



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александар Ацовић

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

Докторска дисертација

Коментори: Владислав Воларевић, ванредни професор
Владимир Ристић, доцент

Крагујевац, 2020. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

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

САЖЕТАК

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

Резултати ове студије су показали да DCs BALBc мишева поседују знатно већи капацитет продукције IDO-а наспрам DCs C57BL/6 животиња, што следствено индукује експанзију Treg лимфоцита који супримирају инфламацију и подстичу регенерацију слузнице црева.

Степен оштећења слузнице црева, па тако и развој болести, се најпоузданије утврђују колоноскопијом, али се ова инвазивна дијагностичка метода не може често изводити. Одређивање фекалног калпротектина представља најчешће коришћени алтернативни дијагностички параметар за праћење тока болести и успешности терапије. Ипак, недостатак валидираног *cut-off*-а и недовољна специфичност овог теста, указује на потребу за увођење нових неинвазивних дијагностичких метода којим се може процењивати успешност терапије и степен регенерације оболеле слузнице. Резултати ове студије указују да се праћењем концентрације кинуренина у гингивалној течности, серуму и фецесу може пратити прогресија улцерозног колитиса.

Због чињенице да су MSCs један од најзначајних извора IDO-а, у овој студији је испитиван и значај IDO/кинуренинског пута за терапијске ефекте MSCs у

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

ABSTRACT

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

The degree of damage to the intestinal mucosa, as well as the development of the disease, are most reliably determined by colonoscopy, but this invasive diagnostic method cannot be performed frequently. The determination of fecal calprotectin is the most commonly used alternative diagnostic parameter for monitoring the course of the disease and the success of therapy. However, the lack of validated cut-off and the lack of specificity of this test indicate the need for the introduction of new, non-invasive diagnostic methods that can evaluate the success of therapy and the degree of regeneration of diseased mucosa. Our results indicate that the monitoring of local and systemic parameters of ulcerative colitis can be observed by monitoring the concentrations of immunomodulatory factors in gingival fluid, serum and feces.

MSCs have been used in the treatment of ulcerative colitis for their immunomodulatory properties, but the results are bidirectional. As one of the most significant sources of IDO, we

examined the role of IDO/kynurenine pathway in immunomodulation of mesenchymal stem cells in a model of DSS-induced colitis. After application of MSCs in C57BL/6 strain mice, they polarized the immune response and transferred the medium from proinflammatory to immunosuppressive environment, where Treg lymphocyte expansion suppressed inflammation and allowed regeneration. On the other hand, the application of MSCs in animals of the BALBc strain contributed to the overall exacerbation of the disease followed by an increase in inflammation parameters.

захвалница

Садржај

1. УВОД.....	13
1.1. Улцерозни колитис.....	14
1.1.1. Имунопатогенеза улцерозног колитиса.....	15
1.1.2. Орални знаци и манифестације улцерозног колитиса	18
1.2. Мишији колитис индукован декстран натријум сулфатом (<i>Dextran Sodium Sulphate-DSS</i>): експериментални модел улцерозног колитиса ...	19
1.2.1. Декстран натријум сулфат (DSS).....	19
1.2.2. Индукција колитиса DSS-ом.....	20
1.2.3. Клинички параметри и хистолошка слика колитиса изазваног DSS-ом.....	21
1.2.4. Патогенеза DSS колитиса.....	21
1.2.5. Ћелије урођене имуности у патогенези акутног DSS колитиса.	22
1.2.6. Цитокини у патогенези колитиса изазваног DSS-ом	23
1.3. Индоламин 2,3 деоксигеназа у улцерозном колитису.....	24
1.3.1. Имуномодулација IDO/кинуренинским путем	25
1.3.2. Модулација имунског одговора IDO/кинуренинским путем у улцерозном колитису	27
1.3.3. IDO у усној дупљи.....	28
1.4. MSCs у терапији улцерозног колитиса	29
1.4.1. Диферентовање MSCs у епителне ћелије црева	29
1.4.2. Улога MSCs у ангиогенези.....	30
1.4.3. Имуномодулацијска својства MSCs	30
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	32
3. ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	33
3.1. Пацијенти	33
3.1.1. Узорковање сулкусне течности од оболелих од улцерозног колитиса и здравих контрола	35
3.1.2. Мерење цитокина, фекалног калпотетктина, <i>CRP</i> -а и концентрација кинуренина у серуму, столици и гингивалној течности пацијената са улцерозним колитисом и здравих контрола.....	35

3.1.3. Анализа фенотипа ћелија изолованих из ламине проприје ткива дебелог црева пацијената оболелих од улцерозног колитиса	36
3.2. Лабораторијске животиње.....	37
3.2.1. Индукција експерименталног колитиса применом DSS -а.....	38
3.2.2. Одређивање клиничког скорa	38
3.3. Хистолошка анализа	39
3.3.1. Израда и припрема исечака ткива	39
3.3.2. Бојење препарата.....	39
3.3.3. Хистолошки скор	39
3.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO).....	40
3.5. Ћелијска линија мишијих мезенхимских матичних ћелија (MSCs) .	40
3.5.1 Апликација MSCs.....	41
3.6. Изолација моноклеара присутних у ламини проприји зида дебелог црева.....	41
3.6.1. Анализа популација моноклеарних ћелија проточном цитометријом	41
3.6.2. Обележавање мембранских маркера.....	44
3.6.3. Мерење интрацелуларних цитокина	44
3.7. Мерење цитокина и кинуренина у серумима експерименталних животиња.....	45
3.8. Изолација дендритских ћелија мишева соја C57BL/6 и BALB/c	45
3.8.1. Анализа фенотипа и улоге дендритских ћелија.....	46
3.9. Деплеција и адаптивни трансфер дендритских ћелија у мишеве третиране DSS-ом којима су претходно деплетирани дендритске ћелије	46
3.10. Деплеција Treg лимфоцита и адаптивни трансфер дендритских ћелија мишевима на DSS-у којима су претходно деплетирани дендритске ћелије	47
4. РЕЗУЛТАТИ	48
4.1. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике клиничких и хистолошких скорова између мишева соја C57BL/6 и BALB/c регистроване током развоја и регенерације колитиса изазваног DSS-ом.....	48
4.2. Активирани дендритске ћелије BALB/c мишева имају већи капацитет експресије IDO-а и продукују имуносупресивни кинуренин, IL-10 наспрам активираних дендритских ћелија C57BL/6 мишева	56

4.3. Дендритске ћелије BALBc мишева индукују експанзију Treg лимфоцита које супримирају инфламацију и убрзавају регенерацију DSS-ом оштећене слузнице црева	59
4.3.1. У инфилтратима слузнице колона оболелих BALBc мишева присутан је значајно већи број Treg лимфоцита него у инфилтратима оболелих C57BL/6 мишева.....	59
4.3.2. Дендритске ћелије промовишу експанзију Treg ћелија и подижу серумску концентрацију имуносупресивног кинуренина који игра кључну улогу у регенерацији слузнице црева код мишева соја BALB/c у моделу DSS колитиса.....	62
4.4. Инхибиција ензимске активности IDO-а, смањује експанзију Treg лимфоцита и онемогућава регенерацију слузнице црева оболелих мишева.....	67
4.5. Дендритске ћелије активношћу IDO-а индукују експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита што је одлучујуће за регенерацију слузнице црева BALB/c мишева у моделу колитиса изазваног DSS-ом .	71
4.6. Фази ремисије и регенерације слузнице црева у људи оболелих од улцерозног колитиса карактеришу веће концентрације кинуренина и у серумима и у фецесима.....	75
4.7. Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних Treg лимфоцита у сузници колона оболелих од улцерозног колитиса који су у фази ремисије болести	83
4.8. Мања концентрација кинуренина и веће концентрације инфламацијских цитокина измерене су у сулкусним течностима оболелих од улцерозног колитиса у поређењу са здравим особама	88
4.9. Интраперитонеална апликација мезенхималних матичних ћелија мишевима соја C57BL/6 смањује све клиничке, биохемијке и хистолошке параметре колитиса изазваног DSS-ом	92
4.10. Примена MSCs код оболелих мишева значајно смањује и концентрацију проинфламацијских цитокина у серуму	95
4.11. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује број инфламацијских дендритских ћелија и макрофага у зиду црева.....	96
4.12. Примена MSCs код оболелих мишева соја C57BL/6 значајно смањује процентуални удео инфламацијских CD4+ ћелија, а повећава проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји	98
4.13. MSCs повећава имуномодулацијски капацитет аплицираних DCs	99

4.14. Интраперитонеална апликација мезенхимских матичних ћелија BALBc мишева погоршава колитис мишева истог соја.....	102
4.15. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно повећава процентуални удео инфламацијских макрофага, а смањује проценат толерогених ћелија присутних у ламини проприји	104
4.16. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно смањује проценат толерогених дендритких ћелија које продукују IL-10.....	106
4.17. Из ламине проприје оболелих BALBc мишева након третмана MSC детектован је знатно већи проценат инфламацијских CD4+ Т лимфоцита	109
4.18. Концентрација кинуреина у серуму одражава разлике у клиничким и хистолошким скоровима између оболелих C57BL/6 и BALB/c којима су апликоване MSCs	111
5. ДИСКУСИЈА	114
5.1. У колитису изазваном DSS-ом, IDO регулише интеракцију DCs и Treg ћелија у ламини проприји црева	114
5.2. Концентрација кинуренина у серуму, фецесу и сулкусној течности: потенцијално нов прогностички параметар код оболелих од улцерозног колитиса.....	116
5.2.1. Одређивање концентрације кинуренина у серуму и фецесу може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса.....	117
5.2.2. Одређивање концентрације кинуренина у сулкусној течности може представљати нов метод за постављање дијагнозе и праћење прогресије улцерозног колитиса.....	118
5.3. Утицај IDO/кинуренин сигналног пута на терапијске ефекте MSCs у модулацији колитиса индукованог DSS-ом	119
6. ЗАКЉУЧАК	121
РЕФЕРЕНЦЕ	123
Биографија.....	148
Библиографија	149

1. УВОД

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

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

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

1.1. Улцерозни колитис

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

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

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

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

1.1.1. Имунопатогенеза улцерозног колитиса

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

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

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

туморских ћелија- α (енгл. *Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α), Интерферона- γ (енгл. *Interferon- γ* , IFN- γ), IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23 (енгл. *Interleukin*, IL) (31).

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

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

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

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

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

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

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

Под дејством IL-6 и IL-23, које продукују APC, активира се пут Jak-STAT при чему се наивни Т лимфоцити након преписивања транскрипционог фактора STAT3 диферентују у субсет Th17 лимфоцита, које карактерише продукција цитокина: IL17, IL-21, IL-22, TNF- α и IL-23 (42, 51). Th17 лимфоцити након продукције TNF- α потенцирају активацију, сазревање и миграцију неутрофила (52). Инфилтрат

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

1.1.2. Орални знаци и манифестације улцерозног колитиса

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

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

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

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

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

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

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

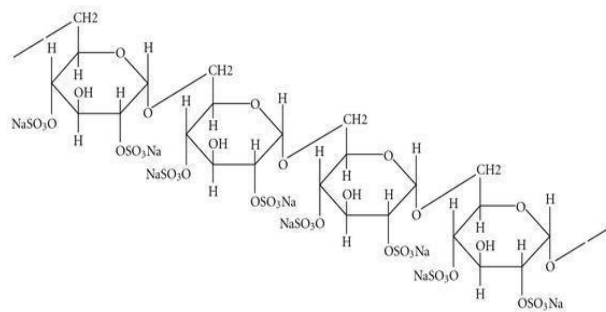
Део експерименталних резултата приказаних у овој дисертацији, добијен је у моделу мишијег колитиса индукованог DSS-ом.

1.2.1. Декстран натријум сулфат (DSS)

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

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

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



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

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

1.2.2. Индукција колитиса DSS-ом

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

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

5% DSS-a у води за пиће (75, 77, 81, 82). Хронични колитис се изазива континуираном администрацијом 1-2% DSS-a са водом за пиће у дужем периоду времена (75, 77, 83, 84).

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

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

1.2.4. Патогенеза DSS колитиса

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

каутелама и појени раствором DSS-а задобијају тежак колитис који се ублажава када се апликују антигени пореклом из бактерија које чине нормалну флору црева (93, 94).

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

1.2.5. Ћелије урођене имуности у патогенези акутног DSS колитиса

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

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

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

уласка бактерија у субепител колона (105, 106, 107, 108, 109). Посебно битну улогу у фагоцитози продрлих интестиналних бактерија играју неутрофили који, ослобађањем цитокина (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и ROS, доприносе развоју инфламације, резултирајући тешким оштећењем зида дебелог црева (108-110).

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

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

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

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

1.2.6. Цитокини у патогенези колитиса изазваног DSS-ом

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

1.3. Индоламин 2,3 деоксигеназа у улцерозном колитису

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

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

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

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

ћелије продукују IDO (130). Највећа активност овог ензима забележена је у дендритским ћелијама, макрофагима, В лимфоцитима, NK ћелијама, активираним моноцитима, гранулоцитима (129-132).

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

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

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

1.3.1. Имуномодулација IDO/кинуренинским путем

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

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

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

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

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

Поред генерисања нових Treg лимфоцита, IDO/кинуренинским путем конвертују се инфламацијски CD4⁺Т лимфоцити у Treg (148). Имуномодулаторне DCs стимулисане TGF- β формирају интраћелијски скафолд за који се везује Src хомологи регион са два

фосфатазна домена (енгл. *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) који дефосфорилишу протеине у трансдукционој каскади CD4+Т лимфоцита и конвертује их у имуносупресиве Трег лимфоците (148). У лимфним чворовима IDO онемогућава конверзију FoxP3+Трег у Th17 лимфоците (које би продуковале IL-17) што резултира акумулацијом Трег у периферном ткиву (141, 148). Трег продукују IL-10, TGF- β па долази до супресије Th1 (IFN- γ +) и Th17 (IL-17+) ћелија (141).

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

1.3.2. Модулација имунског одговора IDO/кинууренинским путем у улцерозном колитису

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

IDO експримирају у великој мери TLR7 и TLR9 рецепторе (155). Након симултане активације агонистима TLR7 и TLR9 активирани DCs колона појачано експримирају IDO чиме ублажавају колитис мишева (155). Сигнални пут IFN- γ /STAT-1 је у активираним DCs веома битан за продукцију IDO-а што је показано у STAT-1 дефицијентним мишевима код којих се не бележи активност овог ензима (156). Појачан имунски одговор Th1 повећава концентрације IFN- γ и подстиче експресију IDO-а у CD103+ DCs, док појачан имунски одговор Th2, коме је својствена појачана продукција IL-4, инхибира продукцију IDO-а у DCs црева (157). CD123+/IDO+pDCs људи и мишије CD103+/DCs продукују велике количине IDO-а који конвертује ефеторске Th1 и Th17 лимфоците у Treg чиме се ствара имуносупресивна средина у колону (141, 158).

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

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

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

1.3.3. IDO у усној дупљи

Истраживања су показала да IDO смањује инфламацију и у усној дупљи (164-169). IDO продукују гингивални фибробласти, мезенхимске матичне ћелије гингиве (G-MSCs), мезенхимске матичне ћелије зубне пулпе (DP-MSCs), мезенхимске матичне ћелије периодонталног лигамента (PDL-MSCs) као и DCs које су инфилтрисане ткиво оралних лезија (170). IDO се константно продукује у гингиви људи, а његова експресија расте

током хроничне пародонтопатије (170). Експериментално је доказано да бактеријски продукти и инфламацијски цитокини појачавају продукцију IDO-а у пародонталним лезијама (164-167, 170). Након активације гингивалних фибробласта, G-MSCs, DP-MSCs, PDL-MSCs као и DCs, LPS-ом или IFN- γ све ове ћелије продукују IDO и тако супримирају експанзију инфламацијских CD4+T-bet+IFN- γ (Th1) као и CD4+ROR γ T+IL-17 (Th17) лимфоцита и конвертују их у Treg лимфоците, стварајући имуносупресивну микросредину (167-170). Матичне ћелије изоловане из периапикалних лезија (PL-MSCs) су способне да, посредством IDO-а, генеришу толерогени фенотип DCs које, затим, због смањене алостимулацијске активности индукују анергију ефекторских Th1 лимфоцита и експанзију имуносупресивних Treg лимфоцита (168).

1.4. MSCs у терапији улцерозног колитиса

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

1.4.1. Диферентовање MSCs у епителне ћелије црева

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

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

1.4.2. Улога MSCs у ангиогенези

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

1.4.3. Имуномодулацијска својства MSCs

MSCs могу, директним контактом као и продукцијом солубилних медијатора, да утичу на ћелије имунског ситема. MSCs супримирају инфламацијске M1 макрофаге и промовишу њихову конверзију у имуносупресивне M2 ћелије (179). Такође, MSCs супримирају сазревање DCs и мењају њихов цитокински профил тако што иинхибирају продукцију проинфламацијских (IFN- γ , IL-12), а подстичу продукцију анти-инфламацијских цитокина (IL-10) што резултира супресијом ефекторских функција инфламацијских Т лимфоцита (180). MSCs мењају цитокински профил CD4+Т лимфоцита тако што супримирају синтезу цитокина (IFN- γ , IL-17) својствених Th1 и Th17 лимфоцитима док подстичу продукцију IL-4 и IL-10 карактеристичних за ефекторске Th2 лимфоците (181). MSCs могу да инхибирају пролиферацију Th1 и Th17 ефекторских лимфоцита активацијом PD-1 рецептора, док продукцијом Трансформишућег фактора раста- β (енгл. *Transforming Growth Factor- β* , TGF- β) или IL-10 повећавају инфилтрат Treg лимфоцита у цревима чиме супримирају инфламацију

(182). MSCs су познате као потентни извор IDO-а (183, 184). Након стимулације IFN- γ , MSCs продукују IDO, при чему инхибирају Т и В ћелијски одговор и инхибирају цитотоксичност, пролиферацију и продукцију имунопотенцирајућих цитокина НК ћелија (185-192).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

Сагласно овом генералном циљу утврђени су и експериментални захтеви:

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

3. ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Пацијенти

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

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

Табела 1. Мауо клинички скор

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

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

Табела 2. *Truelove and Witts* индекса клиничке активности

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

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

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

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

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

Фенотип колон-инфилтришућих ћелија, добијених из биоптата црева пацијената са улцерозним колитисом анализиран је проточном цитометријом. Биоптати су опрани три пута у HBSS-у (енгл. *Hank's balanced salt solution Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*). Овако испране ћелије су инкубирани у HBSS-у са 1ml EDTA (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) десет минута при температури од 37°C. Да би се уклониле епителне ћелије узорци су благо мешани. После тога ћелије су пране HBSS-ом, инкубирани 20-30 минута у 2ml DMEM-а (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) са 1mg/ml колагеназом типа I (=336U/ml) (*Sigma-Aldrich*), 0.1mg/ml DNase-ом (*Sigma-Aldrich*) и 1mg/ml хијалоуронидазом (*Sigma-Aldrich*) без FCS (енгл. *fetal calf serum*) при температури од 37°C. Затим су ћелије два пране у PBS-у (енгл. *Phosphate-buffered saline*) и на концу помешане са градијентом *Ficoll*-а, да би потом биле центрифуговане на 690g у трајању од двадесет минута без употребе кочница. Пажљиво уклоњен интерфазни слој је пран у PBS-у. Добијена ћелијска суспензија опрана је два пута бафером који садржи 0.05% NaN₃, 0.1% BSA (*Bovine Serum Albumin*), и 0.4% TCD (*Trisodium Citrate Dehydrate*) додат у PBS. 1×10^6 ћелија је инкубирано са моноклонским анти-хуманим површинским антителима CD4, CD56 (200, 201). Интраћелијским бојењем обележене су ћелије које продукују IFN- γ , IL-10, IL-17 и FoxP3 (Табела 3). Пре интраћелијског бојења ћелије су претходно стимулисани 4h на 37°C са 5 μ g/ml *phorbol 12-myristate 13-acetate*-ом (PMA) (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*), 5 μ g/ml *ionomycin*-ом (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*) и 1 μ l *Golgi plug* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). После тога обављена је фиксација и пермеабилитација применом *BD Cytofix/Cytoperm kit*-а (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*) и обележене одговарајућим моноклоналним антителима коњугованим са флуорохром-ом.

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

Табела 3. Моноклонска антитела

3.2. Лабораторијске животиње

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

3.2.1. Индукција експерименталног колитиса применом DSS -а

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

3.2.2. Одређивање клиничког скорa

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

Скор	Губитак телесне масе	Конзистенција фецеса	Ректално крварење
0	нема губитка	нормална	нема крварења
1	1-5%	нормална	нема крварења
2	6-10%	ретка	слабо крварење
3	11-15%	ретка слузава	видљиво крварење
4	>15%	дијареја	велико крварење
DAI* се рачуна као збир свих параметара			

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

3.3. Хистолошка анализа

3.3.1. Израда и припрема исечака ткива

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

3.3.2. Бојење препарата

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

3.3.3. Хистолошки скор

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

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

Табела 5. Хистолошки скор

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

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

3.5. Ћелијска линија мишијих мезенхимских матичних ћелија (MSCs)

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

3.5.1 Апликација MSCs

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

3.6. Изолација моноклеарних присутних у ламини проприји зида дебелог црева

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

3.6.1. Анализа популација моноклеарних ћелија проточном цитометријом

Проточном цитометријом установљен је процентуални удео и укупан број сваке популације имунских ћелија важних у патогенези експерименталног модела колитиса и то: CD8⁺ Т лимфоцита, CD4⁺ Т лимфоцита, CD4⁺CD25⁺ регулаторних Т лимфоцита,

CD3+NK1.1+ NKT ћелија; NK1.1+CD3-NK ћелија; CD11c+ дендритских ћелија, CD11c+I-A+ дендритских ћелија које експримирају МНС (*Major histocompatibility complex*) молекула II класе, CD11c+CD80+CD86+ дендритских ћелија које експримирају костимулаторне молекуле, CD11c+CD11b+ позитивних инфламацијских и CD11c+CD8+ регулацијских DCs; CD45+F4/80+ макрофага) (Табела 6).

