacija) i tako dovode do pokretanja odgovora koji nije specifičan za inicirajući agens (autoimunski odgovor). Do sada je identifikovano i više različitih proteina mikroorganizama koji su po strukturi slični proteinima domaćina (Cusick i sar., 2012). Do aktivacije i ekspanzije klonova autoreaktivnih ćelija, koje nisu uklonjene tokom sazrevanja u timusu procesom negativne selekcije, može da dođe usled prepoznavanja unakrsno-reagujućih epitopa nekog infektivnog agensa (molekulska mimikrija). Tada takve ćelije reaguju sa sopstvenim tkivom izazivajući oštećenje i bolest. Takođe, infektivni agensi mogu da učestvuju u indukciji autoimunosti tako što dovode do izmenjene obrade i prezentacije skrivenih antigena domaćina koji su normalno odvojeni od imunskog sistema (npr. skriveni antigeni u testisu i oku).

Širok je spektar mikroorganizama koji mogu da indukuju autoimunost, pri čemu jedan infektivni agens može da bude okidač različitih autoimunskih oboljenja. Danas se latentna infekcija Epstein-Barr virusom povezuje sa mogućom indukcijom multiple skleroze (MS), reumatoidnog artritisa i sistemskog eritemskog lupusa (Lossius i sar., 2012), dok se hepatitis C virus povezuje sa nastankom autoimunskog tireoiditisa, Kronove bolesti, pemfigus vulgarisa i antifosfolipidnog sindroma (Agmon-Levin i sar., 2009). Sa druge strane, više različitih agenasa mogu da budu opisani kao uzročnici u patogenezi jedne

autoimunske bolesti (streptokoke, *Trypanosoma cruzi*, *Borrelia burgdorferi*, citomegalovirus, parvovirus B19 u autoimunskom miokarditisu) (Kindermann i sar., 2012).

S obzirom da su autoimunske bolesti na trećem mestu po morbiditetu i mortalitetu posle kardiovaskularnih i malignih bolesti u industrijski razvijenim zemljama (Kivity i sar., 2009), one su bile predmet brojnih epidemioloških i eksperimentalnih istraživanja koja su pokazala da infekcije mogu i da zaštite od razvoja nekih autoimunskih i atopijskih oboljenja. Naime, epidemiološke studije započete tokom šezdesetih godina prošlog veka su ukazale da postoji obrnuta korelacija između prevalencije infekcije parazitima i pojave autoimunskih bolesti i bile su osnova za formulisanje „higijenske hipoteze” koja govori da smanjena ekspozicija patogenima tokom detinjstva, naročito helmintima, može da dovede do nepravilnog razvoja imunskog sistema koji dalje vodi do povećane predispozicije za razvoj alergijskih i autoimunskih bolesti (Ehlers i sar., 2010; Strachan, 1989). Poslednjih godina ova hipoteza je poznata i kao hipoteza „starih prijatelja“ po kojoj imunski sistem razvija toleranciju prema helmintima i saprofitnim mikroorganizmima iz okruženja uz koje je milionima godina koevoluirao (Sironi i Clerici, 2010). Poslednjih decenija, u ekonomski razvijenim zemljama koje imaju dobre sanitarne uslove i visok nivo zdravstvene zaštite, kontakti čoveka upravo sa ovim infektivnim agensima svedeni su na najmanju moguću meru (Elliott i Weinstock, 2012), a istovremeno je došlo do naglog porasta incidencije hroničnih inflamatornih bolesti (Moroni i sar., 2012).

Kao nastavak epidemioloških, urađen je veliki broj eksperimentalnih studija koje se bave ispitivanjem supresije autoimunskih i alergijskih bolesti primenom različitih helmintskih infekcija, produkata ovih parazita ili čak njihovih rekombinantnih ili sintetskih delova koje su dale rezultate koji govore u prilog higijenskoj hipotezi (Bashi i sar., 2015; McSorley i sar., 2013). Ohrabrujući rezultati u prevenciji i ublažavanju autoimunskih bolesti dobijeni na eksperimentalnim modelima bili su podsticaj da neka istraživanja uđu i u kliničku fazu (Helmsby, 2015; Khan i Fallon, 2013). Kreiranje visoko srodnih i genetski manipuliranih miševa omogućilo je stvaranje eksperimentalnih modela autoimunskih oboljenja kao neophodne podloge kako za dalje izučavanje uzroka bolesti, tako i za njihovu manipulaciju u svrhu ublažavanja bolesti i lečenja. Najviše proučavana autoimunska oboljenja u ovom smislu, a koja mogu da budu modulirana infekcijom parazitima, su

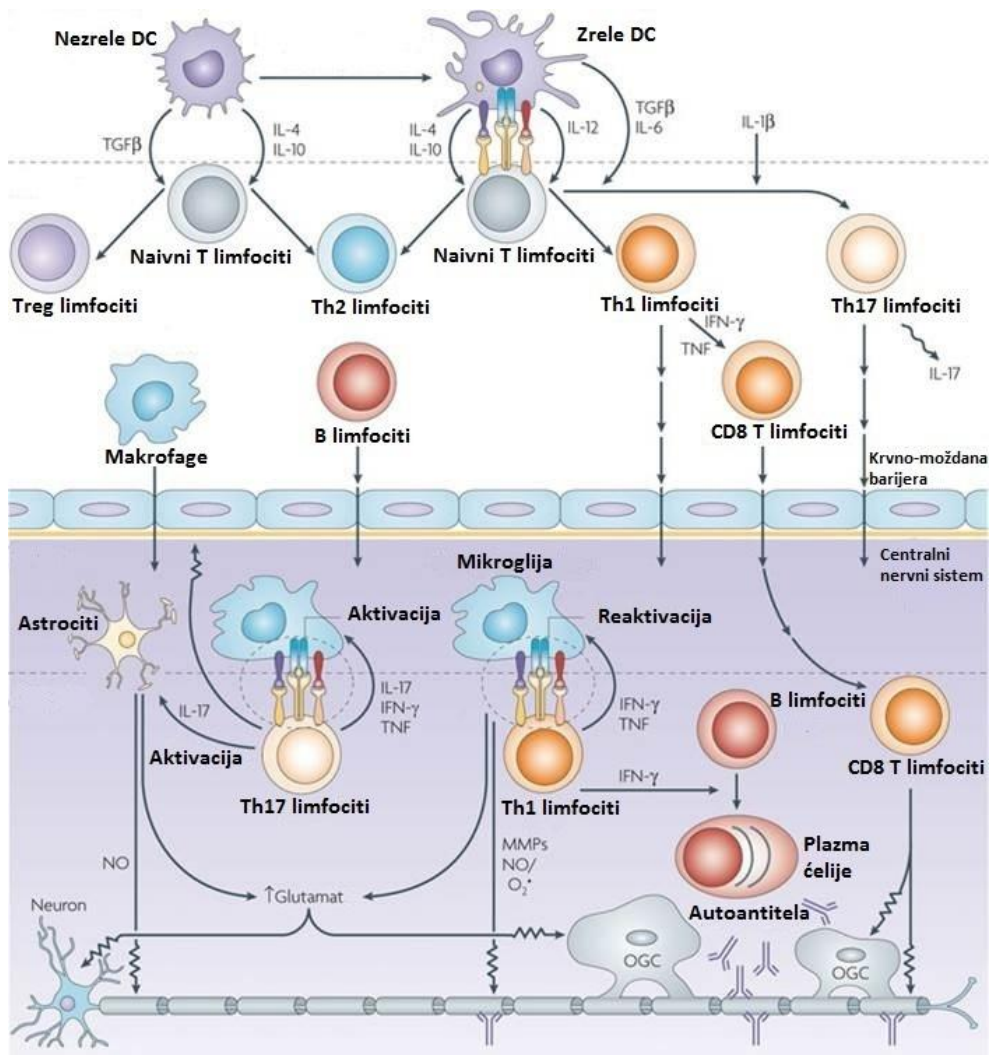
dijabetes melitus tip 1 (T1D), multipla skleroza i inflamatorna bolest creva (IBC) (Gruden-Movsesijan i sar., 2010; 2008; Saunders i sar., 2007; Khan i sar., 2002). Pokazano je prvo da sama infekcija nekim protozoama i helmintima dovodi do ublažavanja toka bolesti, a kasnije je ustanovljeno da, pored tretiranja životinja jajima ili larvama, i aplikacija izolovanih ekskretorno-sekretornih antigena parazita može ublažiti tok ili u potpunosti sprečiti nastanak autoimuskog oboljenja čijem je razvoju životinja genetski podložna, kao što je pokazano u eksperimentalnom autoimuskom encefalomijelitisu (EAE), modelu multiple skleroze kod ljudi (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2013; Kuijk i sar., 2012; Motomura i sar., 2009), modelu dijabetes melitusa tip 1 (Zaccone i sar., 2010; Liu i sar., 2009) i eksperimentalnom kolitisu, kao modelu IBC (Ashour i sar., 2013; Cho i sar., 2012; Blum i sar., 2012; Hang i sar., 2010). Od svih parazita helminti imaju najveći potencijal da modulišu imunski odgovor domaćina. Oni suprimiraju imunski odgovor domaćina usmeren ne samo prema parazitskim, već i prema drugim, nehelmintskim antigenima bilo da su oni organizmu strani (alergeni) ili se radi o sopstvenim (autoantigenima) kod autoimunskih bolesti (Allen i Maizels, 2011). Smatra se da u osnovi protektivnog efekta helmintske infekcije na autoimunost ključnu ulogu imaju indukcija dendritskih ćelija tolerogenog fenotipa koje stimulišu Th2 ćelijsku diferencijaciju, aktivacija CD4⁺ i CD8⁺ Treg i regulatornih B-limfocita (Breg) i alternativno aktivirani makrofagi (McSorley i sar., 2013). Krajnji efekat ovih promena je kreiranje anti-inflamatorne sredine koja pogoduje i parazitu i domaćinu.

1.2. Multipla skleroza

Multipla skleroza je hronična, zapaljenska, demijelinizirajuća, neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) kod ljudi za koju se smatra da je verovatno autoimuskog porekla (Goldenberg, 2012). Tokom bolesti nastaju multipli ožiljci, plakovi ili lezije u beloj masi mozga i kičmene moždine usled zapaljenja koje je praćeno demijelinizacijom i remijelinizacijom, smanjenjem broja oligodendrocita koji prave mijelin, neuronalnom i aksonalnom degeneracijom (Compston, 2009). Na osnovu dosadašnjih ispitivanja smatra se da su autoreaktivne CD4⁺ T-ćelije stečenog imunskog odgovora

okidač patološke kaskade čiji je rezultat demijelinizacija (Nylander i Hafler, 2012). U perifernim limfnim organima verovatno usled prepoznavanja antigena sličnih antigenima CNS-a dolazi do aktiviranja $CD4^+$ T-ćelija specifičnih za antigene CNS-a koje prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (Goverman, 2009). Nakon reaktivacije autoantigenima koje prezentuju lokalne antigen-prezentujuće ćelije u parenhimu CNS-a, ove ćelije proizvode različite citokine i indukuju inflamatorni odgovor koji dovodi do oštećenja mijelina i oligodendrocita i posledične demijelinizacije (McFarlan i Martin, 2007) (Slika 1). Hronični autoimuni odgovor u CNS-u odlikuje fenomen širenja epitopa jer dolazi do oslobađanja novih epitopa nakon početnog oštećenja tkiva (Vanderlugt i Miller, 1996). Na modelu hronično-relapsirajućeg EAE-a koji je indukovano primenom peptida proteolipidnog proteina $PLP_{(139-151)}$ pokazano je da dolazi do širenja imunskog odgovora T-limfocita na druge proteinske determinante PLP-a kao i na drugi autoantigen - mijelin bazni protein (MBP) (Yu i sar., 1996). Ovakva istraživanja su ukazala da bi ulogu u patogenezi različitih stadijuma multiple skleroze mogli imati različiti autoantigeni.

U lezijama obolelih od multiple skleroze dominira infiltracija T-limfocita, B-limfocita, kao i monocita koji postaju aktivirani makrofagi (Lassman, 2007). Ćelije imunskog sistema nakon infiltracije interaguju sa ćelijama CNS-a što dovodi do aktivacije mikroglije i astrocita. U ranim fazama stvaranja plakova, ćelije mikroglije su dominantne, dok ih u hroničnim lezijama zamenjuje astrogliozna (Lassman, 2007). Što se tiče T-ćelijske populacije u novonastalim lezijama uglavnom dominira $CD8^+$ T-ćelijska populacija u odnosu na $CD4^+$ (Friese i Fugger, 2009). Kod obolelih u ranim lezijama i cerebrospinalnoj tečnosti nalaze se B-limfociti koji sazrevaju u plazma ćelije i stvaraju antitela specifična za antigene mijelina (Frischer i sar., 2009; von Budingen i sar., 2008). Smatra se da je poremećaj imunoregulacije uzrok nastanka autoimunskog odgovora u CNS-u. U osnovi imunoregulacije je koordinisana funkcija DC, Treg ćelija, Breg ćelija, citokina efektorskih ćelija. Istraživanja pokazuju da funkcija bilo koje od ovih komponenti može biti poremećena u MS-u (Smith i sar., 2012; Gonsette, 2012; Edwards i sar., 2010).



Slika 1. Patogeneza multiple skleroze (preuzeto iz Brinkmann i sar., 2010). IFN γ - interferon γ ; IL - interleukin; MMPs - matriksne metaloproteinaze; NO - azot monoksid; TGF β - transformišući faktor rasta- β ; TNF - faktor nekroze tumora.

U početnim istraživanjima se smatralo da inflamaciju i oštećenja u CNS-u kod multiple skleroze kao i njenog životinjskog modela EAE-a izazivaju Th1 ćelije koje proizvode interferon (IFN)- γ (Segal, 2005). Međutim, ta hipoteza je promenjena nakon otkrića da miševi kojima je uklonjen gen za IFN- γ i njegov receptor ne samo da razvijaju bolest nego imaju i težu kliničku sliku (Farber i sar., 1996), kao i da primena neutrališućih antitela za IFN- γ dovodi do pogoršanja EAE-a (Heremans i sar., 1996; Duong i sar., 1994). Danas se zna da su za nastanak inflamacije u EAE modelu bolesti ključne T-ćelije koje

produkuju IL-17 i koje su označene kao Th17 ćelije (Korn i sar., 2007; McKenzie i sar., 2006), kao i da ulogu u tom procesu ima i poremećaj broja/funkcije Treg limfocita (Joller i sar., 2012; Lowther i Hafler, 2012).

Istraživanja sprovedena u poslednjoj deceniji ukazala su na značajnu ulogu Th17 limfocita u patogenezi tkivno specifičnih autoimunskih bolesti kao što je MS (Mills, 2008). Ovi limfociti su prvi put izolovani iz periferne krvi pacijenata obolelih od Kronove bolesti (Louten i sar., 2009). Th17 limfociti produkuju citokine IL-17A i IL-17F koji deluju posredstvom receptora koji se nalaze na površini fibroblasta, B- i T-limfocita, ćelija mononuklearnog fagocitnog sistema, stromalnih ćelija u kostnoj srži i endotelnih ćelija krvnih sudova. U fiziološkim uslovima Th17 imunski odgovor ima značajnu ulogu u odbrani od ekstracelularnih bakterija i gljivica, ali je uključen i u zaštitu domaćina od virusnih patogena (Peck i Mellins, 2010). Brojna ispitivanja Th17 ćelija su pokazala da pored zaštitne uloge one mogu imati i patogeni efekat. Smatra se da su čak potentnije od Th1 ćelija u izazivanju tkivne destrukcije tokom inflamatornog procesa kod različitih autoimunskih i hroničnih inflamatornih oboljenja (Rostami i Ciric, 2013). U prilog ovakvoj hipotezi o ulozi Th17 ćelija u razvoju multiple skleroze ide činjenica da tokom EAE-a dolazi do infiltracije Th17 ćelija u mozgu miševa i lokalne produkcije IL-1 β , transformišućeg faktora rasta (TNF) i IL-6 koja indukuje razvoj kliničke simptomatologije bolesti. Nasuprot tome, značajnija infiltracija Th1 ćelija u CNS-u detektuje se tek nakon razvoja kliničke manifestacije bolesti (Murphy i sar., 2010).

Dalja istraživanja su pokazala da u CNS-u u toku bolesti postoji značajna razlika u broju i funkcionalnosti Treg ćelija koja je u korelaciji sa kliničkim tokom bolesti, dok se na periferiji populacija ovih ćelija ne menja značajno. Naime, nivo Th17 ćelija je veoma visok na vrhuncu bolesti u CNS-u i dramatično se smanjuje tokom faze oporavka (Korn i sar., 2007). Nasuprot tome, sa regresijom kliničke simptomatologije, broj Treg ćelija specifičnih za antigene mijelina se značajno povećava, kao i količina anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- β koje one dominantno produkuju (Oukka, 2007). Upravo iz tih razloga postoji korelacija između kliničke slike EAE-a i odnosa specifičnih Treg i Th17 ćelija u CNS-u, ali ne i u drenirajućim limfnim čvorovima (Oukka, 2007).

Saznanja dobijena na animalnim modelima testirana su u humanoj populaciji. Tako je u cerebrospinalnoj tečnosti i sklerotičnim plakovima obolelih od multiple skleroze detektovan povišen nivo IL-17 (Aranami i Yamamura, 2008). Takođe, genetske analize su pokazale povećanu ekspresiju iRNK za IL-17 u krvi, likvoru i moždanom tkivu kod obolelih (Lock i sar., 2002). Istraživanja na humanim mikroglialnim ćelijama potvrdila su da Th17 ćelije imaju ulogu u inflamatornoj demijelinizaciji neurona. Naime, u prisustvu IL-17 ove ćelije proizvode pro-inflamatorne medijatore: IL-6, makrofagni inflamatorni protein 2, azot monoksid (NO), različite hemotoksične faktore neutrofila i adhezivne molekule. Takođe, kod obolelih od multiple skleroze su pored abnormalnosti u Th17 i Th1 imunskom odgovoru utvrđeni i poremećaji na nivou Treg limfocita. Zapaženo je da kod njih ne postoje značajnije razlike u broju Treg limfocita u odnosu na zdrave ljude, međutim u *in vitro* eksperimentima je pokazano da njihove supresorne funkcije nisu adekvatne (Haas i sar., 2005).

1.3. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis kao model multiple skleroze

Jedan od životinjskih modela koji se najviše ispituje sa ciljem da se otkriju inflamatorni procesi i terapijske mogućnosti vezane za autoimunska oboljenja je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis koji predstavlja model bolesti multiple skleroze kod ljudi (Gold i sar., 2006). Ovaj životinjski model deli dosta kliničkih, histoloških i imunoloških osobina sa organ-specifičnim oboljenjem kakvo je multipla skleroza (Constantinescu i sar., 2011). On pomaže da razumemo autoimunsko zapaljenje tkiva u CNS-u i omogućava otkrivanje specifičnih molekula koji učestvuju u skretanju imunskog odgovora ka patološkoj autoreaktivnosti (Korn i sar., 2009).

Model EAE-a uveo je Thomas Rivers tridesetih godina dvadesetog veka, na osnovu hipoteze da akutni diseminovani encefalitis nije povezan sa virusom besnila nego sa komponentom CNS-a zeca koja kontaminira vakcinu u toku pravljenja i koja je uzrok inflamacije u CNS-u (Rivers i Schwentker, 1935). Kasnije je model EAE-a poboljšan dodavanjem Frojndovog adjuvansa emulziji mijelinskog antigena koji je omogućio da se bolest razvije posle jedne doze injekcije (Kabat i sar., 1946). Prekretnica u ispitivanju ove

bolesti je nastala otkrićem da CD4⁺ T-ćelije specifične za antigene mijelina nakon adoptivnog transfera mogu da izazovu inflamaciju praćenu demijelinizacijom u parenhimu CNS-a (Ben-Nun i sar., 1981). Sledećih godina su otkriveni proteini mijelinskog omotača koji mogu pokrenuti autoimunski odgovor i imati ulogu u patogenezi bolesti, a to su mijelin bazni protein (MBP), proteolipidni protein (PLP), mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG), mijelin-asocirani glikoprotein (MAG), mijelin-asocirani oligodendrocitni bazni protein (MOBP) kao i njihovi peptidi (Gold i sar., 2006). Model EAE-a se može indukovati aktivno kod zdravih, genetski podložnih, eksperimentalnih životinja imunizacijom homogenatom kičmene moždine ili različitim antigenima mijelina (Krishnamoorthy i Wekerle, 2009) i pasivno transferom antigen specifičnih CD4⁺ T-limfocita iz imunizovanih životinja u singene primaocce (Zamvil i Steinman, 1990).

Najčešće se aktivna indukcija EAE-a vrši imunizacijom osetljivih visoko srodnih pacova i miševa primenom homogenata kičmene moždine ili pojedinačnim proteinskim komponentama mijelina koje se emulguju u adjuvansu. Najčešće se koristi Frojndov adjuvans sa (kompletan) ili bez (nekompletan) dodatka bakterija *Mycobacterium tuberculosis*. Aktivna imunizacija uz korišćenje kompletnog Frojndovog adjuvansa dovodi do bržeg razvoja i težeg oblika bolesti kod eksperimentalnih životinja. Pored toga što su specifični antigeni organa visoko konzervirani, male razlike u amino kiselinama koje postoje kod visoko srodnih životinjskih vrsta mogu uticati na patogeni potencijal ovih antigena. Brojne studije su pokazale da postoje značajne razlike između vrsta, kao i sojeva u okviru iste vrste, za kapacitet za razvoj EAE-a nakon imunizacije sa istim encefalitogenom (Gold i sar., 2006). Stoga se zavisno od vrste eksperimenta za indukciju EAE-a mogu se koristiti različiti sojevi pacova i miševa. Lewis pacovi se često koriste pošto se kod njih bolest jednostavno izaziva, ali je tok bolesti monofazan i bez znakova demijelinizacije i oštećenja aksona (Croxford i sar., 2011). Inflamacija je kod Lewis pacova predominantno lokalizovana u kičmenoj moždini što je u suprotnosti sa znacima MS-a. Jako izraženu prijemčivost za indukciju EAE-a imaju i Dark Agouti (DA) pacovi kod kojih bolest može biti izazvana i bez prisustva adjuvansa (Stosic-Grujicic i sar., 2004). Bolest kod DA pacova može imati produženo-relapsni i relapsno-remitentni oblik, zavisno do primenjenih antigena i adjuvansa, uz prateći razvoj demijelinizacije i oštećenja aksona u

CNS-u (Scuteri i sar., 2015; Papadopoulos i sar., 2006; Weissert i sar., 1998; Dahlman i sar., 1998; Lorentzen i sar., 1995). Za razliku od Lewis i DA, Albino Oxford (AO) pacovi su rezistentni na izuzetno snažnu imunizaciju homogenatom kičmene moždine obogaćenim kompletnim Frojndovim adjuvansom (Mostarica-Stojkovic i sar., 1982). Relapsno-remitentni i hronično-progresivni oblik bolesti se može indukovati kod C57BL/6 miševa i to korišćenjem MOG-a (Berard i sar., 2010).

Nakon nedelju dana od imunizacije životinja homogenatom kičmene moždine ili pojedinačnim proteinskim komponentama mijelina u perifernom limfnom tkivu nastaju autoreaktivne T-ćelije specifične za antigene mijelina (Wekerle i sar., 1994). Bolest se manifestuje ascedentnom progresivnom paralizom u kaudo-rostralnom pravcu pri čemu dovodi do paralize repa, zatim do pareze, pa paralize zadnjih nogu, koja vremenom dovodi do pareze i paralize prednjih nogu i na kraju smrti kod težih slučajeva, a sve je to praćeno gubitkom telesne mase koji nastaje zbog gubitka apetita i nedovoljnog unosa tečnosti (Wekerle, 2008). Eksperimentalni model EAE-a može se podeliti u tri faze: preimunizaciona faza tokom koje se potencijalno autoreaktivne T-ćelije nalaze u cirkulaciji, ali su još uvek u stanju mirovanja; induktivna faza (obično 0-10 dana nakon imunizacije sa neuroantigenom) tokom koje autoreaktivni limfociti susreću antigene CNS-a u drenirajućim limfnim čvorovima što rezultira njihovom aktivacijom, proliferacijom, diferencijacijom i diseminacijom po organizmu uključujući i CNS i efektorska faza (10-30+ dana nakon imunizacije) tokom koje autoreaktivne T-ćelije u CNS-u opet susreću neuroantigene i aktiviraju mikrogliju i makrofage, krajnje efektorske ćelije koje oštećuju mijelin i druge komponente tkiva CNS-a (Kuerten i Lehmann, 2011). U efektorskoj fazi bolesti klinički znaci paralize su prisutni kod životinja, ali se do kraja perioda bolesti one potpuno ili delimično oporave.

Deset dana nakon imunizacije mnoštvo aktiviranih T-limfocita prelazi u moždano tkivo preko krvno-moždane barijere, dok neaktivirani T-limfociti ne mogu da prođu (Flugel i sar., 2001). Analizom histoloških isečaka može se videti da se akutne lezije nalaze perivaskularno, u tkivu oko zidova krvnih sudova - da su ispunjene leukocitima (Wekerle i sar., 2008). T-ćelije specifične za antigene mijelina bivaju reaktivirane preko MHC molekula II klase u perivaskularnom prostoru gde se ti antigeni prezentuju (Kawakami i

sar., 2005) što dovodi do dalje aktivacije T-ćelija i produkcije efektorskih citokina i hemokina koji privlače makrofage i granulocite u tkivo CNS-a i dovode do inflamacije u tkivu i demijelinizacije. Degradacija mijelina nastaje i kao posledica stvaranja toksičnih supstanci kao što su NO i TNF (Willenborg i sar., 2007). Hronične lezije su ispunjene proliferisanim ili hipertrofisanim mikroglialnim ćelijama, mada progresija bolesti, histopatologija i klinički simptomi variraju.

Modeli udruživanja parazitskih infekcija sa EAE-om. Postoji veliki broj studija koja se bave ispitivanjem uticaja infekcije parazitima i primene njihovih antigena na razvoj i prevenciju EAE-a (Tabela 1). Infekcija parazitom *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) dovodi do ublažavanja kliničke slike EAE-a sa značajno smanjenim parametrima težine bolesti (Gruden-Movsesijan i sar., 2008). U osnovi imunomodulacije EAE-a ovim helmintom nalazi se povećana produkcija IL-4, IL-10 i TGF- β i značajno smanjena produkcija IFN- γ i IL-17 citokina koji su ključni za inicijaciju i progresiju EAE-a. Takođe, dolazi i do ekspanzije CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-ćelija koje suprimiraju Th1 i Th17 imunski odgovor (Gruden-Movsesijan i sar., 2010). Tretman miševa jajima parazita *Shistosoma mansoni* (Sewell i sar., 2003) ili antigenima ovog parazita (Zhu i sar., 2012) pre indukcije EAE-a značajno smanjuje incidenciju bolesti, kao i težinu kliničke slike. Ovakav imunomodulatorni efekat je praćen smanjenom produkcijom IL-12, IFN- γ i TNF- α i povećanom produkcijom IL-4, IL-10 i TGF- β na periferiji. Studije u kojima su korišćeni drugi paraziti kao što su *Heligmosomoides polygyrus* (Wilson i sar., 2010), *Trichinella pseudospiralis* (Wu i sar., 2010), *Shistosoma japonicum* (Zheng i sar., 2008), *Fasciola hepatica* (Walsh i sar., 2009) i *Taenia crassiceps* (Reyes i sar., 2011) potvrdile su da infekcije helmintima sprečavaju ili odlažu početak EAE-a i ublažavaju njegov tok. Ovakav imunomodulatorni efekat helminti ostvaruju inhibicijom Th1 i Th17 imunskog odgovora koja je praćena smanjenom produkcijom IFN- γ , TNF- α , IL-6 i IL-17, uz indukciju Th2 imunskog odgovora domaćina i produkciju citokina IL-4 i IL-10, kao i stimulaciju proliferacije Treg i Breg limfocita. Polarizacija imunskog odgovora u opisanom pravcu posledica je sposobnosti parazita da indukuju stvaranje tolerogenih DC i alternativno aktiviranih makrofaga koje orkestriraju takav razvoj događaja (sprečavanja pojave ili

ublažavanja toka bolesti) (Versini i sar., 2015; Sofronic-Milosavljevic i sar. 2013; Ilic i sar 2011; Ilic i sar., 2008).

Tabela 1. Paraziti čijom primenom je uspešno izmenjen tok eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE) bilo infekcijom ili primenom njihovih izolovanih antigena.

Infektivni agens ili izolovani antigen	Th1/Th2	Autoimunsko oboljenje	Reference
<i>Trichinella spiralis</i> (larve i izolovani antigeni)	Th2	Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE)	Gruden-Movsesijan i sar., (2008, 2010) Kuijk i sar., (2012) Sofronic-Milosavljevic i sar., (2013)
<i>Trichinella pseudospiralis</i> (larve)			Wu i sar., (2010)
<i>Shistosoma mansoni</i> (jaja, larve i izolovani antigeni)			La Flamme i sar., (2003) Sewell i sar., (2003) Zhu i sar., (2012)
<i>Shistosoma japonicum</i> (larve)			Zheng i sar., (2008)
<i>Heligmosomoides polygyrus</i> (larve)			Wilson i sar., (2010)
<i>Fasciola hepatica</i> (larve)			Walsh i sar., (2009)
<i>Taenia crassiceps</i> (larve)			Reyes i sar., (2011)

Ako se sagledaju sva do sada objavljena istraživanja modulacije EAE-a infekcijom ili primenom antigena parazita može se zaključiti da je za uspešnost tretmana bitno vreme njegove primene. Tako su u svim studijama gde je tretman primenjen u preimunizacionoj i induktivnoj fazi dobijeni obećavajući rezultati, dok pri primeni helminata ili njihovih

produkata u efektorskoj fazi kao tretman već ispoljene bolesti nije bilo efekta. Takvi rezultati su u skladu sa obimnim ireverzibilnim oštećenjima tkiva koja nastaju u simptomatskoj fazi bolesti. Drugi zaključak bi bio da je neophodno ponavljati tretman jer bolest ima relapsne faze. Tako bi se i uspešnost dobijena u eksperimentalnim modelima EAE-a mogla posmatrati kao dobar tretman za pojedinačnu epizodu bolesti kao što je npr. relapsna faza koja traje nedeljama, a ne kao uspešan tretman celog toka bolesti koja traje decenijama. Zatim se može zaključiti da tretman helmintima ili njihovim produktima ima multimodalni efekat koji se ogleda u uspostavljanju antiinflamatornog ili regulatornog miljea na periferiji i u CNS-u. Na kraju može se zaključiti da svaki helmint ima svoj protokol imunizacije i primene i da efekti tretmana zavise i od vrste helminta i od doze primenjenih produkata ili živih parazita, kao i patoloških promena koje u organizmu izaziva (Fleming, 2013).

Ohrabrujući rezultati u prevenciji i ublažavanju EAE-a, kao i drugih modela autoimunskih bolesti, kod eksperimentalnih životinja bili su podsticaj da se pokuša sa prvim pilot studijama na ljudima. Tako su pacijenti oboleli od inflamatorne bolesti creva tretirani jajima parazita *Trichuris suis* u Americi (Weinstock i sar., 2002) i pacijenti oboleli od astme larvama parazita *Necator americanus* u Velikoj Britaniji (Mortimer i sar., 2006). Ove studije su pokazale samo delimičan uspeh. Znaci poboljšanja kod kolitisa trajali su kratko zato što larve *T. suis* u crevima mogu opstati nekoliko nedelja pa je za potpuni uspeh terapije neophodno ponavljati tretman. Terapija larvama parazita *N. americanus* usled dugog preživljavanja parazita koje može trajati godinama izaziva neželjene efekte u smislu gastrointestinalnih smetnji i anemije.

Nakon pilot studija počele su prve kliničke studije koje se odnose na tzv. „terapiju parazitima“ u tretmanu multiple skleroze. U opservacionoj studiji Correale i Ferez (2007) uporedili su 2 demografski slične grupe pacijenata obolelih od multiple skleroze. Prva grupa nije imala dodira sa parazitskim infekcijama, dok je druga grupa bila u stalnom kontaktu sa parazitima u svakodnevnom životu. Analize su pokazale da je druga grupa pacijenata bila zaražena gastrointestinalnim parazitima *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, ali bez značajnih i ozbiljnih simptoma infekcije koji bi zahtevali primenu antihelmintske terapije.