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

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

Табела 6. Моноклонска антитела

3.6.2. Обележавање мембранских маркера

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

3.6.3. Мерење интрацелуларних цитокина

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

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

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

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

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

3.7. Мерење цитокина и кинуренина у серумима експерименталних животиња

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

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

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

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

3.8.1. Анализа фенотипа и улоге дендритских ћелија

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

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

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

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

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

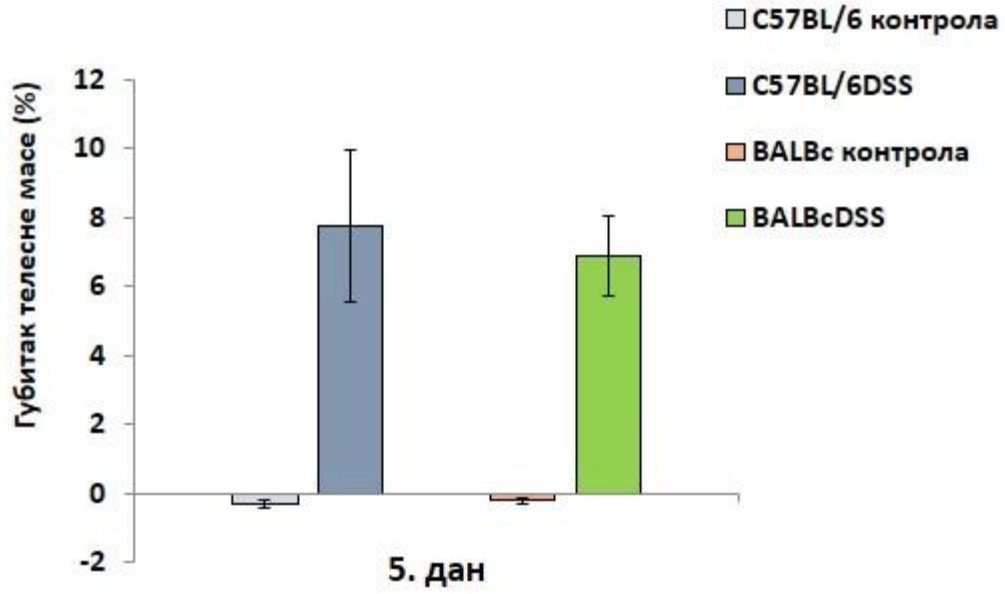
3.10. Деpleција Treg лимфоцита и адоптивни трасфер дендритских ћелија мишевима на DSS-у којима су претходно деплетирани дендритске ћелије

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

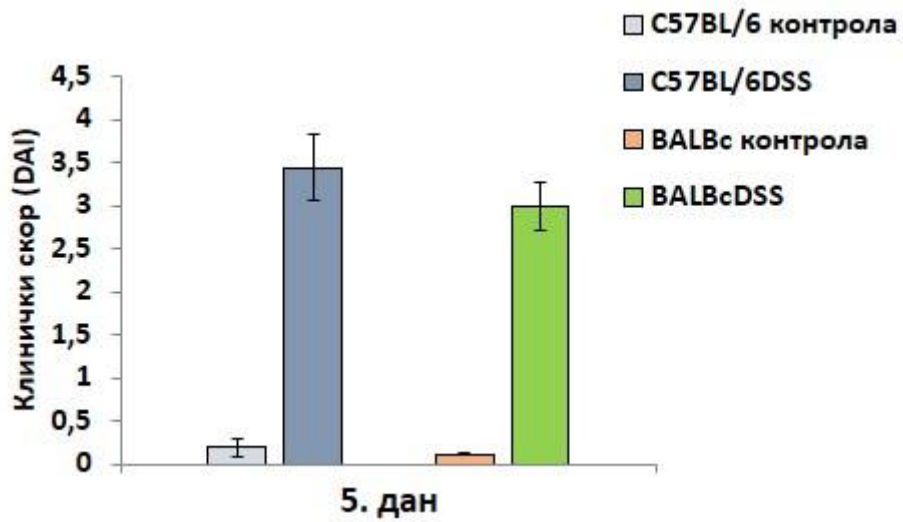
4. РЕЗУЛТАТИ

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

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

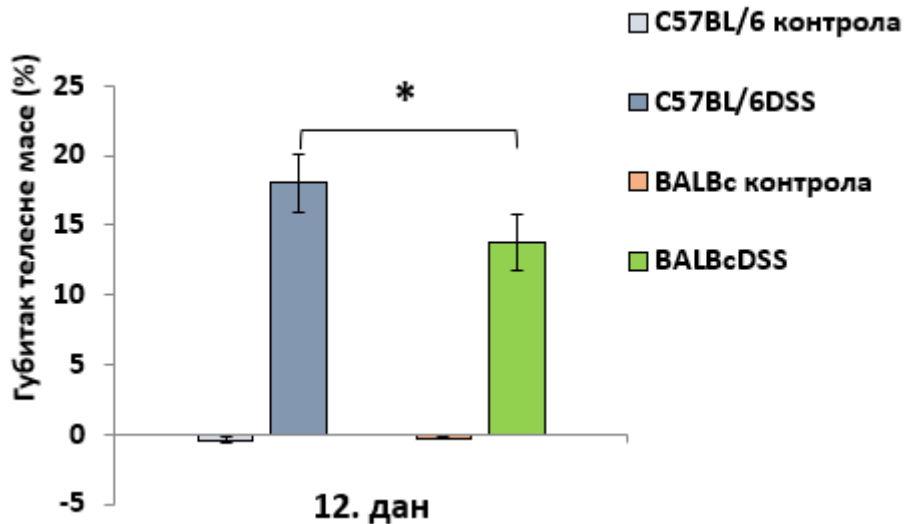


Графикон 1а

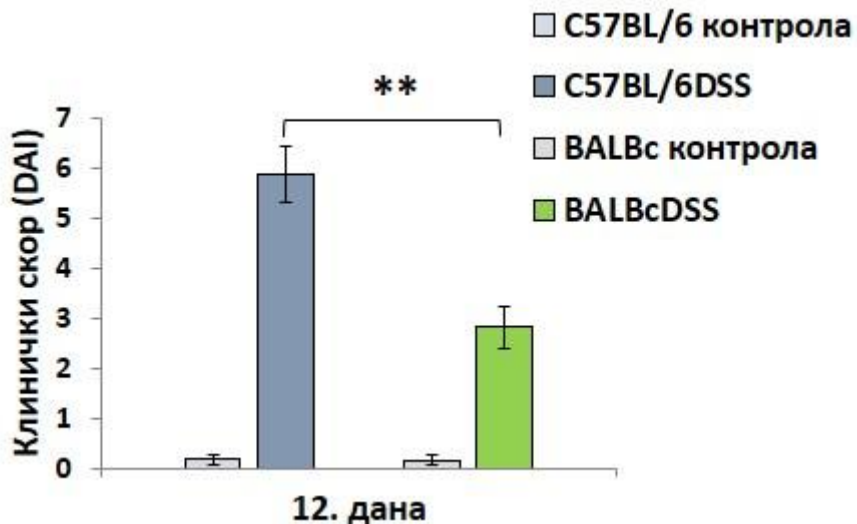


Графикон 1б

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



Графикон 2а

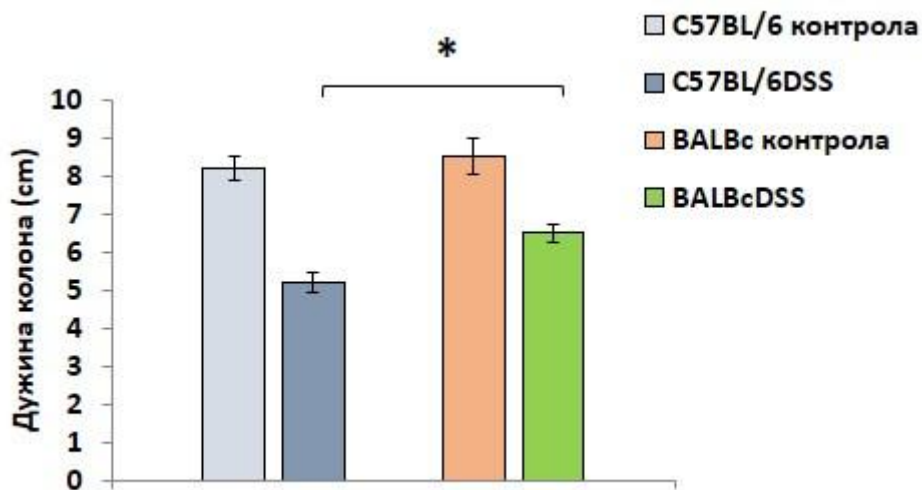


Графикон 2б

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

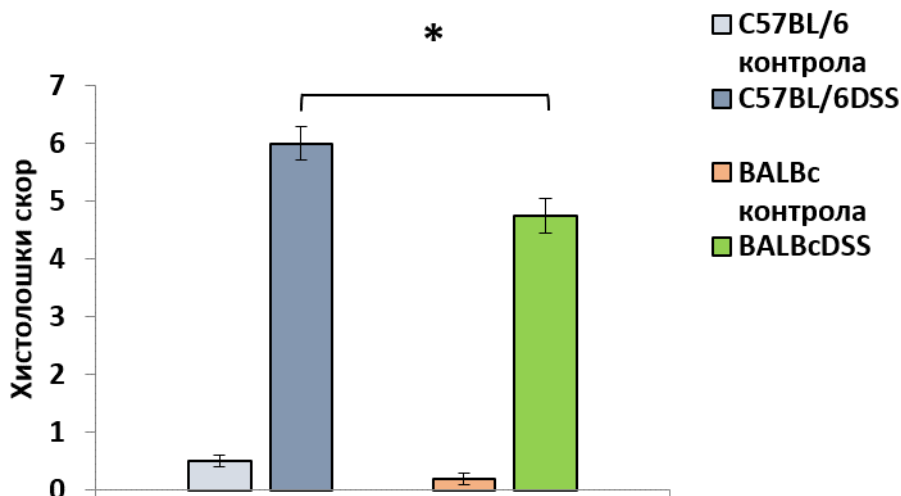
Уочене разлике у клиничкој слици болести су потврђене патолошким и хистолошким налазима. Колитис у људи се одликује скраћењем колоне. Модел колитиса који смо одабрали поред ћелијских механизма наликује људском и у овом аспекту па је праћење дужини колоне неопходно. Након 12-дана експеримента изоловани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

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



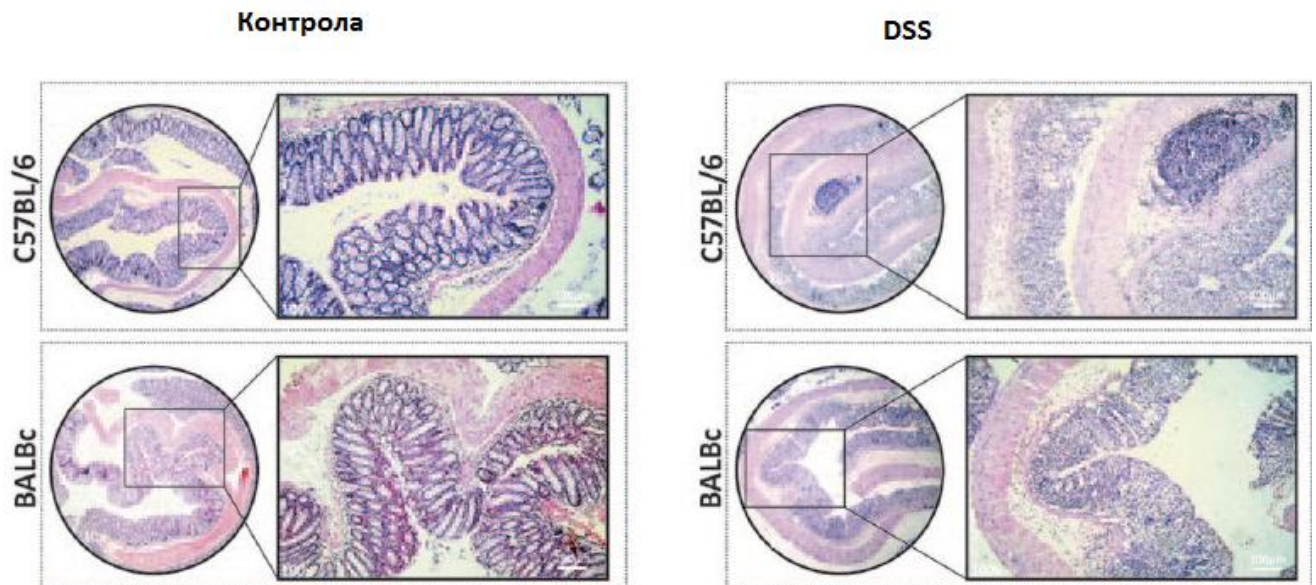
Графикон 3

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



Графикон 4

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



Слика 2

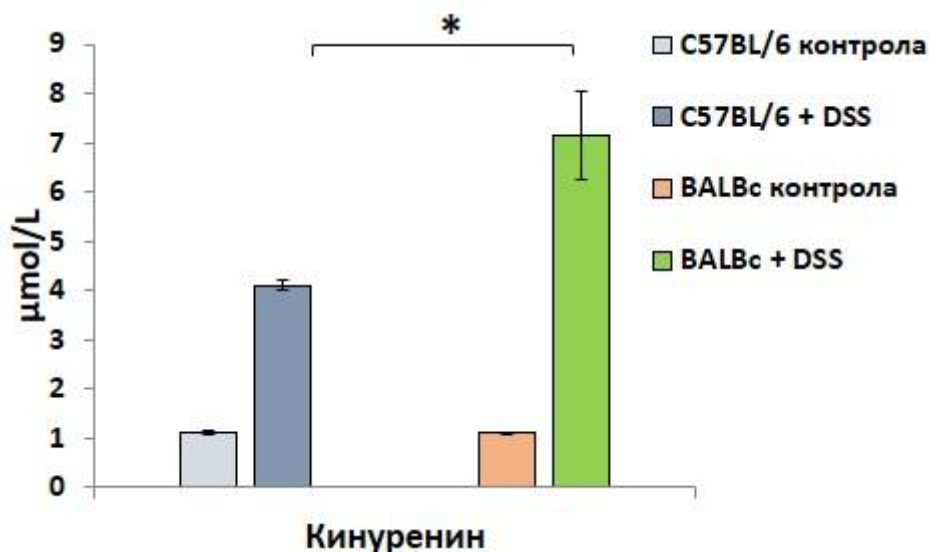
Слика 2. Репрезентативни препарати ткива дебелог црева после примене DSS-а. Код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 оштећења епителних ћелија црева су била опсежнија, масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева другог соја поред ограниченог ћелијског инфилтрата нису уочена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

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

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

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

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

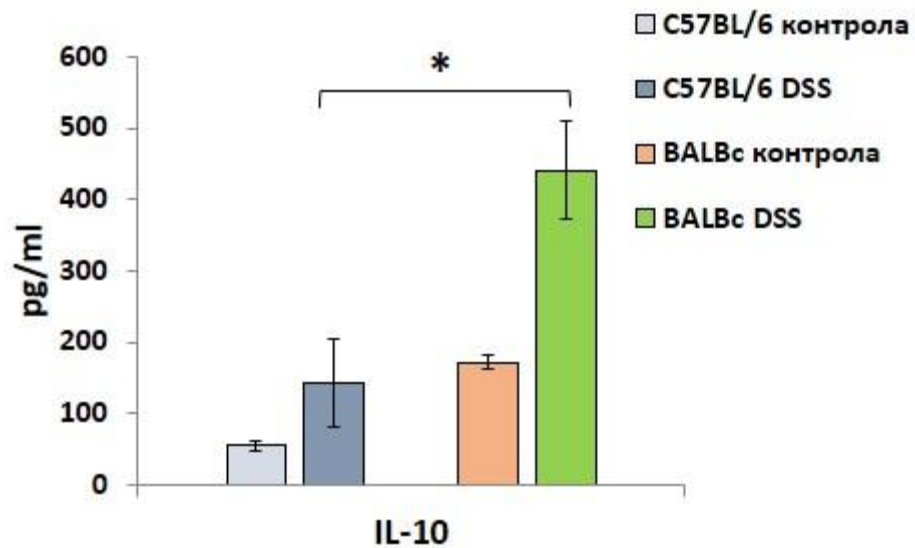


Графикон 5

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

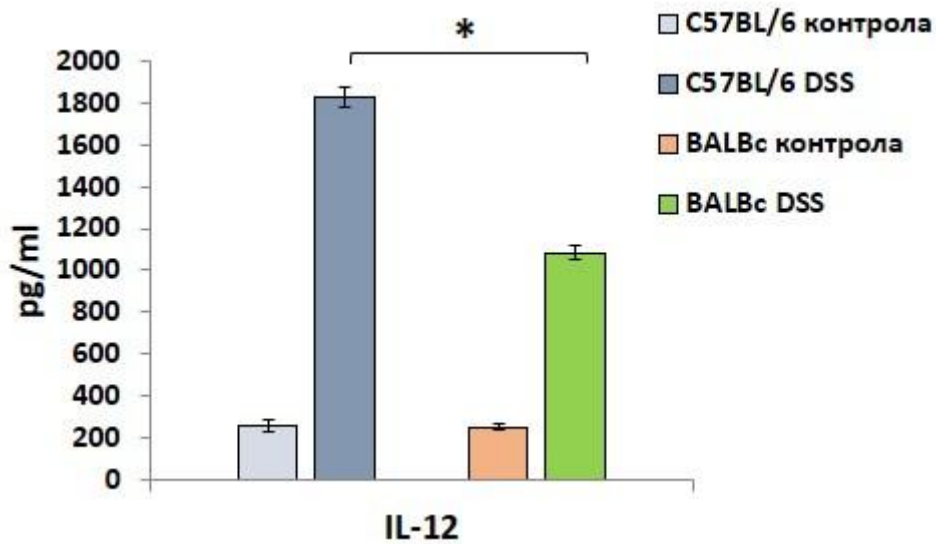
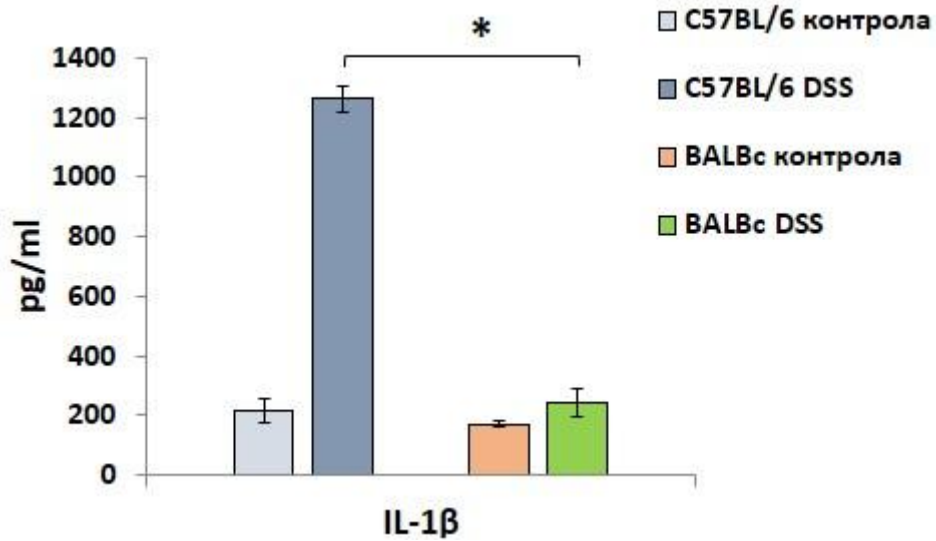
У серуму BALBc мишева који су примали DSS измерена је знатно већа концентрација имуносупресивног IL-10 (Графикон 6а), а концентрације инфламацијских цитокина (IL-12, IL-1 β) значајно мање у поређењу са животињама другог соја (Графикон 6б). Код мишева соја C57BL/6 који су примали DSS се уочава супротан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

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



Графикон ба

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

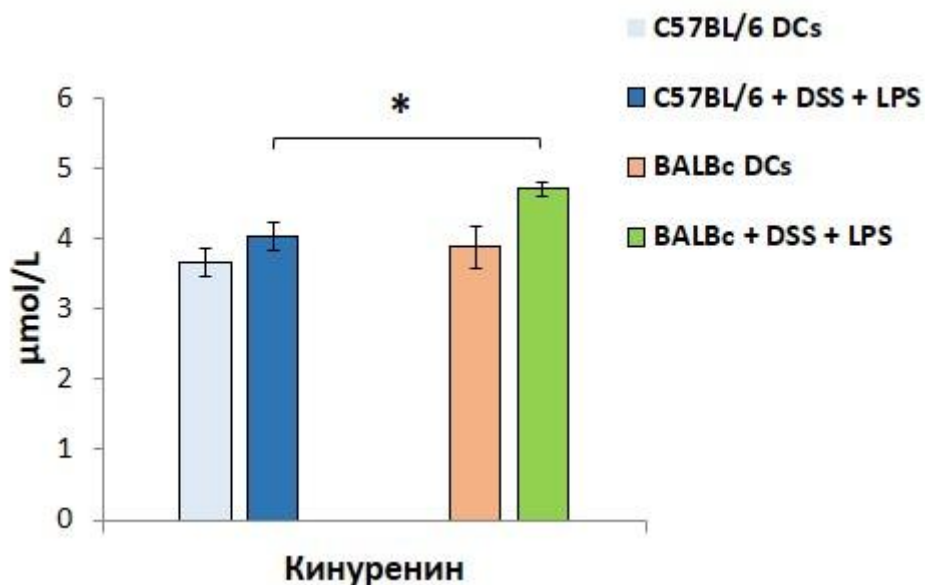


Графико 6б

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

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

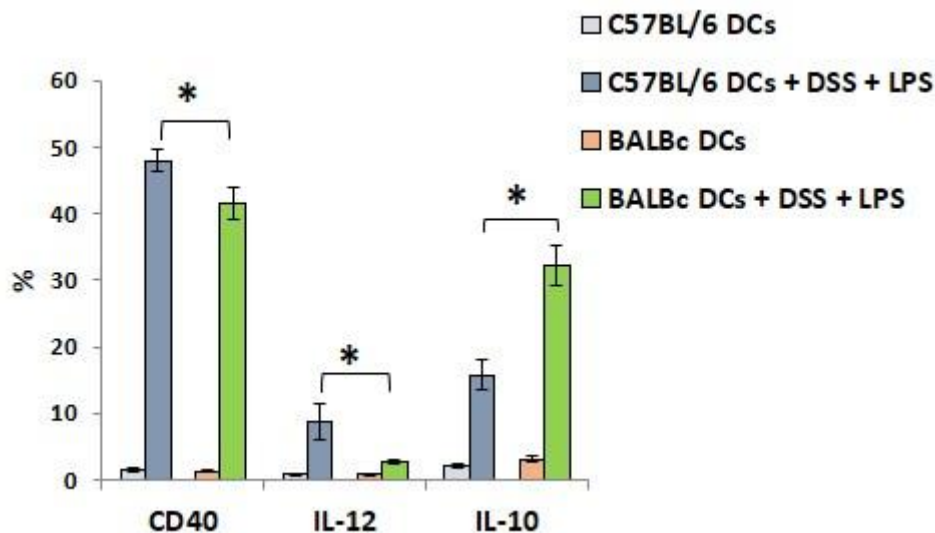
У намери да се утврде ћелијски и молекулски механизми одговорни за сојне разлике у одговору на DSS, прво су анализирани разлике у фенотипу и функцији дендритских ћелија између C57BL/6 и BALB/c мишева. Због чињенице да су дендритске ћелије један од главних извора IDO-а у дигестивном тракта (141) најпре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



Графикон 7

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

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

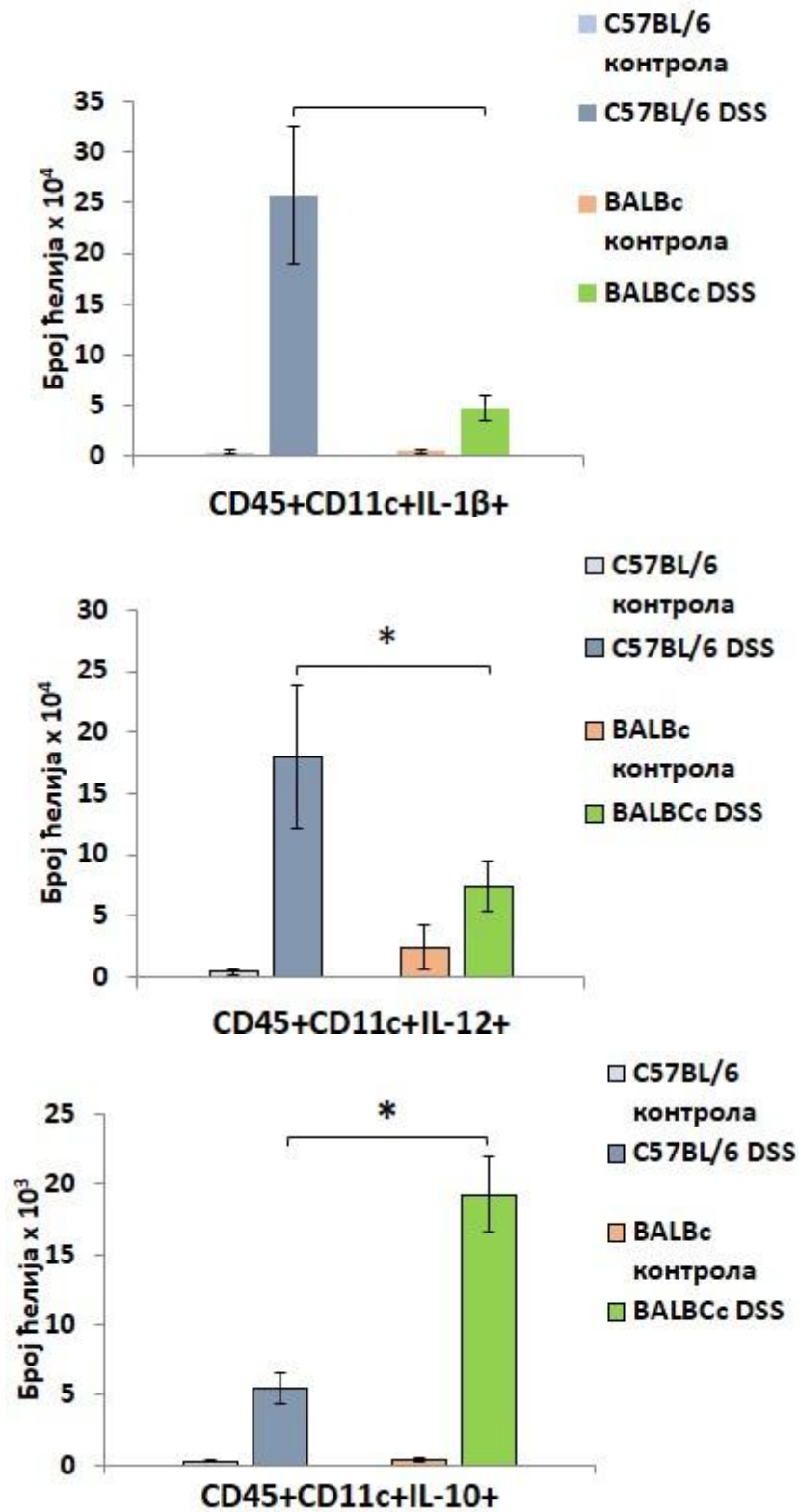


Графикон 8

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

У *ex vivo* експериментима испитана је продукција цитокина у дендритским ћелијама добијеним из ламине проприје колона оболелих мишева оба соја и добијени резултати корелирани су са резултатима добијеним *in vitro*. Статистички значајно већи број толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10 и статистички мањи број инфламацијских DCs позитивних на IL-12 и IL-1 β присутних у ламини проприји колона

DSS-ом третираних BALBc мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима, што је потврдило сојне разлике у фенотипу активираних дендритских ћелија забележеним *in vitro* (Графикон 9).



Графикон 9

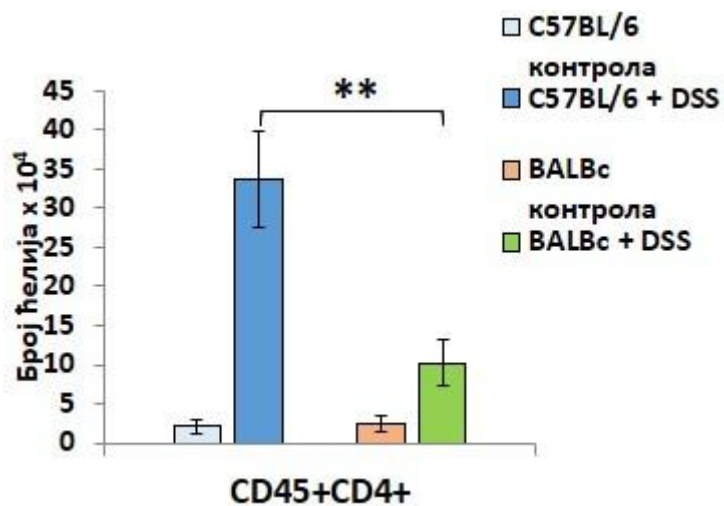
Графикон 9. Разлике у броју толерогених и проинфламацијских дендритских ћелија у ламини проприји DSS-ом третираних мишева соја BALB/c и C57BL/6

4.3. Дендритске ћелије BALB/c мишева индукују експанзију Treg лимфоцита које супримирају инфламацију и убрзавају регенерацију DSS-ом оштећене слузнице црева

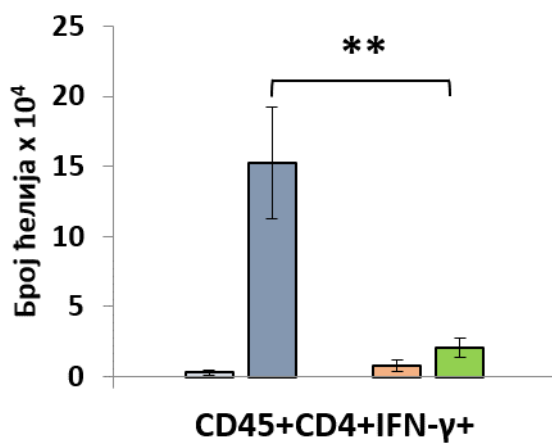
Након што је показан имуносупресивни фенотип дендритских ћелија добијених из ламине проприје оболелих BALB/c мишева испитан је механизам ове супресије, тако што је прво проточном цитометријом анализирана процентуална и нумеричка заступљеност ефекторских субопулација CD⁺ Т лимфоцита у инфилтратима слузнице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

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

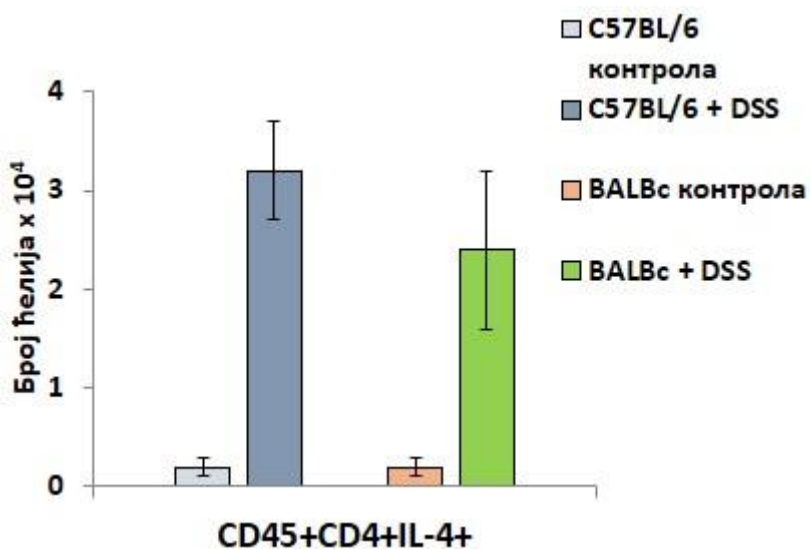
Са циљем испитивања разлика у капацитету BALB/c и C57BL/6 дендритских ћелија за поларизацију Т ћелијског имунског одговора, проточном цитометријом је анализирана процентуална заступљеност и број Th1, Th2 и Th17 CD⁺Т лимфоцита који су инфилтрисали ламину проприју црева оболелих мишева. У ламини проприји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



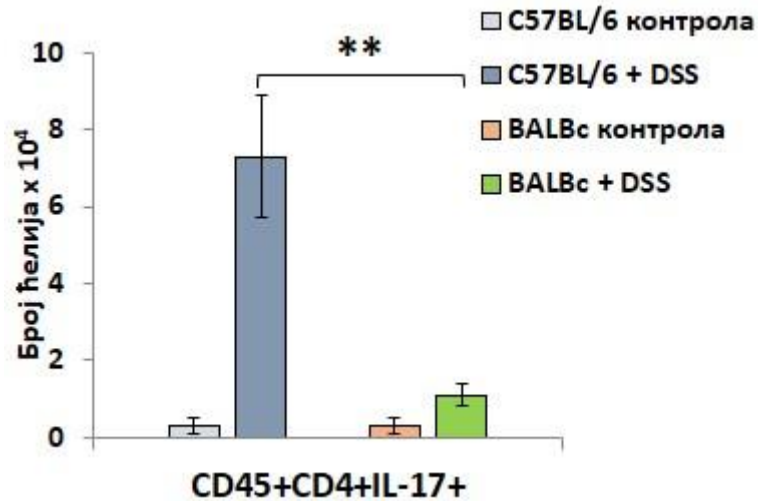
Графикон 10а



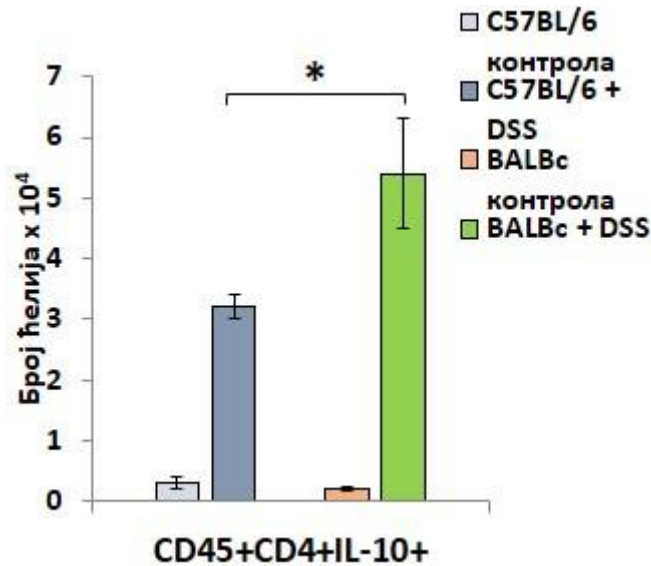
Графикон 10б



Графикон 10в



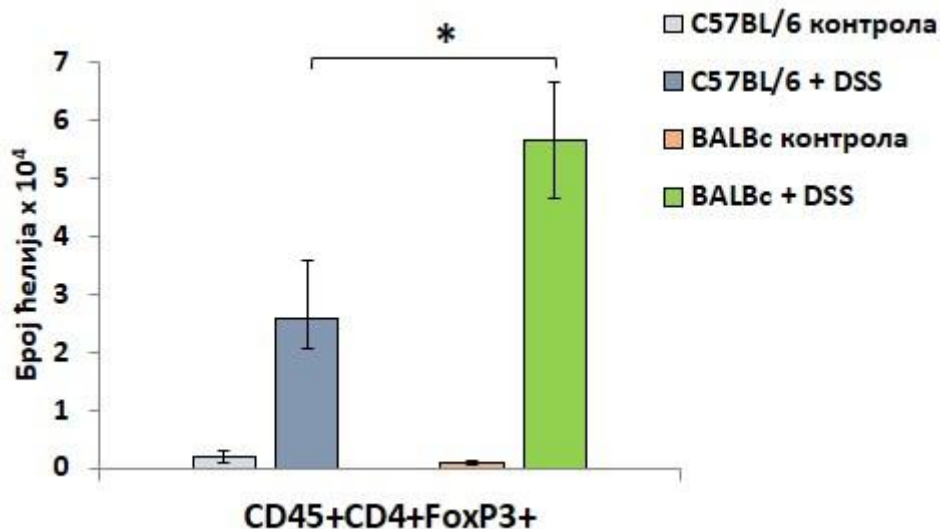
Графикон 10г



Графикон 10д

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

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



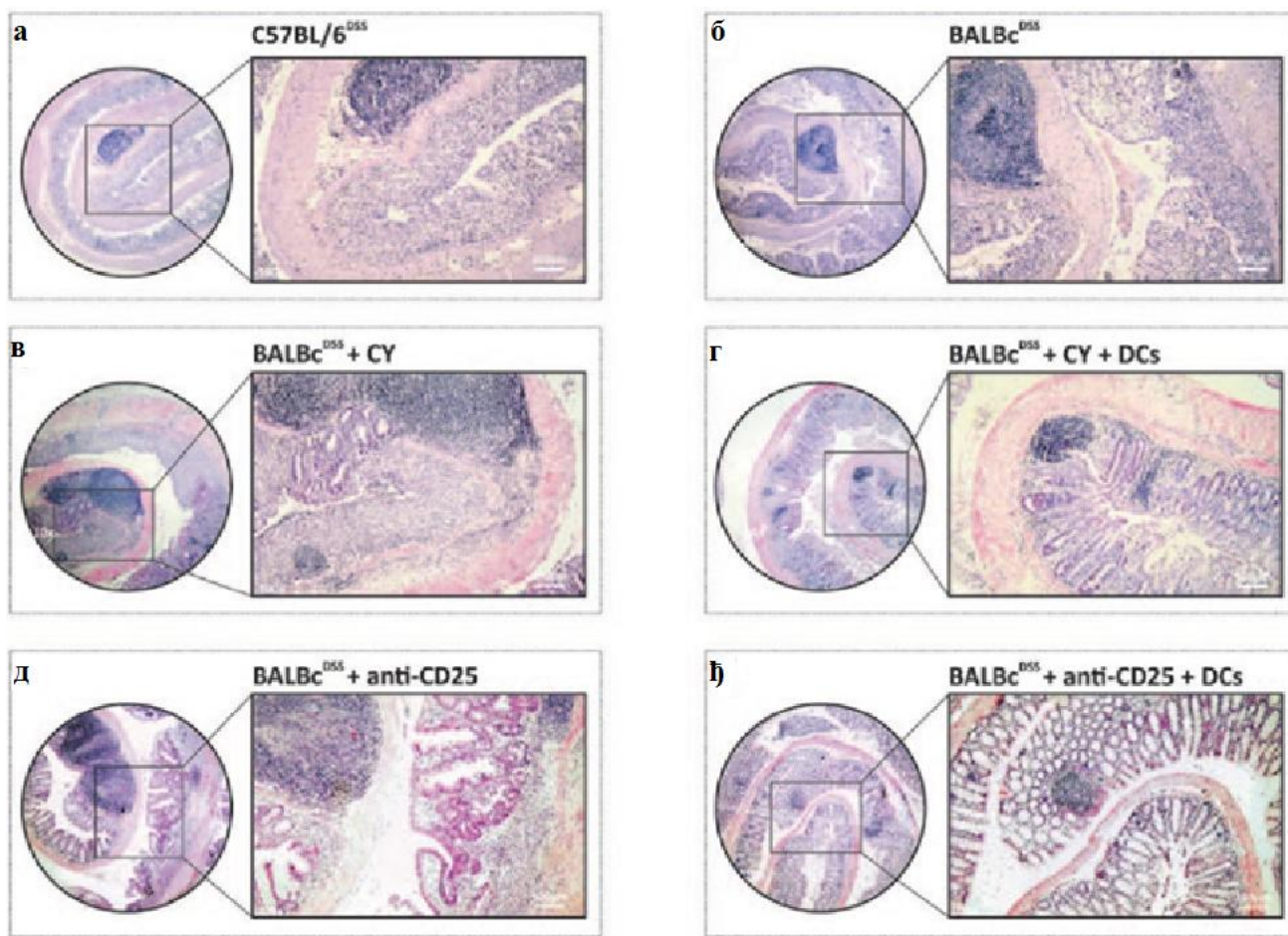
Графикон 11

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

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

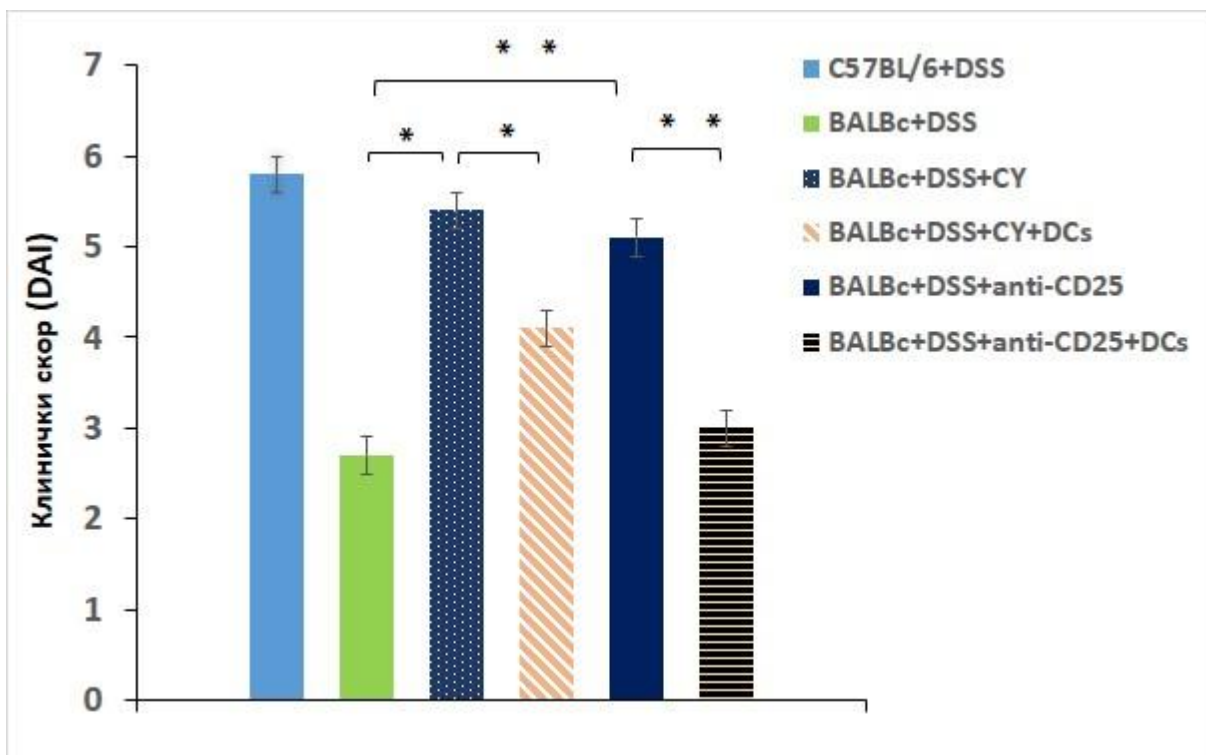
Да би се испитала улога имуносупресивних DCs за експанзију Трег лимфоцита, дендритске ћелије, изоловане из слезина здравих мишева соја BALB/c су пренесене у DSS-ом третиране мишеве истог соја, петог дана након иницијалне апликације DSS-а. Претходно су овим мишевима, апликацијом *Cyclofosamid*-а (10mg/kg)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