Nakon 4,6 godina praćenja druga grupa pacijenata je imala smanjen broj relapsa i novih lezija u CNS-u, dok je u prvoj grupi došlo do pogoršanja u funkcionalnom smislu. Nakon praćenja bolesnika tokom 7 godina par obolelih koji su bili inficirani parazitima razvili su značajne gastrointestinalne simptome. Nakon antihelmintske terapije došlo je do eliminacije parazita, ali su se klinički simptomi multiple skleroze vratili (Correale i Farez, 2011). Imunološke analize ovih pacijenata su pokazale da se kod pacijenata obolelih od MS i prirodno inficiranih parazitima u perifernoj krvi nalazi povišen broj mononuklearnih ćelija koje nakon stimulacije luče IL-10 i TGF- β , a smanjen broj onih koje luče IL-12 i IFN- γ . Ovi pacijenti su imali i povišen broj CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg limfocita, Breg ćelija koje proizvode IL-10 i povećanu ekspresiju TLR2 receptora na B-ćelijama i DC (Correale i Farez, 2012, 2011, 2009, 2007; Correale i sar., 2008). Na osnovu ovih studija na pacijentima može se zaključiti da paraziti imaju imunoregulatornu ulogu u MS-u koju ostvaruju putem stimulacije tolerogenih DC, regulatornih T- i B-ćelija koje inhibiraju autoreaktivne Th1 i Th17 limfocite, kao i putem stimulacije Th2 imunskog odgovora koji inhibira pro-inflamatorni Th1 imunski odgovor.

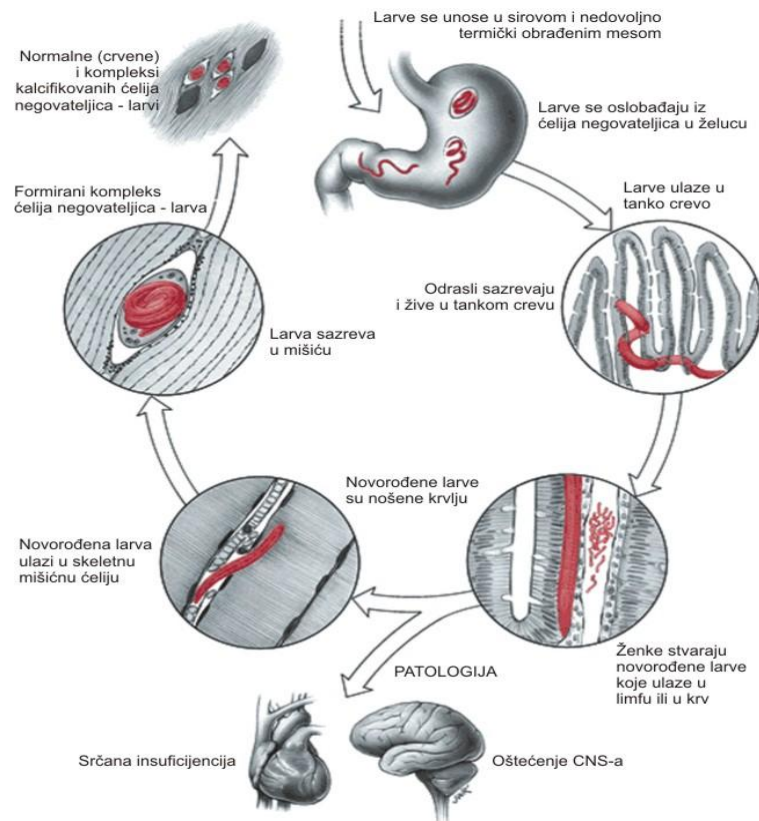
U kliničkoj studiji, helminske terapije multiple skleroze HINT 1 i 2 u Americi, pacijenti su dobijali po 2500 jaja parazita *Trichuris suis* (*T. suis*) oralno (Fleming i sar., 2011). Nakon tretmana broj aktivnih lezija u CNS-u bio je smanjen. U serumu ovih pacijenata postojao je povećan nivo citokina IL-4 i IL-10, kao i povišen broj Treg ćelija CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻ fenotipa, za koje je još od ranije utvrđeno da su smanjene u MS-u (Baecher-Allan i sar., 2011). Slična klinička studija je urađena i u Nemačkoj gde su pacijenti sa hroničnim oblikom MS oralno dobijali po 2500 jaja parazita *T. suis* tokom 6 meseci u razmacima od 2 nedelje (Benzel i sar., 2012). Pacijenti su tokom tretmana bili neurološki stabilni. Imunološka istraživanja su pokazala da su pacijenti u početku razvili Th1 tip imunskog odgovora sa povećanom produkcijom IL-2 i IFN- γ dok je tokom drugog meseca terapije došlo do predominacije Th2 imunskog odgovora. Trenutno u Notingemu, Constantinescu i saradnici vode kliničku studiju primene po 25 larvi parazita *Necator americanus* kod pacijenata sa hroničnim oblikom MS čiji će rezultati dati detaljan uvid u imunološki status ovih bolesnika nakon terapije parazitima jer je planirana analiza citokinskog profila, broja CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija i Breg ćelija.

Jedna od najbitnijih činjenica je da su do sada sve kliničke studije primene parazita u lečenju MS-a bile bezbedne po pacijente i da su imale povoljan uticaj na tok bolesti. Ipak primena živih parazita ne predstavlja optimalnu metodu lečenja. Izolovanje i definisanje produkata parazita koji bi mogli da imaju imunomodulatornu ulogu značajno bi pomoglo u pronalaženju novih i prihvatljivijih pristupa korišćenja parazita za lečenje autoimunskih bolesti. Očekuje se da će u budućnosti ove bezbedne i efikasne anti-inflamatorne molekule koje su paraziti milionima godina akumulirali, naučnici uspeti da identifikuju i da će nastati nova vrsta lekova tzv. „imunobiotici“ (eng. Immunobiotics) koji bi bili korišćeni za lečenje autoimunskih bolesti (Clancy, 2003).

1.4. Parazit *Trichinella spiralis*

Nematode iz roda *Trichinella* su jedne od najrasprostranjenijih zoonotskih parazita na svetu. Infekcija ovim helmintom je opisana kod domaćih i divljih životinja svih kontinenata osim Antarktika (Pozio i Murrell, 2006). Danas se zna da ovaj rod čine 9 vrsta (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *T. patagoniensis*) i 3 genotipa (*Trichinella* T6, T8, T9) kao i dva oblika, inkapsulirani i neinkapsulirani (Pozio i Zarlenga, 2013; Krivokapich i sar., 2012; Gottstein i sar., 2009).

T. spiralis je jedinstvena nematoda po tome što se čitav životni ciklus odvija u okviru jednog domaćina. Ima tri stadijuma životnog ciklusa - adulti, novorođene larve i mišićne larve. Dva od tri stadijuma životnog ciklusa - mišićna larva i adult su intracelularna (Slika 2) (Wu i sar., 2008; Yepez-Mulia i sar., 2007).



Slika 2. Životni ciklus parazita *Trichinella spiralis* (preuzeto iz Despommier, Gwadz, Hotez, Knirsch, Parasitic Diseases 5th ed.)

Trihinelozu nastaje konzumiranjem svežeg ili nedovoljno termički obrađenog mesa i mesnih preradevina koje sadrže infektivne, mišićne larve (L1) ovog parazita (Gottstein i sar., 2009). Kada se u organizam unese inficirano meso, larve bivaju oslobođene pod dejstvom gastrointestinalnih enzima u želucu, aktivirane dejstvom žučnih sokova i odlaze u tanko crevo. Tu paraziti prodiru u mukoza tankog creva, rastu i sazrevaju. U toku sazrevanja larve se 4 puta presvlače (stadijumi L2 - L4) i postaju polno zrele (adultne forme) posle oko 30h. Nakon 6-7 dana od infekcije, kada se odigra kopulacija, odrasle ženke počinju da produkuju novorođene larve (eng. new born larvae - NBL) i taj proces traje do kraja života ženki (period eliminacije odraslih parazita varira od 2 nedelje kod

glodara do 5-6 nedelja kod ljudi). Najveći broj novorođenih larvi migrira kroz submukozu i laminu propriu i putem krvi i limfe dospeva do poprečno-prugastih mišića (Guiliano i sar., 2009; Despommier, 1998), gde prodiru u mišićne ćelije i sazrevaju u infektivne L1 larve (Bruschi, 2002). Na svom putu ka poprečno-prugastim mišićima novorođene larve putem cirkulacije prolaze kroz različite organe uključujući srce, mozak i jetru, izazivajući prolaznu inflamaciju i oštećenje tkiva. Samo larve koje dospeju do mišića mogu preživeti. Invadirane mišićne ćelije podležu de-diferencijaciji i učestvuju u stvaranju potpuno nove i organizmu nepoznate vrste ćelija tzv. „ćelije negovateljice”. Miocit gubi svoje do tada posedovane kontraktilne proteine u toku prvih 8 dana, jedro se deli i nastaje od 40 do 60 nukleusa po ćeliji negovateljici (Wu i sar., 2005). Parazit reprogramira gensku ekspresiju miocita na taj način što produkuje oko 40 različitih glikoproteina, od kojih neki nose za *T. spiralis* specifičan šećer - tivozozu. Ovi produkti parazita dovode do povećane ekspresije 184 gena u mišićnoj ćeliji. Pretpostavlja se da su neki od tih gena odgovorni za ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju, ćelijski ciklus i sintezu molekula sa pro- i sa anti-apoptotskim efektom neophodnih za nastanak i opstanak ćelije negovateljice. Kao posledica traume izazvane prodorom parazita dolazi do aktivacije i proliferacije satelitskih ćelija koje su neophodne za regeneraciju mišićnih ćelija (Matsuo, 2000). Satelitske ćelije se nalaze u istom omotaču kao i mišićna ćelija, ali su od nje odvojene ćelijskom membranom. Satelitske ćelije se se nakon aktivacije samo delimično diferencijuju, fuzionišu sa de-diferentovanim miocitima u potpuno novi tip ćelija koji do tada nije postojao u organizmu domaćina pri čemu snabdevaju ćeliju negovateljicu citoplazmatskim sadržajem (Wu i sar., 2001).

Period od kada larva uđe u mišićnu ćeliju do formiranja kompleksa parazita i ćelije negovateljice traje 21 dan (Despommier, 1998). Kod inkapsuliranih vrsta *Trichinella* u koje spada i *T. spiralis*, ćelije negovateljice bivaju obavijene kolagenom (kapsula) i mrežom novih krvnih sudova. Kolagen tip IV je sintetisan od strane ćelije negovateljice i čini unutrašnji sloj kapsule, dok je kolagen tip VI sintetisan od okolnih fibroblasta i čini spoljašnji sloj kapsule (Despommier, 1998). Tako nastaje cista u kojoj larve opstaju i zadržavaju svoju infektivnost dugi niz godina, zavisno od vrste domaćina. Kapsula je polupropustljiva membrana i omogućava prolaz hranljivih materija male molekulske mase

u pravcu parazita kao i ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi (ES L1) u pravcu domaćina, ali je nepropustljiva za antitela specifična za komponente parazita. Zato se kaže da parazit ima imunoprivilegovano mesto u organizmu domaćina i nekada može da živi koliko i sam domaćin, ali kod ljudi najčešće dolazi do kalcifikacije kapsule i uginuća najvećeg broja parazita posle nekoliko meseci (Bruschi, 2002).

1.5. Antigeni parazita *Trichinella spiralis*

Antigeni parazita *T. spiralis* se dele u 3 grupe: površinske, ekskretorno-sekretorne i somatske antigene (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999). Površinski molekuli na kutikuli parazita i ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi predstavljaju mesta dodira i interakcije sa organizmom domaćina i odgovorni su za akutni inflamatorni odgovor, dok u hroničnoj fazi infekcije samo ES L1 antigeni utiču na imunski odgovor domaćina (Ilic i sar., 2012). S obzirom da parazit ima 3 stadijuma životnog ciklusa, neki od ovih molekula su karakteristični za pojedine stadijume životnog ciklusa (stadijum-specifični) dok su drugi prisutni u svim stadijumima (Nakada i sar., 2005). Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum parazita dolazi do promena u ekspresiji antigenskih molekula, kako površinskih tako i ES L1 što može biti jedna od strategija izbegavanja odbrane domaćina. Postoji više podela antigena parazita *Trichinella spiralis*.

Antigeni mišićnih larvi parazita *Trichinella spiralis* najbolje su okarakterisani. Njihova klasifikacija je vršena na 2 načina: na osnovu bifaznog karaktera produkcije antitela u toku infekcije i na osnovu saznanja dobijenih primenom monoklonskih antitela. Na osnovu bifaznog karaktera produkcije antitela u toku infekcije sa *T. spiralis* oni se dele u dve grupe. Jednu grupu čine antigeni koji indukuju sintezu antitela u ranoj, intestinalnoj fazi infekcije. Ti antigeni se nalaze u unutrašnjim slojevima kutikule, hemolimfi, embrionskim omotačima, hipodermalnoj žlezdi, stihocitima i egzokrinim granulama reproduktivnog trakta mišićnih larvi. Ta, rana faza odgovora na prisustvo larvi specifična je za antigene koji sadrže fosforilholin (PC) (Morelle i sar., 2000; Takahashi i sar., 1993). PC grupa je prisutna kod nekoliko glikoproteina koji se oslobađaju tokom presvlačenja larvi, a ne nalaze se u sastavu ES produkata niti na površini mišićne larve. Drugu grupu čine

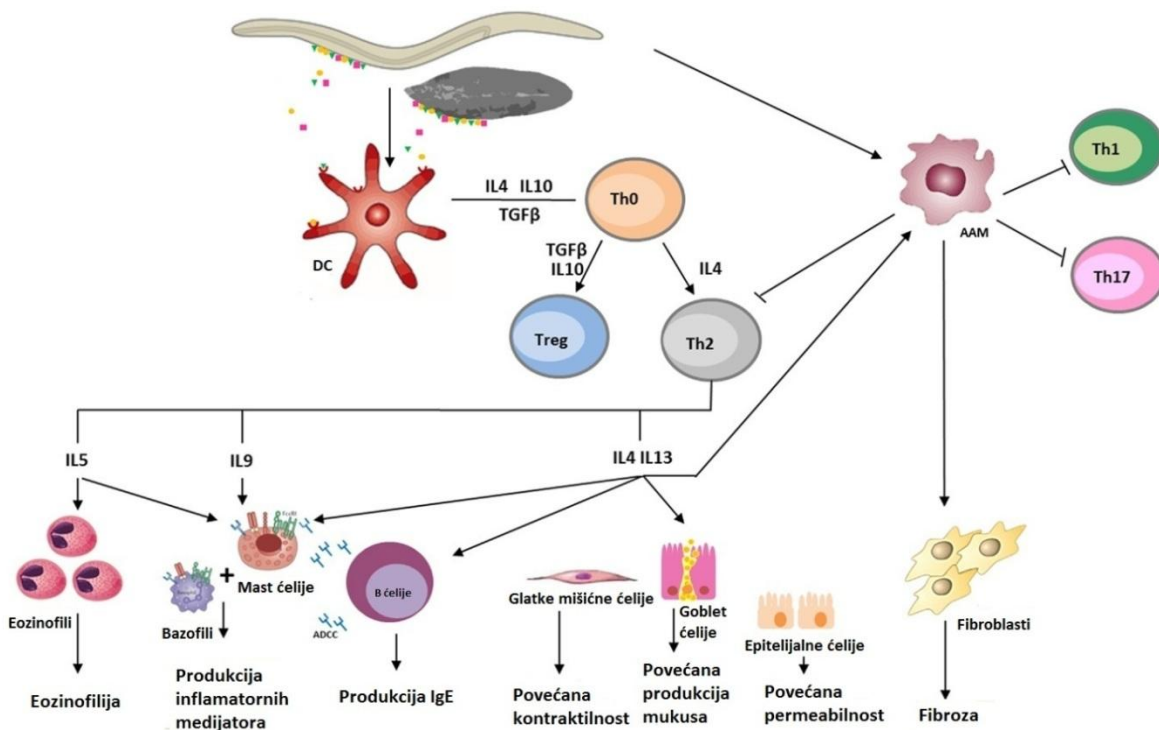
antigeni koji indukuju kasnu fazu humoralnog imunskog odgovora i izazivaju pojavu antitela 4-5 nedelja nakon infekcije, kada se L1 larve nalaze u mišićima (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999). Oni se nalaze na površini, stihocitnim granulama i u ES produktima L1 larvi *T. spiralis* (Takahashi, 1997), označeni su kao TSL antigeni. Antigeni koji indukuju kasnu fazu odgovora organizma su uglavnom glikoproteini od kojih neki sadrže karakterističan šećer - tivelozu (β -vezana 3,6-dideoksi-D-arabinohekszoza) (Ellis i sar., 1997; Takahashi i sar., 1993).

Primenom monoklonskih antitela antigeni mišićnih larvi *T. spiralis* su klasifikovani u 8 grupa (TSL1-TSL8) (Yepez-Mulia i sar., 2007; Appleton i sar., 1991). TSL-1 antigeni su glikoproteini koji potiču iz stihozoma *T. spiralis* (glandularna struktura od 50-75 diskoidnih ćelija stihocita u prednjoj polovini L1 larve) i zastupljeni su kako u ES L1 produktima tako i na površini kutikule parazita (Bolas-Fernandez i sar., 2006; Takahashi, 1997). Većina TSL-1 antigena sadrži tivelozu, šećer karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog genusa *Trichinella* (Gomez-Morales i sar., 2008; Romaris i sar., 2003; Arasu i sar., 1994). Specifična, anti-TSL1 antitela dominantno prepoznaju glikoproteine molekulske mase između 40 i 70 kDa kako u homogenatu mišićne larve tako i u ES L1 produktima u Western blotu (Ortega-Pierres i sar., 1996). Primenom monoklonskog antitela 7C2C5 dokazano je prisustvo epitopa specifičnog samo za stadijum mišićnih larvi čitavog genusa *Trichinella*. Taj epitop je lociran na tripletu antigena molekulske mase 45, 49, 53 kDa (Gamble i Graham, 1984). Druga istraživanja su pokazala da je glikoprotein od 53 kDa prisutan u ES L1 produktima kako mišićne larve *T. spiralis* tako i odraslih parazita i da se antitela protiv ove komponente pojavljuju 8 dana posle infekcije (Romaris i sar., 2003), što ukazuje na njegovu ulogu u indukciji ranog odgovora tokom infekcije ovim parazitom (Nagano i sar., 2008). TSL-1 antigeni privlače posebnu pažnju istraživača od kada je pokazano na modelu infekcije kod miša da oni mogu izazvati stvaranje antitela koja učestvuju u protekciji od reinfekcije (Bolas-Fernandez i sar., 2006; Ortega-Pierres i sar., 1996). Ovi antigeni se oslobađaju (sekretuju ili ekskretuju) najpre u intestinum ubrzo nakon infekcije, a potom ponovo kada se NBL larve nasele u mišićima i počne njihova transformacija u L1 formu, što ukazuje na njihovu značajnu ulogu u uspostavljanju i održavanju parazitizma.

U molekularnoj osnovi parazitizma *T. spiralis* nalazi se proces nastanka i održavanja ćelije negovateljice. Tu ES L1 produkti mišićnih larvi imaju ključnu ulogu kao signalni molekuli (Guiliano i sar., 2009; Wu i sar., 2008). Eksperimentalno je pokazano da ćelije domaćina odgovaraju na ove signalne molekule. Oni se sa jedne strane ponašaju kao antigeni (koji bivaju prezentovani putem antigen-prezentujućih ćelija), dok sa druge strane imaju i direktno dejstvo: 1. na genetskom nivou u pravcu transformacije kontraktilnih ćelija u ćelije negovateljice (Wu i sar., 2008) i 2. na imunski odgovor domaćina koji ih prepoznaje kao citokine (parakini - analozi citokina), ili druge funkcionalne proteine (Despommier, 1998). Ispitivanja ES L1 produkata mišićne larve *T. spiralis* korišćenjem MALDI/TOF masene spektrometrije i laser hromatografske masene spektrometrije omogućila su identifikaciju 43 peptidna fragmenta od 52 koji su analizirani kao najznačajniji sekretorni glikoproteini (Robinson i Connolly, 2005). Pomenuta 43 peptidna fragmenta predstavljaju samo 13 različitih proteina što ukazuje na postojanje multipnih izoformi proteina u sastavu ES antigena mišićnih larvi *T. spiralis* (Robinson i sar., 2005). Danas se zna da su specifična antitela u serumima inficiranih ljudi i/ili životinja ona koja reaguju sa antigenima TSL1 grupe, ali još uvek nije ostvaren konsenzus po pitanju pojedinih proteinskih komponenti koje moraju biti prepoznate. Tako imunodijagnostički značaj u detekciji specifičnih antitela imaju glikoproteinske komponente ES L1 antigena od 45, 49 i 53 kDa (Ilic i sar., 2014), zatim od 43, 45 i 53 kDa (Nagano i sar., 2009), 45, 50 i 55 kDa (Gomez-Morales i sar., 2008) kao i antigene u opsegu od 45 do 55 kDa (Yapez-Mulia i sar., 2007) i antigene od 43-44 i 64 kDa (Yera i sar., 2003). Do sada je pokazano da se u ES L1 produktima mišićnih larvi nalaze: proteini toplotnog šoka, endonukleaze, proteinaze, protein-kinaze, inhibitori proteinaza, superoksid-dismutaze, glikozidaze, glikani, mucini, lektini, parakini (Nagano i sar., 2009). Kao zajedničke proteine mišićnih larvi i adultnih oblika parazita, koje prepoznaju anti-*Trichinella spiralis* antitela i koji mogu imati značajnu ulogu u ranoj dijagnostici, Bien i saradnici (2015) su označili 5-nukleotidazu, enolazu i HSP70 (eng. Heat shock protein, HSP) od ukupno 17 proteinskih komponenti koje su analizirali i identifikovali.

1.6. Imunski odgovor na infekciju parazitom *T. spiralis*

Urođeni imunski sistem predstavlja prvu liniju odbrane organizma od infekcija parazitima, ali i drugim patogenima. Efektorski mehanizmi urođenog imuniteta se aktiviraju odmah nakon infekcije u cilju uništavanja patogena tako da već posle nekoliko časova od kontakta parazita i domaćina dolazi do inflamatorne reakcije, ali se pri tome pokreće i adekvatan stečeni imunski odgovor domaćina preko aktivacije dendritskih ćelija. Taj prvi odgovor je odgovor na antigene koji nisu specifični za vrstu. Inflamaciju na nivou tankog creva u početnoj fazi karakteriše prisustvo neutrofila, a zatim se u efektorske mehanizme odbrane protiv parazita uključuju i mastociti, eozinofili i IgE. Na intestinalom nivou imunski odgovor na infekciju parazitom *T. spiralis* zavisi od prisustva CD4⁺ T-ćelija (Riedlinger i sar., 1986; Grecis i sar., 1985). Prvih dana infekcije javlja se tip 1 citokinskog odgovora (Th1), pro-inflamatorni po karakteru, koji utiče na nastanak odbrambenog, inflamatornog odgovora na nivou creva. Posle 8 dana of infekcije, u vreme kada počinje ekspulzija adultnih parazita iz creva, dolazi do preusmeravanja na citokinski odgovor tipa 2 (Th2) koji je važan za kontrolu inflamacije na intestinalnom nivou i perzistira do kraja akutne i tokom hronične faze infekcije. Citokini karakteristični za Th2 odgovor kod trihineloze su IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Patel i sar., 2009), IL-21 (Frohlich i sar., 2007), IL-25 (Wang i sar., 2007) i IL-33 (Humphreys i sar., 2008) (Slika 3). Ove citokine prvenstveno proizvode T-ćelije, uz učešće B-ćelija, eozinofila, mast ćelija i bazofila.



Slika 3. Imunski odgovor na helminte (preuzeto iz Montaner i sar., 2014); T_h1 - T_h1 limfociti; T_h2 - T_h2 limfociti; T_h17 - T_h17 limfociti; Treg - T regulatorni limfociti; AAM - alternativno aktivirani makrofagi; DC - dendritske ćelije; $TGF\beta$ - transformišući faktor rasta β ; IL - interleukin.

U intestinalnoj fazi odbrane od parazita značajnu ulogu ima aktivacija mastocita pod uticajem IL-4 i IL-13 koje proizvode T_h2 limfociti, kao i B-ćelija specifičnih za antigene koje proizvode IgE antitela (Bruschi i Chiumiento, 2012; Paul i Zhu, 2010). Mast ćelije prisutne u mukozi creva oslobađaju histamin, himaze i citokine koje povećavaju permeabilitet creva i time omogućavaju lakši prolaz antitelima do mesta na kome se nalazi parazit. IgE se u lumenu creva veže za parazitske antigene i pomaže eozinofilima da ih prepoznaju i na taj način vrši prevenciju invazije (Bruschi i Chiumiento, 2012). Infekciju parazitom *T. spiralis* takođe prati i povećana ekspresija IL-5, koji ima važnu ulogu u diferencijaciji eozinofila (Haig i Miller, 1990). Eozinofilija u krvi i tkivima je tipičan odgovor na infekciju nematodama, a to naročito važi za *T. spiralis* (Bruschi i sar., 2008).

Eozinofili su uključeni i u mehanizam odbrane od novorođenih larvi putem ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitela (engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Venturiello i sar., 1995). Eozinofili svoju citotoksičnost za novorođene larve ostvaruju oslobađanjem glavnog baznog proteina, peroksidaze ili reaktivnih oblika kiseonika (Venturiello i sar., 1993). Takođe, zna se da eozinofili imaju imunoregulatornu ulogu kao ćelije koje aktiviraju dendritske ćelije i CD4⁺ T-ćelije da produkuju IL-10 (Huang i sar., 2014). Na modelu eksperimentalnih infekcija je pokazano da IL-5 ima ulogu i u protekciji eozinofila od apoptoze (Gon i sar., 1997). Ispitivanja na miševima koji su deficitarni za IL-5, pokazala su da ovaj citokin igra važnu ulogu u reinfekcijama jer nedostatak IL-5 uzrokuje oslabljenu odbranu od sekundarne infekcije sa *T. spiralis* (Svensson-Frej, 2011; Fabre i sar., 2009; Vallance i sar., 2000). Eozinofili u mišićnoj fazi infekcije imaju ulogu u zaštiti samog parazita jer potpomažu preživljavanje larvi putem produkcije IL-10, a rast larvi sekrecijom IL-4 (Huang i sar., 2014), a takođe štite i organizam domaćina od reinfekcije (Huang i sar., 2015).

Za makrofage, neutrofile i ćelije prirodne ubice (engl. Natural Killer cells, NK) dugo se smatralo da su odgovorne samo za pokretanje Th1 tipa odgovora. Međutim, pokazano je da makrofage u prisustvu Th2 citokina IL-4, IL-13 i IL-21 poprimaju fenotip alternativno aktiviranih makrofaga koji imaju povećanu ekspresiju MHC II molekula, CD40, CD80 i CD86 (Pesce i sar., 2006). Ovako nastali makrofagi imaju potencijal da usmere imunski odgovor u Th2 pravcu produkcijom anti-inflamatornih medijatora (IL-10, IL-13 i TGF-β), ali i malih količina pro-inflamatornih medijatora, kao što su NO, IL-12 i IL-18 (Martinez i Gordon, 2014). Takođe, utvrđeno je da neutrofile mogu učestvovati u Th2 odgovoru i da su u nekim slučajevima uključeni u ubijanje parazitskih nematoda (Porthouse i sar., 2006). Tokom intestinalne faze infekcije NK-ćelije luče IL-13 koji deluje na intestinalne epitelne ćelije i uzrokuje patološke promene koje se odlikuju atrofijom vilusa i hiperplazijom kriпти i peharastih ćelija (McDermott i sar., 2005).

Mišićnu fazu infekcije karakteriše kombinovani Th1/Th2 imunski odgovor uz dominaciju Th2 tipa koji je praćen produkcijom citokina IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, kao i umanjenom, ali ne u potpunosti ukinutom produkcijom IFN-γ (Lee i Ko, 2006). Tokom mišićne faze prvo dolazi do inflamacije na mestu prodora novorođenih larvi, a zatim do

njihove transformacije u mišićne larve čije preživljavanje omogućavaju pristigli eozinofili koji štite parazita (Huang i sar., 2014; Gebreselassie i sar., 2012). Takođe, u mišićnoj fazi dolazi do aktivacije anti-inflamatornih i regulatornih mehanizama koji su odgovorni za kontrolu i ograničavanje inflamacije u mišićnom tkivu. U ovaj proces uključuju se i Treg ćelije i citokini koje one proizvode, odnosno IL-10 i TGF- β koji su značajni za kontrolu i supresiju Th1 odgovora i regulaciju nivoa inflamacije oko ćelije negovateljice čime omogućavaju dug opstanak mišićnih larvi parazita u organizmu domaćina (Patel i sar., 2009; Beiting i sar., 2007).

1.7. Uloga dendritskih ćelija u infekciji helmintima

Hronične helmintske infekcije se odlikuju usmeravanjem imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa. U ovom usmeravanju imunskog odgovora važnu ulogu imaju DC koje prepoznaju helmintske antigene i predstavljaju ih T-limfocitima. Nakon stimulacije DC helmintskim antigenima dolazi do njihovog delimičnog sazrevanja. Fenotip ovih nedovoljno zrelih ćelija odlikuje se niskim nivoom ekspresije MHC II i kostimulatornih molekula, niskom produkcijom pro-inflamatornih citokina i povećanom produkcijom anti-inflamatornog citokina IL-10 (Gruden-Movsesijan i sar., 2011; Ilic i sar. 2011, 2008; MacDonald i Maizels, 2008). Ovakve DC koje nastaju nakon aktivacije antigenima parazita označavaju se kao tolerogene DC (Zaccone i sar., 2003). Iako fenotipski manje zrele, ove DC su u stanju da promovišu intenzivnu antigen-specifičnu CD4⁺ T-ćelijsku proliferaciju i Th2 diferencijaciju (MacDonald i Maizels, 2008). Naime, nakon prepoznavanja antigena, DC ga prerađuju u native peptide i prezentuju T-limfocitima na površini ćelije u sklopu MHC molekula II klase (signal 1) što je praćeno ekspresijom kostimulatornih molekula CD40, CD80 i CD86 (signal 2). Različiti solubilni molekuli koje DC oslobađa ili molekuli vezani za membranu DC koji usmeravaju T-ćelijsku diferencijaciju u pravcu Th1 ili Th2 ćelija smatraju se faktorima polarizacije (signal 3). U slučaju indukcije Th1 odgovora DC pojačano proizvode IL-12, dok citokini IL-1, IL-6 ili IL-23 usmeravaju imunski odgovor ka Th17 tipu (van Beelen i sar., 2007; Kapsenberg, 2003). IL-4 i IL-10 su u početnim istraživanjima bili označeni kao signali koji

usmeravaju ka Th2 polarizaciji, međutim pokazano je da DC dobijene od IL-4 i IL-10 deficitarnih miševa mogu da stimulišu Th2 imunski odgovor. Danas se zna da IL-10 koji proizvode DC ima važniju ulogu u uspostavljanju tolerancije i regulatornog tipa imunskog odgovora nego u pokretanju Th2 odgovora (MacDonald i Maizels, 2008).

U slučaju pojedinih helmintskih infekcija identifikovani su antigeni koji putem interakcije sa DC indukuju Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora (MacDonald i Maizels, 2008). Najbolje izučeni helmintski antigeni u tom smislu su solubilni antigen jaja (eng. soluble egg antigens - SEA) parazita *Shistosoma mansoni* (Perona-Wright i sar., 2006), ES produkti parazita *Nippostrongylus brasiliensis* (Balic i sar., 2004) i *Acanthocheilonema viteae* (ES-62) (Harnett i Harnett, 2010). Istraživanja su pokazala da DC u prisustvu SEA antigena parazita *Shistosoma mansoni* nemaju povećanu ekspresiju kostimulatornih molekula, ali mogu da indukuju Th2 imunski odgovor (Kane i sar., 2004; Thomas i Harn, 2004). Dillon i saradnici (2004) su opisali da izo-fosfatidil serin poreklom iz SEA ovog parazita promovise diferencijaciju CD4⁺ T-limfocita koji proizvode IL-4 i IL-10. Takođe, fosfatidil serin iz SEA parazita *S. mansoni*, može da usmeri diferencijaciju DC tako da one indukuju Th2 tip imunskog odgovora i aktivaciju Treg ćelija koje proizvode IL-10 (van der Kleij, 2002). Stimulacija DC sa ES antigenima *Nippostrongylus brasiliensis* (NES) indukuje nezreo fenotip ovih ćelija, sa smanjenom produkcijom IL-6 i IL-12 kao i ekspresijom kostimulatornih molekula, ali uz očuvanu sposobnost indukcije Th2 imunskog odgovora (Balic i sar., 2004). Još jedan primer helmintskih antigena čiji je efekat na polarizaciju imunskog odgovora detaljnije izučavan je i ES produkt filarialne nematode *Acanthocheilonema viteae* molekulske mase 62 kDa (ES-62). Ovaj antigen je glikoprotein bogat fosforilholinom i istraživanja su pokazala da ima značajnu ulogu u imunomodulatornom dejstvu ES produkata nematode *A. viteae* na imunski odgovor domaćina (Goodridge i sar., 2007; Goodridge i sar., 2005). Nakon stimulacije ES-62 antigenom *A. viteae*, DC delimično sazrevaju i indukuju povećanu koncentraciju IL-4 i smanjenu koncentraciju IFN- γ produkovanih od strane T-limfocita (Whelan i sar., 2000). ES-62 ne samo što predstavlja signal za aktivaciju DC i makrofaga koja vodi ka supresiji produkcije pro-inflamatornih citokina, već inhibira i efektorsku funkciju mast ćelija (Melendez i sar., 2007). Očigledno je da se stepen ekspresije površinskih markera na DC

stimulisanim parazitskim antigenima razlikuje u zavisnosti od vrste parazita i njegovih antigena, ipak takve DC usmeravaju imunski odgovor ka Th2 i/ili regulatornom tipu (van Riet i sar., 2007).