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

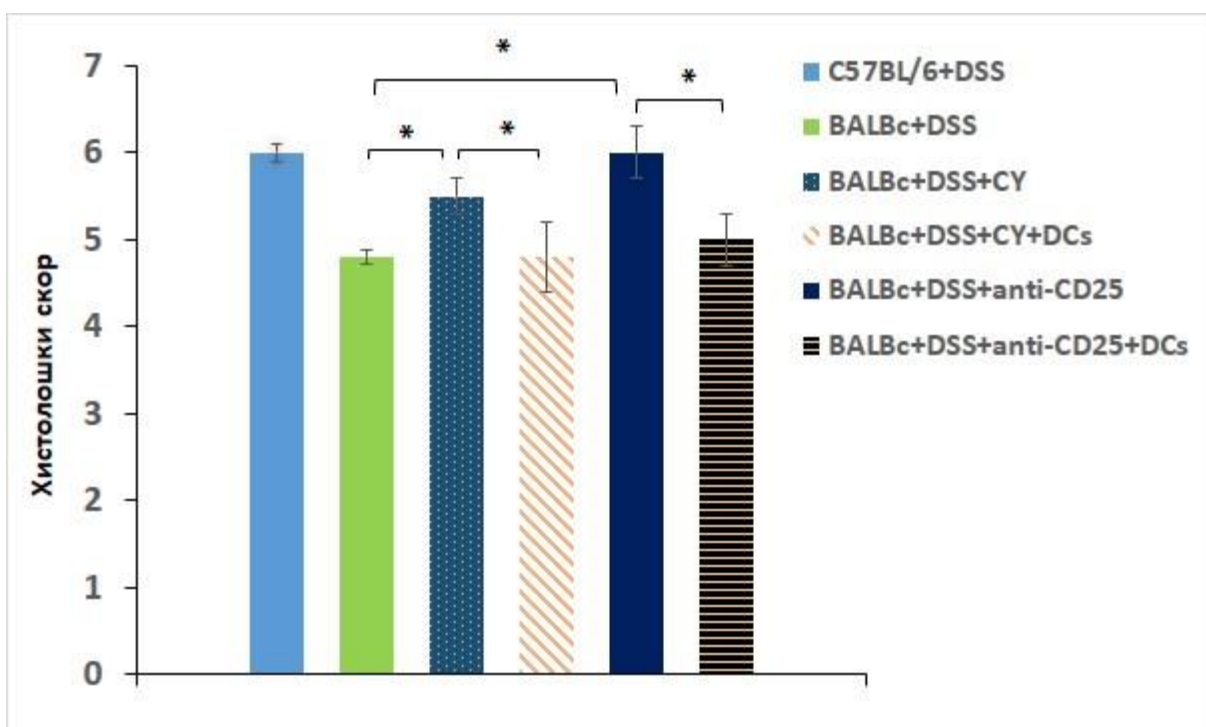


Слика 3

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

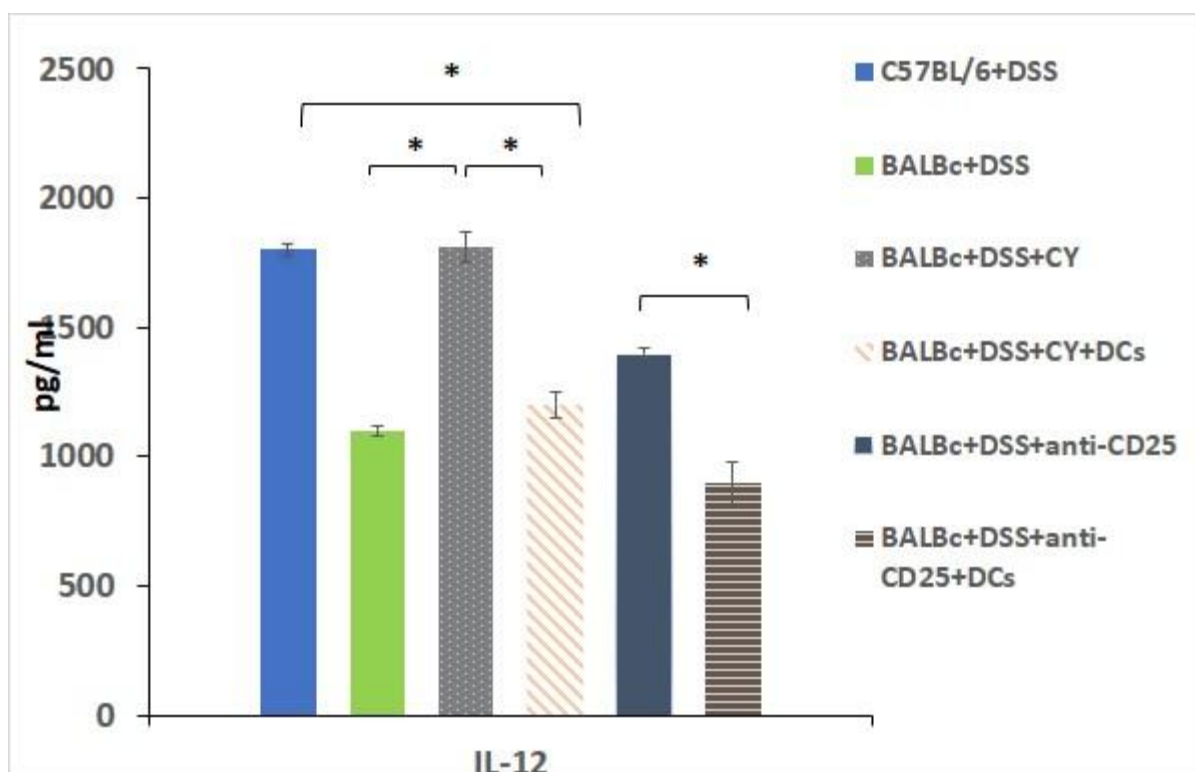


Графикон 12а

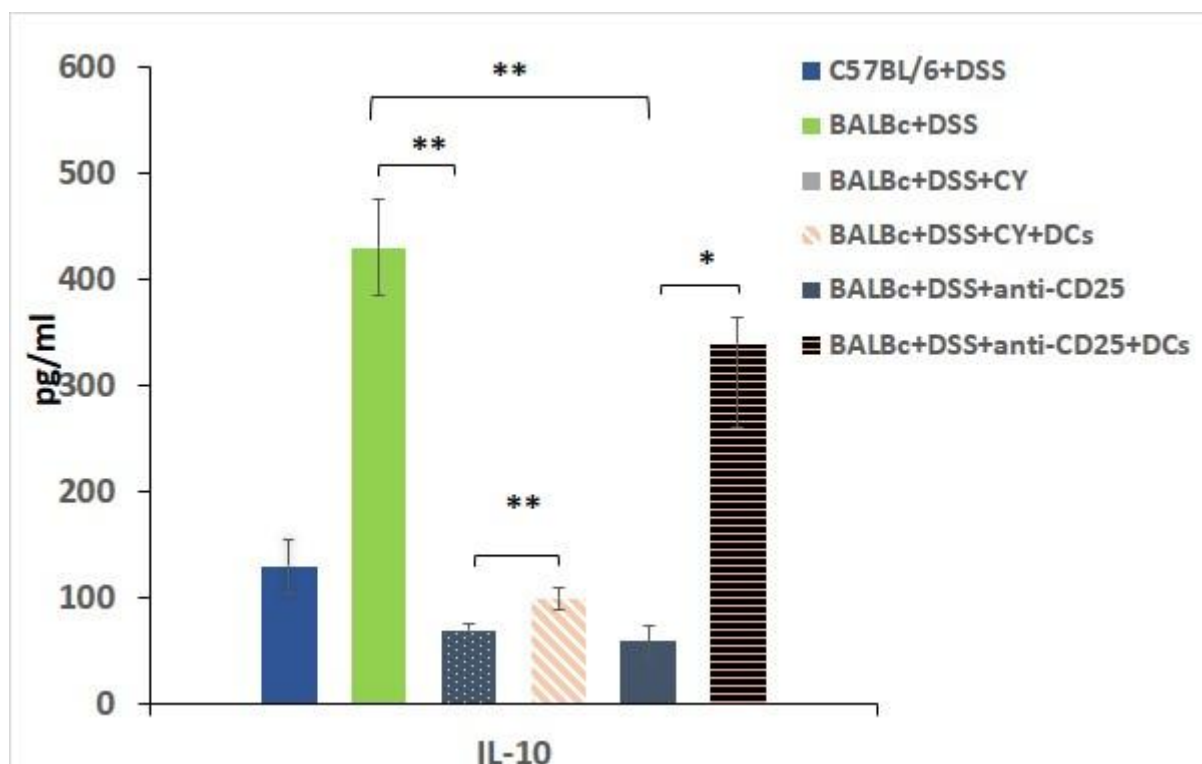


Графикон 12б

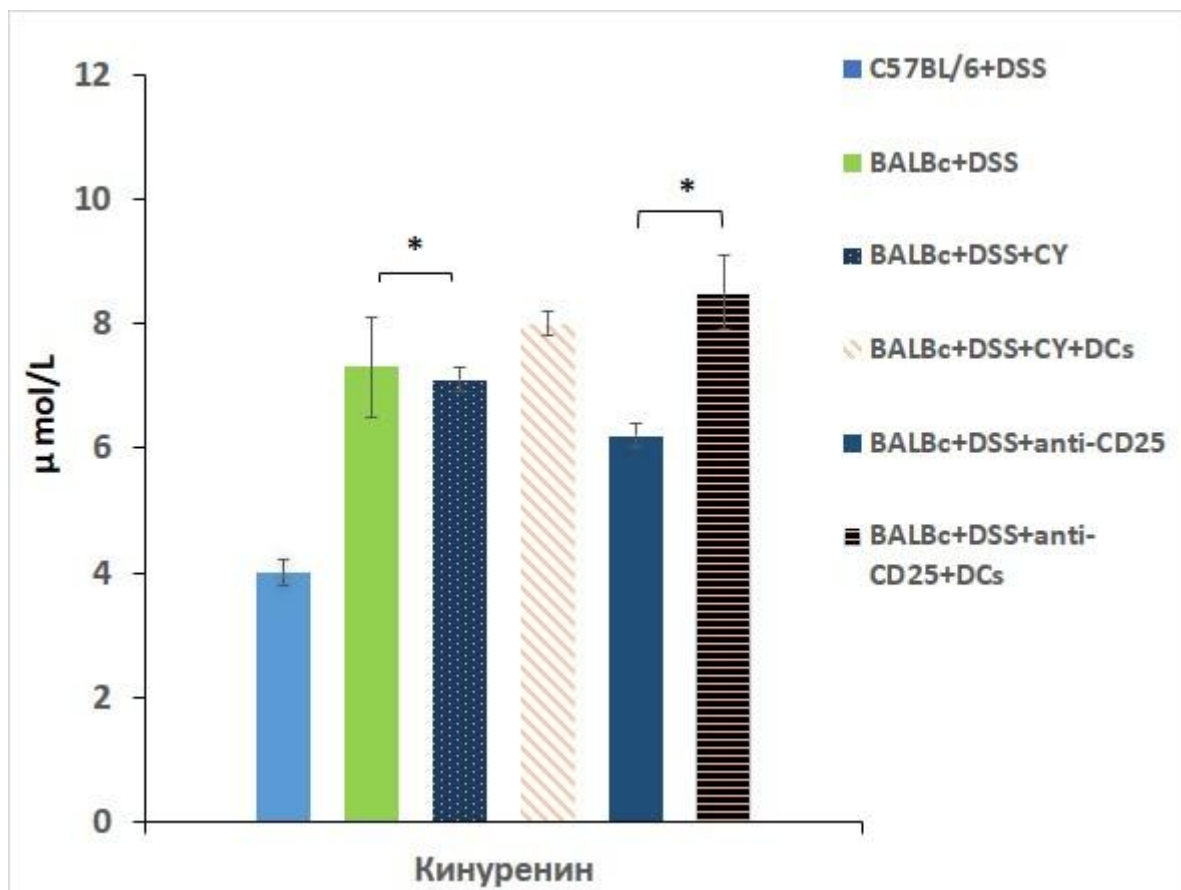
Графикон 12. Клинички (а) и хистолошки скор (б) DSS-ом третираних BALB/c мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити и трансфероване дендритске ћелије.



Графикон 13а



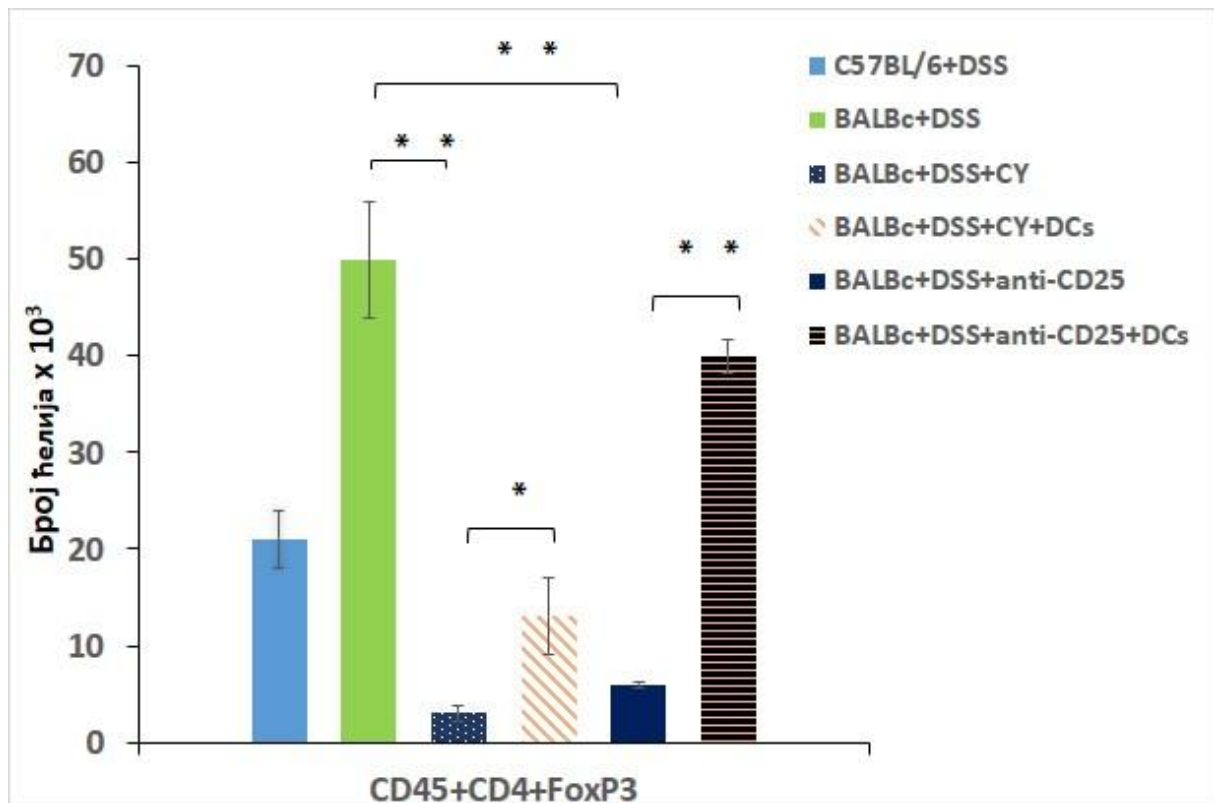
Графикон 13б



Графикон 13в

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

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



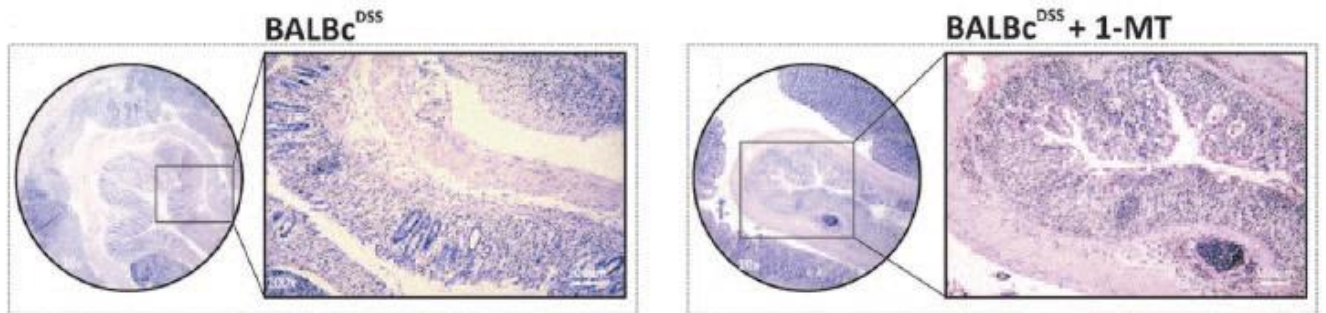
Графикон 14

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

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

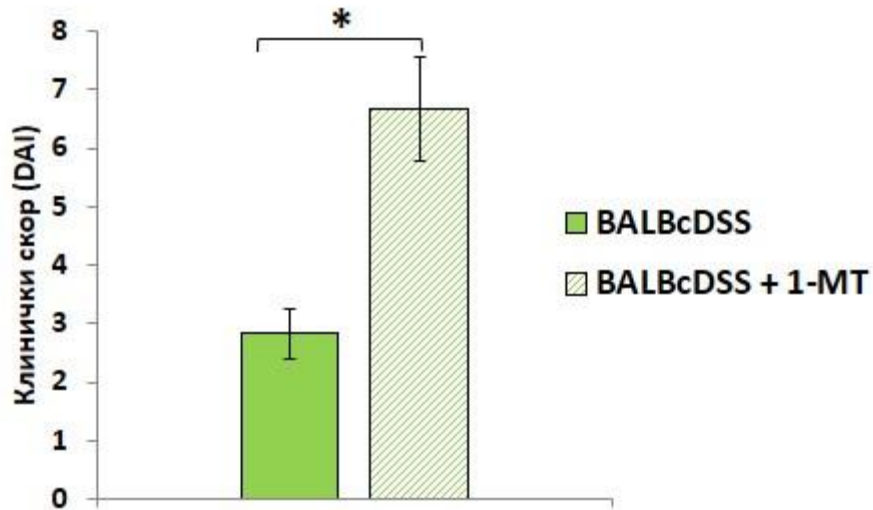
Како би се установило да ли инхибиција IDO-а утиче на процес регенерацију слузнице црева BALB/c мишеви су упоредо са DSS-ом примали и 1-MT (2mg/mL), компетативни хемијски инхибитор IDO-а (215). Инхибиција IDO-а је значајно погоршала оштећења колона BALB/c мишева и узроковала погоршања свих клиничких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

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

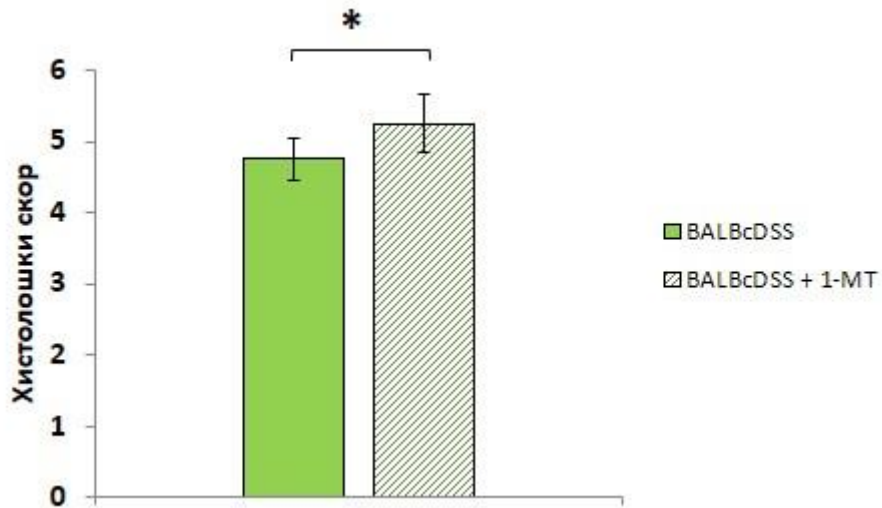


Слика 4

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



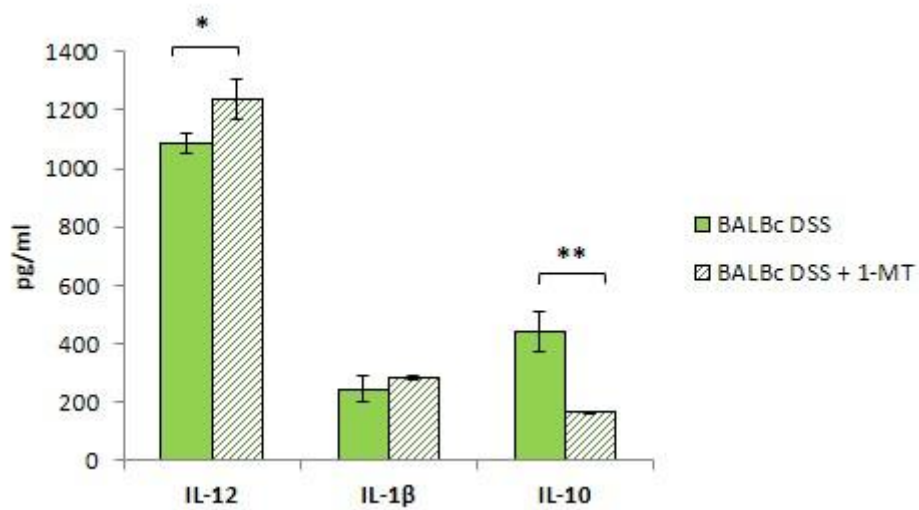
Графикон 15а



Графикон 15б

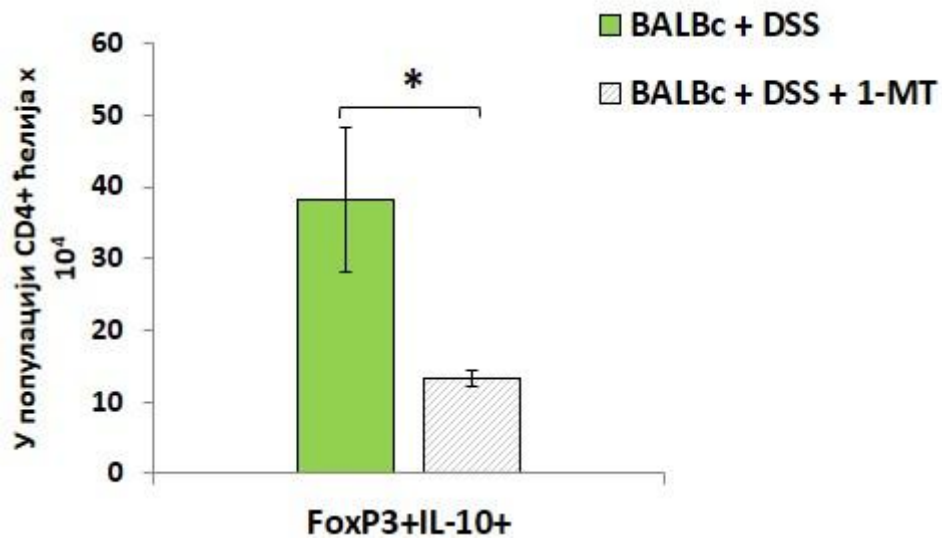
Графикон 15. Клинички (а) и хистолошки скор (б) након блокирања IDO-а употребом 1MT.

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



Графикон 16

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



Графикон 17

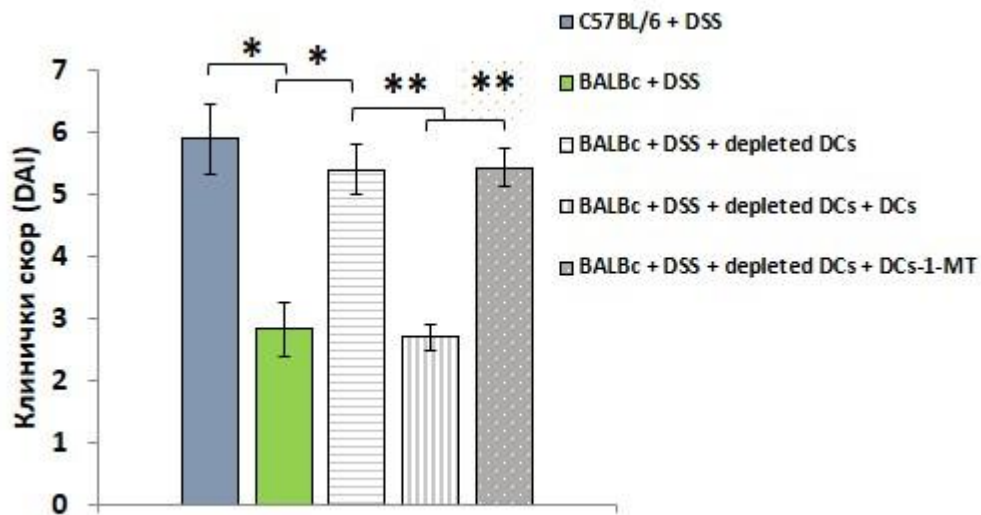
Графикон 17. Број FoxP3 ћелија које продукују IL-10 након примене 1-MT.