Kao i mnogi drugi helminti, *T. spiralis* se smatra majstorom imunomodulacije s obzirom da se u organizmu domaćina mišićna larva nalazi na imunoprivilegovanom mestu tj. u ćeliji negovateljici, odakle ES L1 produktima komunicira sa organizmom domaćina i utiče na ćelije imunskog sistema (Despommier, 1998). Na način koji do sada još nije sasvim objašnjen, *T. spiralis* indukcijom regulatornih mehanizama i rebalansiranjem statusa tolerancije dovodi organizam domaćina do novog nivoa homeostaze. Pokazano je da DC pod uticajem ES L1 antigena parazita *T. spiralis* delimično sazrevaju (Ilic i sar., 2008), kao i da aplikacija ES L1 antigenima stimulisanih DC dovodi do formiranja imunološkog statusa koji odgovara onom kakav se formira u toku hronične infekcije ovim helmintom (Gruden-Movsesijan i sar., 2011). Podaci dobijeni u ovim istraživanjima ukazali su na mogućnost kreiranja novog pristupa u tretmanu EAE-a koji bi podrazumevao upotrebu DC stimulisanih ES L1 antigenima u pre-tretmanu životinja kojima će se indukovati EAE, kao i primenu samog ES L1 antigena parazita pre indukcije EAE-a čime bi se ispitaio kapacitet metaboličkog antigena *T. spiralis* da moduliše tok autoimunskog oboljenja posredstvom DC ili samostalno.

2. CILJEVI

Da bi se ispitaio uticaj ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi parazita *T. spiralis* (ES L1), na tok i modulaciju EAE-a, kao i mehanizmi koji se nalaze u osnovi tog uticaja postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Uspostaviti kulturu dendritskih ćelija poreklom iz kostne srži DA pacova i stimulisati dendritske ćelije ES L1 antigenima *T. spiralis*.
2. Ispitati da li različite doze dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima aplikovanih DA pacovima 7 dana pre indukcije EAE-a dovode do značajne redukcije simptoma autoimunske bolesti.
3. Ispitati da li direktno davanje ES L1 antigena *T. spiralis* DA pacovima dovodi do modulacije EAE-a i odrediti na koji način to zavisi od doze i frekvencije davanja antigena.
4. Pratiti produkciju pro-inflamatornih (IFN- γ , IL-17) i anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10, TGF- β), kao i procentualnu zastupljenost CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-ćelija na sistemskom nivou (ćelije slezine) i na nivou ciljnog organa, tj. kičmene moždine (ćelije infiltrata) i to u induktivnoj, efektorskoj i fazi oporavka od EAE-a.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima je korišćeno 210 pacova ženskog pola genetski visokosrodnog soja Dark Agouti (DA) starosti od 12 do 14 nedelja, uzgajanih na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Sve procedure u radu sa životinjama bile su u skladu sa pravilnikom i odobrenjima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu i Etičke komisije INEP-a. Životinje su bile podeljene u grupe od po 5 životinja i imale su slobodan pristup vodi i hrani.

3.2. Parazit *Trichinella spiralis*

Parazit *Trichinella spiralis* održava se u INEP-u serijskom pasažom na Wistar pacovima (zdrave životinje odgajane su na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije u Beogradu). Primenom izoenzimskih analiza izvršenih 1991. godine u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite, Rim, Italija (European Union Reference Laboratory for Parasites, Institute Superiore di Sanita, Rome, Italy) potvrđena je pripadnost ovog parazita T1 genskom pulu, kao i da se radi o vrsti *T. spiralis*. Izolat je obeležen kao ISS161. U cilju izolacije mišićnih larvi, pacovi su inficirani sa po 5000 infektivnih mišićnih larvi *T. spiralis* i žrtvovani 3 meseca posle infekcije.

3.2.1. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) parazita *T. spiralis*

Nakon žrtvovanja inficiranih pacova koji služe za održavanje soja, uklanjanja kože i unutrašnjih organa, vrši se usitnjavanje tkiva mlevenjem u blenderu. Infektivne mišićne larve (L1 stadijuma) izolovane su metodom enzimske digestije u veštačkoj digestivnoj tečnosti (1% rastvor pepsin-HCl, pH 1,6-1,8 u toku 30 min na 46 °C, uz konstantno mešanje) na magnetnoj mešalici. Nakon završene digestije sadržaj je preliven preko sita promera 180 mikrometara u levak za sedimentaciju u kome sadržaj stoji 30 min. Zatim je ispušteno 40 ml u epruvetu za centrifugiranje. Nakon 10 min, primenom vakuma pokupljeno je gornjih 30 ml tečnosti, a preostalih 10 ml preliveno u Petri šolju. Epruveta je

isprana sa još 10 ml toplog fosfatnog pufera (PBS-a), ispirak uliven u prethodno sipanih 10 ml u petri šolju i izbrojane su L1 larve *T. spiralis* na stereomikroskopu. Larve su potom isprane toplim PBS-om, resuspendovane u PBS-u i korišćene za infekciju životinja kao i za pripremu ekskretorno-sekretornih (ES) produkata parazita.

3.2.2. Dobijanje ekskretorno-sekretornih (ES) produkata L1 larvi parazita *T. spiralis*

Ekskretorno-sekretorni (ES) produkti L1 larvi *T. spiralis* dobijeni su kultivacijom izolovanih larvi u kompletnom DMEM medijumu (Sigma, Nemačka, sa 10mM Hepesa, 2mM L-glutamina, 1mM Na-piruvata i 50 U/ml gentamicina) tokom 18-20 h na 37°C, uz prisustvo 5% CO₂. Nakon kultivacije larve su izdvojene spontanom taloženjem u konusnim epruvetama, a medijum sa prisutnim ES produktima parazita filtriran je preko 0,22 µm membrane (Millipore, SAD), dijalizovan prema fiziološkom rastvoru u zapremini 3 puta većoj od zapremine polaznog medijuma i koncentrovan preko Amicon sistema (Stirred cells 8400 i 8010, Amicon Corp, SAD) uz korišćenje membrana za ultrafiltraciju čija je veličina pora 10.000 NMWL (Amicon PM 10 Ultrafiltration Discs, polyethersulfone). Kvalitet izolovanog antigena je testiran u ELISA testu, a antigen je čuvan na -80°C do upotrebe.

3.3. Dobijanje i gajenje dendritskih ćelija poreklom iz kostne srži DA pacova

Dendritske ćelije iz kostne srži dobijene su prema proceduri opisanoj od strane Ilic i saradnika (2008). Kostna srž izolovana je iz femura i tibije DA pacova ispiranjem kostnih kanala pomoću šprica sa medijumom za ispiranje (RPMI 1640 sa 2% FCS) i igle promera 23G. Dobijena ćelijska suspenzija je profiltrirana kroz sterilnu mrežicu čije su pore 100 µm (BD Biosciences, SAD) u cilju uklanjanja detritusa. Ćelije su zatim centrifugirane na 1800 rpm, 10 minuta na 6°C. Talog je potom resuspendovan u medijumu sa 10% FCS, eritrociti su lizirani hemolizinom (NH₄Cl, pH 7,3) u trajanju od 10 minuta, a nakon toga ćelije su još jednom ispirane i resuspendovane u medijumu. Potom su ćelije postavljene u kulturu u ploče sa 6 bazena i to 5 x 10⁶ ćelija/bazenu u po 2 ml medijuma za kultivaciju RPMI 1640

(PAA Laboratories, Austrija) sa 2 mM L-glutaminom, 1 mM Na-piruvatom, 10 mM Hepesom, 50 U/ml gentamicina, 50 μ M 2-merkaptetanolom (Sigma, Nemačka), obogaćenim sa 10% FCS kao i faktorima rasta: po 25 ng/ml pacovski rekombinantni GM-CSF, IL-4 i humani Flt-3 ligand (Biosource Invitrogen, SAD). Ova kombinacija faktora rasta korišćena je prema proceduri koju su opisali Brissette-Storkus i saradnici (2002). Kultivacija je vršena u inkubatoru na 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Trećeg i sedmog dana od početka kultivacije ćelija vršeno je osvežavanje medijuma tj. iz svakog bazena sakupljeno je po 1 ml medijuma, centrifugirano i ćelijski talozi su resuspendovani u adekvatnoj zapremini svežeg medijuma za kultivaciju sa faktorima rasta i potom je po 1 ml medijuma vraćen u bazene sa ćelijama. Osmog dana je osim zamene medijuma, vršena i stimulacija ćelija sa po 50 μ g/ml ES L1 antigena *T. spiralis* ili sa 200 ng/ml LPS. Nestimulisane ćelije su korišćene kao negativna kontrola. Stimulacija ES antigenima trajala je 48 h, a potom su sakupljene neadherentne stimulisane i nestimulisane ćelije, određena im je vijabilnost i vršena fenotipska karakterizacija (ekspresija površinskih markera).

3.4. Određivanje ekspresije površinskih markera na dendritskim ćelijama

Ekspresija površinskih markera na DC nakon stimulacije antigenima *T. spiralis* analizirana je pomoću protočnog citofluorimetra tj. FACS analizom. Za površinsko bojenje, najmanje 1×10^5 ćelija je isprano u puferu za FACS (PBS sa 1% BSA i 0,05% NaN₃) centrifugiranjem na 1500 rpm, 10 minuta na 6°C. Za blokiranje Fc γ receptora korišćeno je antitelo na Fc receptor (FcR Ab, BD Biosciences, Švedska) u trajanju od 30 minuta na 4°C. Nakon ovog koraka sledilo je još jedno ispiranje u puferu za FACS. Ćelije su potom inkubirane sa antitelima protiv površinskih markera u trajanju od 30 minuta na 4°C.

Za fenotipsku analizu DC poreklom iz kostne srži DA pacova korišćena su sledeća FITC-om obeležena monoklonska antitela: anti-MHC II, anti-CD54 (ICAM-1) i anti-CD86 (B7-2) (Abcam PLC, Velika Britanija). Ćelije inkubirane sa neobebeženim antitelima su nakon toga inkubirane sa sekundarnim antitelom tj. anti-pacov IgG obebeženim sa FITC (INEP, Beograd) u trajanju od 30 min na 4°C. Nakon svake inkubacije sa antitelima sledilo

je ispiranje u puferu za FACS, a nakon poslednjeg ispiranja ćelije su fiksirane u puferu za FACS koji sadrži 1% formaldehida i čuvane na 4°C do analize. Očitavanje rezultata vršeno je na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Nemačka) i podaci su obrađeni u FlowJo programu (Tree Star Inc, SAD).

3.5. Aplikovanje DC stimulisanih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* DA pacovima

DC, nestimulisane ili stimulisane ES L1 antigenom *T. spiralis*, intraperitonealno su aplikovane DA pacovima u tri doze ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 i 5×10^6 ćelija po pacovu) i to 7. dana pre indukcije EAE-a u cilju određivanja optimalnog broja stimulisanih DC potrebnog za modulaciju autoimuskog oboljenja. DA pacovi kojima su aplikovane nestimulisane DC predstavljali su kontrolne životinje.

3.6. Aplikovanje ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima

Ženkama DA pacova vršena je direktna aplikacija ES L1 antigena parazita *T. spiralis* intraperitonealno. Aplikacija ES L1 antigena je rađena u dve doze (150 i 250 µg), u jednom ili dva termina pre indukcije EAE-a da bi se odredila optimalna doza i dinamika aplikovanja antigena potrebna za modulaciju autoimuskog oboljenja. Životinje su podeljene u 4 grupe od po 5 DA pacova i intraperitonealno im je data različita doza ES L1 antigena *T. spiralis* u PBS-u u jednom ili dva termina. Za davanje u jednom terminu aplikovano je 150 µg (ES L1/150 µg + EAE) ili 250 µg ES L1 antigena (ES L1/250 µg + EAE) 7 dana pre indukcije EAE, a za davanje u dva termina aplikovano je 150 µg (ES L1/2x150 µg + EAE) ili 250 µg ES L1 antigena (ES L1/2x250 µg + EAE) i to 14. i 7. dana pre indukcije EAE-a. Pacovi kojima je aplikovan PBS bili su kontrolna grupa (EAE). Praćenje kliničkih znakova bolesti kod životinja trajalo je 25 dana. DA pacovi žrtvovani su 8., 15. i 25. dana nakon indukcije EAE-a u cilju izolovanja ćelija slezina i infiltrata kičmenih moždina radi određivanja produkcije citokina, da bi se utvrdili mehanizmi koji se nalaze u osnovi procesa modulacije autoimunske bolesti.

3.7. Indukcija EAE-a

DA pacovi kojima je izvršena aplikacija stimulisanih ili nestimulisanih DC, odnosno ES L1 antigena *T. spralis* ili PBS-a, imunizovani su homogenatom kičmene moždine (50% m/v u puferizovanom fiziološkom rastvoru) u kompletnom Frojndovom adjuvansu (CFA, Sigma, Nemačka) koji sadrži 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*. EAE je indukovano subkutanom injekcijom 0,1 ml encefalitogene emulzije u zadnju desnu šapu.

Životinje su posmatrane svakodnevno tokom 25 dana trajanja oglada i praćena je pojava kliničkih znakova EAE-a (neurološki znaci i gubitak telesne mase). EAE se klinički manifestuje atonijom repa, parezom i paralizom zadnjih ekstremiteta, uz povremenu pojavu inkontinencije urina. Dan kad su registrovani prvi znaci bolesti, najčešće atonija repa, označavan je kao početak bolesti. Klinička slika je bodovana na skali indeksa bolesti od 0-4, na sledeći način:

- 0- odsustvo kliničkih manifestacija bolesti;
- 1- parcijalna ili kompletna atonija repa (gubitak repnog tonusa);
- 2- pareza zadnjih ekstremiteta;
- 3- kompletna bilateralna paraliza zadnjih ekstremiteta obično praćena sa inkontinencijom;
- 4- moribudno stanje ili smrt životinje.

Ukoliko su klinički znaci bili blaži nego što su imenovani na skali, obeležavani su intermedijarnom vrednosti.

Nekoliko parametara bolesti je određivano da bi se procenila težina EAE-a:

1. incidencija (broj DA pacova u jednoj grupi koji su razvili bolest čiji je indeks 1 ili više, u odnosu na ukupan broj životinja u grupi);
2. srednji dan pojave bolesti (srednji dan kada obolele životinje u grupi razviju prve kliničke znake bolesti);
3. srednji dnevni indeks bolesti (srednja vrednost indeksa bolesti za sve životinje u grupi u tom danu, uključujući i životinje koje nisu razvile EAE);

4. srednja maksimalna vrednost težine bolesti (srednja vrednost maksimalnih vrednosti indeksa bolesti za svaku životinju u grupi u toku eksperimenta);
5. kumulativni indeks bolesti (zbir svih srednjih dnevnih indeksa bolesti po broju dana trajanja eksperimenta);
6. procenat gubitka telesne mase (srednja vrednost promene telesne težine u grupi u odnosu na početnu težinu).

Sve životinje su praćene od 8. do 25. dana od indukcije EAE-a. DA pacovi su žrtvovani 8. (induktivna faza), 15. (efektorska faza) i 25. (faza oporavka od bolesti) dana zbog određivanja produkcije citokina i procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T-ćelija.

3.8. Izolovanje i gajenje ćelija iz slezine

Životinje su žrtvovane u induktivnoj, efektorskoj i fazi oporavka od EAE-a (odnosno 8., 15. i 25. dana posle indukcije bolesti). Slezine DA pacova su aseptički uklonjene, a zatim je sadržaj slezine istisnut iz kapsule i resuspendovan u medijumu RPMI-1640 (PAA Laboratories, Austrija) obogaćenim sa 5% FCS (PAA Laboratories, Austrija) kao i antibiotikom. Ćelije su zatim izolovane centrifugiranjem na gradijentu gustine „Ficoll-rompacon“ (Sigma, SAD) (u odnosu 12:5) na 4000 rpm tokom 15 min. Prsten od mononuklearnih ćelija koji se formirao iznad faze gradijenta je pokupljen, a dobijene ćelije su isprane dva puta u medijumu na 1200 rpm, 10 min. Ćelijski talog je tretiran hemolizinom (NH₄Cl, pH 7,3) radi uklanjanja eritrocita. Nakon ispranja u medijumu, ćelije su resuspendovane i izbrojane. Ćelije su gajene u pločama za ćelijsku kulturu sa 24 bazena (2 x 10⁶ ćelija/bazenu) u prisustvu nespecifičnog stimulusa - 2,5 µg/ml Concanavalina A (ConA) (INEP, Beograd) ili samo u medijumu, na 37 °C, sa 5% CO₂. Posle 48h prikupljeni su supernatanti ćelijskih kultura i čuvani za određivanje koncentracije citokina, a ćelije su korišćene i za površinska i unutarćelijska bojenja antitelima za određivanje prisustva i proporcije Treg ćelija u populaciji efektorskih ćelija.

3.9. Izdvajanje i gajenje ćelija infiltrata kičmene moždine

Ekstrakcija kičmene moždine DA pacova urađena je nakon perfuzije tkiva životinja fiziološkim rastvorom. Tkivo je homogenizovano pomoću čelične mrežice u medijumu RPMI-1640 (PAA Laboratories, Austrija) obogaćenim sa 2% pacovskog seruma kao i antibiotikom. Dobijena suspenzija ćelija je zatim centrifugirana na 1700 rpm tokom 5 min. Talog ćelija je resuspendovan u 40%-nom „Percoll“-u i pažljivo naslojen na 70%-ni „Percoll“ (Sigma, SAD). Nakon centrifugiranja na 2250 rpm tokom 50 min formirao se prsten mononuklearnih ćelija između dva sloja gradijenta gustine. Ćelije su potom pažljivo pokupljene i isprane u medijumu na 2200 rpm tokom 10 min. Ćelijski talog je resuspendovan i ćelije su izbrojane. Nakon toga, ćelije su zasejane u otvorima ploča sa 96 mesta (5×10^5 ćelija/bazenu) bez stimulacije tokom 72h na 37 °C, sa 5% CO₂. Potom su pokupljeni supernatanti kultura i čuvani za određivanje koncentracije citokina, a ćelije su korišćene i za površinska i unutarćelijska bojenja antitelima za određivanje prisustva i proporcije Treg ćelija u populaciji efektorskih ćelija.

3.10. Određivanje koncentracije citokina primenom ELISA testa

U supernatantima kultura ćelija slezine i infiltrata kičmene moždine određene su koncentracije pro-inflamatornih (IFN- γ , IL-17) i anti-inflamatornih citokina (IL-4, IL-10, TGF- β) primenom enzimskog imunotesta (ELISA) i to za IL-17 korišćenjem Murine IL-17 ELISA Development Kit (PeproTech, SAD), za IL-4, IL-10 i IFN- γ korišćenjem odgovarajućih BD OptEIA Set Rat sistema (BD Biosciences, SAD), kao i za TGF- β korišćenjem ELISA kompleta za pacovski TGF- β 1 (R&D Systems, SAD) prema uputstvima proizvođača.

3.11. Određivanje broja Foxp3⁺ T regulatornih ćelija

U cilju određivanja procentualne zastupljenosti Foxp3⁺ Treg ćelija u populaciji izolovanih ćelija slezine i infiltrata kičmene moždine, ćelije su inkubirane sa antitelima specifičnim za markere Treg ćelija - CD4, CD25 i Foxp3 obeleženim fluorohromima. Nakon sakupljanja iz kulture, po 1×10^6 ćelija/uzorku, isprano je u puferu za FACS (PBS sa 1% bovine serum albumina (BSA) i 0,05% NaN₃) centrifugiranjem na 1500 rpm, 5 minuta na 6°C. Potom su ćelije inkubirane sa antitelima na površinske markere T-limfocita: anti-pacov CD4 obeleženim sa FITC-om, anti-pacov CD25 obeleženim sa PE-om (eBioscience, SAD) i odgovarajućim izotipskim kontrolama: FITC ili PE obeleženim IgG2 pacova. Antitela su korišćena u razblaženju 1:100 u puferu za FACS. Usledilo je ispiranje ćelija u puferu za FACS, a potom fiksiranje i permeabilizacija ćelija u odgovarajućem puferu Fix/Perm (eBioscience, SAD) preko noći na 4°C. Nakon toga ćelije su isprane puferom za permeabilizaciju (eBioscience, SAD) i inkubirane sa antitelom za intracelularni marker Treg ćelija tj. anti-pacov Foxp3 obeleženim sa PECy5 ili odgovarajućom izotipskom kontrolom tj. PECy5 obeležen IgG1 pacova (eBioscience, SAD). Antitela su korišćena u razblaženju 1:50 u puferu za permeabilizaciju, inkubacija je trajala 30 minuta na 4°C. Nakon inkubacije ćelije su isprane 2 puta u puferu za permeabilizaciju, resuspendovane u puferu za FACS sa 1% formaldehida i čuvane na 4°C do analize na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Nemačka). Podaci su obrađeni u FlowJo programu (TreeStar Inc, SAD).

3.12. Statističke analize

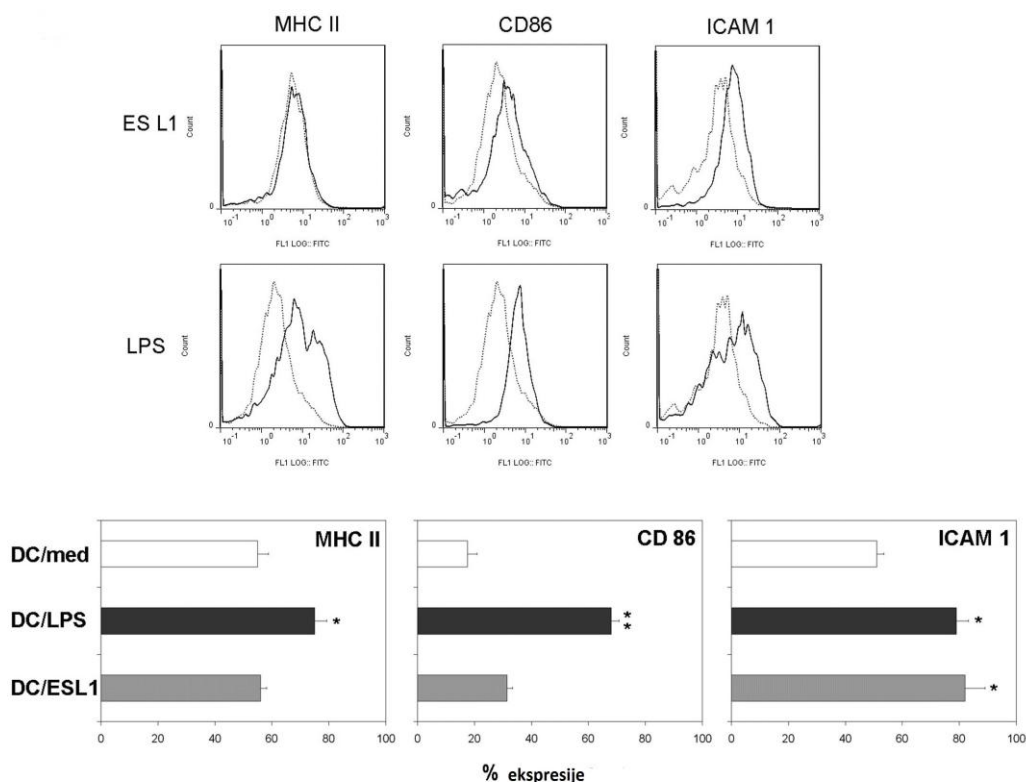
Svi rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD (standardna devijacija). Za određivanje statističke značajnosti primenjen je Studentov *t* test. U svim testovima vrednosti verovatnoće (*p*-vrednosti) manje od 0,05 smatrane su značajnim, a manje od 0,01 visoko značajnim.

3.REZULTATI

4.1. Karakterizacija dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis*

Da bi se ispitaio efekat aplikacije različitih doza dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* na tok i modulaciju EAE-a, najpre su izolovane dendritske ćelije iz kostne srži DA pacova i stimulirane navedenim antigenima (DC/ES L1) ili LPS-om kao faktorom koji izaziva potpuno sazrevanje DC (DC/LPS). Kontrolne dendritske ćelije su gajene u medijumu (nestimulirane ćelije, DC/med). Nakon stimulacije određena je vijabilnost ćelija i izvršena njihova fenotipska karakterizacija ispitivanjem ekspresije površinskih markera. Takođe, funkcionalna karakterizacija ovih ćelija izvršena je ispitivanjem produkcije citokina IL-12p70 i IL-10.

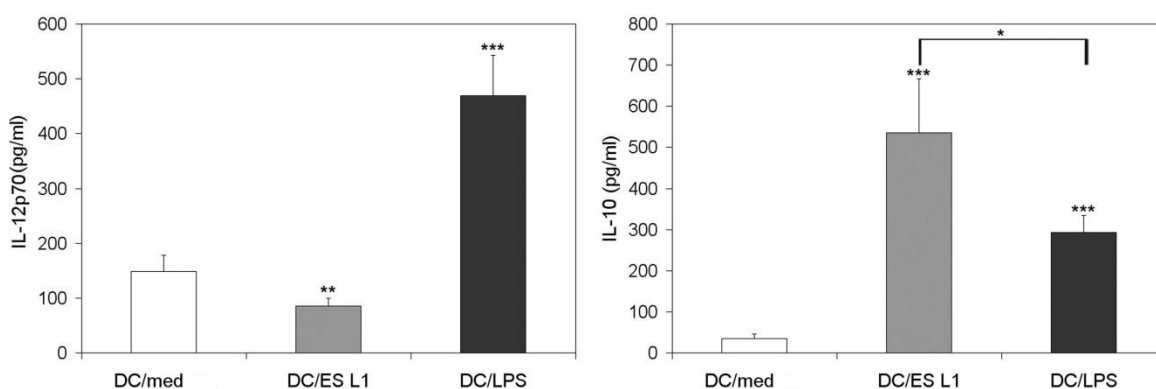
Kontrolne ćelije su imale morfološke karakteristike nezrelih DC. Stimulacija DC sa ES L1 antigenima indukovala je umereno povećanje ekspresije površinskog markera CD 86 ($31,4 \pm 1,9$ nasuprot $17,5 \pm 3,4$ kod kontrolnih DC), statistički značajno povećanje ICAM-1 ($82 \pm 7,1$ nasuprot $51 \pm 2,5$; $p < 0,05$), dok u ekspresiji MHC molekula II klase nije bilo razlike u odnosu na kontrolne ćelije gajene u medijumu ($56 \pm 2,2$ nasuprot $55 \pm 3,8$) što ukazuje da su DC/ES L1 imale karakteristike nepotpuno zrelih DC. Stimulacija DC bakterijskim LPS-om je izazivala sazrevanje ćelija koje se odlikuje statistički značajno povećanom ekspresijom svih ispitivanih markera (Slika 4).



Slika 4. Ekspresija površinskih markera MHC II, CD 86 i ICAM-1 na DC poreklom iz kostne srži DA pacova stimuliranih sa ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* (DC/ESL1) ili sa LPS-om (DC/LPS). Negativna kontrola DC/med (nestimulirane DC) je predstavljena histogramima isprekidanih linija. Prikazana je i procentualna zastupljenost ekspresije ispitivanih markera na DC nakon stimulacije sa ES L1 ili LPS-om u poređenju sa nestimuliranim DC. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 4 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nivoi citokina IL-12p70 i IL-10 analizirani su u ćelijskim supernatantima. Pokazano je da DC stimulirane ES L1 antigenima proizvode znatno manje IL-12p70, citokina neophodnog za Th1 imunski odgovor, u odnosu na kontrolne ćelije ($85,1 \pm 14,3$ nasuprot $149,1 \pm 29,3$ kod nestimuliranih DC; $p < 0,01$). U isto vreme, produkcija IL-10 je bila značajno povećana u DC nakon stimulacije sa ES L1 ($536,2 \pm 98,5$ nasuprot $39,8 \pm 7,4$ kod nestimuliranih DC; $p < 0,005$), što bi moglo da ukazuje na potencijal ovih ćelija da indukuju toleranciju (Slika 5). Kao definisani Th1 stimulator, LPS je provokirao intenzivnu produkciju IL-12p70 od strane DC ($456,2 \pm 85,5$ nasuprot $149,1 \pm 29,3$ kod nestimuliranih

DC; $p < 0,001$). Zapaženo je i da je LPS indukovao značajno povećanje nivoa IL-10 u poređenju sa nivoom detektovanim kod nestimuliranih ćelija ($285,1 \pm 43,5$ nasuprot $39,8 \pm 7,4$; $p < 0,001$), no taj nivo je bio dvostruko niži od nivoa produkcije IL-10 koji je zapažen kod DC stimuliranih sa ES L1 antigenima.



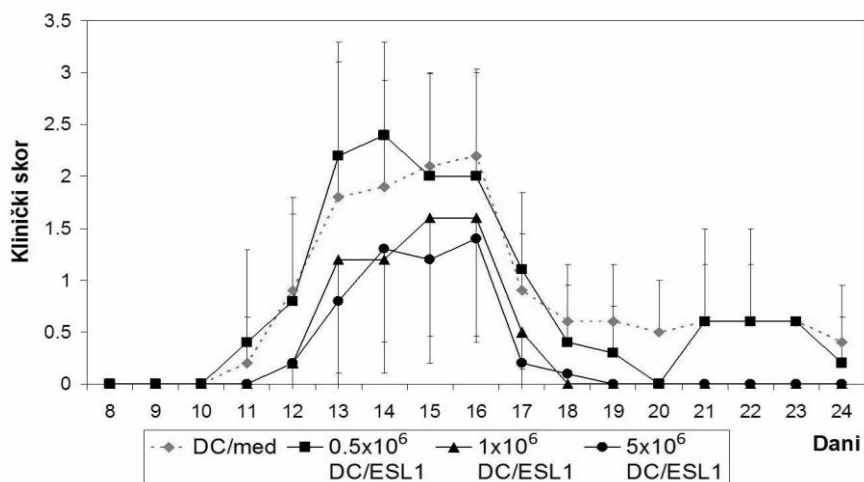
Slika 5. Aktivacioni status DC pod uticajem ES L1 antigena parazita *T. spiralis* ili LPS-a prećen je preko određivanja citokina IL-12p70 i IL-10 u kulturi ćelija. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 4 urađena sa sličnim rezultatima ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2. Aplikacija dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* i njihov uticaj na pojavu i tok EAE-a - Efekat različitih doza

Životinje su podeljene u grupe od po 5 DA pacova i intraperitonealno im je data različita doza dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* (DC/ES L1) - $0,5 \times 10^6$, 1×10^6 i 5×10^6 , 7 dana pre indukcije EAE-a. Pacovi kojima je aplikovano 5×10^6 dendritskih ćelija kultiviranih samo u medijumu bili su kontrolna grupa (DC/med).

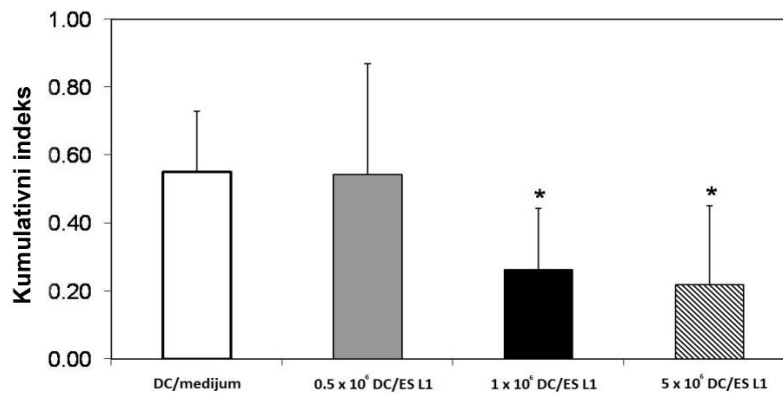
Životinje su kontrolisane svakodnevno tokom 25 dana nakon indukcije EAE-a. Praćena je pojava neuroloških znakova bolesti. Rezultati koji ukazuju na efekat različitih doza dendritskih ćelija na pojavu, razvoj i tok EAE-a dobijeni su u dva odvojena eksperimenta.

Svi DA pacovi u kontrolnim grupama razvili su bolest približno jednake težine. Prvi klinički znaci javili su se između 11. i 14. dana posle indukcije EAE-a i dostigli su svoj maksimum između 13. i 16. dana (Slika 5). Većina životinja u kontrolnim grupama oporavila se do kraja perioda posmatranja od 25 dana. Srednji maksimalni stepen težine bolesti kod kontrolne grupe bio je $2,4 \pm 0,6$ (Tabela 3).



Slika 6. Efekat tretmana različitim dozama DC/ES L1 – $0,5 \times 10^6$, 1×10^6 i 5×10^6 , 7 dana pre indukcije EAE-a na razvoj neuroloških znakova EAE-a. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

Različite aplikovane doze dendritskih ćelija stimulisanih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* imale su različite efekte na razvoj EAE-a. Najniža doza od $0,5 \times 10^6$ DC/ES L1 nije imala uticaj na tok bolesti, dok su veće ispitivane doze ćelija imale uticaj na tok bolesti u smislu njenog ublažavanja, a koji je bio direktno zavisano od primenjene doze (Slike 6, 7).



Slika 7. Efekat tretmana različitim dozama DC/ES L1 na težinu EAE-a prikazanu kroz vrednost kumulativnog indeksa. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$

Incidencija EAE-a bila je najniža kod DA pacova koji su primili 5×10^6 DC/ES L1 (6/10) u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama, iako ova razlika nije dostigla statističku značajnost (Tabela 2).

Životinje tretirane sa 1×10^6 i 5×10^6 DC/ES L1, kod kojih je došlo do razvoja bolesti, imale su veoma blage kliničke znake, niži srednji maksimalni stepen težine bolesti ($1,8 \pm 1,3$ za 1×10^6 DC/ES L1; $1,6 \pm 1,5$ za 5×10^6 DC/ES L1) i statistički značajno niži kumulativni indeks ($0,26 \pm 0,2$ za 1×10^6 DC/ES L1; $0,22 \pm 0,2$ za 5×10^6 DC/ES L1) u odnosu na kontrolnu grupu (maksimalni klinički skor $2,4 \pm 0,6$ i kumulativni indeks $0,55 \pm 0,2$). U grupi tretiranoj najnižom dozom ćelija od $0,5 \times 10^6$ DC/ES L1, maksimalni klinički skor ($2,4 \pm 0,9$) i kumulativni indeks bolesti ($0,5 \pm 0,3$) bili su slični kao u kontrolnoj grupi (Tabela 2).

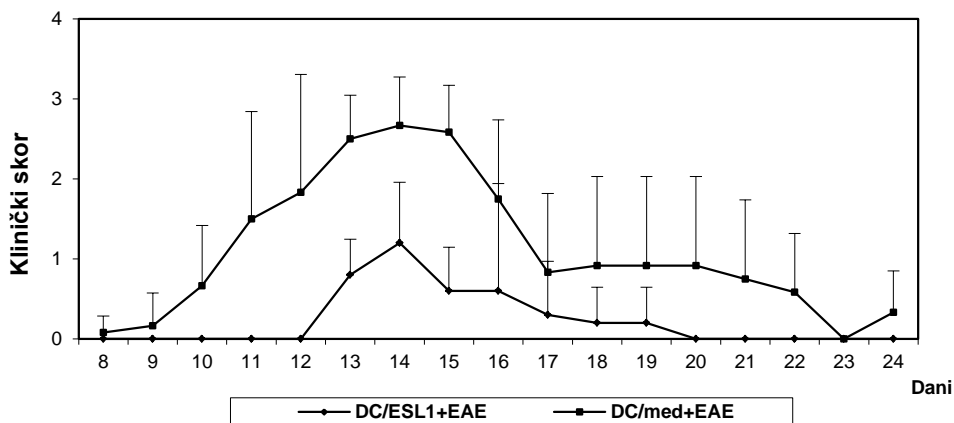
Tretman životinja sa DC stimulisanim sa ES L1 antigenima nije doveo do odlaganja početka bolesti, ali je značajno skratio trajanje EAE-a kod životinja tretiranih dozom od 1×10^6 , a naročito 5×10^6 DC/ES L1 (Tabela 2).

Tabela 2. Efekat tretmana DA pacova dendritskim ćelijama stimulisanim ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* na razvoj i tok EAE-a. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Grupe	Incidencija	Početak bolesti	Trajanje bolesti	Maksimalni klinički skor	Kumulativni indeks
DC/medijum	100%	12,4 \pm 1,1	9,4 \pm 3,7	2,4 \pm 0,6	0,6 \pm 0,2
0,5 x 10 ⁶ DC/ES L1	100%	12,2 \pm 0,8	7,2 \pm 2,5	2,4 \pm 0,9	0,5 \pm 0,3
1 x 10 ⁶ DC/ES L1	100%	12,8 \pm 0,5	4,2 \pm 2,4*	1,8 \pm 1,3	0,3 \pm 0,2*
5 x 10 ⁶ DC/ES L1	60%	13 \pm 1,0	3,0 \pm 3,1**	1,6 \pm 1,5	0,2 \pm 0,2*

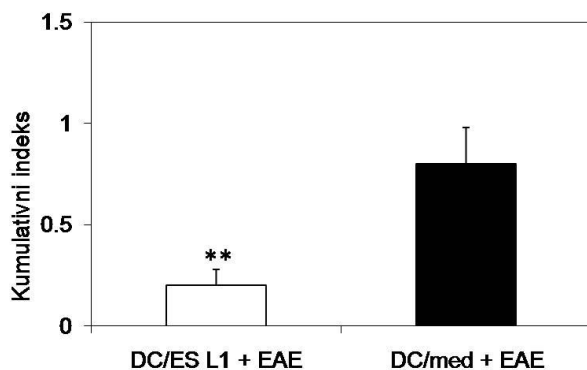
4.2.1. Ispitivanje uticaja tretmana sa 5 x 10⁶ DC/ES L1 na razvoj i tok EAE-a na model sistemu DA pacova

Rezultati dobijeni u prethodnim eksperimentima pokazuju da je kod životinja tretiranih sa 1 x 10⁶ i 5 x 10⁶ DC/ES L1 bolest statistički značajno kraće trajala i da su imale najniži kumulativni indeks u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, doza od 5 x 10⁶ DC/ES L1 je imala najveći uticaj na promenu toka EAE-a. Svi parametri koji ukazuju na težinu bolesti (incidencija, maksimalni klinički skor, kumulativni indeks, dužina trajanja bolesti) bili su značajno sniženi u ovoj grupi životinja u odnosu na kontrolnu. Stoga, da bismo potvrdili dobijene rezultate i stekli uvid u mehanizme koji se nalaze u osnovi imunomodulacije EAE-a, eksperiment je ponovljen sa prethodno pomenutom izabranom dozom DC/ES L1.



Slika 8. Efekat tretmana sa 5×10^6 DC/ES L1 na razvoj neuroloških znakova EAE-a. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

Životinje kojima je aplikovano 5×10^6 DC/ES L1 (DC/ES L1) pre indukcije EAE-a razvile su blaži oblik bolesti sa značajno sniženim parametrima kao što je maksimalni klinički skor u odnosu na kontrolne DA pacove koji su primili DC u medijumu (DC/med) ($1,4 \pm 0,8$ naspram $3,0 \pm 0,1$; $p < 0,05$) (Slika 8, Tabela 3). Takođe, kumulativni indeks bolesti je kod tretiranih životinja bio niži nego kod kontrolnih ($0,2 \pm 0,1$ naspram $0,8 \pm 0,3$; $p < 0,01$) (Slika 9, Tabela 3).



Slika 9. Efekat tretmana sa 5×10^6 DC/ES L1 na težinu EAE-a (u odnosu na kontrolne DA pacove koji su primili nestimulisane DC prikazan kroz vrednosti kumulativnog indeksa. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$.

Dužina trajanja bolesti kod životinja koje su dobile 5×10^6 DC/ES L1 pre indukcije EAE-a bila je značajno skraćena ($3,0 \pm 2,5$ kod tretiranih naspram $9,7 \pm 4,1$ kod kontrolnih DA pacova; $p < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Efekat tretmana izabranom dozom od 5×10^6 DC/ES L1 na razvoj i tok EAE-a. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Grupe	Incidencija	Početak bolesti	Trajanje bolesti	Maksimalni klinički skor	Kumulativni indeks
DC/med	100%	$10,8 \pm 1,9$	$9,7 \pm 4,1$	$3,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$
5×10^6 DC/ES L1	60%	$13,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 2,5^{**}$	$1,4 \pm 0,8^*$	$0,2 \pm 0,1^{**}$

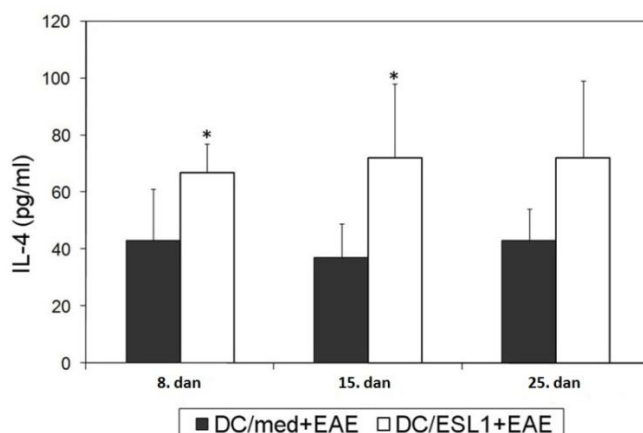
U cilju detaljnog ispitivanja mehanizama koji se nalaze u osnovi imunomodulacije toka EAE-a kod svih životinja, tretiranih sa DC/ES L1 ili netretiranih, izolovani su splenociti i ćelije infiltrata kičmenih moždina u cilju određivanja produkcije citokina na sistemskom (ćelije slezine) i na nivou ciljnog organa (ćelije infiltrata kičmenih moždina). Životinje su u grupama od po 5 DA pacova žrtvovane u induktivnoj (8. dan), efektorskoj (15. dan) i fazi oporavka od bolesti (25. dan).

4.2.2. Uticaj primene DC stimulisanih ES L1 antigenima na imunski odgovor na nivou slezinskih ćelija u toku EAE-a

Na sistemskom nivou, u splenocitima izolovanim iz životinja kojima su aplikovane DC/ES L1, 8. dana nakon indukcije EAE-a nivo produkcije IL-4 bio je statistički značajno

povišen ($67 \pm 10,1$ pg/ml) u odnosu na produkciju ovog citokina kod kontrolnih životinja (43 ± 18) (Slika 10).

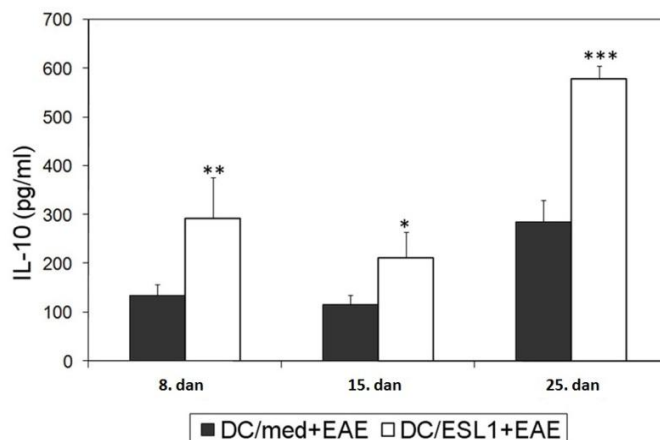
Statistički značajno viši nivo produkcije ovog citokina, u odnosu na životinje koje su primile nestimulisane DC, zadržava se kod životinja tretiranih sa DC/ES L1 i u efektorskoj fazi bolesti (15. dan) (72 ± 36 naspram 37 ± 12 ; $p < 0,05$). U fazi oporavka od bolesti nije bilo statistički značajnih razlika u produkciji IL-4 između tretirane i kontrolne grupe životinja (72 ± 27 naspram $43 \pm 10,2$). Dobijeni rezultati ukazuju da profilaktička primena DC stimulisanih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* obezbeđuje skretanje ka Th2 imunskom odgovoru, bez obzira na indukciju EAE-a.



Slika 10. Produkcija citokina IL-4 u slezini 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$.

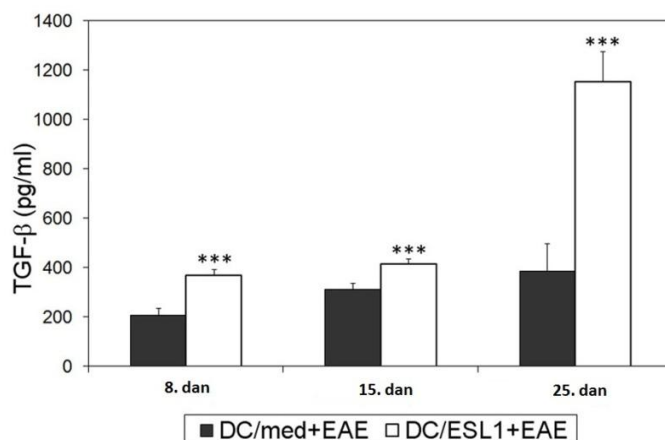
IL-10 je citokin čija se funkcija dovodi u vezu sa Th2 i regulatornim tipom imunskog odgovora. Tretman DC/ES L1 izaziva statistički značajno visok nivo produkcije IL-10 u poređenju sa kontrolnim životinjama u splenocitima tokom svih faza bolesti (8. dan: $293 \pm 82,5$ nasuprot $135 \pm 21,4$; $p < 0,01$; 15. dan: $211,4 \pm 53,5$ nasuprot $115,2 \pm 19,9$; $p < 0,05$; 25. dan: $578,1 \pm 27,1$ nasuprot $285,5 \pm 43,7$; $p < 0,005$) (Slika 11). Najveća razlika u produkciji ovog citokina između tretiranih i netretiranih životinja bila je u fazi oporavka

od bolesti. Aplikacija DC stimulisanih ES L1 antigenima pre indukcije EAE-a održava povišen nivo Th2 i anti-inflamatornih citokina nakon indukcije bolesti.



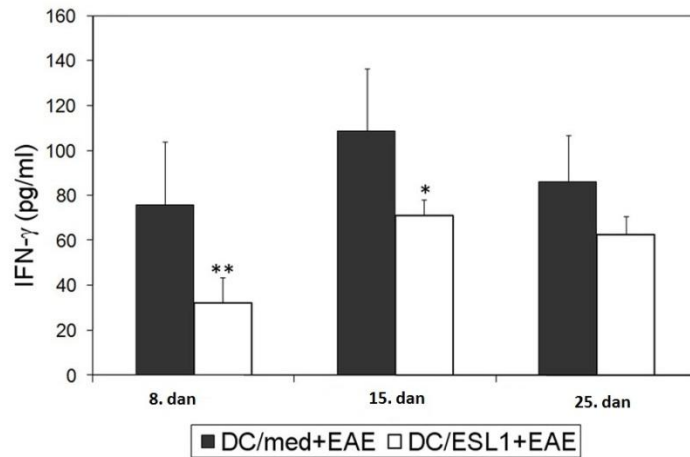
Slika 11. Produkcija citokina IL-10 u slezini 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

TGF- β je citokin koji se dovodi u vezu sa regulatornim tipom imunskog odgovora. Aplikovanje DC/ES L1 životinjama pre indukcije autoimunske bolesti izaziva statistički značajno povišen nivo produkcije TGF- β u splenocitima tretiranih u poređenju sa kontrolnim životinjama tokom svih faza bolesti (8. dan: $367,4 \pm 25,9$ nasuprot $235,6 \pm 29,6$; $p < 0,005$; 15. dan: $412,6 \pm 21,6$ nasuprot $312,1 \pm 25,8$; $p < 0,005$; 25. dan: 1170 ± 130 nasuprot 362 ± 21 ; $p < 0,005$) (Slika 12). Tokom faze oporavka, 25. dana bolesti, nivo produkcije ovog citokina bio je najviši kod tretiranih DA pacova u poređenju sa kontrolnim. Profilaktički primenjene DC stimulisane ES L1 antigenima održavaju povišen nivo regulatornih citokina nakon indukcije EAE-a.



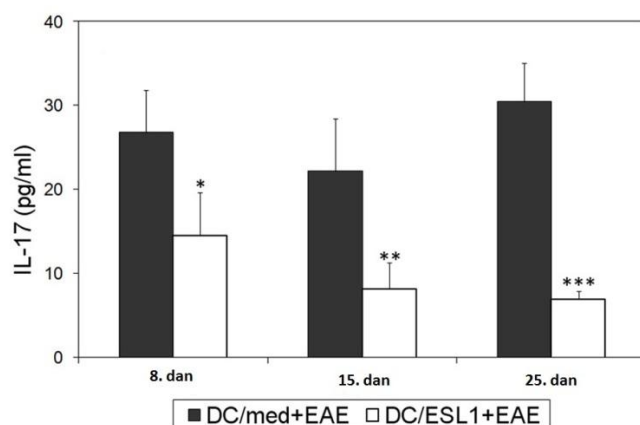
Slika 12. Produkcija citokina TGF- β u slezini 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; *** $p < 0,005$.

IFN- γ je ključni citokin imunskog odgovora Th1 tipa, a značajan je jer prati razvoj EAE-a. Aplikovanje DC/ES L1 snižava produkciju ovog citokina u ćelijama slezina tretiranih DA pacova u induktivnoj i efektorskoj fazi bolesti u odnosu na kontrolne životinje. Nivo produkcije IFN- γ je 8. dana nakon indukcije EAE-a kod tretiranih pacova bio dvostruko niži u odnosu na kontrolne životinje ($32,2 \pm 11,3$ nasuprot $75,8 \pm 28$; $p < 0,01$). U efektorskoj fazi bolesti razlika u produkciji ovog citokina zadržava statističku značajnost u korist DC/ES L1 tretirane grupe životinja ($70,9 \pm 7,1$ nasuprot $108,7 \pm 27,8$ $p < 0,05$). Tokom faze oporavka od bolesti zapaženo je da je produkcija IFN- γ i dalje niža kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolne, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost ($62,6 \pm 8,2$ naspram $86,1 \pm 20,6$) (Slika 13).



Slika 13. Produkcija citokina IFN- γ u slezini 8., 15. i 25. dana bolesti DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 i kontrolne grupe životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

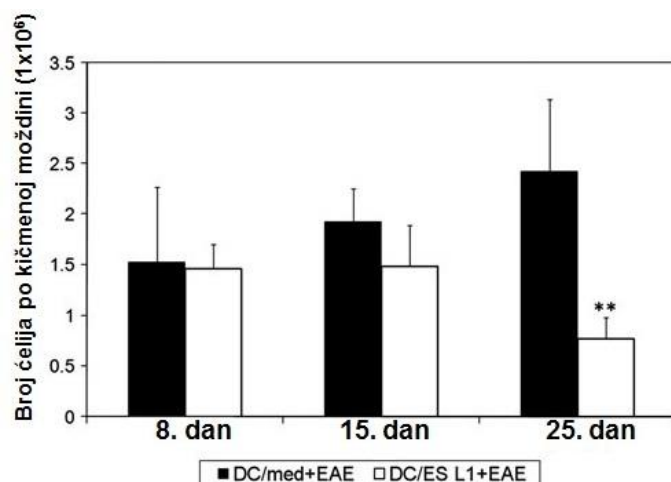
IL-17 je ključni citokin imunskog odgovora Th17 tipa koji ima ulogu u inflamatornom procesu kod različitih autoimunskih i hroničnih inflamatornih oboljenja, uključujući EAE. Produkcija ovog citokina bila je značajno niža u ćelijama slezina životinja tretiranih sa DC/ES L1 tokom svih faza bolesti u odnosu na kontrolne životinje pri čemu je razlika u produkciji dostizala sve veću statističku značajnost kako je bolest odmicala. U induktivnoj fazi 8. dana kod tretiranih DA pacova produkcija IL-17 je bila smanjena ($14,5 \pm 5,1$ nasuprot $26,8 \pm 5$; $p < 0,05$), 15. dana je bila još niža ($8,2 \pm 3,1$ nasuprot $22,2 \pm 6,2$; $p < 0,01$), a tokom faze oporavka od bolesti razlika u produkciji IL-17 između tretiranih i netretiranih životinja dostigla je najveću statističku značajnost ($7 \pm 0,9$ naspram $30,4 \pm 4,6$; $p < 0,005$) (Slika 14).



Slika 14. Produkcija citokina IL-17 u slezini 8., 15. i 25. dana bolesti DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 i kontrolne grupe životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

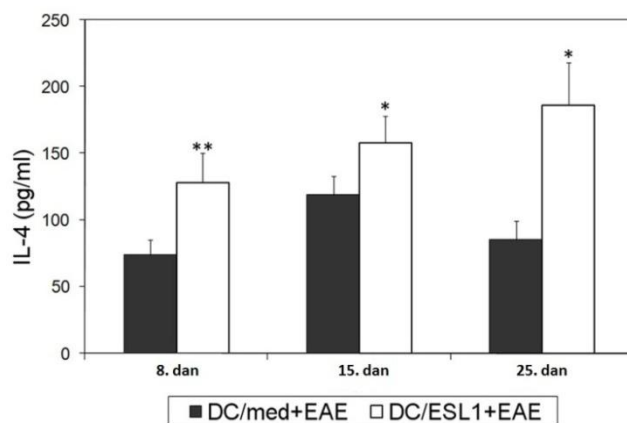
4.2.3. Uticaj primene DC stimulisanih ES L1 antigenima na imunski odgovor na nivou ćelija infiltrata kičmenih moždina u toku EAE-a

Inflamatorne ćelije se akumuliraju unutar centralnog nervnog sistema DA pacova od početka bolesti do faze oporavka od EAE-a. U ovom radu ispitan je efekat primene DC/ES L1 na stepen infiltracije inflamatornih ćelija u tkivu kičmene moždine pacova kod kojih je indukovana bolest. Ćelije infiltrata u kičmenim moždinama izolovane su u toku faze indukcije, efektorske i faze oporavke od bolesti kod životinja tretiranih sa DC/ES L1, kao i kod kontrolnih životinja. Broj ćelija infiltrata u grupi kontrolnih životinja je rastao u toku bolesti, dostižući maksimum u toku faze oporavka. Kod pacova koji su pre indukcije EAE-a bili tretirani sa DC/ES L1 zapaženo je smanjenje broja ćelija infiltrata do nivoa od trećine vrednosti detektovane kod kontrolnih životinja 25. dana bolesti (Slika 15). Dobijeni rezultati sugerišu da tretman životinja sa DC/ES L1 utiče na značajno smanjenje stepena infiltracije ćelija u kičmenoj moždini tokom EAE-a u odnosu na kontrolne životinje.



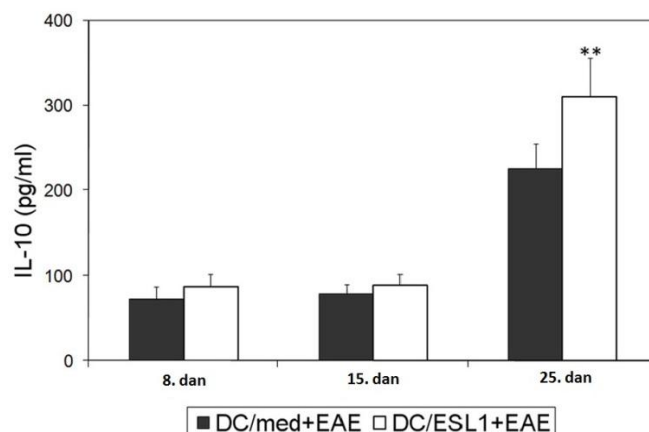
Slika 15. Celularnost infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana od indukcije EAE-a kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 i kontrolne grupe životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$.

Produkcija citokina praćena je kako na sistemskom nivou, tako i na nivou ciljnog tkiva, tj. u ćelijama infiltrata u CNS-u. U ćelijama infiltrata kičmenih moždina izolovanim iz životinja kojima su aplikovane DC/ES L1, 8. dana nakon indukcije EAE-a bio je statistički značajno povišen ($p < 0,01$) nivo produkcije IL-4 (128 ± 22 pg/ml) u odnosu na produkciju ovog citokina kod kontrolnih životinja (74 ± 11 pg/ml). Tretirane životinje zadržavaju statistički značajno viši nivo produkcije IL-4 u odnosu na životinje koje su primile nestimulisane DC kako u efektorskoj fazi bolesti (158 ± 20 naspram 119 ± 14 ; $p < 0,05$) tako i u fazi oporavka od bolesti (186 ± 29 naspram 88 ± 15 ; $p < 0,05$) (Slika 16).



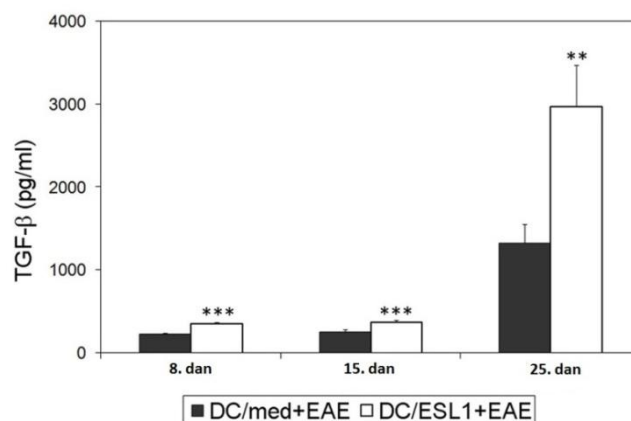
Slika 16. Produkcija citokina IL-4 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tretman sa DC/ES L1 izaziva statistički značajno povećanje nivoa produkcije IL-10 na nivou ciljnog organa u poređenju sa kontrolnim životinjama samo tokom faze oporavka od bolesti (25. dan: $310,3 \pm 44,8$ nasuprot $225,5 \pm 28,7$; $p < 0,01$). U induktivnoj i efektorskoj fazi bolesti nivoi produkcije IL-10 kod ovih životinja bili su viši u odnosu na nivoe detektovane kod kontrolnih DA pacova, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost (8. dan: $87 \pm 15,2$ nasuprot $72,3 \pm 14,8$; 15. dan: $88,3 \pm 13,4$ nasuprot $78,3 \pm 11,2$) (Slika 17).



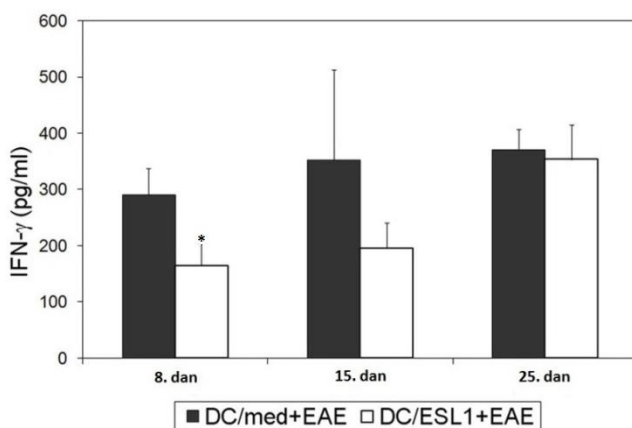
Slika 17. Produkcija citokina IL-10 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$.

Aplikovanje DC/ES L1 životinjama pre indukcije autoimunske bolesti utiče na visok nivo produkcije regulatornog citokina TGF- β koji je, tokom svih faza bolesti, statistički značajno povećan u odnosu na nivo detektovan u CNS-u kontrolnih životinja (8. dan: $349,4 \pm 23,3$ nasuprot $226,1 \pm 14,3$; $p < 0,005$; 15. dan: $372,4 \pm 22,4$ nasuprot $250,7 \pm 34$; $p < 0,005$; 25. dan: 2960 ± 302 nasuprot $1350,5 \pm 135,2$; $p < 0,01$) (Slika 18).



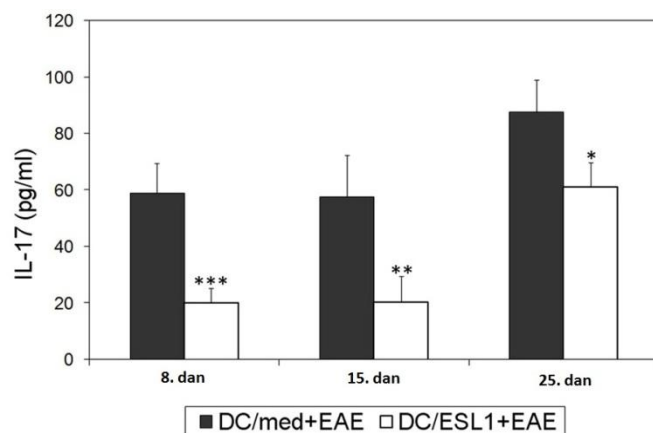
Slika 18. Produkcija citokina TGF- β u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Profilaktička primena DC/ES L1 snižava produkciju pro-inflamatornog citokina IFN- γ u ćelijama infiltrata kičmenih moždina u induktivnoj i efektorskoj fazi bolesti tretiranih u odnosu na kontrolne životinje. Ipak, smanjenje produkcije IFN- γ dostiglo je statističku značajnost samo 8. dana bolesti kod tretiranih pacova ($164,4 \pm 40,4$ nasuprot $290,7 \pm 45,7$; $p < 0,05$), dok 15. dana ta razlika nije bila statistički značajna ($195,1 \pm 44,6$ nasuprot $352,9 \pm 158,9$). Tokom faze oporavka od bolesti produkcija ovog citokina je bila slična kod tretiranih i kontrolnih životinja ($353 \pm 61,9$ nasuprot $370,8 \pm 36,2$) (Slika 19).



Slika 19. Produkcija citokina IFN- γ u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$.

Produkcija IL-17 bila je značajno niža u ćelijama infiltrata kičmenih moždina izolovanih iz životinja tretiranih sa DC/ES L1 tokom svih faza bolesti u odnosu na kontrolne životinje. Razlika u produkciji IL-17 dostigla je najveću statističku značajnost ($p < 0,005$) na početku bolesti u induktivnoj fazi ($20,1 \pm 5,3$ kod tretiranih pacova nasuprot $58,9 \pm 10,5$ kod kontrolnih životinja). Trend značajno smanjene produkcije IL-17, na nivou ciljnog organa tretiranih životinja, nastavljen je i tokom 15. i 25. dana nakon indukcije EAE-a (15. dan: $20,4 \pm 9,2$ nasuprot $57,6 \pm 14,6$; $p < 0,01$; 25. dan: $61,1 \pm 8,6$ nasuprot $87,6 \pm 11,5$; $p < 0,05$) (Slika 20).



Slika 20. Produkcija citokina IL-17 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 i kontrolne grupe životinja. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

4.2.4. Uticaj tretmana sa 5×10^6 DC/ES L1 na indukciju populacije regulatornih T ćelija u toku EAE-a

Visoki nivoi IL-10 i TGF- β produkovani u toku bolesti od strane slezinskih ćelija i infiltrata kičmenih moždina DA pacova tretiranih sa DC/ES L1 pre indukcije EAE-a ukazali su na aktivaciju regulatorne mreže imunskog odgovora i na njenu ulogu u ublažavanju toka bolesti. Da bi se proverila ova pretpostavka, slezinske ćelije i ćelije infiltrata kičmenih moždina pacova tretiranih sa DC/ES L1 i kontrolnih životinja analizirane su na prisustvo Treg ćelija putem određivanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija.

Da bismo ispitali uticaj aplikacije izabrane doze dendritskih ćelija (5×10^6) stimulisanih ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* na proliferaciju i/ili ekspanziju Treg limfocita poreklom iz slezina i kičmenih moždina DA pacova, populacija efektorskih ćelija je bojena sa fluorohromima obeleženim antitelima na površinske (CD4 i CD25) i unutarćelijske (Foxp3) markere Treg ćelija.