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

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

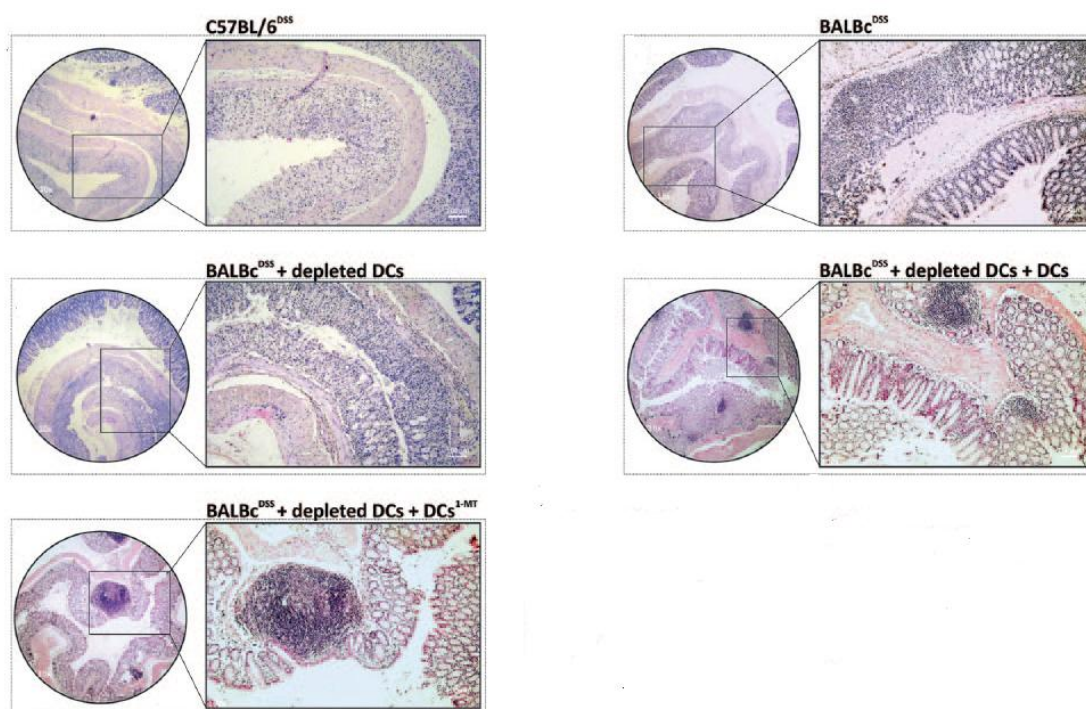
Са циљем да се елиминише утицај резидентних дендритских ћелија, из експерименталних животиња су пре трансфера дендритских ћелија деплетиране резидентне дендритске ћелије интраперитонеалном апликацијом сапорина (*Saporin, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA*) у дози од 2mg/kg. Сапорин циљно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

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



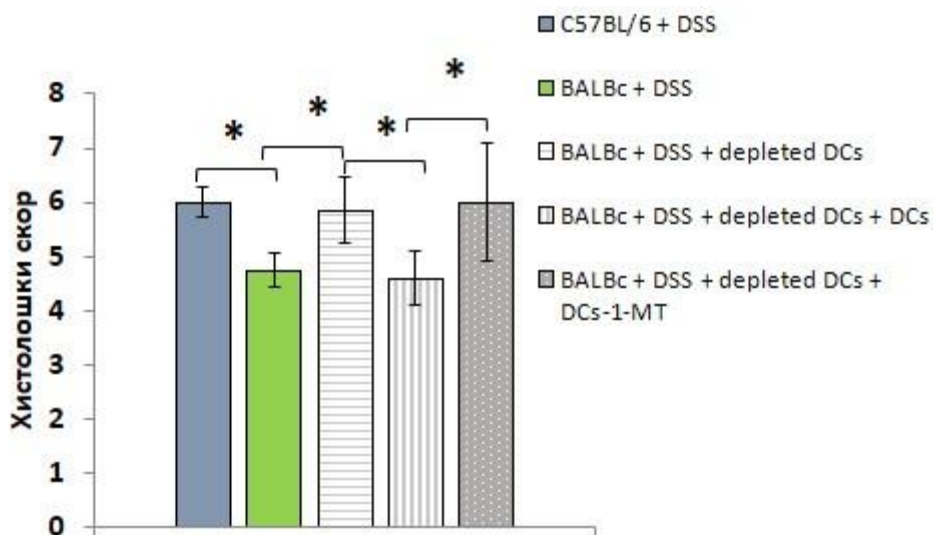
Графикон 18

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



Слика 5

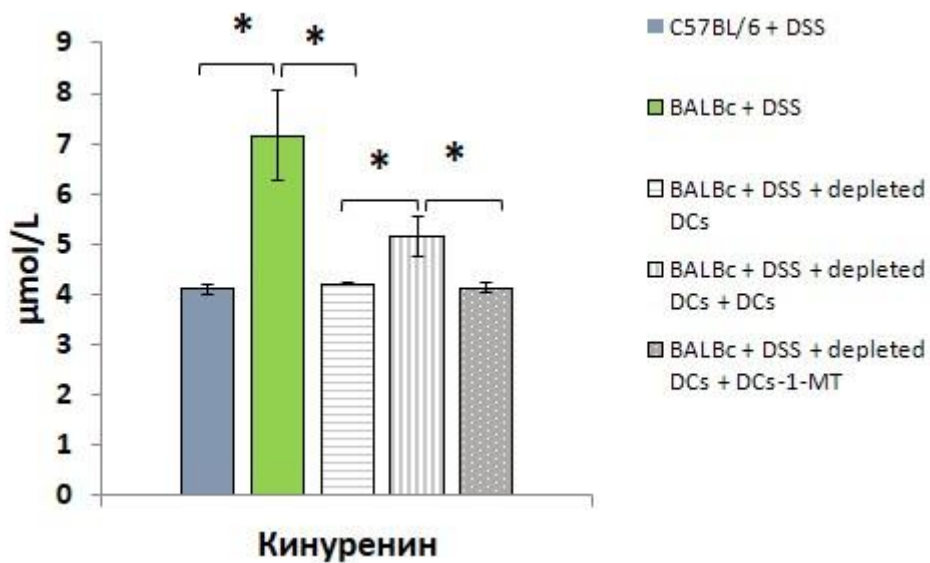
Слика 5. Репрезентативни исечци ткива колона DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија. Животињама којима смо деплетирали DCs уочено је оштећење епитела праћено едемом и ћелијским инфилтратом, а сличан налаз је уочен и код групе мишева који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



Графикон 19

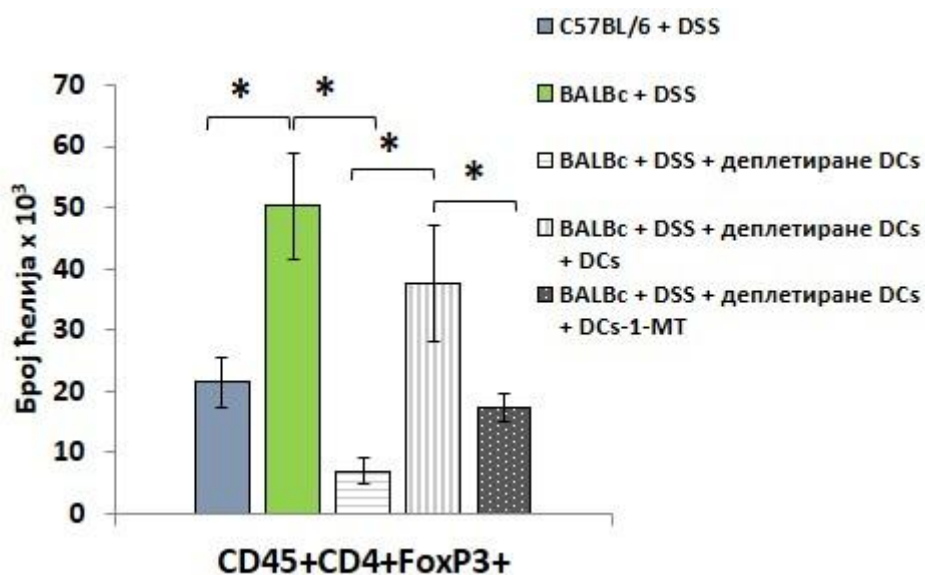
Графикон 19. Хистолошки скор DSS-ом третираних мишева који су примили дендритске ћелије након деплеције резидентних дендритских ћелија

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



Графикон 20

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



Графикон 21

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

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

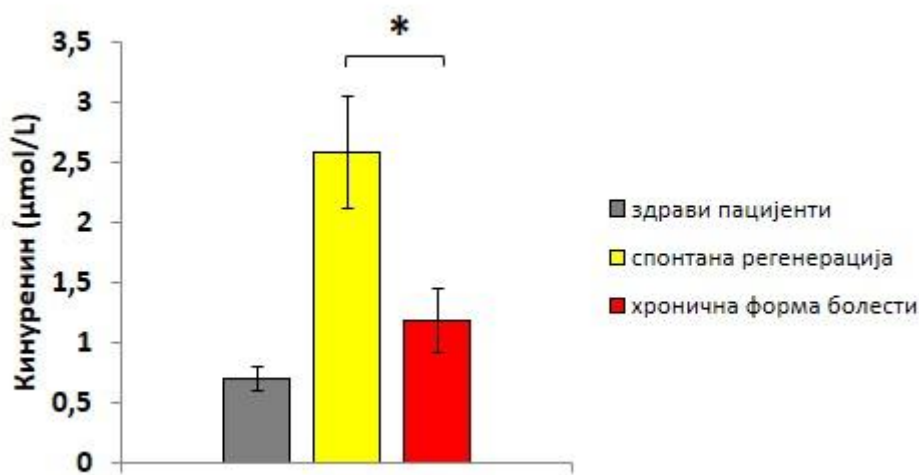
Да би се проверила релевантност резултата добијених у мишијем моделу болести, анализирани су концентрације кинуренина у серуму и фецесу пацијената оболелих од улцерозног колитиса у различитим фазама болести и добијени подаци су поређени са резултатима добијеним код здравих испитаника. Оболели пацијенти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

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

Табела 7

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

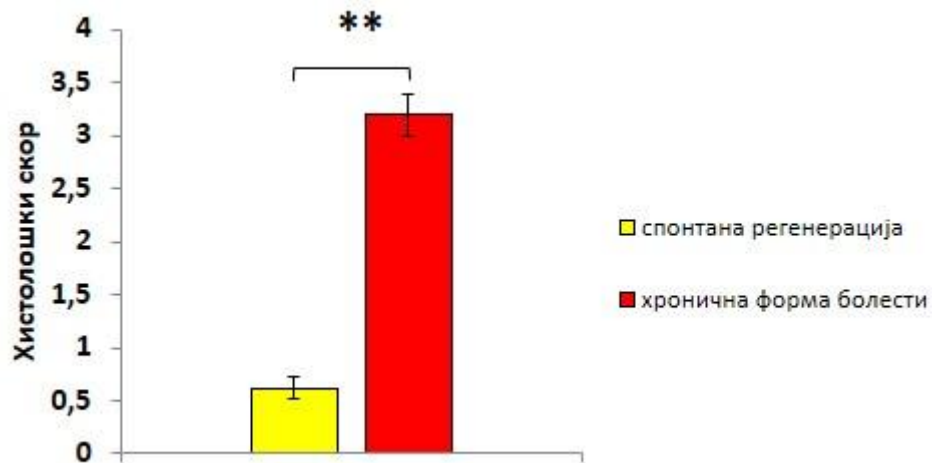
Веће концентрације кинуренина у серуму измерене су у обе групе оболелих у поређењу са здравим испитаницима. Концентрација кинуренина у серуму пацијената код којих је колитис у фази ремисије су биле значајно веће него у групи оболелих од хроничног перзистентног облика колитиса, односно постојала је статистички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



Графикон 22

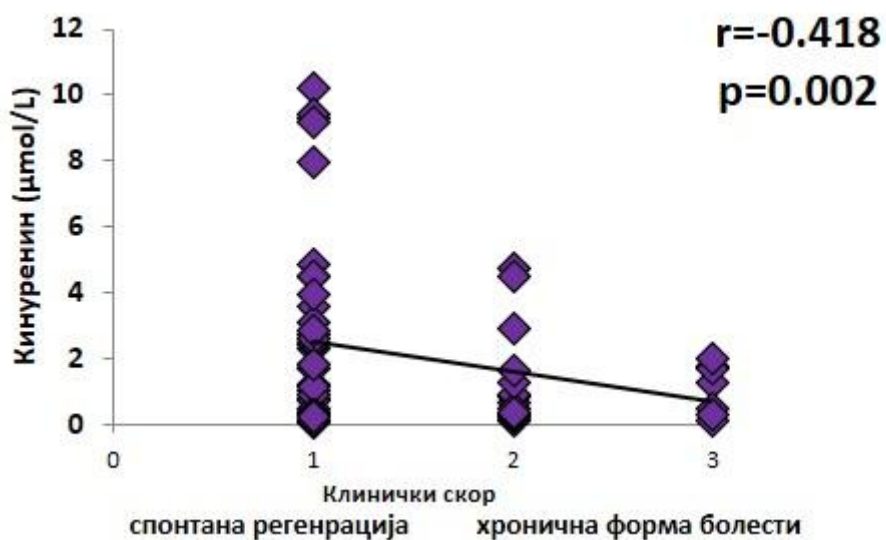
Графикон 22. Серумске концентрације кинуренина.

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



Графикон 23

Графикон 23. Хистолошки скор пацијената.

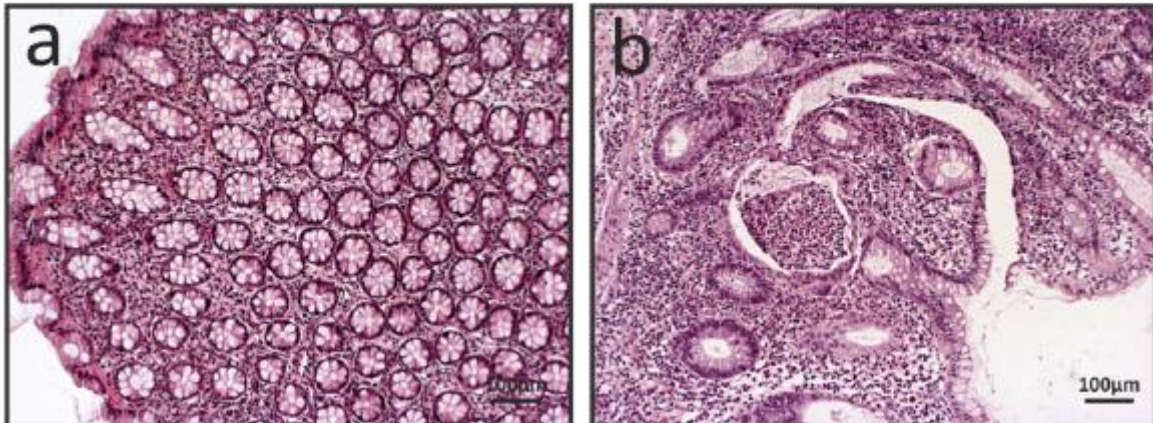


Графикон 24

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

Спонтана регенераија

Хронична форма болести



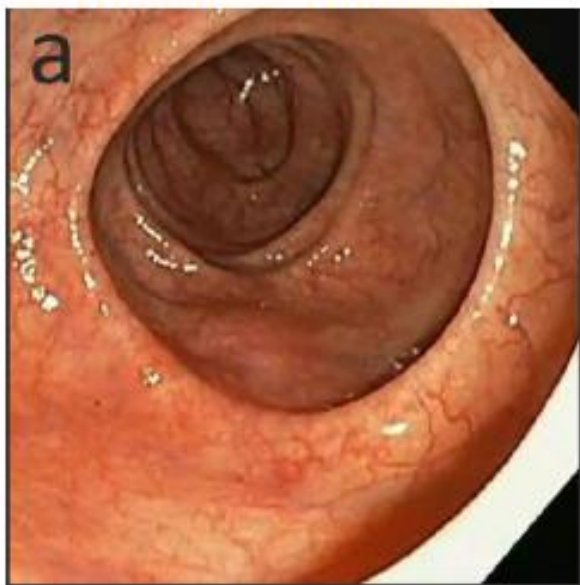
Слика 6

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

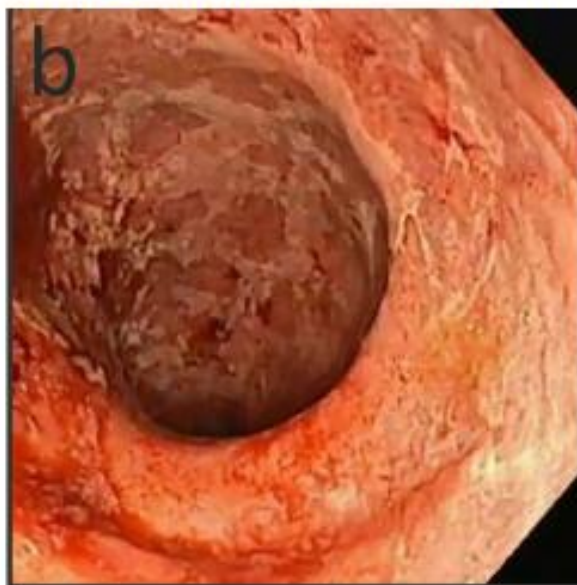
Код пацијената са хроничним презистирајућим обликом колитиса, код којих је већи ендоскопски скор, ендоскопским прегледом уочили су се еритем, ерозије и збрисана васкуларна мрежа (Слика 7), док су вредности кинуренина у серуму биле значајно мање (Графикон 22). у поређењу са пацијентима у ремисији који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

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

а-спонтана регенерација

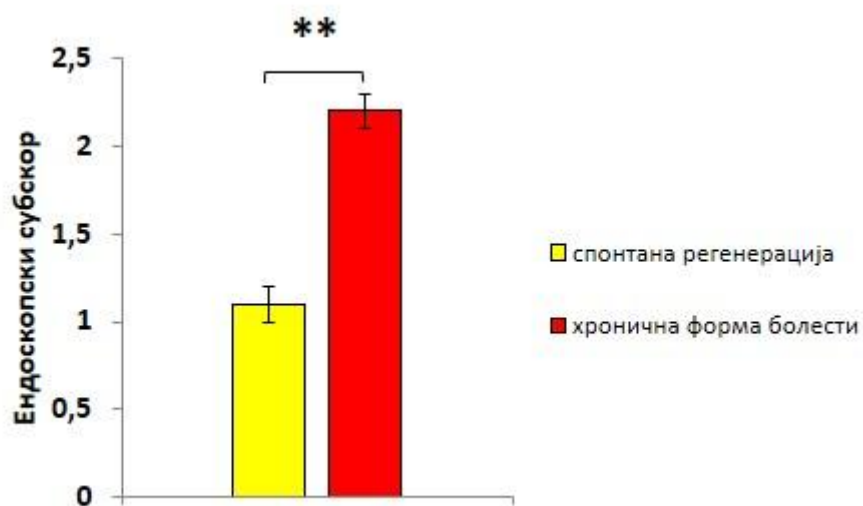


б-хронична форма болести



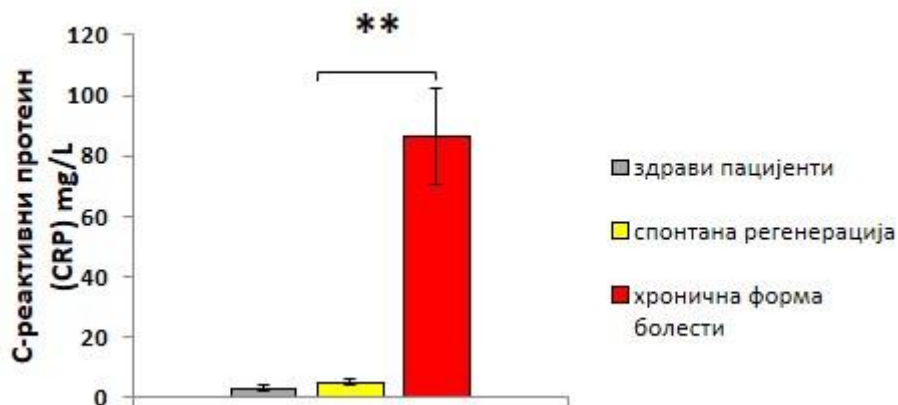
Слика 7

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

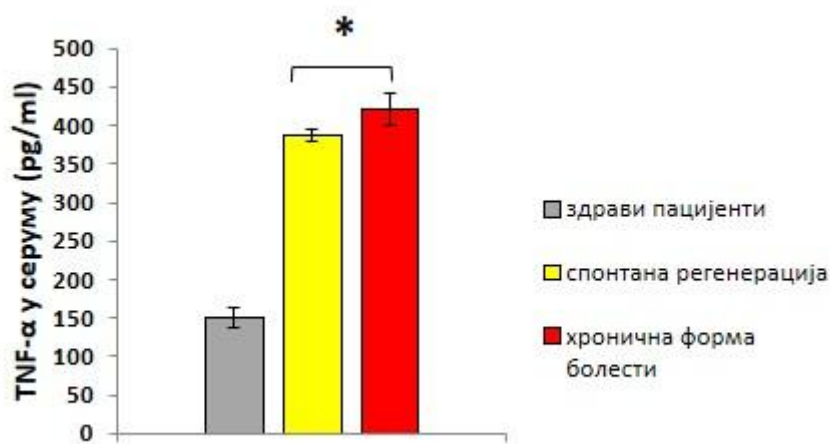


Графикон 25

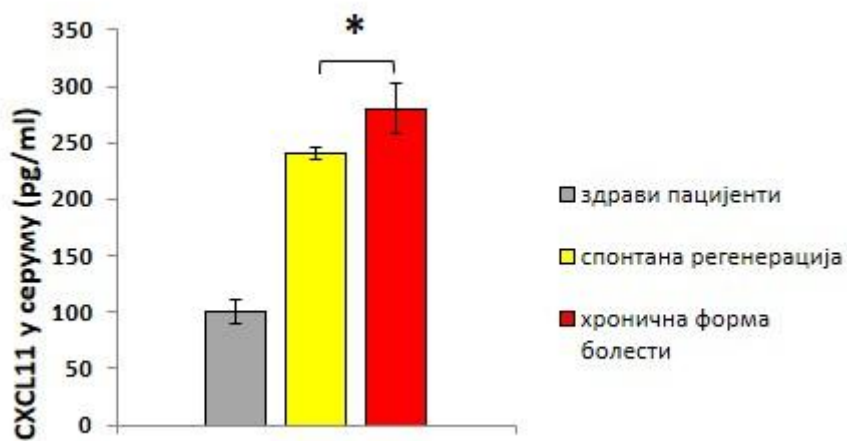
Графикон 25. Мауо ендоскопски субскор.