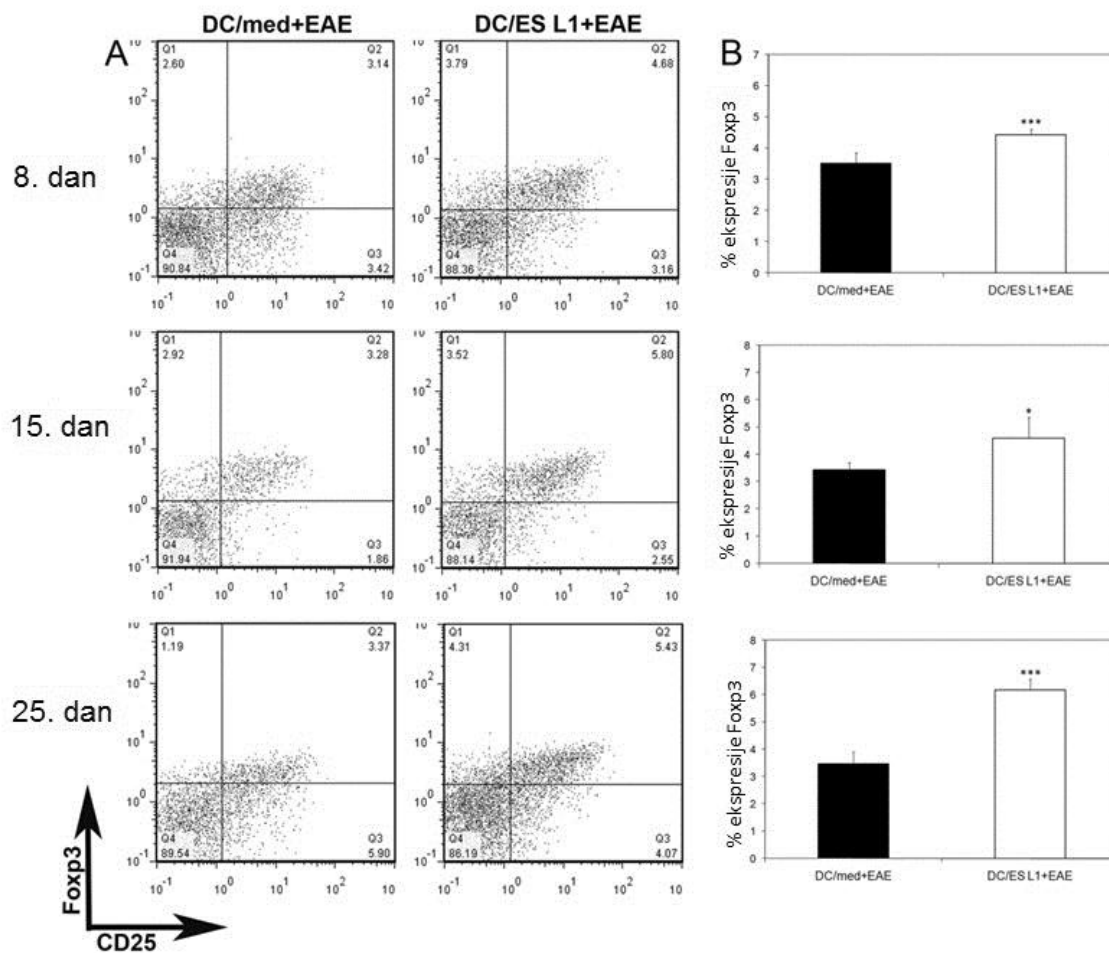
Na sistemskom nivou, u ćelijama slezina izolovanih iz DA pacova koji su primili stimulisane DC, zapaženo je značajno povećanje procentualne zastupljenosti

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u populaciji T-limfocita u odnosu na kontrolu, tj. populaciju T-limfocita iz DA pacova koji su dobili nestimulisane DC.

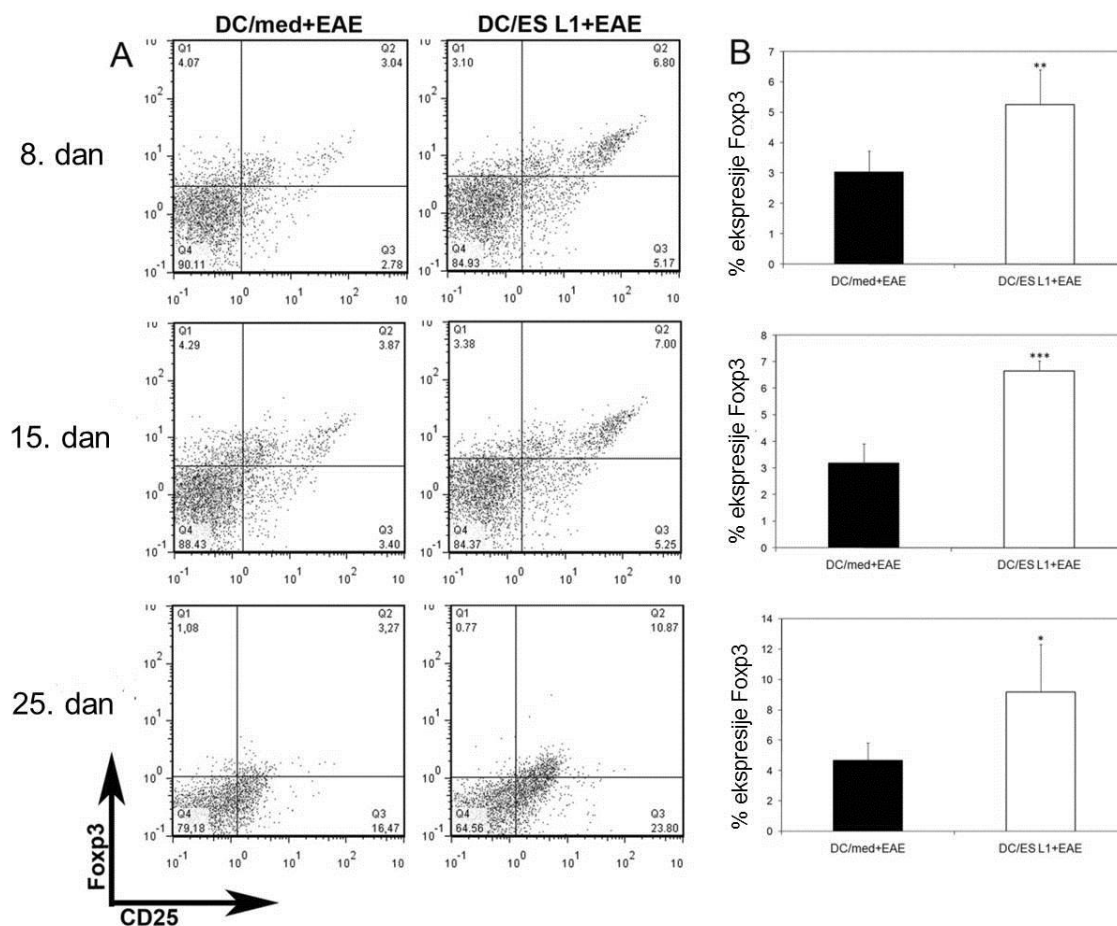
U induktivnoj (8. dan) i fazi oporavka od bolesti (25. dan) povećanje procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u populaciji slezinskih ćelija kod tretiranih DA pacova dostiglo je najveću statističku značajnost ($p < 0,005$) u odnosu na kontrolu (8. dan: $4,43 \pm 0,17$ nasuprot $3,51 \pm 0,35$; 25. dan: $4,88 \pm 0,52$ naspram $3,73 \pm 0,34$). Primjenjena doza DC/ES L1 dovela je do značajnog povećanja proporcije Treg limfocita i u efektorskoj fazi bolesti ($4,89 \pm 1,60$ naspram $3,40 \pm 0,96$; $p < 0,05$) (Slika 21).

Prisustvo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-ćelija ispitivano je i u ćelijama infiltrata kičmene moždine. Analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala je značajno povećanu zastupljenost CD4⁺CD25⁺ T-ćelija koje eksprimiraju Foxp3 u infiltratima kičmenih moždina DA pacova koji su pre indukcije EAE-a tretirani sa DC/ES L1 u odnosu na zastupljenost ovih ćelija kod kontrolnih životinja tokom svih faza bolesti (8. dan: $4,4 \pm 0,2$ naspram $3,5 \pm 0,3$; $p < 0,01$; 15. dan: $4,6 \pm 0,8$ naspram $3,4 \pm 0,3$; $p < 0,005$; 25. dan: $4,9 \pm 0,6$ naspram $3,6 \pm 0,3$; $p < 0,05$) (Slika 22).

Dobijeni rezultati ukazuju da postoji veza između prisustva Foxp3⁺ T-ćelija i težine EAE-a. U cilju ispitivanja pretpostavljene korelacije, izvršeno je poređenje kumulativnog indeksa bolesti životinja žrtvovanih 25. dana bolesti i proporcije CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ćelija u njihovim kičmenim moždinama. Kumulativni indeks je parametar težine bolesti i predstavlja zbir svih srednjih dnevnih indeksa bolesti u okviru grupe po broju dana trajanja eksperimenta. Odnos relativne ekspresije Foxp3 na CD4⁺CD25⁺ T-ćelijama i težine bolesti imao je inverznu vrednost ($r = -0,829$). Dobijeni podaci potvrđuju da je proporcija Foxp3⁺ T-ćelija u infiltratima u CNS-u vezana za ublažavanje toka i težine EAE-a.



Slika 21. Ekspresija Fcpx3⁺ na CD4⁺CD25⁺ ćelijama 8., 15., 25. dana EAE-a u splencitima DA pacova tretiranih sa 5×10^6 DC/ES L1 u odnosu na kontrolne životinje. A) Reprerentativni plotovi za svaki od ispitivanih termina iz jednog od dva eksperimenata; B) Procenat Fcpx3⁺ ćelija u okviru populacije CD4⁺ T-limfocita iz slezinskih ćelija DA pacova tretiranih sa DC/ES L1 u odnosu na kontrolne životinje. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprerentativnog eksperimenata od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, * $p < 0,005$.**



Slika 22. Ekspresija F_{oxp3}⁺ na CD₄⁺CD₂₅⁺ ćelijama 8., 15., 25. dana EAE-a u infiltratima kičmenih moždina DA pacova tretiranih sa 5 x 10⁶ DC/ES L1 u odnosu na kontrolne životinje. A) Reprerzentativni plotovi za svaki od ispitivanih termina iz jednog od dva eksperimenta; B) Procenat F_{oxp3}⁺ ćelija u okviru populacije CD₄⁺ T-limfocita iz infiltrata kičmenih moždina DA pacova tretiranih sa DC/ES L1 u odnosu na kontrolne životinje; Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; **p*<0,05, *p*<0,01, ****p*<0,005.**

4.3. Direktna, *in vivo* primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis* u imunomodulatorne svrhe

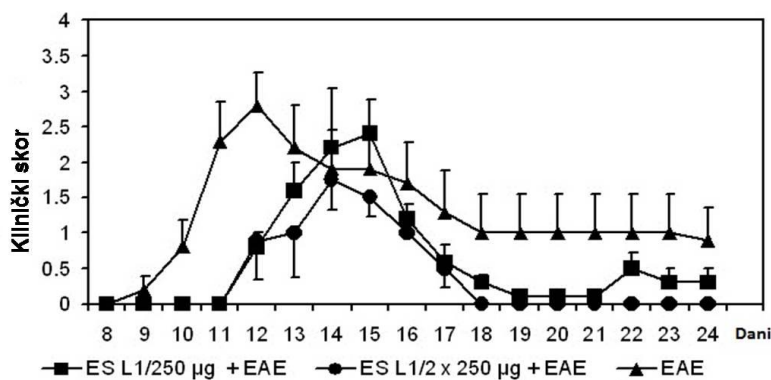
Pošto je pokazano da ES L1 antigeni, posredstvom stimulisanih DC, poseduju kapacitet da menjaju tok EAE-a i ublažavaju bolest kod DA pacova, sledeći deo istraživanja bio je usmeren na ispitivanje potencijala izolovanih ES L1 antigena da, nakon direktne intraperitonealne aplikacije, ublaže EAE.

4.3.1. Efekat direktne primene ES L1 antigena *T. spiralis* na pojavu i tok EAE-a kod DA pacova

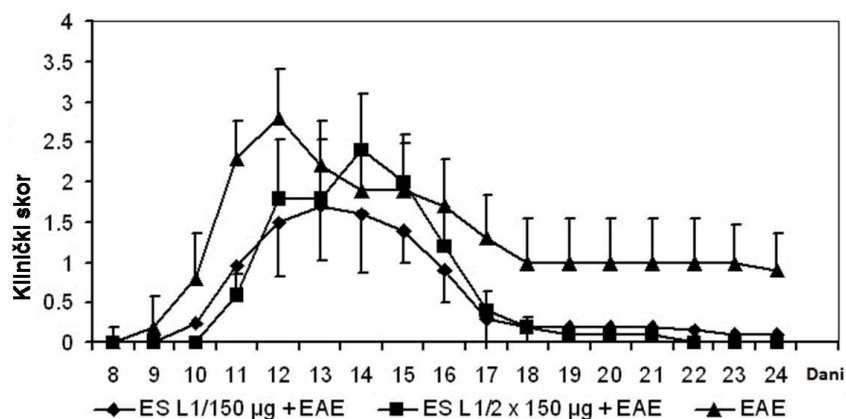
Prvi zadatak odnosio se na određivanje optimalne doze ES L1 antigena i intervala aplikacije. Doze antigena od 150 ili 250 μg date su DA pacovima u jednom (7 dana pre indukcije EAE-a) ili dva termina (14 i 7 dana pre indukcije EAE-a). Životinje su posmatrane svakodnevno tokom 25 dana nakon indukcije EAE-a. Praćena je pojava neuroloških znakova bolesti. Rezultati koji ukazuju na efekat različitih doza ES L1 antigena na pojavu, razvoj i tok EAE-a dobijeni su u dva odvojena eksperimenta.

Svi DA pacovi u kontrolnoj grupi (tretiranoj PBS-om pre indukcije EAE-a) razvili su bolest približno jednake težine. Prvi klinički znaci javili su se između 9. i 11. dana posle indukcije EAE-a i dostigli su svoj maksimum između 11. i 13. dana (Tabela 5). Većina životinja u kontrolnoj grupi oporavila se do kraja perioda posmatranja od 25 dana. Srednji maksimalni stepen težine bolesti kod kontrolne grupe bio je $3,3 \pm 0,3$ (Tabela 4).

Različite aplikovane doze ES L1 antigena parazita *T. spiralis* imale su različite efekte na razvoj i tok EAE-a. U grupi životinja kojoj je doza od 250 μg ES L1 antigena data u 2 termina i to 14 i 7 dana pre indukcije EAE-a simptomi bolesti bili su najefikasnije ublaženi (Slike 23, 24; Tabela 4).



Slika 23. Efekat tretmana dozom od 250 μg ES L1 datom u jednom ili dva termina pre indukcije EAE-a na razvoj neuroloških znakova bolesti. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.



Slika 24. Efekat tretmana dozom od 150 µg ES L1 datom u jednom ili dva termina pre indukcije EAE-a na razvoj neuroloških znakova bolesti. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

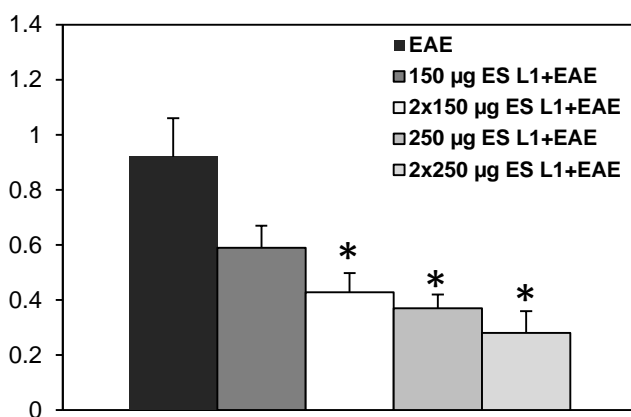
Incidencija EAE-a bila je najniža kod DA pacova koji su primili 250 µg ES L1 u dva termina (8/10) u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama, iako ova razlika nije dostigla statističku značajnost (Tabela 4).

Životinje tretirane sa ES L1 kod kojih je došlo do razvoja bolesti, imale su veoma blage kliničke znake i niži srednji maksimalni klinički skor bolesti ($2,2 \pm 1,1$ pri tretmanu sa 1 x 150 µg ES L1; $2,4 \pm 0,9$ za 1 x 250 µg ES L1; $2,0 \pm 1,0$ za 2 x 250 µg ES L1) u odnosu na kontrolnu grupu ($3,3 \pm 0,3$). Samo u jednoj grupi životinja tretiranoj sa 2 x 150 µg ES L1 ($3,4 \pm 0,3$) nije bilo razlike u maksimalnom kliničkom skoru u odnosu na kontrolne životinje. Takođe, aplikovanje ES L1 antigena dovelo je do smanjenja kumulativnog indeksa bolesti ($0,5 \pm 0,1$ za 2 x 150 µg ES L1; $0,4 \pm 0,2$ za 1 x 250 µg ES L1; $0,3 \pm 0,2$ za 2 x 250 µg ES L1), koje je dostiglo statističku značajnost ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu ($0,9 \pm 0,3$), osim u grupi tretiranoj sa 1 x 150 µg ES L1 ($0,6 \pm 0,2$) (Tabela 4, Slika 25).

Nijedan od primenjenih tretmana životinja sa ES L1 antigenima nije doveo do odlaganja početka bolesti, ali su statistički značajno ($p < 0,01$) skratili trajanje EAE-a i to posebno kod DA pacova koji su primili 250 µg ES L1 u dva termina (bolest je trajala svega $4,5 \pm 1,3$ dana u odnosu na $13,0 \pm 5,8$ dana kod kontrola) (Tabela 4).

Tabela 4. Efekat direktnog davanja ES L1 antigena parazita *T. spiralis* na razvoj i tok EAE-a kod DA pacova. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

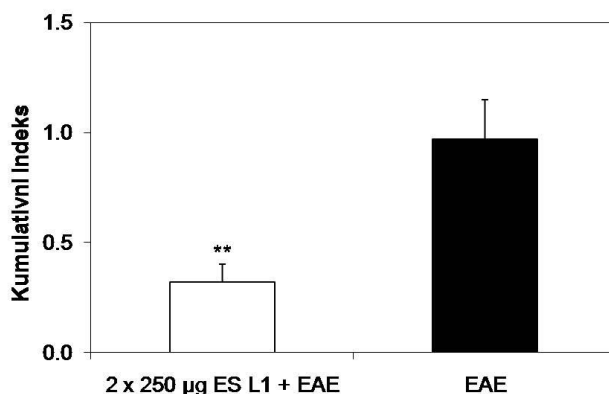
Grupe	Incidencija	Početak bolesti	Trajanje bolesti	Maksimalni klinički skor	Kumulativni indeks
EAE	100%	10,0 \pm 0,7	13,0 \pm 5,8	3,3 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3
150 μ g ES L1 + EAE	100%	12,8 \pm 2,1	8,3 \pm 4,4*	2,2 \pm 1,1	0,6 \pm 0,2
2 x 150 μ g ES L1 + EAE	100%	11,8 \pm 1,5	7,0 \pm 2,7**	3,4 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1*
250 μ g ES L1 + EAE	100%	12,4 \pm 0,9	7,8 \pm 2,6*	2,4 \pm 0,9	0,4 \pm 0,2*
2 x 250 μ g ES L1+ EAE	80%	12,8 \pm 1,1	4,5 \pm 1,3**	2,0 \pm 1,0	0,3 \pm 0,2*



Slika 25. Efekat tretmana različitim dozama i terminima aplikovanja ES L1 na težinu EAE-a izraženu preko kumulativnog indeksa bolesti. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$.

Kod životinja tretiranih direktnim davanjem 250 µg ES L1 u dva termina, 14 i 7 dana pre indukcije EAE-a, bolest je najkraće trajala, a kumulativni indeks je u toj grupi bio najniži u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Da bismo potvrdili prethodno dobijene rezultate i detaljno ispitali mehanizme koji se nalaze u osnovi modulacije toka EAE-a, eksperiment je ponovljen sa pomenutom izabranom dozom ES L1 antigena parazita *T. spiralis* koja je dala najbolje rezultate.

Životinje kojima je aplikovano 250 µg ES L1 u dva termina pre indukcije EAE-a razvile su blaži oblik bolesti sa značajno sniženim parametrima kao što su maksimalni klinički skor ($2,3 \pm 0,4$ kod tretiranih naspram $3,2 \pm 0,0$ kod kontrolnih DA pacova; $p < 0,05$) i kumulativni indeks ($0,3 \pm 0,1$ kod tretiranih naspram $1,0 \pm 0,2$ kod kontrolnih DA pacova; $p < 0,01$) (Slika 26, Tabela 5). Takođe, trajanje bolesti kod ovih životinja bilo je značajno skraćeno ($7,6 \pm 3,6$ kod tretiranih naspram $13,8 \pm 3,5$ kod kontrolnih DA pacova; $p < 0,01$) (Tabela 5).



Slika 26. Efekat tretmana dozom od 250 µg ES L1 aplikovanom u dva termina pre indukcije EAE-a na težinu bolesti izraženu preko kumulativnog indeksa bolesti. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$.

Tabela 5. Efekat direktne primene izabrane doze od 250 µg ES L1 u dva termina, 14 i 7 dana pre indukcije EAE-a, na razvoj i tok autoimunske bolesti kod DA pacova. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

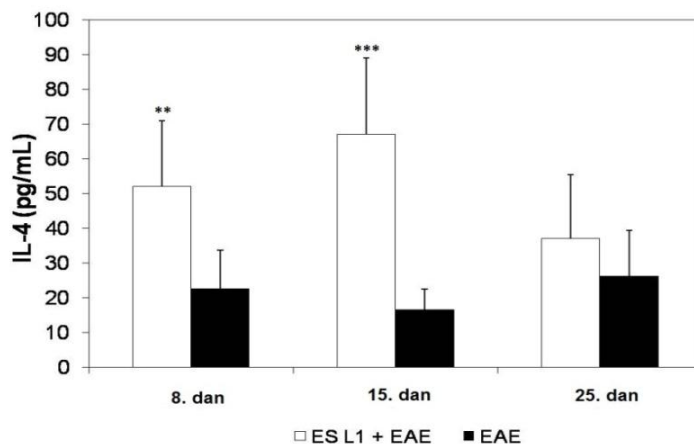
Grupe	Incidencija	Početak bolesti	Trajanje bolesti	Maksimalni klinički skor	Kumulativni indeks
EAE	10/10	10,2 ± 1,2	13,8 ± 3,5	3,2 ± 0,0	1,0 ± 0,2
2 x 250 µg ES L1 + EAE	8/10	11,7 ± 1,4	7,6 ± 3,6 **	2,3 ± 0,4 *	0,3 ± 0,1**

Životinje tretirane sa ES L1 antigenima parazita *T. spiralis*, kao i kontrolne koje su dobile PBS, žrtvovane su u induktivnoj (8. dan), efektorskoj (15. dan) i fazi oporavka od bolesti (25. dan) kada su izolovani splenociti i ćelije infiltrata kičmenih moždina u cilju određivanja produkcije citokina na sistemskom (ćelije slezine) i na nivou ciljnog organa (ćelije infiltrata kičmenih moždina) u supernatantima ćelijskih kultura.

4.3.2. Uticaj direktne primene ES L1 antigena pre indukcije EAE-a na imunski odgovor na nivou ćelija slezine u toku bolesti

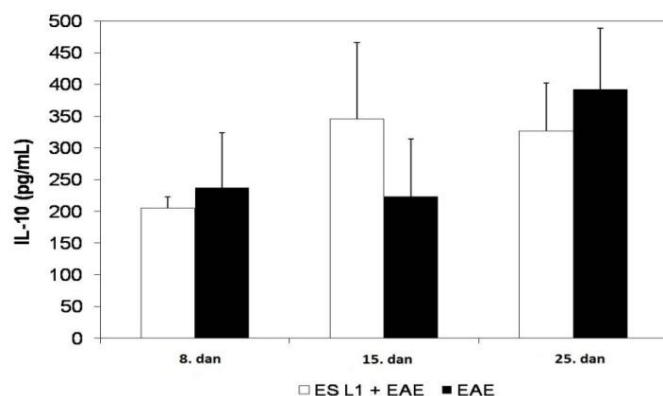
Merenje produkcije citokina pokazalo je da, na sistemskom nivou, direktna profilaktička primena ES L1 antigena utiče na značajno povećanje nivoa Th2 citokina i smanjenje nivoa Th1 i Th17 citokina u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok uticaj na promenu u produkciji anti-inflamatornih i regulatornih citokina nije bio statistički značajan. Naime, u splenocitima izolovanim iz životinja koje su dobile 2 doze od po 250 µg ES L1 pre indukcije EAE-a, na početku bolesti, u induktivnoj fazi, bio je statistički značajno povećan nivo ($p < 0,01$) produkcije IL-4 ($52 \pm 10,1$ pg/ml) u odnosu na kontrolne životinje ($22,6 \pm 8,5$). Splenociti tretiranih životinja zadržali su statistički značajno povišen nivo ($p < 0,005$) produkcije ovog citokina i u efektorskoj fazi bolesti ($67,3 \pm 12,8$) u odnosu na

netretirane DA pacove ($16,5 \pm 7,1$). U fazi oporavka od bolesti nije bilo statistički značajnih razlika u produkciji IL-4 između ispitivanih grupa ($37 \pm 4,3$ naspram $26,2 \pm 8,7$) (Slika 27). Dobijeni rezultati ukazuju da profilaktička primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis*, kao i primena DC stimulisanih sa ES L1, obezbeđuje skretanje ka Th2 imunskom odgovoru, bez obzira na indukciju EAE-a.



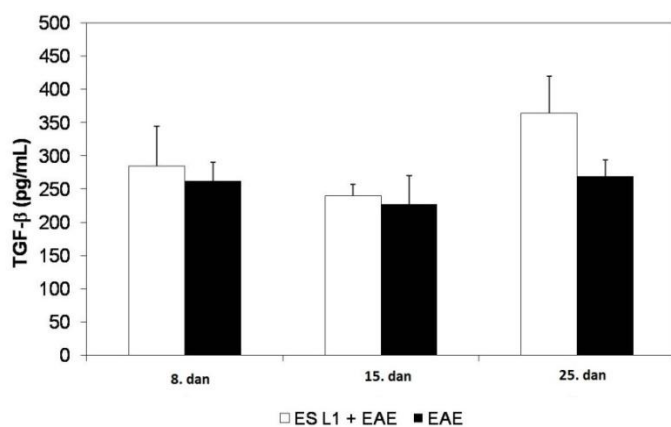
Slika 27. Produkcija citokina IL-4 u ćelijama slezina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Tretman sa ES L1 antigenima parazita *T. spiralis* uticao je na povećanje produkcije anti-inflamatornog citokina IL-10 na sistemskom nivou u poređenju sa kontrolnim životinjama tokom efektorske faze bolesti, odnosno u trenutku kada je bolest na vrhuncu (15. dan: $310,3 \pm 44,8$ nasuprot $225,5 \pm 28,7$), ali razlika u produkciji nije dostigla statističku značajnost. U induktivnoj i fazi oporavka od bolesti u produkciji IL-10 nije bilo značajnih razlika između tretiranih i kontrolnih životinja (8. dan: $204,6 \pm 18,1$ nasuprot $237,4 \pm 86,7$; 25. dan: $326,4 \pm 75,4$ nasuprot $392 \pm 96,4$) (Slika 28).



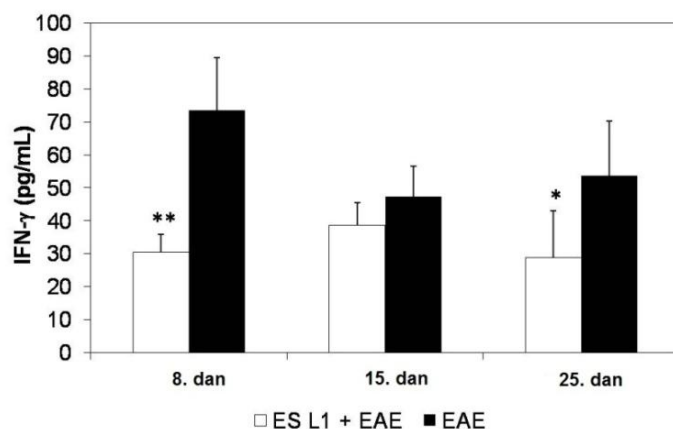
Slika 28. Produkcija citokina IL-10 u ćelijama slezina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

Aplikovanje ES L1 antigena životinjama pre indukcije autoimunske bolesti izazvalo je povećan nivo produkcije regulatornog citokina TGF- β u splenocitima tretiranih pacova u poređenju sa kontrolnim životinjama tokom svih faza bolesti, ali razlika u produkciji nije dostigla statističku značajnost (8. dan: $284,1 \pm 60$ nasuprot 262 ± 28 ; 15. dan: $240 \pm 17,3$ nasuprot 227 ± 43 ; 25. dan: 364 ± 56 nasuprot 269 ± 25) (Slika 29).



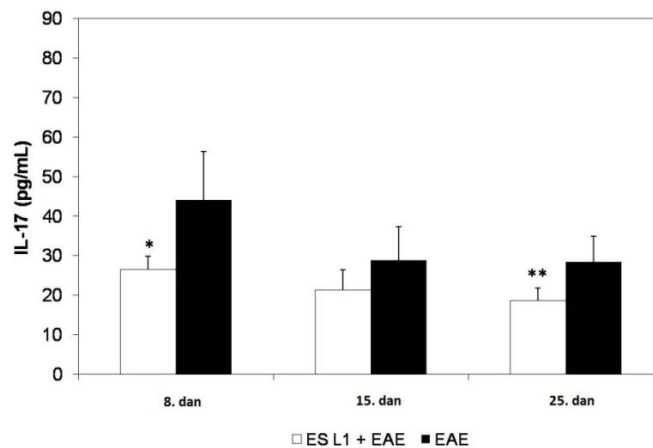
Slika 29. Produkcija citokina TGF- β u ćelijama slezina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

Primena ES L1 antigena snižava produkciju Th1 citokina IFN- γ u ćelijama slezina DA pacova tokom svih faza bolesti. U induktivnoj i fazi oporavka od bolesti, razlika u produkciji IFN- γ u odnosu na kontrolne životinje dostigla je statističku značajnost (8. dan: $30,4 \pm 5,5$ nasuprot $73,6 \pm 15,8$; $p < 0,01$; 25. dan: $28,7 \pm 14,3$ nasuprot $53,6 \pm 16,7$; $p < 0,05$). Razlika u produkciji ovog citokina između grupa tokom efektorske faze bolesti nije bila statistički značajna (15. dan: $38,6 \pm 6,8$ nasuprot $47,2 \pm 9,3$) (Slika 30).



Slika 30. Produkcija citokina IFN- γ u ćelijama slezina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 μ g ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

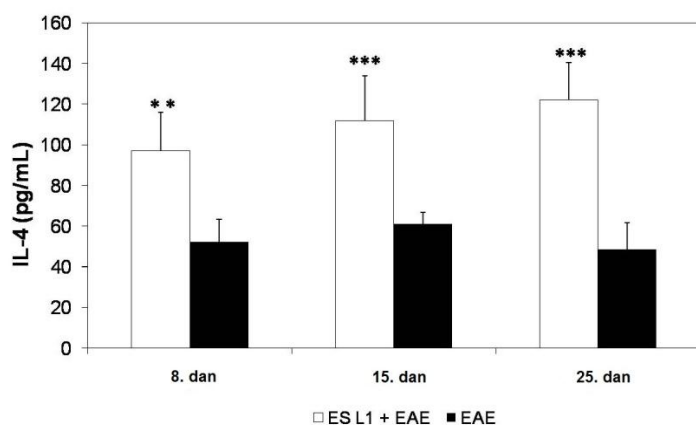
Produkcija pro-inflamatornog citokina IL-17 bila je niža u ćelijama slezina životinja tretiranih sa ES L1 tokom svih faza bolesti u odnosu na kontrolne životinje i ta razlika je dostigla statističku značajnost u efektorskoj ($26,4 \pm 3,4$ nasuprot $44,1 \pm 12,2$; $< 0,05$) i fazi oporavka od bolesti ($18,6 \pm 3,2$ nasuprot $28,4 \pm 6,4$; $p < 0,01$). Produkcija IL-17 je bila smanjena i 15. dana nakon indukcije EAE-a kod tretiranih DA pacova, ali razlika u odnosu na kontrolu nije bila značajna ($21,3 \pm 5,1$ nasuprot $28,8 \pm 8,5$) (Slika 31).



Slika 31. Produkcija citokina IL-17 u ćelijama slezina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

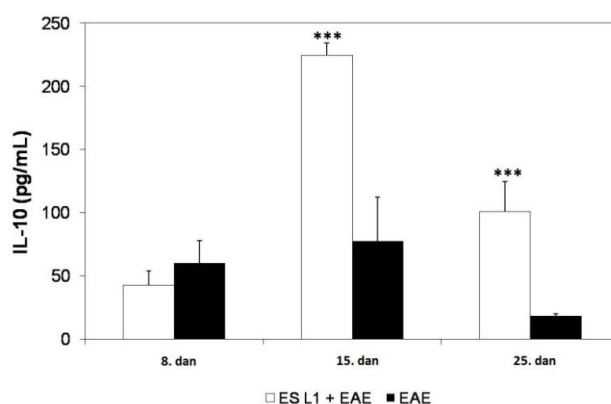
4.3.3. Uticaj direktne primene ES L1 antigena pre indukcije EAE-a na imunski odgovor na nivou infiltrata kičmenih moždina u toku bolesti

Na nivou ciljnog organa, za razliku od rezultata dobijenih na sistemskom nivou, pokazano je da direktna primena ES L1 antigena pre indukcije EAE-a izaziva značajno povećanu produkciju kako Th2 tako i anti-inflamatornih i regulatornih citokina, kao i smanjenje nivoa Th1 i Th17 citokina u odnosu na nivoe produkcije ovih citokina kod kontrolne grupe životinja. Naime, u ćelijama infiltrata kičmenih moždina izolovanih iz tretiranih životinja, detektovan je povišen nivo produkcije IL-4 (97 ± 19 pg/ml) u induktivnoj fazi bolesti koji je bio skoro dvostruko veći u odnosu na produkciju ovog citokina kod kontrolnih životinja ($52,3 \pm 11,0$; $p < 0,01$). I u efektorskoj fazi bolesti tretirane životinje su imale statistički značajno povišen nivo produkcije ovog citokina u odnosu na netretirane DA pacove (112 ± 22 naspram $61 \pm 5,9$; $p < 0,005$). U fazi oporavka od bolesti statistička značajnost u produkciji IL-4 je i dalje bila visoka ($122 \pm 18,5$ kod tretiranih naspram $48,5 \pm 13,1$ kod netretiranih životinja; $p < 0,005$) (Slika 32). Dobijeni rezultati ukazuju da primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis* indukuje polarizaciju imunskog odgovora ka Th2 tipu na nivou CNS-a, bez obzira na indukciju EAE-a.



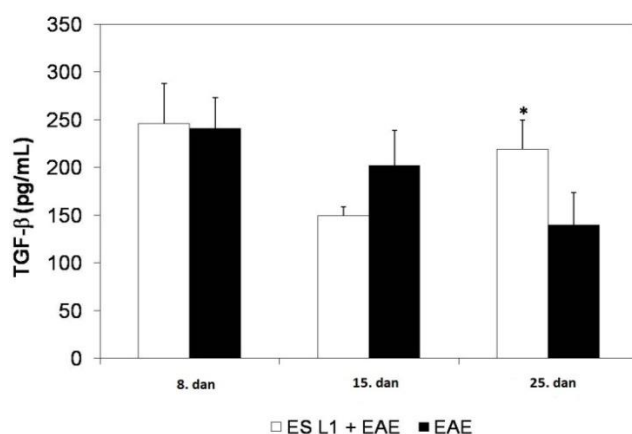
Slika 32. Produkcija citokina IL-4 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Tretman sa ES L1/2x250 µg pre indukcije EAE-a izazvao je statistički značajno povećanje produkcije IL-10 na nivou ciljnog organa u poređenju sa kontrolnim životinjama tokom efektorske faze (15. dan: $224,3 \pm 9,9$ nasuprot $77,2 \pm 35,1$), kao i tokom faze oporavka od bolesti (25. dan: $100,9 \pm 23,6$ nasuprot $18,2 \pm 1,8$) dok u induktivnoj fazi nije bilo značajnih razlika u produkciji IL-10 kod tretiranih i netretiranih životinja (8. dan: $42,7 \pm 11,1$ nasuprot $60,1 \pm 17,6$) (Slika 33). Očigledno je da ES L1 antigeni aplikovani profilaktički pre indukcije autoimunske bolesti održavaju povišen nivo kako Th2 tako i anti-inflamatornih citokina u CNS-u.



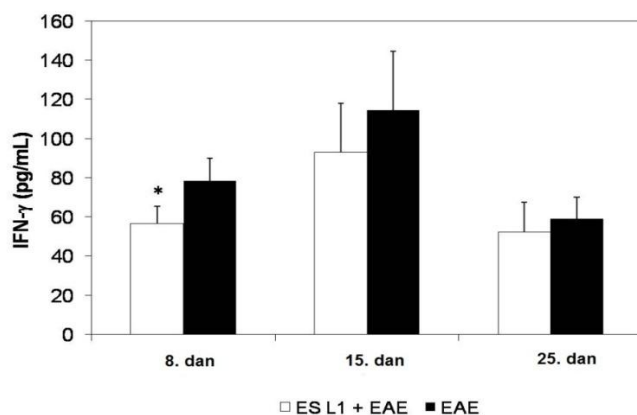
Slika 33. Produkcija citokina IL-10 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; *** $p < 0,005$.

Na nivou kičmene moždine, aplikovanje ES L1 antigena životinjama nije uticalo na nivo produkcije TGF- β u induktivnoj fazi 8. dana bolesti (246 ± 42 nasuprot 241 ± 32). Povećanje produkcije ovog citokina kod tretiranih DA pacova dostiglo je statističku značajnost samo 25. dana ($219,3 \pm 30,2$ nasuprot $140 \pm 33,4$). U efektorskoj fazi EAE-a, u infiltratima kičmenih moždina, produkcija TGF- β nija bila značajno različita između grupe životinja tretiranih sa ES L1 i kontrolne grupe ($149,4 \pm 9,1$ nasuprot $202 \pm 36,7$) (Slika 34).



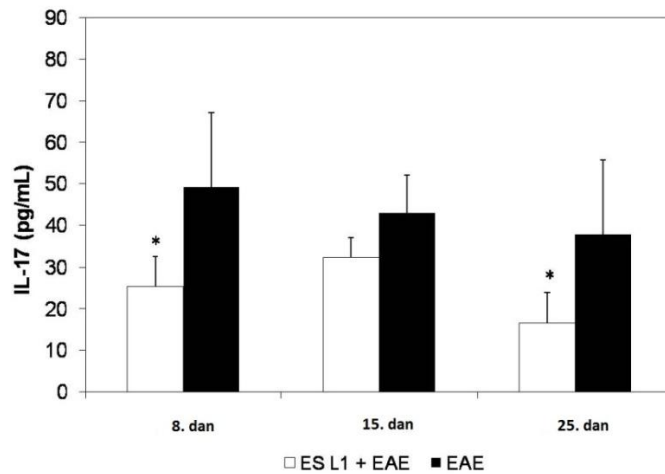
Slika 34. Produkcija citokina TGF- β u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 μ g ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima.

U ćelijama infiltrata kičmenih moždina nakon aplikovanja ES L1 došlo je do smanjene produkcije IFN- γ tokom svih faza bolesti. U induktivnoj fazi razlika u produkciji u odnosu na kontrolne životinje bila je statistički značajna (8. dan: $56,5 \pm 9,1$ nasuprot $78,5 \pm 11,7$; $p < 0,05$). U efektorskoj i fazi oporavka od EAE-a razlika u produkciji IFN- γ kod tretirane i kontrolne grupe životinja nije bila značajna (15. dan: 93 ± 25 nasuprot $114,6 \pm 30$; 25. dan: $52,2 \pm 15,3$ nasuprot $59,1 \pm 11,1$) (Slika 35).



Slika 35. Produkcija citokina IFN- γ u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 μ g ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$.

Na nivou ciljnog organa kod životinja kojima je aplikovano 250 μ g ES L1 u dva termina pre indukcije EAE-a, u induktivnoj i fazi oporavka od bolesti bio je smanjen nivo produkcije IL-17 i razlika u produkciji u odnosu na kontrolnu grupu životinja dostigla je statističku značajnost (8. dan: $25,4 \pm 7,2$ nasuprot $49,1 \pm 18$, $p < 0,05$; 25. dan: $16,6 \pm 7,3$ nasuprot $37,9 \pm 17,8$, $p < 0,05$). I u efektorskoj fazi bolesti u ćelijama CNS-a tretiranih životinja bio je niži nivo produkcije IL-17, ali bez značajne razlike u odnosu na netretirane DA pacove ($32,4 \pm 4,7$ naspram $42,9 \pm 9,1$) (Slika 36). Dobijeni rezultati ukazuju da primena ES L1 antigena parazita *T. spiralis* obezbeđuje suprimiranje Th17 imunskog odgovora na nivou CNS-a, bez obzira na indukciju EAE-a.

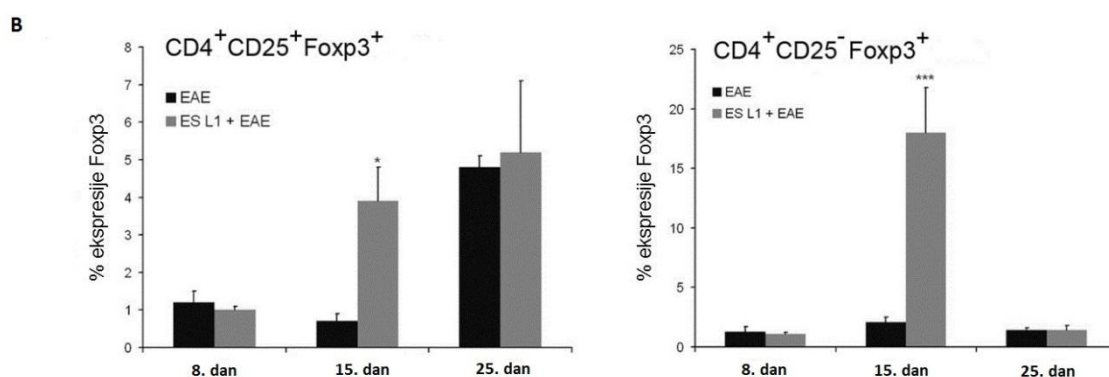
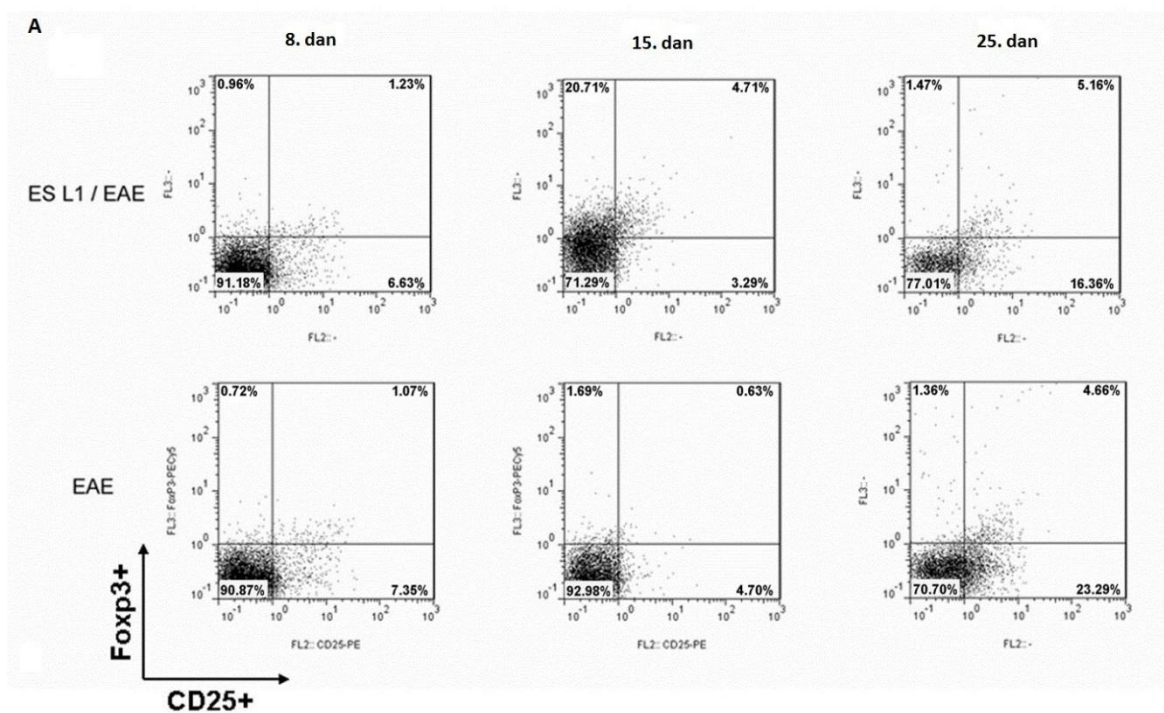


Slika 36. Produkcija citokina IL-17 u ćelijama infiltrata kičmenih moždina 8., 15. i 25. dana bolesti kod DA pacova tretiranih sa 250 µg ES L1 u dva termina. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$.

4.3.4. Uticaj direktnog davanja ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima pre indukcije EAE-a na populaciju regulatornih T ćelija u toku bolesti

Da bismo ispitali uticaj direktne primene ES L1 antigena na procentualnu zastupljenost Treg limfocita poreklom iz slezina i kičmenih moždina DA pacova kojima je indukovano EAE, populacija ćelija infiltrata je bojena sa fluorohromima obeleženim antitelima na površinske (CD4 i CD25) i unutarćelijske (Foxp3) markere Treg ćelija.

U ćelijama slezina izolovanih iz DA pacova koji su primili ES L1 u dva termina pre indukcije EAE-a, došlo je do značajnog povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u efektorskoj fazi bolesti u odnosu na kontrolu, tj. populaciju T-limfocita iz DA pacova koji su primili PBS ($3,9 \pm 0,9$ naspram $0,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$). Primenjena doza ES L1 u induktivnoj i fazi oporavka od bolesti nije dovela do značajne promene u proporciji Treg limfocita u odnosu na kontrolnu grupu (8. dan: $1,1 \pm 0,1$ naspram $1,2 \pm 0,3$; 25. dan: $5,2 \pm 1,9$ naspram $4,8 \pm 0,4$) (Slika 37).

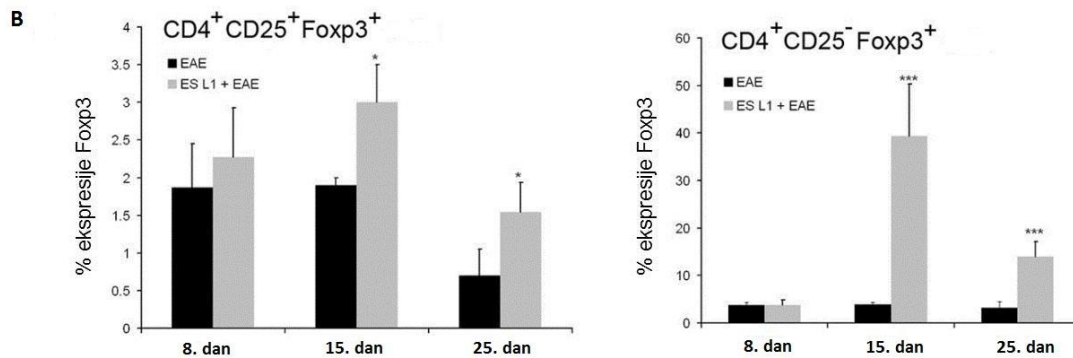
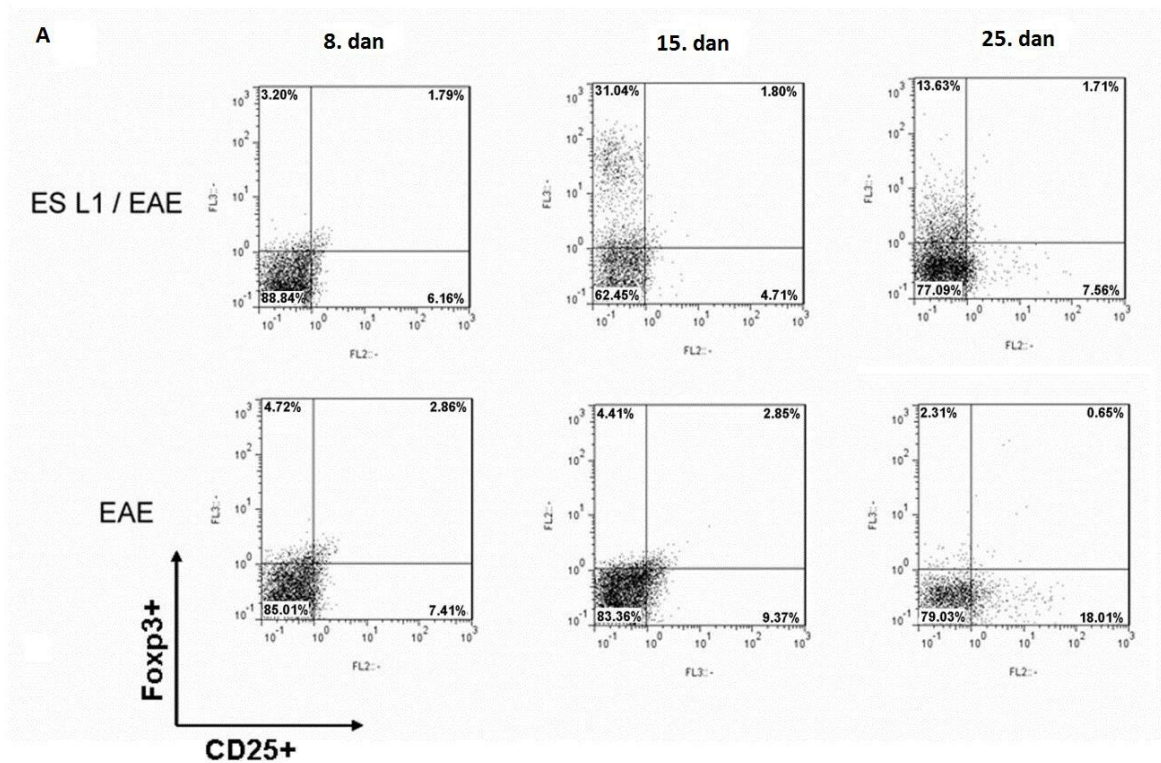


Slika 37. Procentualna zastupljenost CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ćelija 8., 15., 25. dana EAE-a u splenicima DA pacova tretiranih sa 2 x 250 µg ES L1 u odnosu na kontrolne životinje tretirane PBS-om. A) Reprerativni plotovi za svaki od ispitivanih termina iz jednog od dva eksperimenta. B) Procenat Foxp3⁺ ćelija u okviru populacije CD4⁺ T-limfocita iz slezinskih ćelija DA pacova tretiranih sa 2 x 250 µg ES L1 u odnosu na kontrolne životinje. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, * $p < 0,005$.**

Na sistemskom nivou u populaciji Foxp3⁺ T-limfocita, pored CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija, detektovano je prisustvo atipičnih CD4⁺ Treg ćelija koje eksprimiraju Foxp3 marker, ali ne i CD25. Povećanje procentualne zastupljenosti ovih ćelija bilo je statistički visoko značajno kod životinja koje su tretirane sa ES L1 u odnosu na kontrolu u efektorskoj fazi bolesti (15. dan: 18,0 ± 3,8 naspram 2,1 ± 0,4; *p*<0,005). U induktivnoj (8. dan: 1,1 ± 0,1 naspram 1,3 ± 0,4), kao i u fazi oporavka od bolesti (25. dan: 1,4 ± 0,4 naspram 1,4 ± 0,2) broj CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Treg ćelija bio je skoro isti kod tretiranih i kontrolnih životinja (Slika 37).

U ćelijama infiltrata kučmenih moždina izolovanih iz DA pacova koji su dobili 2 x 250 µg ES L1 pre indukcije EAE-a došlo je do povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u odnosu na DA pacove koji su primili PBS. Razlika u povećanju Treg limfocita u CNS-u kod tretiranih u odnosu na netretirane životinje bila je statistički značajna (*p*<0,05) tokom efektorske (15. dan: 3,0 ± 0,5 naspram 1,9 ± 0,1) i tokom faze oporavka od bolesti (25. dan: 1,5 ± 0,4 naspram 0,7 ± 0,3). U induktivnoj fazi, 8. dana bolesti, nije bilo značajne razlike u broju CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija između tretirane i kontrolne grupe životinja (2,3 ± 0,7 naspram 1,9 ± 0,6) (Slika 38).

Na nivou ciljnog organa, kao i na sistemskom nivou, detektovano je značajno povećanje broja atipičnih CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Treg ćelija. U induktivnoj fazi bolesti broj ovih ćelija je bio sličan između tretirane i netretirane grupe životinja (3,8 ± 1,1 naspram 3,7 ± 0,6). Visoka statistički značajna razlika (*p*<0,005) u procentualnoj zastupljenosti CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ćelija između životinja koje su primile ES L1 i životinja koje su dobile PBS dostignuta je u efektorskoj fazi bolesti (39,3 ± 11,0 naspram 3,9 ± 0,5) i nastavljena tokom faze oporavka (13,9 ± 3,2 naspram 3,2 ± 1,3) (Slika 38).



Slika 38. Procentualna zastupljenost $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ i $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ ćelija 8., 15., 25. dana EAE-a u infiltratima kičmenih moždina DA pacova tretiranih sa 2 x 250 μ g ES L1 u odnosu na kontrolne životinje tretirane PBS-om. A) Reprezentativni plotovi za svaki od ispitivanih termina iz jednog od dva eksperimenta. B) Procenat $Foxp3^+$ ćelija u okviru populacije $CD4^+$ T-limfocita iz infiltrata kičmenih moždina DA pacova tretiranih sa 2 x 250 μ g ES L1 u odnosu na kontrolne životinje. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD dobijene iz reprezentativnog eksperimenta od 2 urađena sa sličnim rezultatima; * $p < 0,05$, * $p < 0,005$.**

3. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je uticaj ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi parazita *T. spiralis* na tok i modulaciju EAE-a kod DA pacova, putem direktne primene ES L1 produkata, kao i DC stimulisanih ovim antigenima sa ciljem da se utvrde mehanizmi imunomodulacije kao i uloga dendritskih ćelija u njima.

Prvi cilj istraživanja bio je da se uspostavi kultura dendritskih ćelija poreklom iz kostne srži DA pacova i da se izvrši njihova stimulacija ES L1 antigenima parazita *T. spiralis*. Dobijeni rezultati pokazali su da je ovaj cilj uspešno ostvaren i da u uspostavljenoj kulturi DC ne sazrevaju u potpunosti pod uticajem ES L1 antigena parazita *T. spiralis* u poređenju sa DC koje su gajene u prisustvu LPS-a kao faktora koji indukuje njihovu zrelost i statistički značajno povećanje ekspresije svih ispitivanih markera. Naime, fenotipska karakterizacija DC pokazala je da ćelije stimulisane ES L1 antigenima imaju umereno povećanu ekspresiju CD86, statistički značajno povećanu ekspresiju ICAM1, dok u ekspresiji MHC molekula II klase nije bilo razlike u poređenju sa kontrolnim ćelijama gajenim samo u medijumu. Opisani fenotip u potpunosti odgovara onom dobijenom od strane Gruden-Movsesijan i saradnika (2011).

Stepen sazrevanja DC, a samim tim i fenotip, zavise od vrste primenjenih parazitskih antigena (White i Artavanis-Tsakonas, 2012). Tako, solubilni antigeni jaja (SEA) parazita *S. mansoni* izazivaju povećanje ekspresije MHC II, CD40 i CD86 na DC, ali u manjoj meri nego što to čine Th1 stimulasi, dok se ekspresija CD80 i OX40L ne povećava (Marshall i Pearce, 2008; Jenkins i Mountford, 2005). Ekskretorno-sekretorni antigeni nematode *N. brasiliensis* izazivaju povećanje ekspresije CD86 i CD40 na DC, ali ne i povećanje CD80 i MHC molekula II klase (Balic i sar., 2004). Za razliku od njih, cistein proteazni inhibitor iz ES produkata parazita *Heligmosomoides polygyrus* indukuje smanjenu ekspresiju CD40, CD86 i MHC molekula II klase na DC miša (Sun i sar., 2013). Takođe, pokazano je da DC nekompletno sazrevaju i nakon aktivacije antigenima drugih parazita kao što su *Taenia crassiceps* (Terrazas i sar., 2011), *Echinococcus multilocularis* (Nono i sar., 2012), *Trypanosoma cruzi* (Poncini i sar., 2008), *Plasmodium falciparum* (Bousheri i Cao, 2008), *Laishmania donovani* i *Laishmania major* (Revest i sar., 2008; Wiethe i sar., 2008). Slično kao *T. spiralis*, produkti ovih parazita uticali su na delimično

povećanje ekspresije MHC II i kostimulatornih molekula, pa čak i na odsustvo ekspresije nekih od ovih molekula na DC.

Iako nepotpuno zrele, DC edukovane sa ES L1 antigenima *T. spiralis* i sa ovakvim fenotipom imaju kapacitet da prezentuju antigene T-ćelijama i produkuju citokine koji su važni signali za inicijaciju anti-inflamatornog i regulatornog tipa imunskog odgovora (Gruden-Movsesijan i sar., 2011). Upravo na osnovu produkcije citokina u ćelijskim supernatantima izvršena je i funkcionalna karakterizacija ovih ćelija. Potvrđeno je da u uspešno uspostavljenoj kulturi DC stimulisane ES L1 antigenima produkuju znatno manje IL-12p70, pro-inflamatornog citokina neophodnog za Th1 imunski odgovor, u odnosu na kontrolne ćelije. U isto vreme, produkcija anti-inflamatornog citokina IL-10 je bila značajno povećana pod uticajem ES L1 stimulacije, što ukazuje na anti-inflamatorni potencijal ovih ćelija i sposobnost da indukuju toleranciju na način kako je to već ranije opisano (Gruden-Movsesijan i sar. 2011; Ilic i sar., 2008). Citokinska produkcija od strane ovde prikazanih DC je u saglasnosti i sa rezultatima ostvarenim sa antigenima drugih parazita. Na primer, nakon stimulacije ES antigenima *N. brasiliensis* DC smanjeno produkuju IL-12p40 i IL-6 (Balic i sar., 2004). Takođe, i pretretman DC sa ES-62 produktom parazita *Acanthocheilonema viteae*, kao i ES produktima parazita *Brugia malayi* inhibira produkciju IL-12 (Pineda i sar., 2015; Goodridge i sar., 2005; Semnani i sar., 2003). I SEA antigeni parazita *S. mansoni* indukuju povećanu produkciju anti-inflamatornog citokina IL-10 kod DC (Kane i sar., 2004). Iz dosadašnjih istraživanja, može se zaključiti da bez obzira na to koji su markeri i u kojoj meri eksprimirani na površini DC nakon stimulacije antigenima poreklom od nekoliko do sada ispitivanih helminata i protozoa, ove ćelije samo delimično sazrevaju i imaju sposobnost da usmeravaju imunski odgovor ka Th2 i/ili regulatornom tipu.

S obzirom da ES L1 antigeni parazita *T. spiralis* edukuju DC poreklom od DA pacova tako da one dalje usmeravaju imunski odgovor u suprotnom pravcu od onog koji prati autoimunske bolesti, jedan od ciljeva rada bio je da se ispita da li i na koji način primena različitih doza tako stimulisanih DC datih 7 dana pre indukcije EAE doprinosi redukciji simptoma autoimunske bolesti. Naime, kada su u pitanju imunomodulatorni potencijali helminata u modelu EAE-a, prethodna istraživanja su pokazala da infekcija

parazitima *T. spiralis* (Gruden-Movsesijan i sar., 2010; 2008), *Shistosoma mansoni* (La Flamme i sar., 2003) i *Trypanosoma cruzi* (Tadokoro i sar., 2004) ima povoljno dejstvo na razvoj i tok autoimunske bolesti. DA pacovi inficirani mišićnim larvama *T. spiralis* razvijali su bolest blagog intenziteta, koja je trajala kraće i svi parametri vezani za procenu težine bolesti bili su značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Gruden-Movsesijan i sar., 2010; 2008). S obzirom da primena živih parazita nije najoptimalniji način za tretman bolesti, hteli smo da ispitamo da li primena DC koje su edukovane antigenima parazita *T. spiralis* može da izazove modulaciju toka EAE-a koja se vidi tokom primene infekcije mišićnim larvama. Istraživanja Gruden-Movsesijan i saradnika (2011) su pokazala da DC stimulisane ES L1 antigenima, nakon *in vivo* aplikacije zdravim DA pacovima, imaju potencijal da polarišu imunski odgovor u pravcu Th2 i regulatornog tipa, kao i da indukuju ekspanziju Foxp3⁺ Treg ćelija, odnosno da usmere imunski odgovor na isti način kao i infekcija parazitom *T. spiralis*. Rezultati dobijeni u ovom radu, su po prvi put pokazali da DC stimulisane ES L1 antigenima i aplikovane 7 dana pre indukcije EAE-a imaju kapacitet da formiraju anti-inflamatorno okruženje koje nije pogodno za razvoj EAE-a i koje odgovara smanjenju težine bolesti, tj. kreira se modulacija toka bolesti koja odgovara toku uočenom i pri primeni infekcije mišićnim larvama *T. spiralis*. Takođe, broj ćelija u infiltratima kičmenih moždina kod životinja koje su primile DC/ES L1 bio je značajno niži nego kod kontrolnih životinja posebno u fazi oporavka od bolesti što je u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima o stepenu infiltracije CNS-a kod životinja kojima je indukovano EAE nakon infekcije mišićnim larvama *T. spiralis* (Gruden-Movsesijan i sar., 2010). Dobijeni efekat primene DC/ES L1 na stepen infiltracije inflamatornih ćelija u tkivu kičmene moždine ukazuje da DC edukovane ES L1 antigenima uspešno suprimiraju inflamatorni proces u CNS-u. Jedno od mogućih tumačenja dobijenih rezultata je da je zapažena modulacija bolesti posledica obnovljenog statusa tolerancije indukovanoj antigenima parazita, odnosno da su antigeni parazita indukovali tolerogeni status DC i posledičnu polarizaciju T-ćelijskog odgovora u pravcu regulatornog tipa. U tom slučaju aktivirane Treg ćelije imale bi sposobnost da suprimiraju ne samo specifični imunski odgovor na antigene parazita, već i na autoantigene.

Ublažavanje simptoma EAE-a nakon tretmana DC/ES L1 bilo je praćeno povećanom produkcijom IL-4, IL-10 i TGF- β , a smanjenom produkcijom IL-17 i IFN- γ , kao i ekspanzijom CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-ćelija kako na nivou ciljnog tkiva (CNS), tako i na sistemskom nivou u slezini. Na osnovu značajno povećane produkcije IL-4, može se zaključiti da profilaktička primena DC stimulisanih ES L1 antigenima pokreće Th2 odgovor i da je visok nivo ovog citokina delom odgovoran za smanjenu produkciju IFN- γ . Sa druge strane, Treg ćelije, kao i visoki nivoi IL-10 i TGF- β , su najverovatnije uključeni u redukciju produkcije i Th1 i Th17 citokina odgovornih za razvoj autoimunosti. Prema tome, deluje da su Th2 tip imunskog odgovora uz jaku aktivaciju regulatorne mreže odgovorni za povoljne efekte koje DC edukovane ES L1 antigenima imaju na tok EAE-a (Stromnes i sar., 2008).

Indukcija Foxp3⁺ Treg ćelija je jedan od mehanizama kojima tolerogene DC kontrolišu autoreaktivne T-limfocite (Chung i sar., 2013; Kornete i Piccirillo, 2012). Na značaj Treg ćelija u supresiji autoimunskih bolesti ukazala je studija McGeachy i saradnika (2005) koji su ustanovili da C57BL/6 miševi kod kojih su primenom monoklonskog anti-CD25 antitela inaktivisane ili depletirane Treg ćelije imaju povećanu osetljivost za indukciju EAE-a i prestaju da budu otporni na reindukciju ove bolesti. Pokazano je i da je pasivni transfer CD4⁺CD25⁺ Treg ćelija izolovanih iz CNS-a C57BL/6 miševa u fazi oporavka od EAE-a, miševima 1 dan pre ili 1 dan posle indukcije EAE-a doveo do značajne supresije simptoma bolesti, dok primena CD4⁺CD25⁺ Treg ćelija izolovanih iz limfnih čvorova naivnih miševa nije imala takav efekat. Takođe, i pasivni transfer splenocita, zajedno sa detektovanim povećanim brojem Treg ćelija, poreklom iz pacova inficiranih mišićnim larvama *T. spiralis* uticao je na ublažavanje EAE-a (Gruden-Movsesijan i sar., 2010). Regulatorne T-ćelije koje nastaju nakon infekcije helmintom *T. spiralis* i nakon primene DC stimulisanih ES L1 antigenima zajedno sa povišenim nivoima citokina IL-10 i TGF- β mogu biti uključene u kontrolu i Th2 odgovora na parazitsku infekciju, kao i Th1 i Th17 odgovora odgovornih za nastanak EAE-a. IL-10 je ključni citokin u oporavku od EAE-a (Zhang i sar., 2004), dok je TGF- β neophodan za indukciju Foxp3⁺ Treg limfocita i prepoznat kao centralna komponenta supresivne uloge Treg ćelija (Tran, 2012; Chen i Konkeli, 2010). Huang i kolege (2000) su pokazali da aplikacija DC stimulisanih peptidom

MBP-a, MBP₍₆₈₋₈₆₎, indukuje protekciju od EAE-a kod Lewis pacova. Čelije stimulisane autoantigenom u ovom eksperimentu predstavljale su adherentnu frakciju DC koja ima visok nivo ekspresije gena za IL-10 i nizak nivo ekspresije gena za IL-12 što odgovara produkciji citokina kod DC stimulisanih ES L1 antigenima u našem eksperimentu. Xiao i kolege (2004) su ukazali na terapijski potencijal DC poreklom iz slezine koje su stimulisane IFN- γ na modelu akutnog EAE-a kod Lewis pacova i hronično-relapsnog EAE-a kod C57BL/6 i SJL/J miševa. DC stimulisane TNF uspešno su suprimirale EAE-a kod miševa (Menges i sar., 2002), kao i eksperimentalni tireoiditis (Verginis i Carayanniotis, 2005) i kolagenom indukovani artritis (van Duivenvoorde i sar., 2004). TNF indukuje delimično sazrevanje DC koje stimulišu proliferaciju Treg ćelija koje proizvode IL-10. Menges i saradnici (2002) su tretmanom miševa jednim intravenskim (i.v.) aplikovanjem DC stimulisanih TNF-om i MOG-om postigli ublažavanje znakova EAE-a, dok su primenom tri uzastopne aplikacije dobili potpunu zaštitu od razvoja bolesti što ukazuje na neophodnost ponovljene stimulacije antigenima. Autori ovog rada objašnjavaju da su tri doze neophodne za generisanje Treg ćelija. Potvrde rezultate za ovakvu tvrdnju objavili su Pletinckx i saradnici (2011) koji su pokazali da nakon jedne stimulacije T-ćelija sa DC koje su prethodno stimulisane TNF-om dolazi do usmeravanja imunskog odgovora u pravcu Th2, ali ne i Treg imunskog odgovora u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Za razliku od toga, naši rezultati pokazuju da je jedna doza DC/ES L1 dovoljna za aktivaciju Treg limfocita.