Графикон 26а



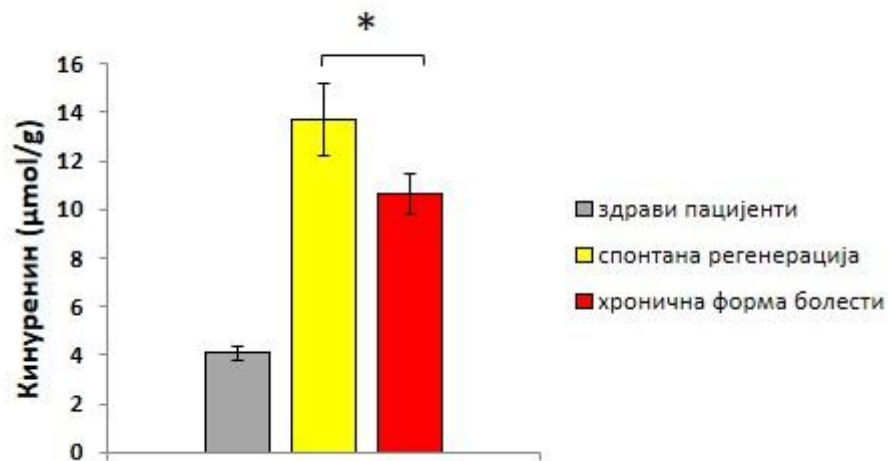
Графикон 26б



Графикон 26в

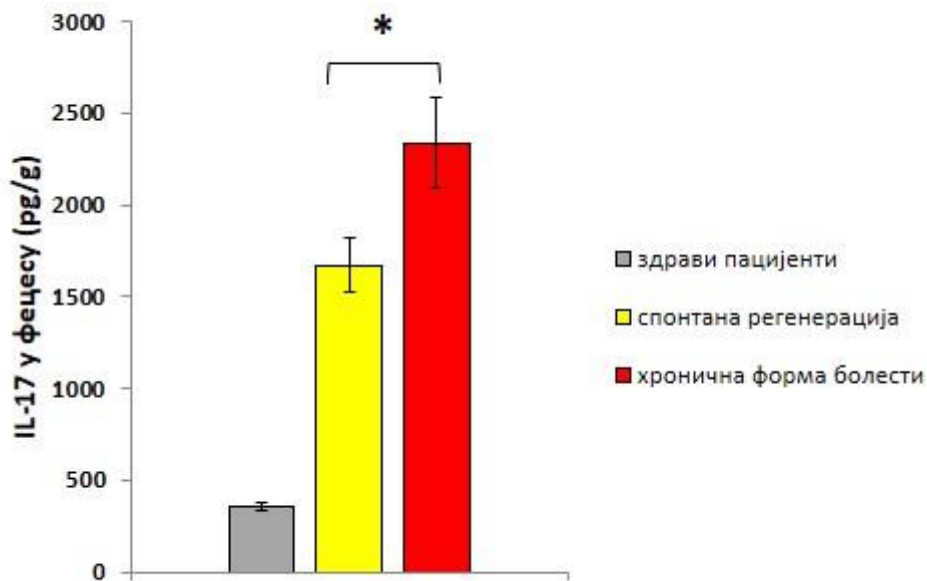
Графикон 26. Серумске концентрације CRP-а(а), TNF-α(б) и CXCL11(в)

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

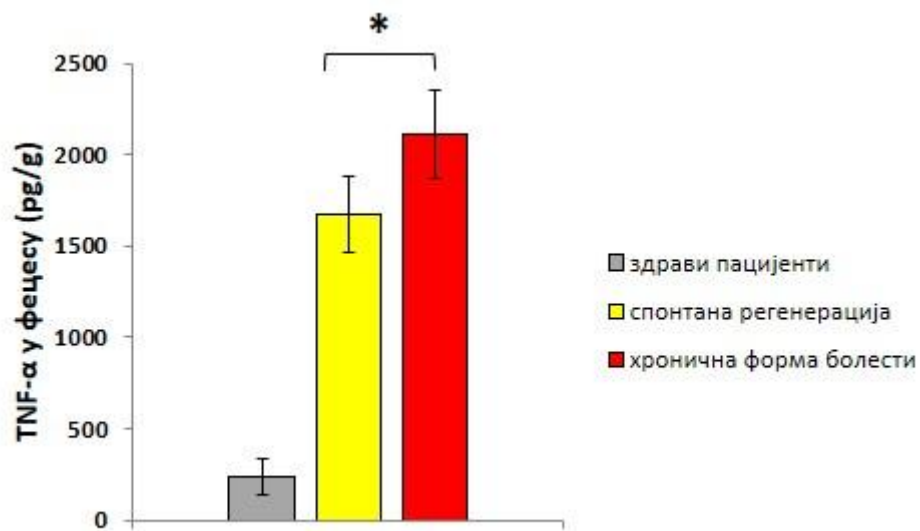


Графикон 27

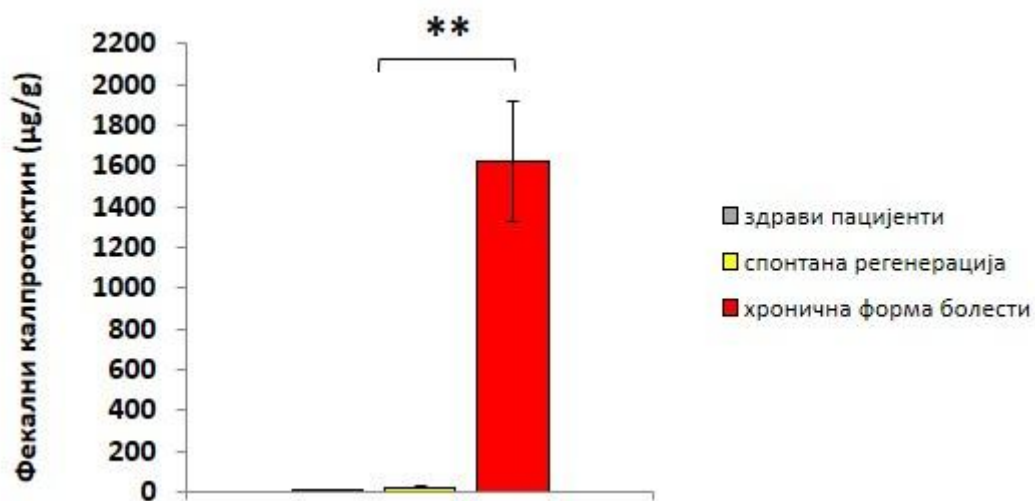
Графикон 27. Концентрације кинуренина у фецесу.



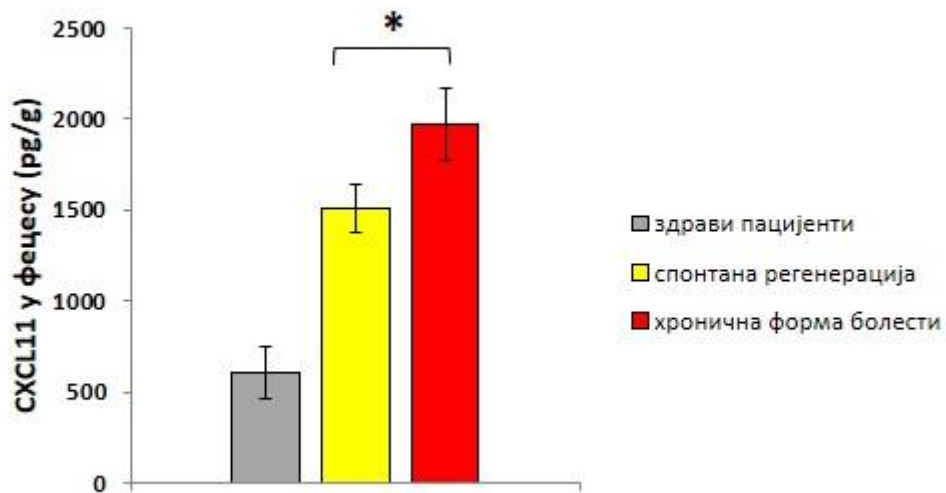
Графикон 28а



Графикон 28б



Графикон 28в

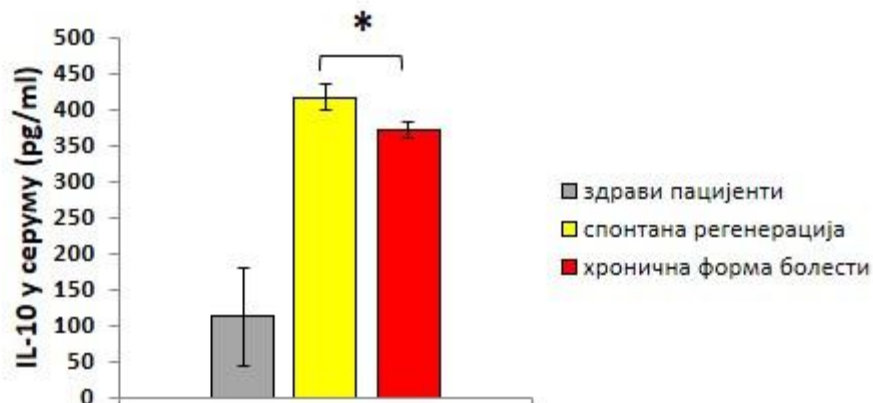


Графикон 28г

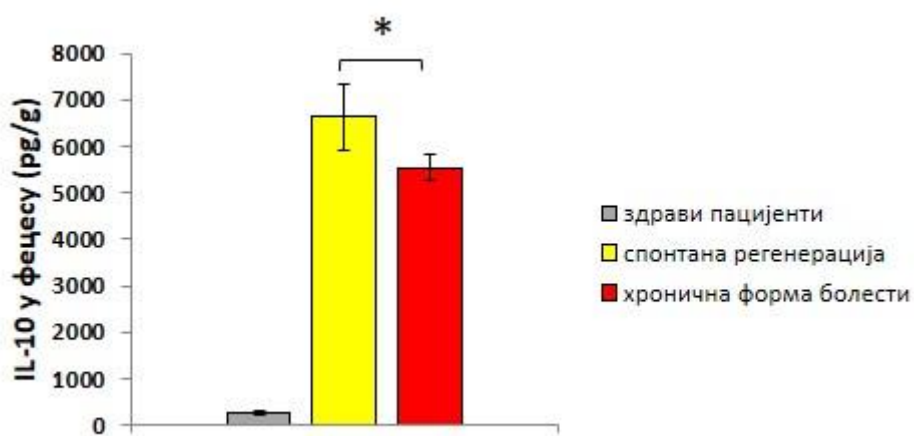
Графикон 28. Концентрације IL-17(а), TNF-α(б), фекални калпротектин(в), CXCL11(г) у фецесу пацијената.

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

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



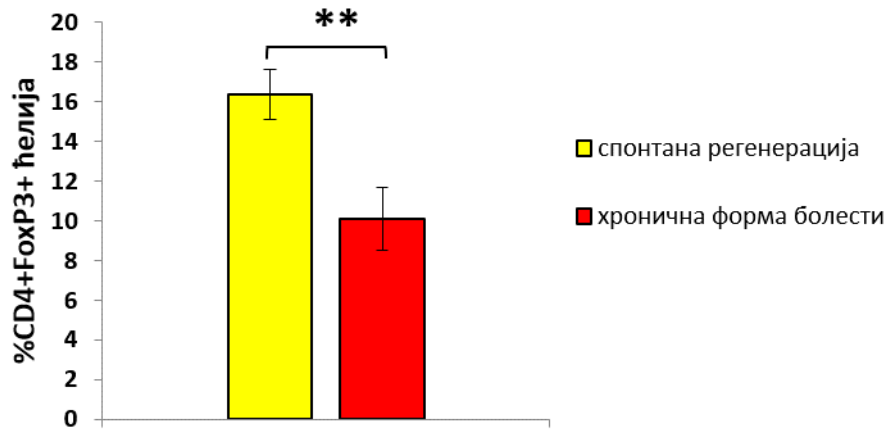
Графикон 29а



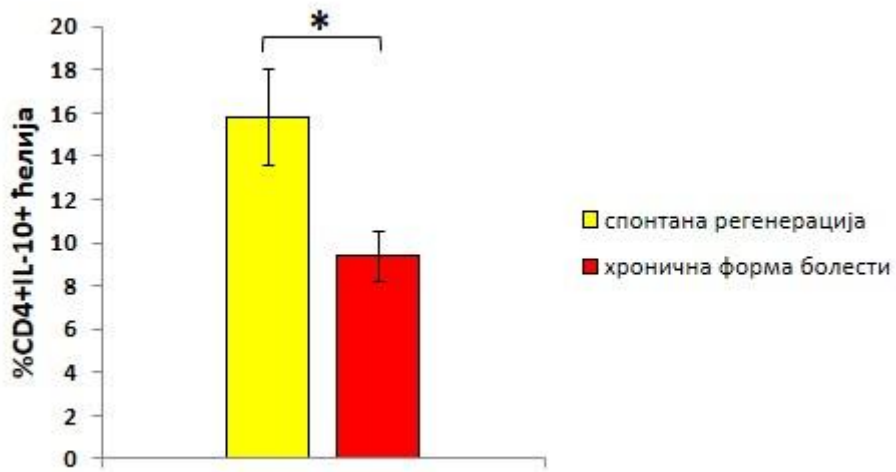
Графикон 29б

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

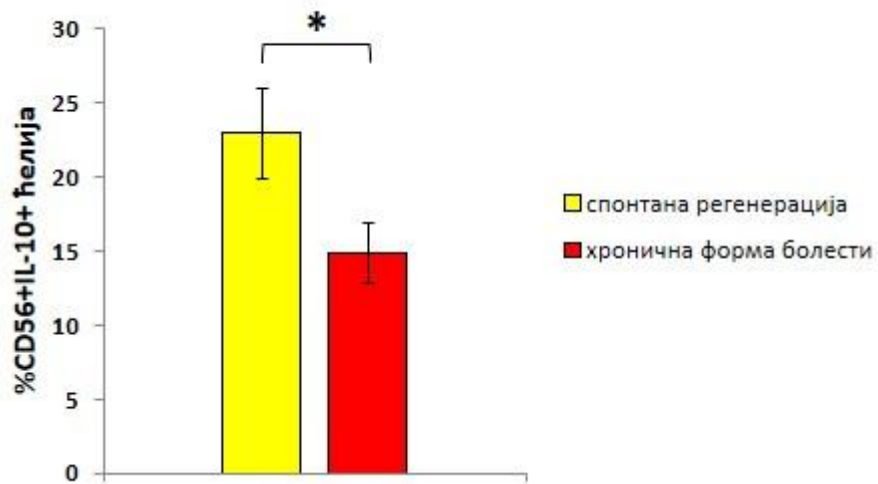
Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних CD4+FoxP3+, CD4+IL-10+ Treg лимфоцита, CD56+IL-10+ NK ћелија и смањење броја инфламацијских CD4+ IFN- γ + T и CD56+IL-17+ NK ћелија у ламини проприји црева оболелих у фази ремисије болести (Графикон 30 а, б,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



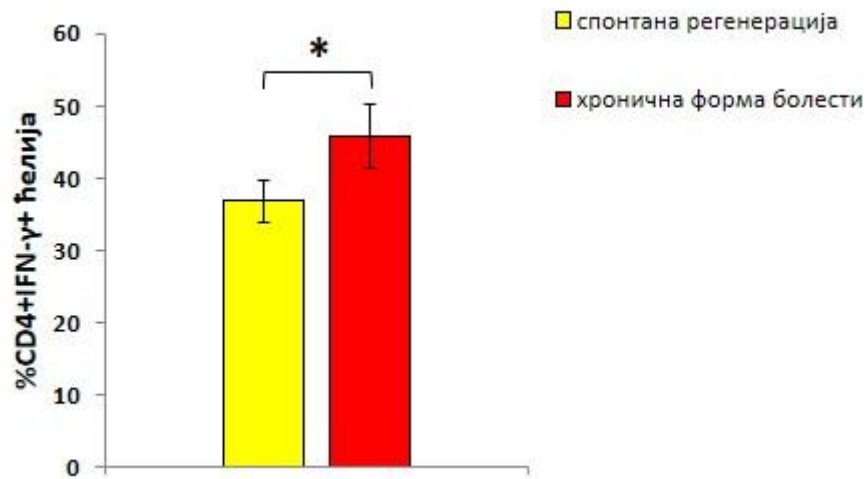
Графикон 30а



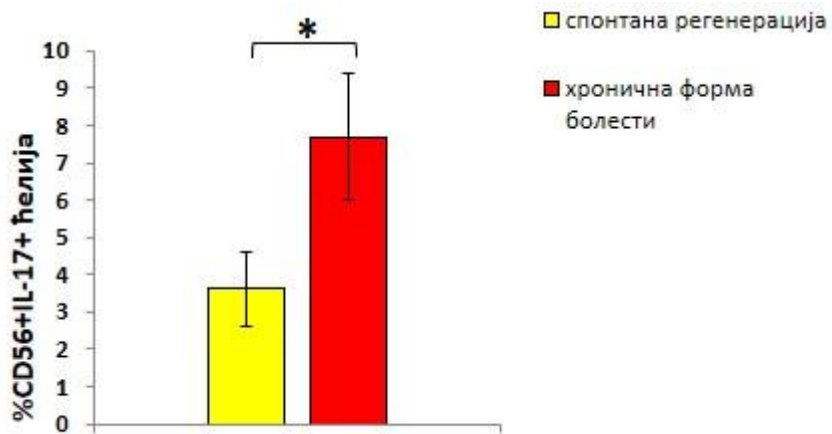
Графикон 30б



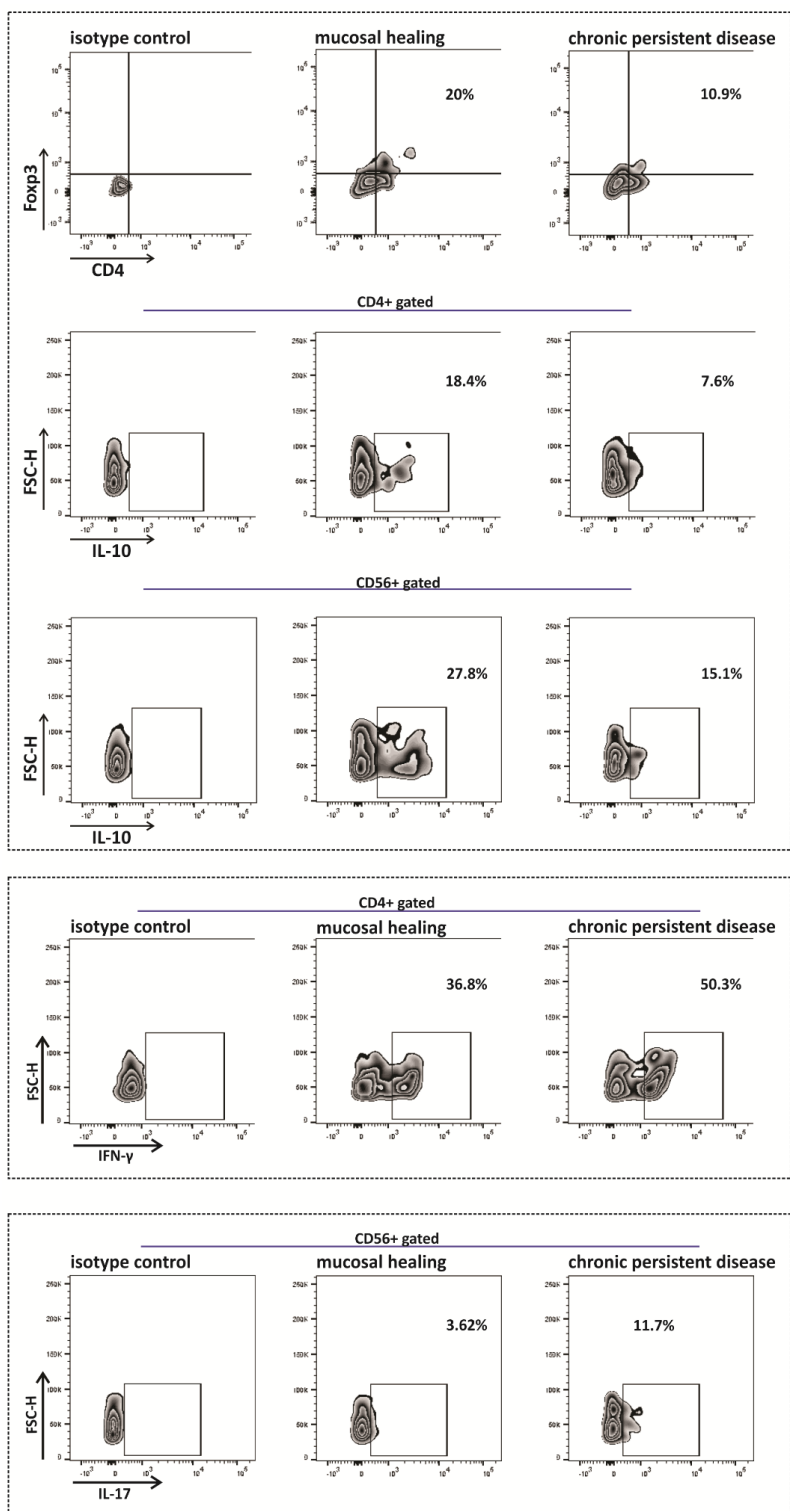
Графикон 30в



Графикон 30г



Графикон 30д

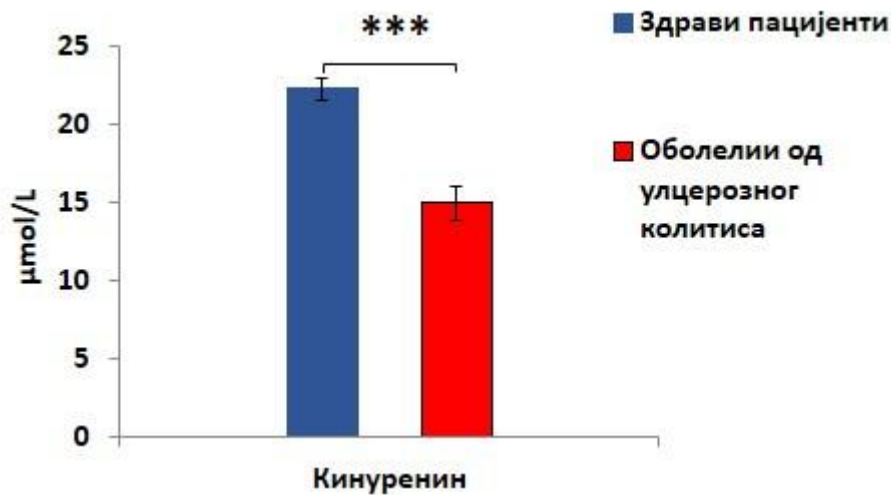


Графикон 30ђ

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

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

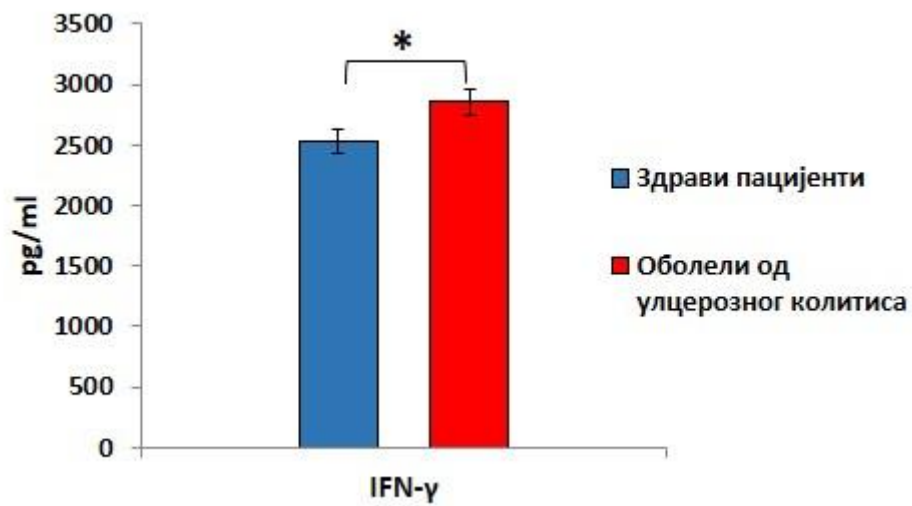
Пораст инфламацијских цитокина и неконтролисан имунски одговор у цревима оболелих од улцерозног колитиса праћен је системском инфламацијом која се може манифестовати и патолошким променама у усној дупљи. Сулкусна течност је лако доступна и њена анализа омогућава праћење параметара локалне и системске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