Neke od glavnih nedoumica u vezi tolerogenih DC su njihov potencijal za kliničku primenu, njihova stabilnost posle *in vivo* aplikacije u smislu podložnosti različitim uticajima u organizmu primaoca, kao i mogućnost promene njihovog fenotipa iz tolerogenog u imunogeni (Hu i Wan, 2011). U studiji Menges i saradnika (2002) delimično zreo fenotip DC nije bio stabilan jer su nakon primene sekundarnog stimulusa LPS-a ove ćelije proizvodile pro-inflamatorne citokine. Za razliku od njih, Yang i saradnici (2013) su pokazali da sekundarni stimulus sa LPS-om tokom 48h nije menjao imunosupresivni fenotip tolerogenih DC koji su dobili nakon stimulacije sa GM-CSF, IL-10 i TGF- β i da su ove ćelije bile potpuno rezistentne na maturaciju. Brojna istraživanja ukazuju da i način primene tolerogenih DC može imati uticaj na njihov terapijski potencijal. Tako postoji više studija koje su pokazale da subkutano (s.c.) primenjene tolerogene DC imaju povoljno

dejstvo na tok EAE-a (Zhang i sar., 2004; Pettersson i sar., 2004; Xiao i sar., 2001; Huang i sar., 2000; Yang i sar., 2000). S druge strane, i.v. primena tolerogenih DC nije imala uticaj na tok eksperimentalnog modela astme (Nayyar i sar., 2012; Bellinghausen i sar., 2006), EAE-a kod pacova (Zhang i sar., 2004), dok je na modelu kardiomiopatije kod miša (Li i sar., 2006), u eksperimentalnom autoimunskom miokarditisu (Zimmermann i sar., 2012; Yang i sar., 2006) i dijabetesu (Besin i sar., 2008; Liang i sar., 2007) redukovala znake bolesti. Voigtlander i saradnici (2006) su pokazali da s.c. primenjene DC stimulisane TNF-om nisu imale protektivnu ulogu u modulaciji EAE-a koja je ranije dobijena pri njihovoj i.v. aplikaciji. Moguće objašnjenje je da nakon subkutane aplikacije dolazi do promene tolerogenog statusa delimično zrelih DC nakon interakcije sa drugim DC u najbližem limfnom čvoru. Ipak, nakon intracerebralne aplikacije DC stimulisanih TNF-om kod miševa one i dalje zadržavaju tolerogenu ulogu i odlažu ili čak sprečavaju nastanak EAE-a putem indukcije limfocita koji proizvode IL-10 na periferiji i suprimiranjem produkcije IL-17 u CNS-u (Zozulya i sar., 2009). Najbolje rezultate u inhibiciji kolagenom indukovano artritisa dala je intraperitonealna (i.p.) primena DC koje eksprimiraju IL-4 u odnosu na s.c. i i.v. primenu (Morita i sar., 2001). Iako nismo sigurni šta se događa nakon i.p. aplikacije DC/ES L1 možemo da pretpostavimo da su stabilne jer nakon njihove primene dolazi do supresije bolesti i uspostavljanja anti-inflamatorne sredine koja traje od indukcije EAE-a pa sve do kraja perioda posmatranja. Očigledno je da anatomsko lokalizacija patološkog procesa u konkretnoj bolesti ima značaj za odabir mesta i načina aplikacije tolerogenih DC pri čemu očekujemo da ćelije budu kompetentne za migraciju i da će putovati do ciljnih mesta gde su lokalizovane patološke promene ili do drenirajućih limfnih čvorova da bi došle u kontakt sa odgovarajućim efektorskim T-limfocitima (Gordon i sar., 2014).

Ublažavanje simptoma bolesti u našem eksperimentu bilo je direktno zavisno od primenjene doze DC stimulisanih ES L1 antigenima. Najniža doza od $0,5 \times 10^6$ DC/ES L1 nije imala uticaj na tok bolesti, dok je tretman najvećom dozom od 5×10^6 DC/ES L1 imao najjači uticaj na ublažavanje simptoma EAE-a. Za razliku od naših rezultata, Lim i saradnici (2009) su na eksperimentalnom modelu artritisa kod miševa pokazali da do ublažavanja simptoma bolesti dolazi samo pri primeni male doze od 2×10^5 DC stimulisanih TNF- α , dok je pri primeni 2×10^6 ćelija došlo do pogoršanja bolesti. Takođe,

Yang i saradnici (2013) su pri primeni tri doze tolerogenih DC primetili da najniža (5×10^4) i najveća (5×10^6) doza nisu imale uticaj na menjanje toka artritisa kod miševa, dok je doza od 5×10^5 uspešno suprimirala bolest. I u eksperimentalnom modelu miokarditisa, tolerogene DC stimulisane miozinom primenjene u manjim dozama (od 2×10^5 i 1×10^6) dovele su do smanjenja inflamacije u tkivu srčanog mišića, dok je pri primeni većeg broja ćelija (od 2×10^6) došlo do povećanja inflamacije (Lee i sar., 2014). Očigledno je da dosadašnja istraživanja ukazuju na to da terapijski potencijal delimično zrelih DC u terapiji autoimunskih bolesti može da zavisi i od primenjene doze ćelija, od konkretnog animalnog model sistema, ali i od vrste autoimunske bolesti koja se tretira.

Pored supresivne aktivnosti Treg ćelija koja je specifična za antigene, ove ćelije svoju aktivnost mogu da ispoljavaju i putem „bystander“ supresije (Maloy i Powrie, 2001), kao što je to slučaj u modelu bolesti korišćenom u ovom radu. Regulatorne ćelije, jednom aktivirane svojim specifičnim antigenom, imaju sposobnost da inhibiraju efektorske funkcije T-ćelija nezavisno od njihove antigene specifičnosti (Thornton i Shevach, 2000). U eksperimentalnim modelima spontanog nastanka EAE-a, transfer $CD4^+$ T-ćelija iz zdravih životinja sprečava nastanak bolesti (Van de Keere i Tonegawa, 1998), što ukazuje na postojanje Treg ćelija čija je aktivnost nespecifična za antigene. Pristup lečenju autoimunskih oboljenja koji bi koristio „bystander“ supresiju mogao bi da ohrabrujuće rezultate jer za veliki broj bolesti još uvek nisu definisani ciljni autoantigeni. Iako postoji još dosta nepoznanica u vezi sa potencijalnom primenom prethodno stimulisanih, tolerogenih DC u tretmanu autoimunskih oboljenja, rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da su DC stimulisane ES L1 antigenima sposobne ne samo da izazovu, već i da održe anti-inflamatorni i regulatorni imunski odgovor nezavisno od indukcije EAE-a, sa posledičnom redukcijom bolesti ili čak protekcijom od iste.

S obzirom da smo prethodno pokazali da u evolucijom uspostavljenom sistemu parazit-domaćin, zahvaljujući kontinuiranoj molekularnoj komunikaciji između parazita *T. spiralis* i domaćina, dolazi do uspešne modulacije imunskog odgovora na autoantigene (Gruden-Movsesijan, 2010; 2008), naš sledeći korak bilo je ispitivanje da li isti efekat u ublažavanju toka i težine autoimunskog oboljenja može da se postigne, pored antigenom edukovanih DC, i primenom samih, izolovanih ES produkata parazita. Tako su naša dalja

ispitivanja pratila uticaj aplikovanja ES L1 antigena parazita *T. spiralis* na tok bolesti. Dobijenim rezultatima je potvrđen potencijal ES L1 antigena, primenjenih dvokratno pre indukcije bolesti, da utiču na tok autoimunskog oboljenja u CNS-u, tj. da značajno redukuju znake EAE-a što se ogleda u nižem maksimalnom stepenu težine bolesti i kumulativnom indeksu, kasnijem početku i kraćem trajanju bolesti kod životinja tretiranih ES L1 pre indukcije EAE-a. Ovi produkti parazita *T. spiralis* su nakon profilaktičke primene imali kapacitet da menjaju tok EAE-a putem preusmeravanja imunskog odgovora u pravcu Th2 na periferiji i u CNS-u, kao i putem aktivacije Treg ćelija. Aplikacija ES L1 antigena dovela je takođe i do pojave nekonvencionalnih CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Treg ćelija, koje su bile prisutne u visokom procentu i na periferiji i u centralnom nervnom sistemu životinja tretiranih ES L1 antigenima pre indukcije EAE-a, čija uloga još nije rasvetljena ali, za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u ublažavanju simptoma bolesti.

Supresija Th1/Th17 odgovora zapažena u tretmanu ES L1 antigenima može biti posledica pojačanog Th2 i anti-inflamatornog odgovora tj. povećane produkcije IL-4 i IL-10, jer je poznato da su citokini IL-4 i IL-10 medijatori koji mogu da spreče proliferaciju Th1 limfocita i produkciju pro-inflamatornih citokina (Hocke i sar., 2006). Efekat primene ES L1 antigena bio je najuočljiviji na povećanje produkcije IL-4 koje je bilo prisutno kako u ciljnom tkivu, tako i na sistemskom nivou, tokom čitavog perioda praćenja bolesti. Visok nivo ovog citokina je najverovatnije imao presudnu ulogu u smanjenju produkcije IFN- γ . Značajno umanjen nivo IFN- γ i IL-17 citokina, koji su inače neophodni za razvoj i progresiju EAE-a, bio je zapažen kod životinja tretiranih ES L1 antigenima pre indukcije bolesti. Može se pretpostaviti da je usmeravanje imunskog odgovora u pravcu Th2 tipa, indukovano primenom ES L1 antigena, i posledična redukcija Th1/Th17 odgovora, zapravo mehanizam koji je delom odgovoran za ublažavanje toka EAE-a. Deo supresivnog efekta ES L1 antigena na produkciju pro-inflamatornih citokina može se pripisati efektu IL-10, koji je tokom praćenja EAE-a obilno produkovan u tkivu CNS-a. TGF- β je citokin koji ima ulogu u regulisanju stečenog imunskog odgovora i u aktivaciji Foxp3⁺ Treg ćelija (Travis i Sheppard, 2014). Profilaktička primena ES L1 antigena je imala zanemarljiv uticaj na nivo produkcije ovog regulatornog citokina na sistemskom nivou tokom celog perioda praćenja bolesti. Jedino je na nivou CNS-a u efektorskoj fazi bolesti došlo do povećanja produkcije

TGF- β . Može se zaključiti da uočena imunomodulacija posredovana ES L1 antigenima nije zavisna od TGF- β . Rezultati dobijeni u ovom radu sa profilaktičkom primenom ES L1 antigena parazita *T. spiralis* koreliraju sa rezultatima autora koji su koristili totalni solubilni ekstrakt, dobijen homogenizacijom celih mišićnih larvi *T. spiralis* (tzv. sirovi antigen), u modulaciji toka EAE-a (Kuijk i sar., 2012), kao i eksperimentalnog kolitisa (Motomura i sar., 2009). Motomura i saradnici (2009) su ispitali ulogu sirovog antigena *T. spiralis* u modulaciji toka eksperimentalnog kolitisa umesto infekcije ovim parazitom. Primena sirovog antigena mišićnih larvi parazita submukozno u rektum pre indukcije kolitisa dovela je do značajne redukcije znakova bolesti koja je bila praćena aktivacijom Th2 imunskog odgovora sa povećanom produkcijom IL-13, kao i regulatornog tipa odgovora uz povećanje TGF- β . Posledično je došlo do supresije Th1 posredovanog inflamatornog odgovora i smanjene produkcije citokina IL-1 β . Ovi rezultati su ukazali na značaj lokalno primenjenih antigena helminta u modulaciji toka kolitisa putem aktivacije Th2 ćelijske populacije i povećanja broja Treg limfocita. Upravo su ovom studijom Motomura i saradnici (2009) doprineli novim saznanjima vezanim za mogućnost razvoja terapije Chron-ove bolesti bazirane na primeni antigena parazita umesto terapije infekcijom. Kuijk i saradnici (2012) su primenom solubilnih antigena parazita *T. suis* i *T. spiralis* uspešno ublazili tok EAE-a, ali bez objašnjavanja mehanizama koji se nalaze u osnovi dobijene imunomodulacije autoimunske bolesti. Takođe, postoje i podaci drugih autora o imunomodulatornom dejstvu ES antigena različitih životnih stadijuma *T. spiralis*. Intraperitonealna primena ES L1 antigena imala je protektivno dejstvo i na eksperimentalno izazvanu polimikrobnu sepsu kod C57BL/6 miševa. Povoljno dejstvo tretmana se ogledalo u smanjenom oštećenju bubrega i jetre, kao i smanjenom mortalitetu kod tretiranih životinja, uz smanjen nivo pro-inflamatornih citokina TNF, IL-1 β , IL-6, a povećan nivo regulatornih citokina IL-10 i TGF- β u serumu (Du i sar., 2014). Takođe, značajno ublažavanje simptoma eksperimentalnog kolitisa kod C57/BL6 miševa uspešno je postignuto intraperitonealnom primenom ES produkata adultnih oblika parazita *T. spiralis*. U osnovi imunomodulatornog efekta bila je aktivacija Treg ćelija i povećanje produkcije citokina IL-10 i TGF- β praćena smanjenjem produkcije pro-inflamatornih citokina IFN- γ , IL-6 i IL-17 na nivou slezine, mezenteričnih limfnih čvorova i kolona, dok je nivo Th2 citokina IL-4 i IL-13 bio povišen samo u slezini i

limfnim čvorovima, ali ne i u kolonu (Yang i sar., 2014). Naši rezultati se takođe slažu i sa rezultatima studije u kojoj je za tretman EAE-a korišćen solubilni antigen jaja parazita *S. japonicum*, dat profilaktički pre indukcije bolesti ili tokom prekliničke faze bolesti. Ovakav tretman je rezultovao smanjenjem težine bolesti koja je bila praćena povećanjem produkcije Th2 citokina IL-4, a smanjenjem produkcije pro-inflamatornog citokina IFN- γ na periferiji i u CNS-u, što je u korelaciji sa našim rezultatima (Zheng i sar., 2008). I intraperitonealna aplikacija solubilnih antigena jaja parazita *S. mansoni* suprimirala je nastanak T1D kod NOD miševa indukcijom Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora (Zacccone i sar., 2009). Insulitis u okviru T1D kod NOD miševa uspešno je sprečen i intraperitonealnom primenom ES produkata helminta *Fasciola hepatica* (Lund i sar., 2014). Ekskretorno-sekretorni glikoprotein ES-62 parazita *Acanthocheilonema viteae* ublažava artritis indukovani kolagenom na mišjem modelu supresijom produkcije Th1 tipa citokina, ali bez aktivacije Th2 tipa imunskog odgovora (Pineda i sar., 2012; Harnett i sar., 2010). Takođe, i ES produkti nematode *Nippostrongylus brasiliensis* suprimiraju razvoj astme kod miševa preosetljivih na ovalbumin (Trujillo-Vargas i sar., 2007), a administracija ES produkata adulta u periodu senzitivacije kompletno blokira produkciju mukusa, eozinofiliju i značajno smanjuje hiperreaktivnost disajnih puteva (Harnett i Harnett, 2009). Očigledno je da uticaj helmintskih produkata na razvoj i tok različitih inflamatornih poremećaja može biti vrlo raznolik, što zavisi od prirode helmintskih produkata, kao i od organizma domaćina.

S obzirom da Treg ćelije aktivno učestvuju u ublažavanju jačine EAE-a i rezoluciji bolesti (O'Connor i Anderton, 2008; Hori i sar., 2002; Olivares-Villagomez i sar., 1998) ili u odlaganju početka bolesti (Lowther i sar., 2013), a i da su prethodni rezultati ovog rada pokazali da ES L1 antigeni posredstvom i.p. aplikovanih stimulisanih DC utiču na povećanje proporcije Treg ćelija kod tretiranih životinja, ispitali smo da li tretman izolovanim ES L1 antigenima ima uticaj na povećanje procentualne zastupljenosti Foxp3⁺ Treg ćelija kod životinja kojima je indukovani EAE. Dobijeni rezultati su pokazali da ES L1 antigeni izazivaju značajno povećanje zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-ćelija na periferiji i u CNS-u tokom efektorske i faze oporavka od bolesti u odnosu na životinje tretirane PBS-om. Povećanje broja Treg ćelija u fazi oporavka od EAE-a u korelaciji je sa rezultatima drugih autora (Korn i sar., 2007; O'Connor i sar., 2007; McGeachy i sar.,

2005). Ovakav rezultat je bio očekivan jer je poznato da Treg ćelije imaju značajnu ulogu u supresiji znakova EAE-a i rezoluciji bolesti. Kontrola jačine inflamatornog odgovora i autoreaktivnih efektorskih ćelija od strane Treg limfocita potvrđena je u eksperimentima u kojima je nakon uklanjanja Treg ćelija pre indukcije EAE-a, došlo do pogoršanja bolesti koje je bilo praćeno povećanom produkcijom IFN- γ i IL-17 (McGeachy i sar., 2005; Reddy i sar., 2005). Glavni medijatori supresivne uloge Treg ćelija su citokini IL-10 i TGF- β (Marie i sar., 2005). Ipak, IL-10 je prepoznat kao ključni citokin modulacije EAE-a koja je posredovana Treg ćelijama (Zhang i sar., 2004). Pored naših, i studije drugih autora koji su koristili različite antigene parazita pokazuju da paraziti indukuju regulatorni tip imunskog odgovora praćen aktivacijom CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-limfocita koji suprimiraju autoreaktivne efektorske ćelije (Chaudhry i sar., 2011; Metenou i sar., 2010; Doetze i sar., 2000). Ipak, na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da primena ES L1 produkata *T. spiralis* ima povoljan efekat na tok EAE-a, ali ne izaziva imunski odgovor koji je karakterističan za infekciju ovim parazitom. Iako su pokušaji iznalaženja adekvatnijeg i manje invazivnog pristupa u tretmanu autoimunskih bolesti, u odnosu na infekciju živim parazitima, veoma dobrodošli, moguće je da izolovani produkti parazita ne mogu da zamene evolutivno kreiran odnos između domaćina i parazita. Ipak, ukoliko se primene u odgovarajućem trenutku, adekvatnoj dozi i pogodnom dinamikom, izolovani antigeni parazita mogu pokrenuti imunomodulaciju bolesti i ublažiti joj tok. Ovo je dovoljan razlog da se ovi produkti i njihovi efekti na imunski odgovor i tok autoimunskog oboljenja i dalje intenzivno ispituju.

Ispitivanja sprovedena u ovom radu pokazala su da aplikacija ES L1 antigena DA pacovima pre indukcije EAE-a dovodi do značajnog povećanja zastupljenosti nekonvencionalnih CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T-ćelija i na sistemskom i na lokalnom nivou. Ovakav efekat u modulaciji EAE-a pomoću parazita *T. spiralis* do sada je zapažen samo u tretmanu sa ES L1 antigenima dok aplikacija dendritskih ćelija stimuliranih ES L1 antigenima (Sofronic i sar., 2013), kao i infekcija mišićnim larvama parazita (Gruden-Movsesijan i sar., 2010; 2008) ne izazivaju ekspanziju Foxp3⁺ populacije ćelija koja ne eksprimira CD25.

Različite eksperimentalne studije su potvrdile da pored CD25⁺ T-ćelija, imunosupresivno dejstvo u *in vitro* i *in vivo* uslovima imaju i CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T-ćelije, CD8⁺ T-ćelije, kao i T-ćelije prirodne ubice (Garba i sar., 2002; Sonoda i sar., 2001; Haynes i sar., 2000). Takođe, pokazano je da je za regulatornu aktivnost T-limfocita na mišjem modelu neophodna ekspresija Foxp3, ali ne i ekspresija CD25 molekula (Fontenot i sar., 2005). Regulatorna funkcija CD4⁺CD25⁻ T-ćelijske populacije pokazana je i u studiji o protektivnom efektu ovih ćelija na nastanak dijabetesa (Stephens i Mason, 2000). Takođe, pokazano je postajanje i regulatorna uloga CD4⁺CD25⁻ T-ćelija u eksperimentanim modelima autoimunskog encefalomijelitisa (Furtado i sar., 2001; Olivares-Villagomez i sar., 2000) i inflamatorne bolesti creva (Annacker i sar., 2001). U model sistema tolerancije indukovane bakterijskim superantigenima pokazano je da CD25⁻ T-ćelije imaju regulatornu ulogu koja se ogleda u supresiji odgovora na stafilokokni enterotoksin B i to posredstvom povećane produkcije IL-10 (Feunou i sar., 2003). I u našem model sistema, ćelije infiltrata kičmene moždine produkovale su značajno više IL-10 od ćelija kontrolnih životinja i nivo ovog citokina je bio u korelaciji sa brojem CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T-ćelija u infiltratima kičmenih moždina. Imunoregulatorna uloga CD4⁺Foxp3⁺ T-ćelija koje ne ekspimiraju CD25 pokazana je i kod miševa inficiranih bakterijom *Bordetella pertussis* (Coleman i sar., 2012). Ova ćelijska populacija je bila dominantna u plućima, slezini i gasterintestinalnom traktu inficiranih miševa i putem produkcije IL-10 uticala na kontrolu imunskog odgovora na infektivni agens i na uspostavljanje tolerancije. Jedno od mogućih objašnjenja porekla CD25⁻ T-ćelija jeste da ova populacija ćelija predstavlja rezervoar CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-ćelija koje se mogu regrutovati u slučaju potrebe, na primer u slučaju nastanka autoimunskih bolesti (Zelenay i sar., 2005). Nekoliko studija je dokumentovalo postojanje povišenog broja CD25⁻ Treg ćelija u krvi pacijenta obolelih od sistemskog lupusa (Bonelli i sar., 2009; Lin i sar., 2007). Kod pacijenata obolelih od multiple skleroze u fazi remisije utvrđen je normalan nivo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija, dok u relapsnoj fazi kod ovih pacijenata postoji povećan broj CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Treg limfocita na sistemskom nivou i ove ćelije imaju sposobnost da suprimiraju efektorske T-limfocite u *in vitro* uslovima (Fransson i sar., 2010). Na osnovu naših, i rezultata drugih autora može se zaključiti da populacija ovih ćelija doprinosi modulaciji EAE-a koja se postiže primenom metaboličkih

produkata mišićnih larvi *T. spiralis*. Imajući u vidu da samo tretman sa ES L1 antigenima indukuje ekspanziju CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T-ćelija može se pretpostaviti da profilaktička promena ovih antigena doprinosi supresiji bolesti upravo putem aktivacije Foxp3⁺ Treg ćelija ovog fenotipa, uz pokretanje Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja modulacije autoimunskih bolesti primenom parazita i njihovih produkata jasno se može zaključiti da molekularni mehanizmi modulacije autoimunskih bolesti zavise kako od vrste parazita i prirode primenjenih produkata parazita, tako i od domaćina i od vrste bolesti koja se tretira. Sumiranjem dosadašnjih saznanja vezanih za protektivni efekat helmintskih infekcija u autoimunskim bolestima jasno je da u osnovi imunomodulacije leži nekoliko mehanizama: dominacija Th2 ćelijske populacije i Th2 odgovora (Pulendran i Artis, 2012), aktivacija Treg ćelija (Taylor i sar., 2012), Breg ćelija (Hussaarts i sar., 2011) i pojava alternativno aktiviranih makrofaga (Van Dyken i Locksley, 2013). Krajnji efekat imunomodulacije je kreiranje anti-inflamatorne sredine koja pogoduje i parazitu i domaćinu (Allen i Maizels, 2011). Na ovaj način, obezbeđujući sebi opstanak helminti kao što je *T. spiralis* pomažu i organizmu domaćina. Rezultati ove studije dali su doprinos izučavanju imunomodulatornih svojstava metaboličkih antigena parazita *T. spiralis* što predstavlja veoma aktuelnu temu ispitivanja. Ukazali su na mogućnost primene novog pristupa u tretmanu EAE-a koji bi podrazumevao upotrebu DC stimuliranih ES L1 antigenima ili primenu samih ES L1 antigena parazita pre indukcije autoimunske bolesti. Očekuje se da će u skoroj budućnosti biti izolovane i definisane pojedinačne komponente ES antigena parazita koje imaju isti efekat u supresiji autoimunskih bolesti kao infekcija ili primena solubilnih antigena s ciljem da se razvije novi pristup u lečenju hroničnih inflamatornih bolesti koje u današnje vreme dobijaju razmere epidemije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Nakon aktivacije DC sa ES L1 antigenima parazita *Trichinella spiralis* dolazi do njihovog delimičnog sazrevanja i niske produkcije pro-inflamatornog citokina IL-12p70 i povećane produkcije anti-inflamatornog citokina IL-10.
2. U ovom radu prvi put je pokazan inhibitorski efekat dejstva dendritskih ćelija edukovanih sa ES L1 antigenima *T. spiralis* (DC/ES L1) na razvoj EAE-a. Ustanovljeno je da je to dozno zavisani fenomen, pri čemu je najveći uticaj na parametre koji ukazuju na smanjenje težine bolesti ostvaren primenom doze od 5×10^6 DC/ES L1.
3. Tretman DA pacova sa DC/ES L1 i to pre indukcije EAE-a dovodi do značajne redukcije simptoma autoimunske bolesti. Mehanizam koji je u osnovi ovog fenomena zasniva se na polarizaciji imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa praćenog povećanom produkcijom IL-4, IL-10 i TGF- β , a smanjenom produkcijom pro-inflamatornih citokina IFN- γ i IL-17. Takođe, dolazi do povećanja procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u populaciji T-limfocita na sistemskom novou u slezini i na nivou ciljnih organa, u CNS-u.
4. Rezultati dobijeni u ovom radu po prvi put su pokazali da direktno davanje različitih doza izolovanih ES L1 antigena parazita *T. spiralis* DA pacovima u različitim terminima može dovesti do modulacije EAE-a na dozno zavisani način. Najveći uticaj ostvaren je primenom doze od 250 μ g koja je data u dva termina i to u smislu odlaganja početka bolesti, smanjenja incidencije, suprimiranja razvoja kliničkih znakova i skraćivanja trajanja bolesti.

5. Primena ES L1 antigena indukuje ubedljiv Th2 odgovor na sistemskom i lokalnom nivou, kao i anti-inflamatorni odgovor na nivou ciljnog tkiva, uz smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, bez značajnog uticaja na promenu produkcije anti-inflamatornih i regulatornih citokina (IL-10 i TGF- β) na sistemskom nivou. Primena izolovanih antigena pokreće ekspanziju Treg ćelija, ali nekonvencionalnog, dominantno CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ fenotipa i na periferiji i na nivou ciljnog organa.

6. Ovaj rad ukazuje da ne samo infekcija parazitom *T. spiralis* već i profilaktički tretman njenim produktima (bilo posredstvom DC stimulisanih sa ES L1 ili direktnom aplikacijom ES L1 antigena) daje sličan efekat ublažavanja toka bolesti. Dobijeni rezultati takođe ukazuju da u osnovi različitih tretmana leže različiti mehanizmi, a to se najviše odnosi na razlike u populacijama Treg limfocita koje se aktiviraju i proliferišu pod uticajem direktne aplikacije ES L1 u odnosu na tretman DC stimulisanih sa ES L1.

7. LITERATURA

1. Agmon-Levin N, Shapira Y, Selmi C, Barzilai O, Ram M, Szyper-Kravitz M, Sella S, Katz BS, Youinou P, Renaudineau Y, Larida B, Invernizzi P, Gershwin ME, Shoenfeld Y. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2009; 34: 55-58.
2. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11: 375-388.
3. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001; 166: 3008-3018.
4. Appleton JA, Bell GR, Homan W, van Knapen F. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol Today.* 1991; 7: 190-192.
5. Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 2008; 57: 115-120.
6. Arasu P, Ellis LA, Iglesias R, Ubeira FM, Appleton JA. Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 65: 201-211.
7. Ashour D, Othman A, Shareef M, Gaballah H, Mayah W. Interactions between *Trichinella spiralis* infection and induced colitis in mice. *J Helminthol.* 2013; 88: 210-218.
8. Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, Ashley CW, Berioux G, Dominguez-Villar M, Hafler DA. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2011; 186: 3317-3326.

9. Balic A, H Marcus Y, Holland M, Maizels R. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *Eur J Immunol.* 2004; 34: 3047-3059.
10. Bashi T, Bizzaro G, Ben-Ami Shor D, Blank M, Shoenfeld Y. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 98-104.
11. Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. *J Immunol.* 2007; 178: 1039-1047.
12. Bellinghausen I, Sudowe S, König B, Reske-Kunz AB, Knop J, Saloga J. Interleukin-10-treated dendritic cells do not inhibit Th2 immune responses in ovalbumin/alum-sensitized mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 141: 61-69.
13. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981; 11: 195-199.
14. Benzel F, Erdur H, Kohler S, Frentsch M, Thiel A, Harms L, Wandinger KP, Rosche B. Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *J. Helminthol.* 2012; 86: 339-347.
15. Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia.* 2010; 58: 434-445.

16. Besin G, Gaudreau S, Ménard M, Guindi C, Dupuis G, Amrani A. Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes*. 2008; 57: 2107-2017.
17. Bien J, Cabaj W, Moskwa B. Proteomic analysis of potential immunoreactive proteins from muscle larvae and adult worms of *Trichinella spiralis* in experimentally infected pigs. *Folia Parasitologica*. 2015; 62: 022.
18. Blum AM, Hang L, Setiawan T, Urban JP Jr, Stoyanoff KM, Leung J, Weinstock JV. *Heligmosomoides polygyrus bakeri* induces tolerogenic dendritic cells that block colitis and prevent antigen-specific gut T cell responses. *J Immunol*. 2012; 189: 2512-2520.
19. Bolas-Fernandez F, Corral Bezara LD. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci*. 2006; 81: 297-303.
20. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2009; 182: 1689-1695.
21. Bousheri C, Cao H. New insight into the role of dendritic cells in malaria immune pathogenesis. *Trends Parasitol*. 2008, 24: 199-200.
22. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 883-897.

23. Brissette-Storkus CS, Kettel JC, Whitham TF, Giezeman-Smits KM, Villa LA, Potter DM, Chambers WH. Flt-3 ligand (FL) drives differentiation of rat bone marrow-derived dendritic cells expressing OX62 and/or CD161 (NKR-P1). *J Leukoc Biol.* 2002; 71: 941-949.
24. Bruschi F, Chiumiento L. Immunomodulation in trichinellosis: does *Trichinella* really escape the host immune system? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012; 12: 4-15.
25. Bruschi F, Korenaga M, Watanabe N. Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? *Trends Parasitol.* 2008; 24: 462-467.
26. Bruschi F. The Immune Response to the Parasitic Nematode *Trichinella* and the Ways to Escape it. From Experimental Studies to Implications for Human Infection. *Curr. Drug Targets Immune Endocr Metab Disord.* 2002; 2: 269-280.
27. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, Jack RS, Wunderlich FT, Bruning JC, Muller W, Rudensky AY. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2011; 34: 566-578.
28. Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'Adaptive' Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol.* 2010; 2: 30-36.
29. Cho M, Park M, Kang S, Choi S, Ahn S, Yu H. *Trichinella spiralis* infection suppressed gut inflammation with CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T cell recruitment. *Korean J Parasitol.* 2012; 50: 385-390.
30. Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, Cools N. Dendritic Cells: Cellular Mediators for Immunological Tolerance. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 972865.

31. Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 2003; 38: 9-12.
32. Coleman MM, Finlay CM, Moran B, Keane J, Dunne PJ, Mills KH. The immunoregulatory role of CD4⁺FoxP3⁺CD25⁻ regulatory T cells in lungs of mice infected with *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64: 413-424.
33. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008; 372: 1502-1517.
34. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011; 164: 1079-1106.
35. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol.* 2008; 64: 187-199.
36. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2007; 61: 97-108.
37. Correale J, Farez M. Helminth antigens modulate immune responses in cells from multiple sclerosis patients through TLR2-dependent mechanisms. *J Immunol.* 2009; 183: 5999-6012.
38. Correale J, Farez MF. Does helminth activation of toll-like receptors modulate immune response in multiple sclerosis patients? *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 112.
39. Correale J, Farez MF. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2011; 233: 6-11.

40. Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 177-183.
41. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 42: 102-111.
42. Dahlman I, Lorentzen JC, de Graaf KL, Stefferl A, Linington C, Luthman H, Olsson T. Quantitative trait loci disposing for both experimental arthritis and encephalomyelitis in the DA rat; impact on severity of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis and antibody isotype pattern. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 2188-2196.
43. Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. *Trichinella antigens*: a review. *Vet Res*. 1999; 559-571.
44. Despommier DD. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today*. 1998; 14: 318-323.
45. Despommier, Gwadz, Hotez, Knirsch. Parasitic Diseases. Fifth Edition 5th Edition. AppleTrees Productions L.L.C. NY.
46. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172: 4733-4743.
47. Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A. (Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol*. 2000; 12: 623-630.

48. Du L, Liu L, Yu Y, Shan H, Li L. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products protect against polymicrobial sepsis by suppressing MyD88 via mannose receptor. *Biomed Res Int*. 2014; 898646.
49. Duong TT, Finkelman FD, Singh B, Strejan GH. Effect of anti-interferon-gamma monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. *J Neuroimmunol*. 1994; 53: 101-107.
50. Edwards LJ, Robins RA, Constantinescu CS. Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine*. 2010; 50: 19-23.
51. Ehlers S, Kaufmann SH. Infection, inflammation, and chronic diseases: consequences of a modern lifestyle. *Trends Immunol*. 2010; 31: 184-190.
52. Elliott DE, Weinstock JV. Where are we on worms? *Curr Opin Gastroenterol*. 2012; 28: 551-556.
53. Ellis LA, McVay CS, Probert MA, Zhang J, Bundle DR, Appleton JA. Terminal β -linked tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiology*. 1997; 7: 383-390.
54. Fabre M, Beiting D, Bliss S, Appleton J. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Vet Parasitol* 2009; 159: 245-248.
55. Farber A, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with disrupted IFN γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. 1996; 156: 5-7.

56. Feunou P, Poulin L, Habran C, Le Moine A, Goldman M, Braun MY. CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells act respectively as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance. *J Immunol.* 2003; 171: 3475-3484.
57. Fleming JO, Isaak A, Lee JE, Luzzio CC, Carrithers MD, Cook TD, Field AS, Boland J, Fabry Z. Probiotic helminth administration in relapsingremitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Mult Scler.* 2011; 17: 743-754.
58. Fleming JO. Helminth therapy and multiple sclerosis. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 259-274.
59. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 2001; 14: 547-560.
60. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005; 22: 329-341.
61. Fransson M, Burman J, Lindqvist C, Atterby C, Fagius J, Loskog A. T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse. *Autoimmunity.* 2010; 43: 590-597.
62. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009; 66: 132-141.
63. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009; 132: 1175-1189.

64. Frohlich A, Marsland BJ, Sonderegger I, Kurrer M, Hodge MR, Harris NL, Kopf M. IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo. *Blood*. 2007; 109: 2023-2031.
65. Furtado GC, Olivares-Villagomez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, Lafaille JJ. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev*. 2001; 182: 122-134.
66. Gamble HR, Graham CE. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am J Vet Res*. 1984; 45: 67-74.
67. Garba ML, Pilcher CD, Bingham AL, Eron J, Frelinger JA. HIV antigens can induce TGF- β 1-producing immunoregulatory CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2002; 168: 2247-2254.
68. Gebreselassie NG, Moorhead AR, Fabre V, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. *J Immunol*. 2012; 188: 417-425.
69. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.
70. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T*. 2012; 37: 175-184.
71. Gomez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Cherchi S, Pezzoti P, Pozio E. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15: 1723-1729.

72. Gon S, Saito S, Takeda Y, Miyata H, Takatsu K, Sendo F. Apoptosis and in vivo distribution and clearance of eosinophils in normal and *Trichinella spiralis*-infected rats. *J Leukoc Biol.* 1997; 62: 309-317.
73. Gonsette RE. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg.* 2012; 112: 133-140.
74. Goodridge HS, McGuinness S, Houston K, Egan C, Al-Riyami L, Alcocer M, Harnett M, Harnett W. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 127-137.
75. Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, Houston KM, Egan C, Al-Riyami L, Liew FY, Harnett W, Harnett MM. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol.* 2005; 174: 284-293.
76. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.* 2014; 5: 7.
77. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22: 127-145.
78. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 393-407.
79. Granucci F, Zanoni I, Ricciardi-Castagnoli P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 1683-1697.
80. Grecis RK, Riedlinger J, Wakelin D. L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology.* 1985; 56: 213-218.

81. Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, Vasilev S, Radovic I, Sofronic-Milosavljevic Lj. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011; 34: 429-439.
82. Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Majstorovic I, Vasilev S, Sofronic-Milosavljevic Lj. *Trichinella spiralis*: modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Exp Parasitol*. 2008; 188: 641-647.
83. Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M, Sofronic-Milosavljevic L. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunol*. 2010; 32: 450-459.
84. Guiliano DB, Oksov Y, Lustigman S, Gounaris K, Selkirk ME. Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 515-524.
85. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 3343-3352.
86. Haig DM, Miller HRP. Differentiation of bone marrow cells into effector cells. *Parasites: Immunity and Pathology*. Ed J.M. Behnke, Taylor & Francis, London 1990; 42-62.
87. Hang L, Setiawan T, Blum AM, Urban J, Stoyanoff K, Arihiro S, Reinecker HC, Weinstock JV. *Heligmosomoides polygyrus* infection can inhibit colitis through direct interaction with innate immunity. *J Immunol*. 2010; 6: 3184-3189.

88. Harnett MM, Melendez AJ, Harnett W. The therapeutic potential of the filarial nematode-derived immunomodulator, ES-62 in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159: 256-267.
89. Harnett W, Harnett M. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 278-284.
90. Harnett W, Harnett MM. Immunomodulatory Activity and Therapeutic Potential of the Filarial Nematode Secreted Product, ES-62. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 666: 88-94.
91. Haynes LM, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Melvold RW, Miller SD. CD8⁺ T cells from Theiler's virus-resistant BALB/cByJ mice downregulate pathogenic virus-specific CD4⁺ T cells. *J Neuroimmunol.* 2000; 106: 43-52.
92. Helmbj H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders - where do we stand? *BMC Immunol.* 2015; 16: 12.
93. Heremans H, Dillen C, Groenen M, Martens E, Billiau A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 2393-2398.
94. Hocke A, Ermert M, Althoff A, Brell B, Nguessan P, Suttorp N, Ermert, L. Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL-10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans. *Cytokine.* 2006; 33: 199-211.
95. Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25⁺ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 8213-8218.

96. Hu J, Wan Y. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology*. 2011; 132: 307-314.
97. Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *J Immunol*. 2014; 193: 4178-4187.
98. Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lubber KL, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *J Immunol*. 2015; 194: 283-290.
99. Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122: 437-444.
100. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol*. 2008; 180: 2443-2449.
101. Hussaarts L, van der Vlugt LE, Yazdanbakhsh M, Smits HH. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128: 733-739.
102. Ilic N, Colic M, Gruden-Movsesijan A, Majstorovic I, Vasilev S, Sofronic-Milosavljevic Lj. Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by *Trichinella spiralis* antigens. *Parasite Immunol*. 2008; 30: 491-495.
103. Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunol Res*. 2012; 52: 111-119.

104. Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Zivojinovic M, Sofronic-Milosavljevic Lj. Characteristic band pattern in Western blots for specific detection of anti-*Trichinella spiralis* antibodies in different host species. *Acta Veterinaria*. 2014; 64: 33-43.
105. Ilic N, Worthington JJ, Gruden-Movsesijan A, Travis MA, Sofronic-Milosavljevic L, Grecis RK. *Trichinella spiralis* antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3⁺ T cells *in vitro*. *Parasite Immunol*. 2011; 33: 572-582.
106. Jenkins SJ, Mountford AP. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infect Immun*. 2005; 73: 395-402.
107. Johnston MJ, MacDonald JA, McKay DM. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology*. 2009; 136: 125-147.
108. Joller N, Peters A, Anderson AC, Kuchroo VK. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol Rev*. 2012; 248: 122-139.
109. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science*. 1946; 104: 362-363.
110. Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, Hunter CA, Pierce EJ. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol*. 2004; 173: 7454-7461.
111. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 984-993.

112. Kawakami N, Nagerl UV, Odoardi F, Bonhoeffer T, Wekerle H, Flugel A. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J Exp Med.* 2005; 201: 1805-1814.
113. Khan AR, Fallon PG. Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 293-299.
114. Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun.* 2002; 70: 5931-5937.
115. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 779-792.
116. Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and Autoimmunity – Friends or Foes? *Trends Immunol.* 2009, 30: 409-414.
117. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 485-517.
118. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007; 13: 423-431.
119. Kornete M, Piccirillo CA. Functional crosstalk between dendritic cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the maintenance of immune tolerance. *Front Immunol.* 2012; 3: 165.

120. Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 2031-2035.
121. Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Prous CL, Ribicich M, Marucci G, La Rosa G, Confalonieri V. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int J Parasitol.* 2012; 42: 903-910.
122. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31: 907-916.
123. Kuijk LM, Klaver EJ, Kooij G, van der Pol SMA, Heijnen P, Bruijns SCM, Kringel H, Pinelli E, Kraal G, de Vries HE, Dijkstra CD, Bouma G, van Die I. Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Mol Immunol.* 2012; 51: 210-218.
124. La Flamme AC, Ruddenklau K, Bäckström BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun.* 2003; 71: 4996-5004.
125. Lassmann H, Brück, W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; 17: 210-218.
126. Lee JH, Kim TH, Park HE, Lee EG, Jung NC, Song JY, Seo HG, Seung KB, Chang K, Lim DS. Myosin-primed tolerogenic dendritic cells ameliorate experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* 2014; 101: 203-210.
127. Lee KM, Ko RC. Cell-mediated responses at the muscle phase of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* infection. *Parasitol Res.* 2006; 99: 70-77.

128. Li WM, Liu W, Gao C, Zhou BG, Yang SS, Wang Z, Zhang RH, Gan RT, Kong YH, Li Y. Antigen-specific tolerance induced by IL-10 gene modified immature dendritic cells in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119: 1646-1652.
129. Liang X, Ma L, Thai NL, Fung JJ, Qian S, Lu L. The role of liver-derived regulatory dendritic cells in prevention of type 1 diabetes. *Immunology*. 2007; 120: 251-260.
130. Lim DS, Kang MS, Jeong JA, Bae YS. Semi-mature DC are immunogenic and not tolerogenic when inoculated at a high dose in collagen-induced arthritis mice. *Eur J Immunol*. 2009; 39: 1334-1343.
131. Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37: 987-996.
132. Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A, Alem F, Lagunoff D, Bleich D, Gause WC. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2009; 77: 5347-5358.
133. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002; 8: 500-508.
134. Lorentzen JC, Issazadeh S, Storch M, Mustafa MI, Lassman H, Linington C, Klareskog L, Olsson T. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J Neuroimmunol*. 1995; 63: 193-205.

135. Lossius A, Johansen JN, Torkildsen Ø, Vartdal F, Holmøy T. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis - association and causation. *Viruses*. 2012; 4: 3701-3730.
136. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123: 1004-1011.
137. Lowther DE, Chong DL, Ascough S, Ettore A, Ingram RJ, Boyton RJ, Altmann DM. Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol*. 2013; 126: 501-515.
138. Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev*. 2012; 248: 156-169.
139. Lund ME, O'Brien BA, Hutchinson AT, Robinson MW, Simpson AM, Dalton JP, Donnelly S. Secreted proteins from the helminth *Fasciola hepatica* inhibit the initiation of autoreactive T cell responses and prevent diabetes in the NOD mouse. *PLoS One*. 2014; 9: e86289.
140. Lutz MB. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front Immunol*. 2012; 3: 123.
141. MacDonald AS, Maizels RM. Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J Exp Med*. 2008; 205: 13-17.
142. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010; 108: 111-165.
143. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001; 2: 816-822.

144. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005; 201: 1061-1067.
145. Marshall FA, Peace EJ. Uncoupling of induced protein processing from maturation in dendritic cells exposed to a highly antigenic preparation from a helminth parasite. *J Immunol.* 2008; 181: 7562-7570.
146. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *MF1000Prime Rep.* 2014; 6: 13.
147. Matsuo A, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Five types of nuclei present in capsule of *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 2000; 121: 203-210.
148. McDermott JR, Humphreys NE, Forman SP, Donaldson DD, Grecis RK. Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *J Immunol.* 2005; 175: 3207-3213.
149. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007; 8: 913-919.
150. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005; 175: 3025-3032.
151. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006; 27: 17-23.
152. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 301-310.

153. Melendez AJ, Harnett MM, Pushparaj PN, Wong WS, Tay HK, McSharry CP, Harnett W. Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. *Nat Med.* 2007; 13: 1375-1381.
154. Menges M, Rössner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G., Lutz, M.B. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor- α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med.* 2002; 195: 15-21.
155. Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly SY, Coulibaly YI, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, Sanogo D, Doumbia SS, Traore SF, Mahanty S, Klion A, Nutman TB. At homeostasis filarial infections have expanded adaptive T regulatory but not classical Th2 cells. *J Immunol.* 2010; 184: 5375-5382.
156. Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol.* 2008; 38: 2636-2649.
157. Montaner S, Galiano A, Trelis M, Martin-Jaular L, del Portillo AH, Bernal D, Marcilla A. The Role of Extracellular Vesicles in Modulating the Host Immune Response during Parasitic Infections. *Front Immunol.* 2014; 5: 433.
158. Morelle W, Haslam SM, Olivier V, Appleton JA, Morris HR, Dell A. Phosphorylcholine – containing N-glycans of *Trichinella spiralis*: identification of multiantennary lacdiNac structures. *Glycobiology.* 2000; 10: 941-950.
159. Morita Y, Yang J, Gupta R, Shimizu K, Sheldon AE, Endres J, Mulé JJ, McDonagh TK, Fox AD. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1275-1284.

160. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2012; 11: A386-392.
161. Mortimer K, Brown A, Feary J, Jagger C, Lewis S, Antoniak M, Pritchard D, Britton J. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with *Necator americanus* in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75: 914-920.
162. Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clin Exp Immunol.* 1982; 50: 311-317.
163. Motomura Y, Wang H, Deng Y, El-Sharkawy RT, Verdu EF, Khan WI. Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155: 88-95.
164. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2010; 24: 641-651.
165. Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Species-Specific Antibody Responses to the Recombinant 53-Kilodalton Excretory and Secretory Proteins in Mice Infected with *Trichinella* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 468-473.
166. Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitol Res.* 2009; 104: 197-207.
167. Nakada T, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 2005; 96: 354-360.

168. Nayyar A, Dawicki W, Huang H, Lu M, Zhang X, Gordon JR. Induction of prolonged asthma tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells: differential impact on airway hyperresponsiveness and the Th2 immunoinflammatory response. *J Immunol.* 2012; 189: 72-79.
169. Nono, J.K, Pletinckx, K, Lutz, M.B., Brehm, K. Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells *in vitro*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1516.
170. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2012; 122: 1180-1188.
171. O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 2008; 193: 1-11.
172. O'Connor RA, Malpass KH, Anderton SM. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007; 179: 958-966.
173. Olivares-Villagomez D, Wang Y, Lafaille JJ. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1998; 188: 1883-1894.
174. Olivares-Villagomez D, Wensky AK, Wang Y, Lafaille JJ. Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2000; 164: 5499-5507.
175. Ortega-Pierres MG, Yopez-Mulia L, Homan W, Gamble RH, Lim PL, Takahashi Y, Wassom DI, Appleton JA. Workshop on detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Par Immunol.* 1996; 18: 273-284.

176. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 87-90.
177. Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R. Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. *Exp Neurol.* 2006; 197: 373-385.
178. Patel N, Kreider T, Urban JF Jr, Gause WC. Characterisation of effector mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue - dwelling intestinal nematode parasites. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 13-21.
179. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 225-235.
180. Peck A, Mellins ED. Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect Immun.* 2010; 78: 32-38.
181. Perona-Wright G, Jenkins SJ, MacDonald AS. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 711-721.
182. Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF Jr, Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ, Wynn TA. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2044-2055.
183. Pettersson A, Ciumas C, Chirsky V, Link H, Huang YM, Xiao BG. Dendritic cells exposed to estrogen in vitro exhibit therapeutic effects in ongoing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2004; 156: 58-65.

184. Pineda MA, Eason RJ, Harnett MM, Harnett W. From the worm to the pill, the parasitic worm product ES-62 raises new horizons in the treatment of rheumatoid arthritis. *Lupus*. 2015; 24: 400-411.
185. Pineda MA, McGrath MA, Smith PC, Al-Riyami L, Rzepecka J, Gracie JA, Harnett W, Harnett MM. The Parasitic Helminth Product ES-62 Suppresses Pathogenesis in CIA by Targeting of the IL-17-Producing Cellular Network at Multiple Sites. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 3168-3178.
186. Pletinckx K, Stijlemans B, Pavlovic V, Laube R, Brandl C, Kneitz S, Beschin A, De Baetselier P, Lutz MB. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or *Trypanosoma brucei* antigens instruct default Th2-cell responses. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 3479-3494.
187. Poncini CV, Soto CDA, Batalla E, Solana ME, Gonzalez Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* Induces Regulatory Dendritic Cells *In Vitro*. *Infection and Immunity*. 2008; 76: 2633-2641.
188. Porthouse KH, Chirgwin SR, Coleman SU, Taylor HW, Klei TR. Inflammatory responses to migrating *Brugia pahangi* third-stage larvae. *Infect Immun*. 2006; 74: 2366-2372.
189. Pozio E, Murrell DK. Systemics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv Parasitol*. 2006; 63: 367-439.
190. Pozio E, Zarlenga DS. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int J Parasitol*. 2013; 43: 983-997.
191. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*. 2012; 337: 431-435.

192. Reddy J, Waldner H, Zhang X, Illes Z, Wucherpfennig KW, Sobel RA, Kuchroo VK. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2005; 175: 5591-5595.
193. Revest M, Donaghy L, Cabilic F, Guiguen C, Gangneux JP. Comparison of the immunomodulatory effects of *L. donovani* and *L. major* excreted–secreted antigens, particulate and soluble extracts and viable parasites on human dendritic cells. *Vaccine.* 2008; 26: 6119-6123.
194. Reyes JL, Espinoza-Jiménez AF, González MI, Verdin L, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2011; 267: 77-87.
195. Riedlinger J, Grecis RK, Wakelin D. Antigen specific T-cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* in vivo. *Immunology.* 1986; 58: 57-61.
196. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* 1935; 61: 689-702.
197. Robinson MW, Connolly B. Proteomic analysis of the excretory–secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics.* 2005; 17: 4525-4532.
198. Robinson MW, Gare DC, Connolly B. Profiling excretory/secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Vet Parasitol.* 2005; 132: 37-41.

199. Romaris F, Dea-Ayuela MA, Bolas F, Martinez-Fernandez R, Sanmartin ML, Ubeira FM. Heterogeneity and immunogenicity of *Trichinella* gp53. *Parasite Immunol.* 2003; 25: 297-305.
200. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182: 68-79.
201. Rostami A, Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci.* 2013; 333: 76-87.
202. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155: 1151-1164.
203. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2005; 24: 211-226.
204. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008; 133: 775-787.
205. Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect. Immun.* 2007; 75: 397-407.
206. Scuteri A, Donzelli E, Rigolio R, Ballarini E, Monfrini M, Crippa L, Chiorazzi A, Carozzi V, Meregalli C, Canta A, Oggioni N, Tredici G, Cavalett G. Therapeutic Administration of Mesenchymal Stem Cells Abrogates the Relapse Phase in Chronic Relapsing-Remitting EAE. *J Stem Cell Res Ther.* 2015; 5:2.

207. Segal BM. CNS chemokines, cytokines, and dendritic cells in autoimmune demyelination. *J Neurol Sci.* 2005; 228: 210-214.
208. Semnani RT, Liu AY, Sabzevari H, Kubofcik J, Zhou J, Gilden JK, Nutman TB. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2003; 171: 1950-1960.
209. Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol.* 2003, 15: 59-69.
210. Sironi M, Clerici M. The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective. *Microbes Infect.* 2010; 12: 421-427.
211. Smith KM, Guerau-de-Arellano M, Costinean S, Williams JL, Bottoni A, Mavrikis Cox G, Satoskar AR, Croce CM, Racke MK, Lovett-Racke AE, Whitacre CC. miR-29ab1 deficiency identifies a negative feedback loop controlling Th1 bias that is dysregulated in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2012; 189: 1567-1576.
212. Sofronic-Milosavljevic Lj, Radovic I, Ilic N, Majstorovic I, Cvetkovic J, Gruden-Movsesijan A. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Med Microbiol Immunol.* 2013; 202: 239-249.
213. Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol.* 2001; 166: 42-50.

214. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol.* 2000; 165: 3105-3110.
215. Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136: 49-55.
216. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989; 299: 1259-1260.
217. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by Th1 and Th17 cells. *Nat Med.* 2008; 14: 337-342.
218. Sun Y, Liu G, Li Z, Chen Y, Liu Y, Liu B, Su Z. Modulation of dendritic cell function and immune response by cysteine protease inhibitor from murine nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Immunol.* 2013; 138: 370-381.
219. Svensson-Frej M. Immunobiology of intestinal eosinophils - a dogma in the changing? *J Innate Immun.* 2011; 3: 565-576.
220. Tadokoro CE, Vallochi AL, Rios LS, Martins GA, Schlesinger D, Mosca T, Kuchroo VK, Rizzo, LV, Abrahamsohn IA. Experimental autoimmune encephalomyelitis can be prevented and cured by infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Autoimmun.* 2004; 23: 103-115.
221. Takahashi Y, Homan W, Lim PL. Ultrastructural location of the phosphorylcholine-associated antigen in *Trichinella spiralis*. *J Parasitol.* 1993; 79: 604-609.
222. Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol today.* 1997; 13: 3.

223. Taylor MD, van der Werf N, Maizels RM. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends Immunol.* 2012; 33: 181-189.
224. Terrazas C A, Sánchez-Muñoz F, Mejía-Domínguez AM, Amezcua-Guerra LM, Terrazas LI, Bojalil R, Gómez-García L. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2011; 7: 1391-1400.
225. Thomas P, Harn D. Immune biasing by helminth glycans. *Cell Microbiol.* 2004; 6: 13-22.
226. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000; 164: 183-190.
227. Tran DQ. TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol.* 2012; 4: 29-37.
228. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32: 51-82.
229. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, Erb KJ. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 336-344.
230. Vallance BA, Matthaei KI, Sanovic S, Young IG, Collins S.M. Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defence against challenge *Trichinella spiralis* infections. *Parasite Immunol.* 2000; 22: 487-492.

231. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007; 27: 660-669.
232. Van de Keere F, Tonegawa S. CD4+ T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 1998; 188: 1875-1882.
233. van der Kleij D, Latz E, Brouwers J, Kruize Y, Schmitz M, Kurt-Jones E, Espevik T, de Jong E, Kapsenberg M, Golenbock D, Tielens A, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk: *Schistosomal* lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*. 2002; 277: 48122-48129.
234. van Duivenvoorde LM, van Mierlo GJ, Boonman ZF, Toes RE. Dendritic cells: vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. *Immunobiology*. 2006; 211: 627-632.
235. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 317-343.
236. van Riet E, Hartgers F, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*. 2007; 212: 475-490.
237. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 831-836.
238. Venturiello SM, Giambartolomei GH, Costantino SN. Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* new born larvae. *Parasite Immunol*. 1995; 17: 555-559.

239. Venturiello SM, Giambartolomei GH, Costantino SN. Immune killing of newborn *Trichinella* larvae by human leucocytes. *Parasite Immunol.* 1993; 15: 559-564.
240. Verginis P, Li HS, Carayanniotis G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2005; 174: 7433-7439.
241. Versini M, Jeandel PY, Bashi T, Bizzaro G, Blank M, Shoenfeld Y. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC Med.* 2015; 13: 81.
242. Voigtländer C, Rössner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C, Menges M, Schuler G, Zozulya AL, Ortler S, Lee J, Weidenfeller C, Sandor M, Wiendl H, Fabry Z. Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *J Neurosci.* 2009; 29: 140-152.
243. Vojdani A. A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 437231.
244. von Büdingen HC, Kuo TC, Sirota M, van Belle CJ, Apeltsin L, Glanville J, Cree BA, Gourraud PA, Schwartzburg A, Huerta G, Telman D, Sundar PD, Casey T, Cox DR, Hauser SL. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2012; 122: 4533-4543.
245. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KHG. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J Immunol.* 2009; 183: 1577-1586.

246. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu YJ. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med.* 2007; 204: 1837-1847.
247. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182: 207-214.
248. Weinstock JV, Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF Jr, Thompson R. The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. *J Lab Clin Med.* 2002; 139: 334-338.
249. Weissert R, Wallström E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, Olsson T. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1265-1273.
250. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol.* 1994; 36: S47-53.
251. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: iii56-60.
252. Whelan M, Harnett M, Houston K, Patel V, Harnett W, Rigley K. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol.* 2000; 164: 6453-6460.
253. White RR, Artavanis-Tsakonas K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence.* 2012; 3:668-677.

254. Wiethe C, Debus A, Mohrs M, Steinkasserer A, Lutz M, Gessner A. Dendritic Cell Differentiation State and Their Interaction with NKT Cells Determine Th1/Th2 Differentiation in the Murine Model of *Leishmania major* Infection. *J Immunol.* 2008; 180: 4371-4381.
255. Willenborg DO, Staykova M, Fordham S, O'Brien N, Linares D. The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2007; 191: 16-25.
256. Wilson MS, Taylor MD, O'Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, Anderton SM, Maizels RM. Helminth-induced CD19 + CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 1682-1696.
257. Wu Z, Matsuo A, Nakada T, Nagano I, Takahashi Y. Different response of satellite cells in kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology.* 2001; 123: 85-94.
258. Wu Z, Nagano I, Asano K, Takahashi Y. Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitol Res.* 2010; 107: 1173-1188.
259. Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology.* 2005; 130: 561-573.
260. Wu Z, Sofronic-Milosavljevic Lj, Nagano I, Takahashi Y. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasite Vectors.* 2008, 19: 27.
261. Xiao BG, Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H. Bone marrow-derived dendritic cells from experimental allergic encephalomyelitis induce immune tolerance to EAE in Lewis rats. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125: 300-309.

262. Xiao BG, Wu XC, Yang JS, Xu LY, Liu X, Huang YM, Bjelke B, Link H. Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol*. 2004; 16: 13-22.
263. Yang J, Yang Y, Ren Y, Xie R, Zou H, Fan H. A mouse model of adoptive immunotherapeutic targeting of autoimmune arthritis using allo-tolerogenic dendritic cells. *PLoS One*. 2013; 8: e77729.
264. Yang S, Li W, Liu W, Gao C, Zhou B, Li S, Li Y, Kong Y. IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *Clin Immunol*. 2006; 121: 63-73.
265. Yang X, Yang Y, Wang Y, Zhan B, Gu Y, Cheng Y, Zhu X. Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms ameliorate DSS-induced colitis in mice. *PLoS One*. 2014; 9: e96454.
266. Yopez-Mulia L, Hernandez-Bello R, Arizmendi-Puga N, Fonseca-Linan RI, Ortega-Pierres G. Contribution to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Par Immunol*. 2007, 29: 661-670.
267. Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J. Development of a Western Blot Kit for Diagnosis of Human Trichinellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10: 793-796.
268. Yu M, Johnson JM, Tuohy VK. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med*. 1996; 183: 1777-1788.

269. Zacccone P, Burton O, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol.* 2009; 39: 1098-1107.
270. Zacccone P, Burton OT, Gibbs S, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A. Immune modulation by *Schistosoma mansoni* antigens in NOD mice: effects on both innate and adaptive immune systems. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 795210.
271. Zacccone P, Fehervari Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, Cooke A. *Shistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33: 1439-1449.
272. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 579-621.
273. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. (Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *PNAS.* 2005; 102: 4091-4096.
274. Zhang QH, Link H, Xiao BG. Efficacy of peripheral tolerance induced by dendritic cells is dependent on route of delivery. *J Autoimmun.* 2004; 23: 37-43.
275. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004; 16: 249-256.
276. Zheng X, Hu X, Zhou G, Lu Z, Qiu W, Bao J, Dai Y. Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *J Neuroimmunol.* 2008; 194: 107-114.

277. Zhu B, Trikudanathan S, Zozulya AL, Sandoval-Garcia C, Kennedy JK, Atochina O, Norberg T, Castagner B, Seeberger P, Fabry Z, Harn D, Khoury SJ, Guleria I. Immune modulation by Lacto-N-fucopentaose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 2012; 142: 351-61.
278. Zimmermann O, Homann JM, Bangert A, Müller AM, Hristov G, Goeser S, Wiehe JM, Zittrich S, Rottbauer W, Torzewski J, Pfitzer G, Katus HA, Kaya Z. Successful use of mRNA-nucleofection for overexpression of interleukin-10 in murine monocytes/macrophages for anti-inflammatory therapy in a murine model of autoimmune myocarditis. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1: e003293.
279. Zozulya AL, Ortler S, Lee J, Weidenfeller C, Sandor M, Wiendl H, Fabry Z. Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *J Neurosci.* 2009; 29: 140-152.

SPISAK SKRAĆENICA

DC - dendritske ćelije

LPS - lipopolisaharid

T reg - regulatorni T-limfociti

IL - interleukin

TGF- β - transformišući faktor rasta β

MS - multipla skleroza

T1D - dijabetes melitus tip 1

IBC - inflamatorna bolest creva

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Breg - regulatorni B-limfociti

CNS - centralni nervni sistem

PLP - proteolipidni protein

MBP - mijelin bazni protein

IFN γ - interferon γ

MMPs - matriksne metaloproteinaze

NO - azot monoksid

TNF - faktor nekroze tumora

MOG - mijelin oligodendrocitni glikoprotein

MAG - mijelin-asocirani glikoprotein

MOBP - mijelin-asocirani oligodendrocitni bazni protein

DA - Dark Agouti pacovi

AO - Albino Oxford pacovi

T. spiralis - *Trichinella spiralis*

T. suis - *Trichuris suis*

L1 - mišićne larve parazita *Trichinella spiralis*

PC - fosforilholin

NBL - novorođene larve parazita *Trichinella spiralis*

ES L1 - ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi parazita *Trichinella spiralis* (ES L1)

HSP - protein toplotnog šoka

T_h1 - Th1 limfociti

T_h2 - Th2 limfociti

T_h17 - Th17 limfociti

AAM - alternativno aktivirani makrofagi

NK - ćelije prirodne ubice (engl. Natural Killer cells, NK)

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

SEA - solubilni antigen jaja (eng. soluble egg antigens - SEA) parazita *Shistosoma mansoni*

NES - ekskretorno-sekretorni antigeni parazita *Nippostrongylus brasiliensis*

ES-62 - ekskretorno-sekretorni produkt filarialne nematode *Acanthocheilonema viteae* molekulske mase 62 kDa

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

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

T. spiralis - *Trichinella spiralis*

S. mansoni - *Shistosoma mansoni*

N. brasiliensis - *Nippostrongylus brasiliensis*

BIOGRAFIJA

Ivana Mitić je rođena 21.05.1981. godine u Užicu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2000/2001. godine i isti završila oktobra 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,11.

Specijalističke akademske studije smeru Imunologija upisala je 2008. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i završila ih 2011. godine odbranom Završnog akademskog specijalističkog rada "Ukrštena reaktivnost između autoantitela i antigena *Trichinella spiralis*", mentor: prof. dr Marija-Mostarica Stojković, komentor: dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević. Doktorske studije smeru Molekularna medicina upisala je 2009. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Zapošljava se 2008. godine kao istraživač pripravnik na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju, Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu, na nacionalnom projektu: „Ćelijski i molekularni mehanizmi imunskog odgovora i imunoregulacije u sistemu parazit-domaćin“ (br. B143047, 2007-2010) finansiranog od strane Ministarstva za nauku, pod rukovodstvom Dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević. Zvanje istraživač saradnik stiže decembra 2012. godine. Trenutno je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: "Izučavanje imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti" (br. B173047, 2010-2014) pod rukovodstvom Dr Ljiljane Sofronić-Milosavljević. Autor je ili koautor 5 publikacija u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazi podataka (SCI) i većeg broja saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ivana Mitić

број уписа 11-MM/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita Trichinella spiralis

- 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, 23.05.2016.

Ivana Mitić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ivana Mitić

Број уписа 11-MM/09

Студијски програм Molekularna medicina

Наслов рада Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita Trichinella spiralis

Ментор Prof. dr Miloš Marković, VNS dr Nataša Ilić

Потписани Ivana Mitić

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, 23.05.2016

Ivana Mitić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Modulacija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa primenom ekskretorno-sekretornih antigena parazita Trichinella spiralis

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, 23.05.2016.

Мана Милић