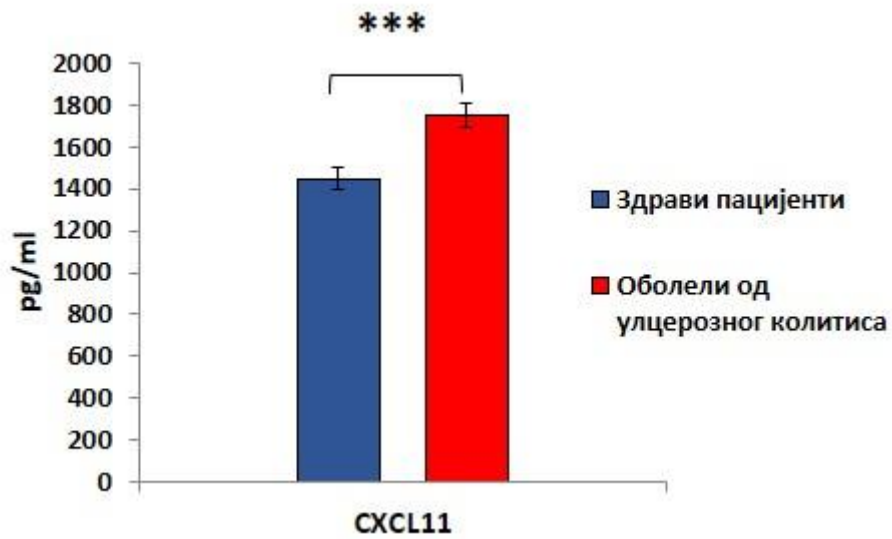
Графикон 31

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

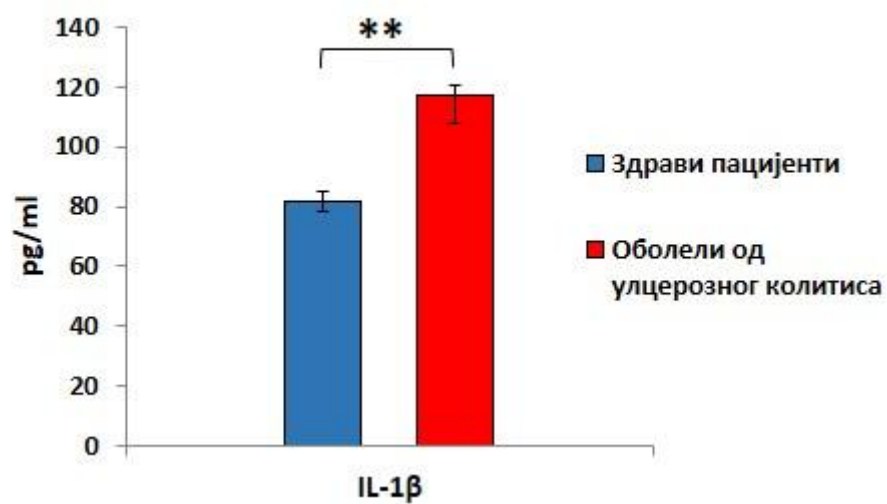
Мање концентрације кинуренина праћене су и значајно већим концентрацијама инфламацијских цитокина у гингивалној течности: IFN- γ , CXCL11, IL-1 β , IL-12, IL-23, IL-17 (Графикон 32 а, б, в, г, д, њ).



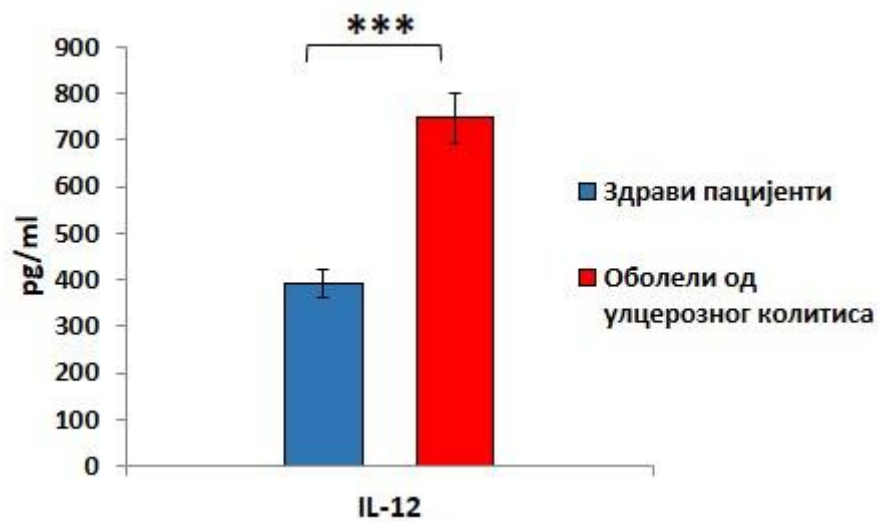
Графикон 32а



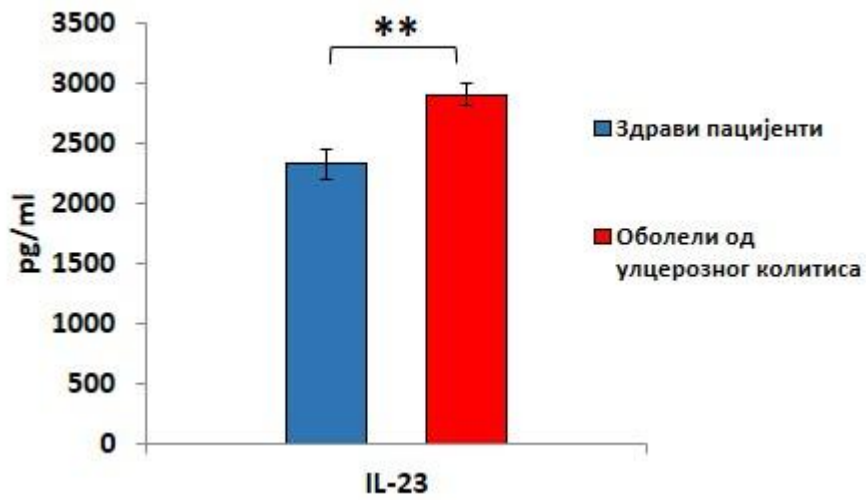
Графикон 32б



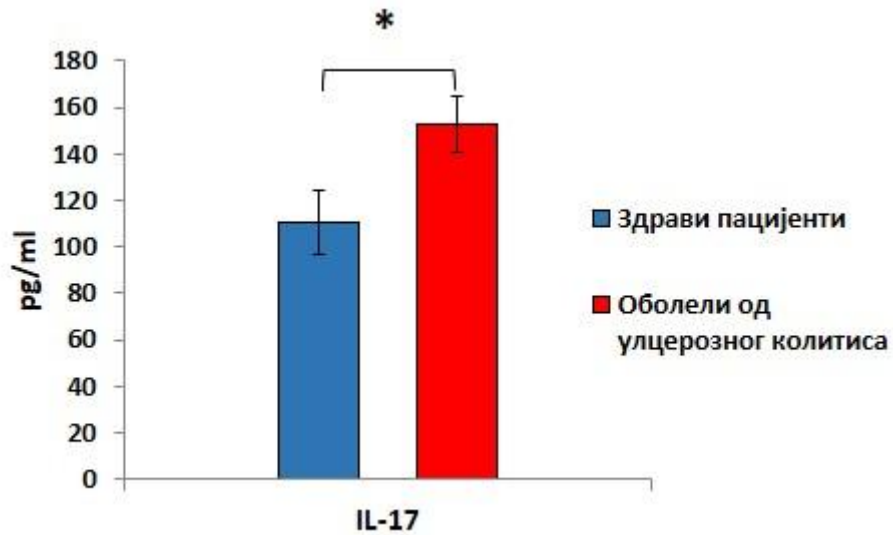
Графикон 32в



Графикон 32г



Графикон 32д



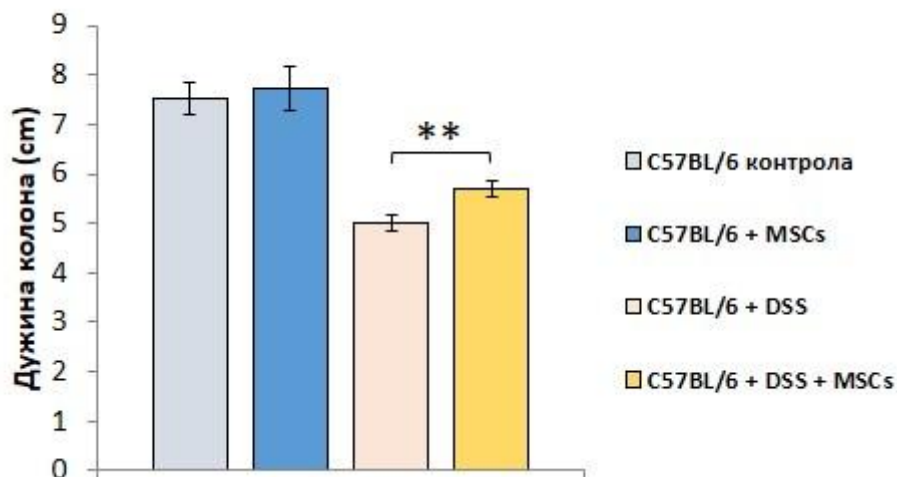
Графикон 32ђ

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

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

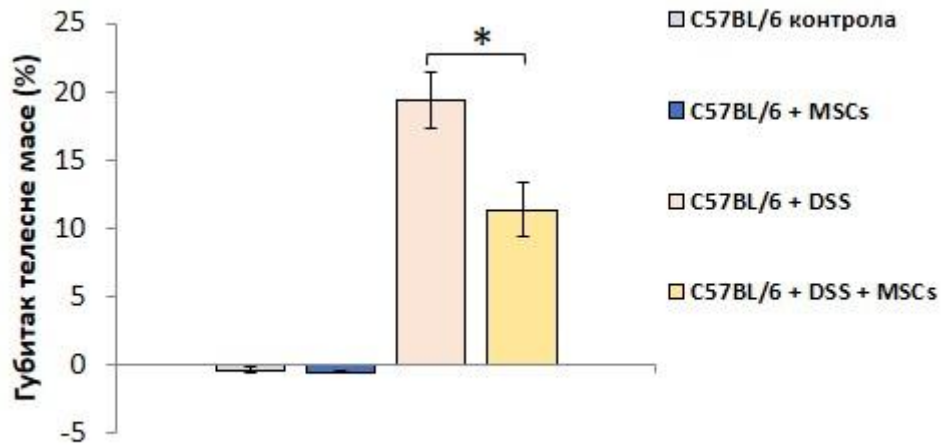
Поред дендритских ћелија, MSCs су главни ћелијски извор IDO-а у цревима (183, 184). Због тога је испитиван терапијски потенцијал MSCs у модулацији колитиса.

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



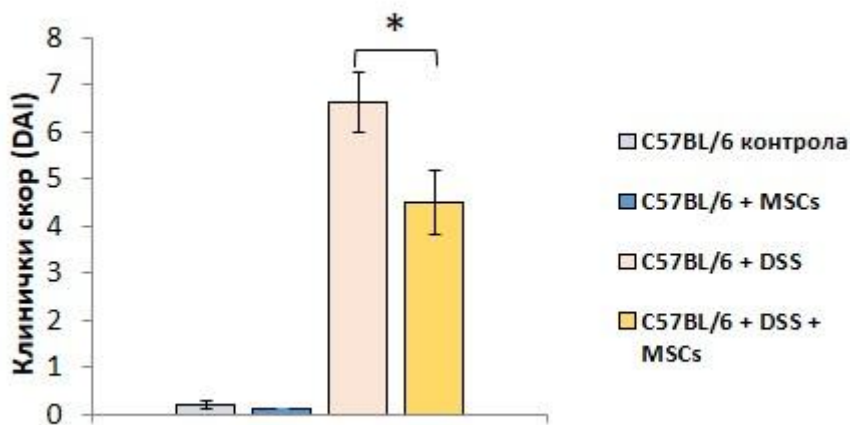
Графикон 33

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



Графикон 34

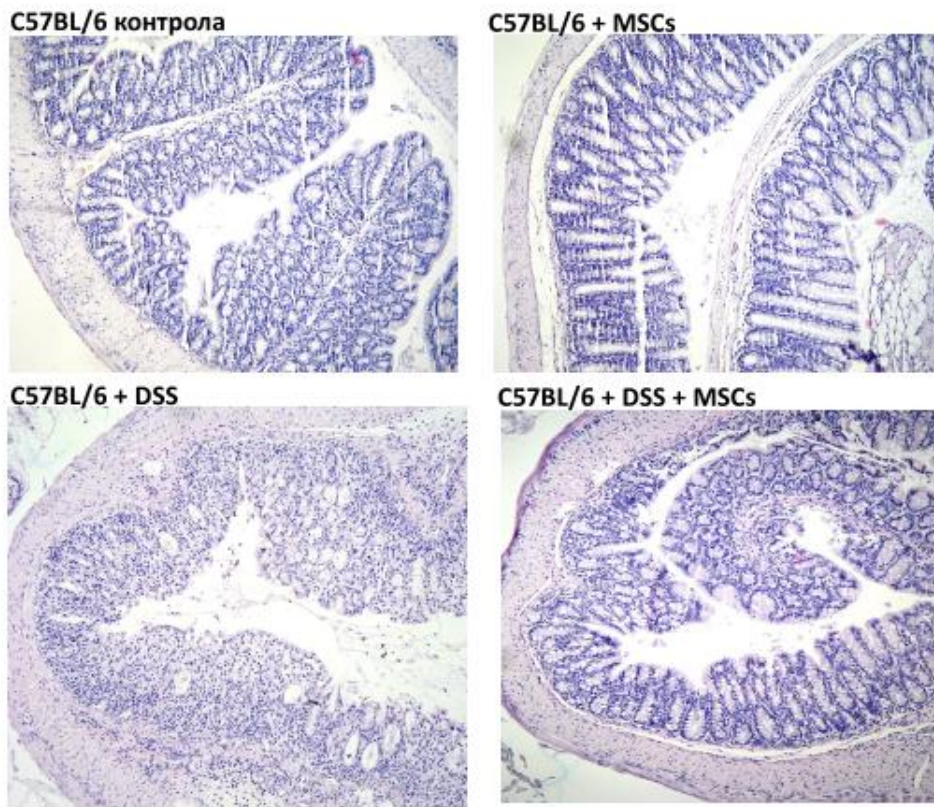
Графикон 34. Губитак телесне масе C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.



Графикон 35

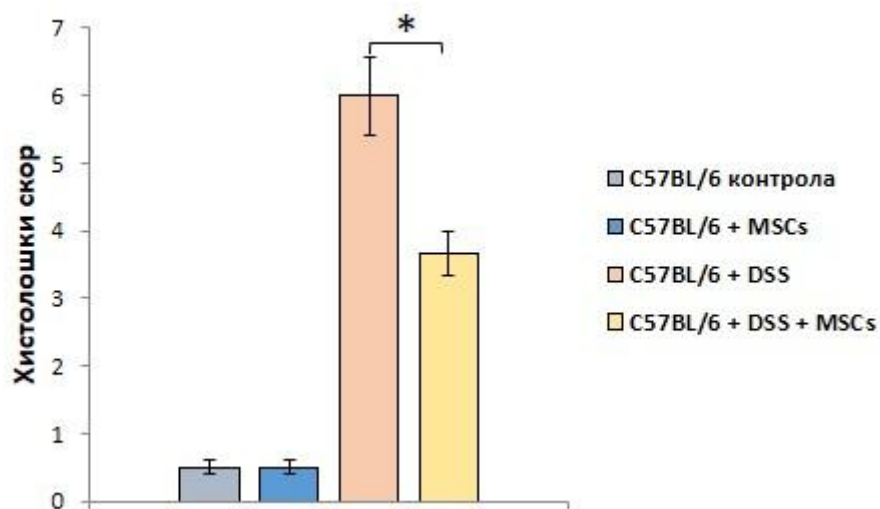
Графикон 35. Клинички (DAI) скор C57BL/6 мишева третираних DSS-ом и након апликације MSCs.

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



Слика 8

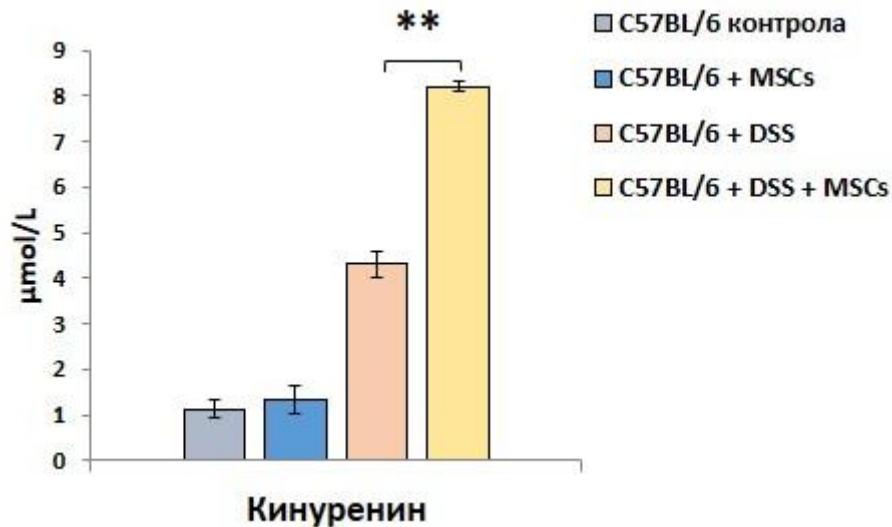
Слика 8. Репрезентативни исечци зида дебелог црева после апликације DSS-а и апликације MSCs. Код DSS-ом третираних мишева соја C57BL/6 оштећења епителних ћелија црева су била опсежнија, масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева који су третирани MSCs поред ограниченог ћелијског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



Графикон 36

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

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

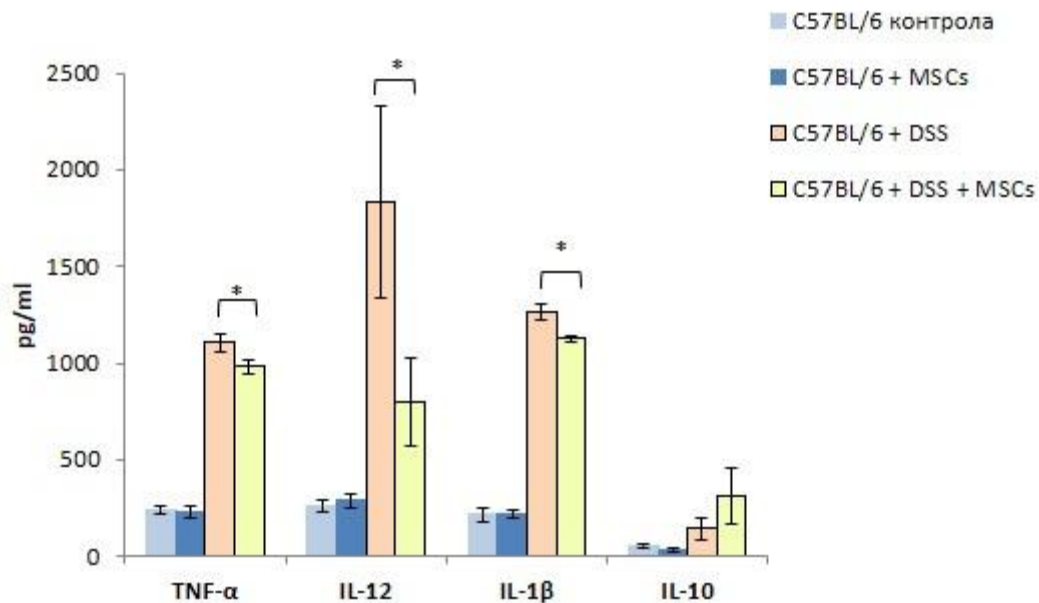


Графикон 37

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

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

У серуму животиња које су примале MSCs измерене су значајно мање концентрације инфламацијских цитокина (TNF- α , IL-12, IL-1 β) у поређењу са мишева којима нису апликоване MSCs (Графикон 39). Уз то, примена MSCs узроковала је пораст концентрације имunosупресивног IL-10 у серуму оболелих животиња (Графикон 38).

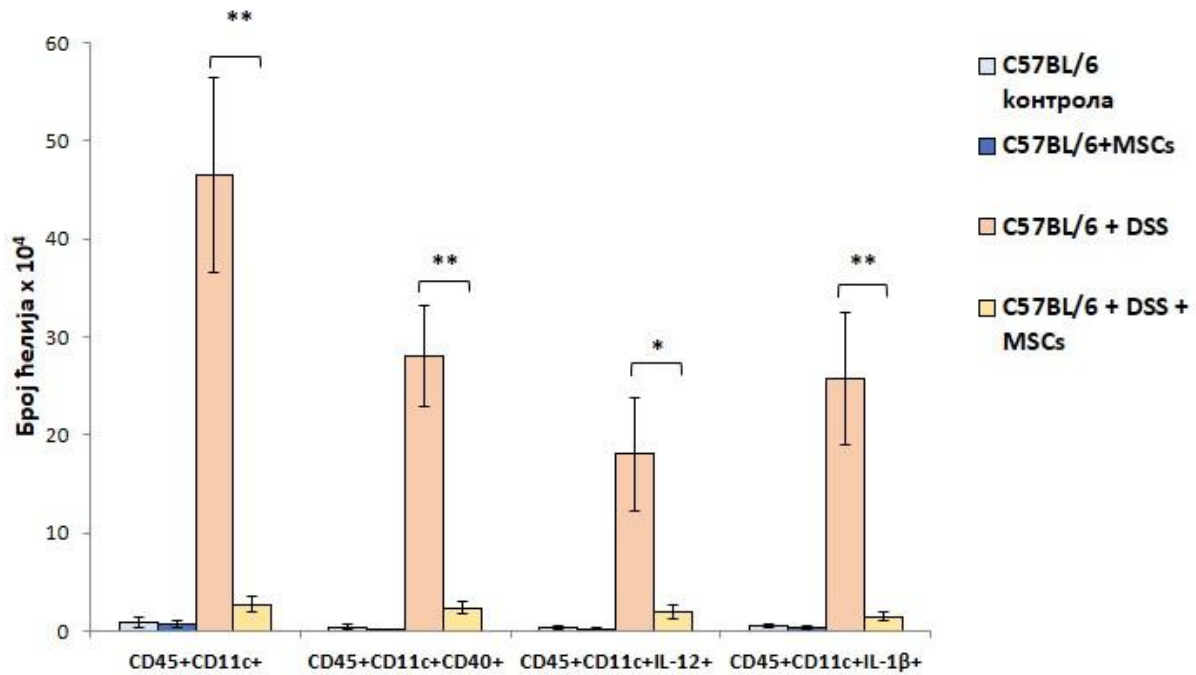


Графикон 38

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

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

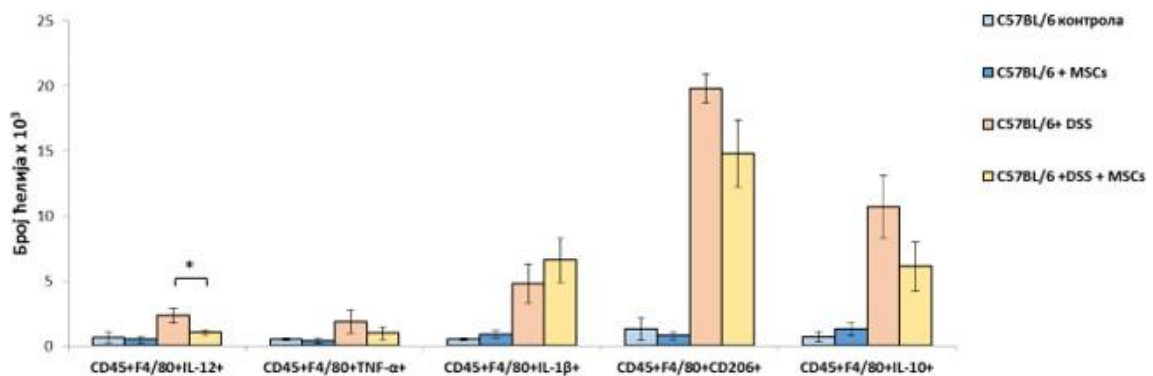
Дванаестог експерименталног дана, из ламине проприје колона C57BL/6 мишева изолован је значајно мањи број проинфламацијских дендритских ћелија (CD45+CD11c+, CD45+CD11c+CD40+, CD45+CD11c+IL-12, CD45+CD11c+IL-1 β)(Графикон 39).



Графикон 39

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

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



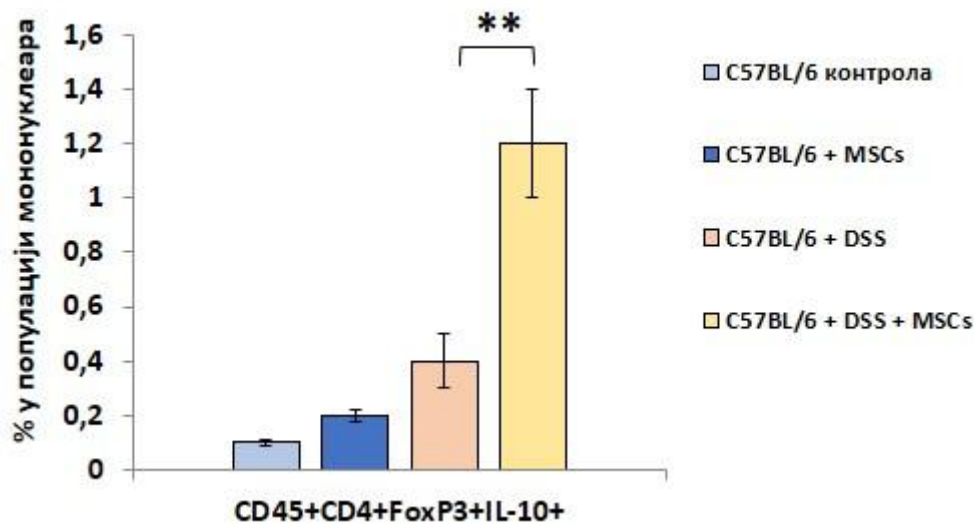
Графикон 40

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

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

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

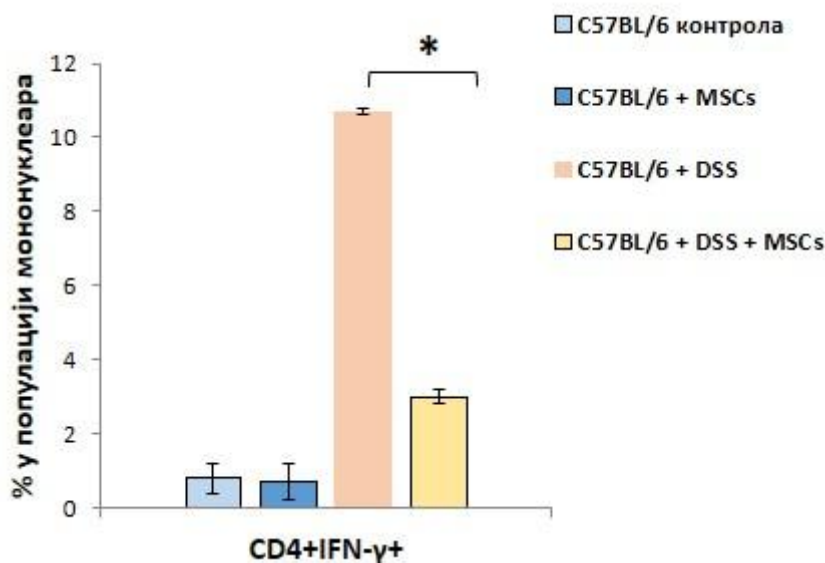
У ћелијским инфилтратима ламине проприје мишева који су примали MSCs био је присутан значајно већи проценат имуносупресивних CD45⁺CD4⁺FoxP3⁺IL-10⁺ Treg лимфоцита (Графикон 41).



Графикон 41

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

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



Графикон 42

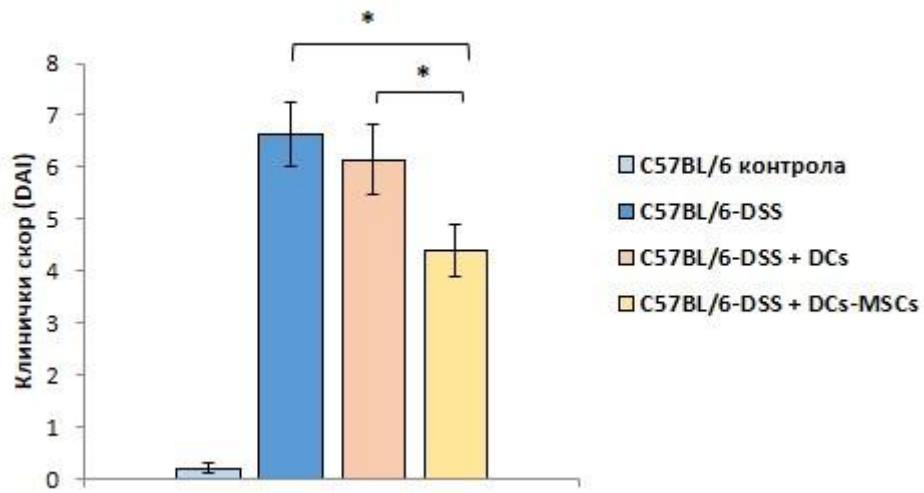
Графикон 42. Процентуална заступљеност T лимфоцита који продукују IFN- γ у популацији мононуклеара излованих из ламине проприје мишева након апликације MSCs.

4.13. MSCs повећава имуномодулацијски капацитет аплицираних DCs

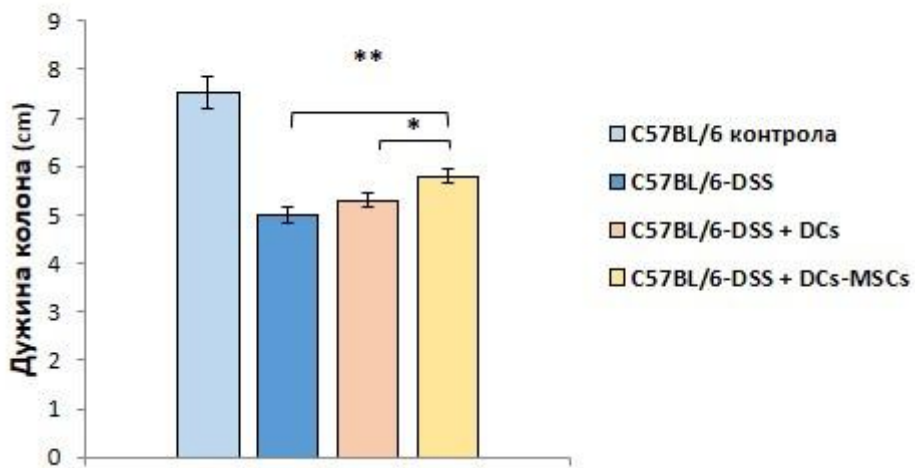
Да би се испитала могућност да се апликацијом MSCs повећају толерогени и имуносупресивни потенцијал дендритских ћелија и на тај начин допринесу смањењу инфламације колона, оболелим мишевима су апликоване дендритске ћелије претходно изоловане из здравих мишева и кокултивисане са MSCs.

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

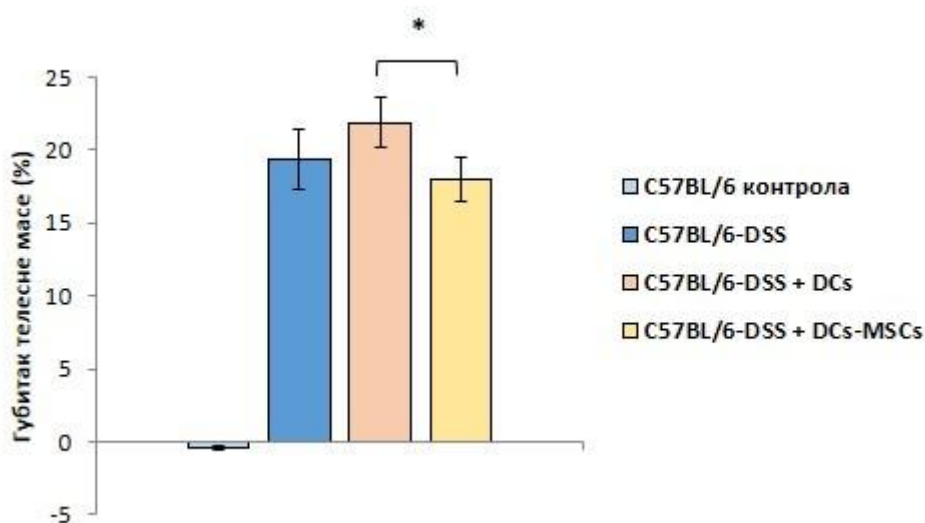
Оболеле животиње које су примиле C57BL/6 дендритске ћелије култивисане у стандардним условима су развиле тежи облик колитиса. Супротно томе, оболели мишеви којима су апликоване C57BL/6 дендритске ћелије претходно култивисане са MSCs, су развиле лакши облик болести, манифестован мањим DAI скором (знатно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



Графикон 43а



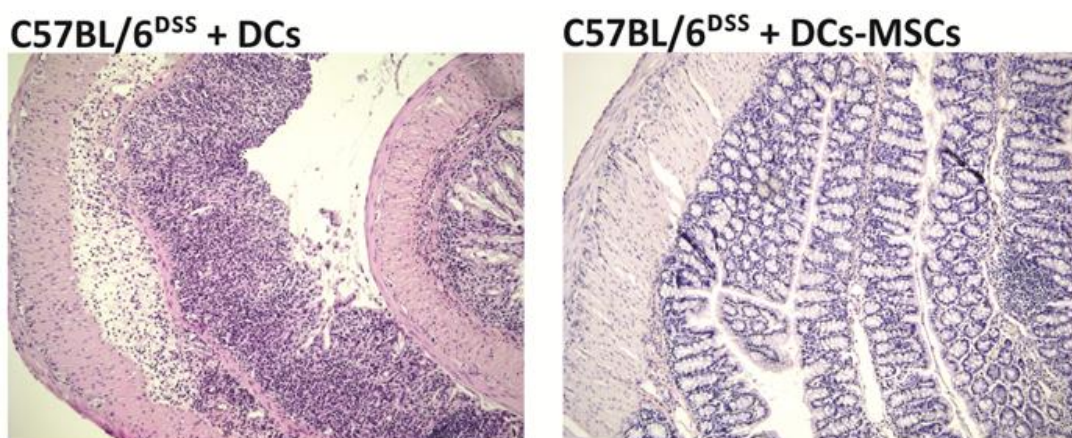
Графикон 43б



Графикон 43в

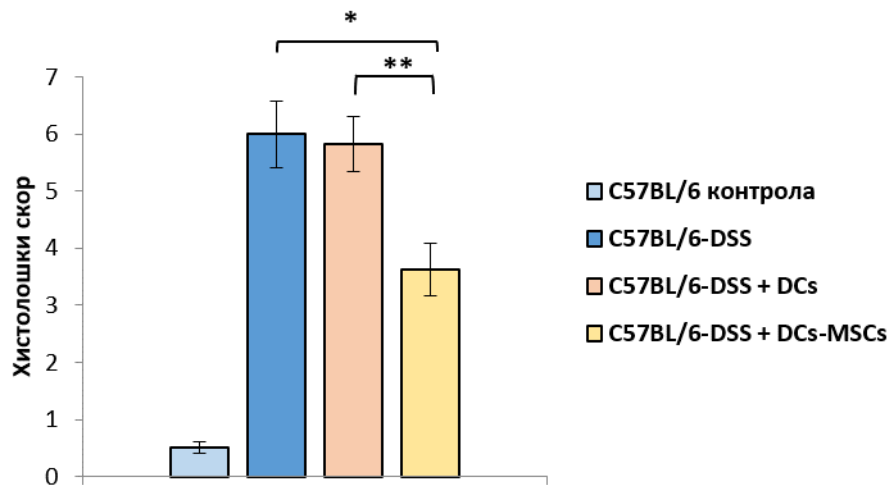
Графикон 43. Клинички (DAI) скор(а), хистолошки скор(б) и губитак телесне масе(в) код животиња којима су апликоване DCs култивисане са MSCs.

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



Слика 9

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



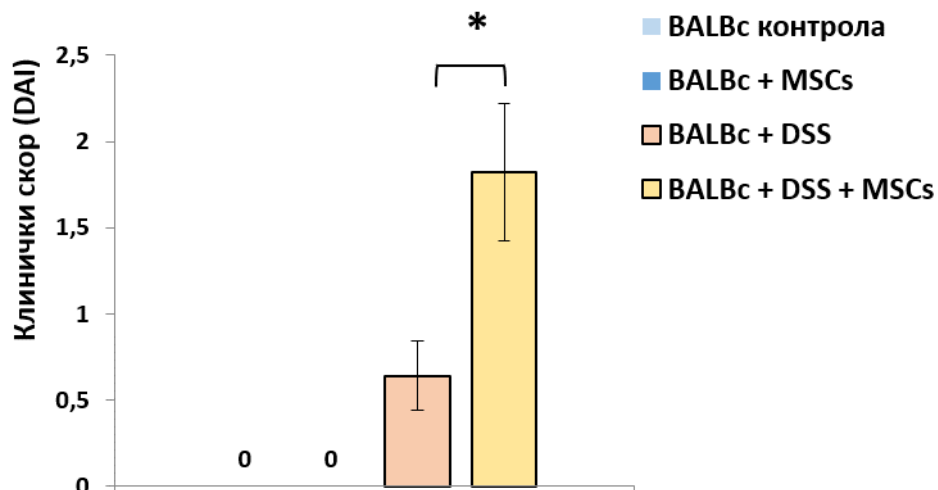
Графикон 44

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

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

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

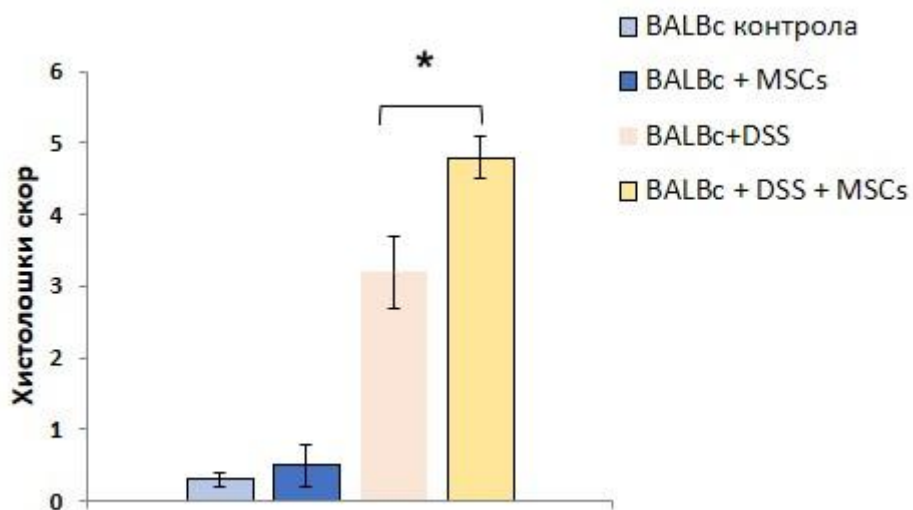
Супротно од ефеката које су C57BL6 MSCs имале у модулацији колитиса мишева истог соја, код оболелих BALBc мишева након примене BALBc MSCs уочава се значајно погоршање клиничке слике: обилне, кржаве столице и значајан губитак телесне масе у поређењу са животињама које су примиле само DSS. (Графикон 45).



Графикон 45

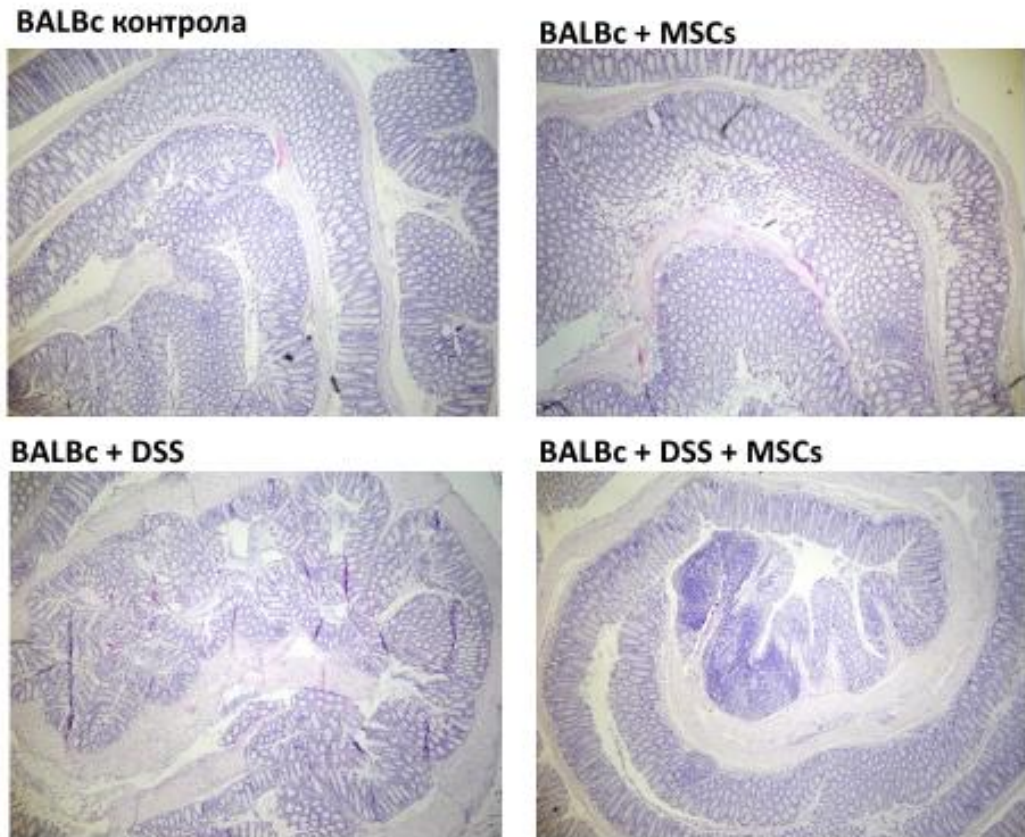
Графикон 45. Клинички (DAI) скор након апликације MSCs мишеви BALB/c соја

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



Графикон 46

Графикон 46. Хистолошки скор DSS-ом третираних мишева соја BALB/c након апликације MSCs.

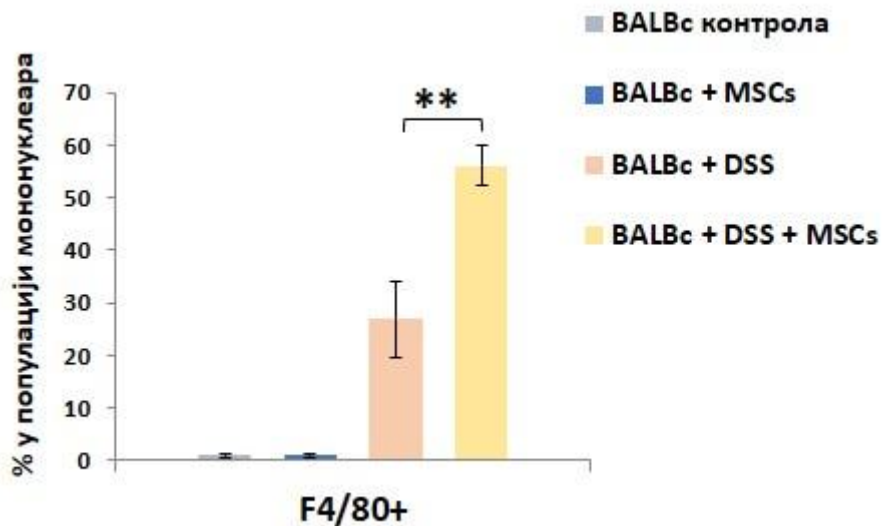


Слика 10

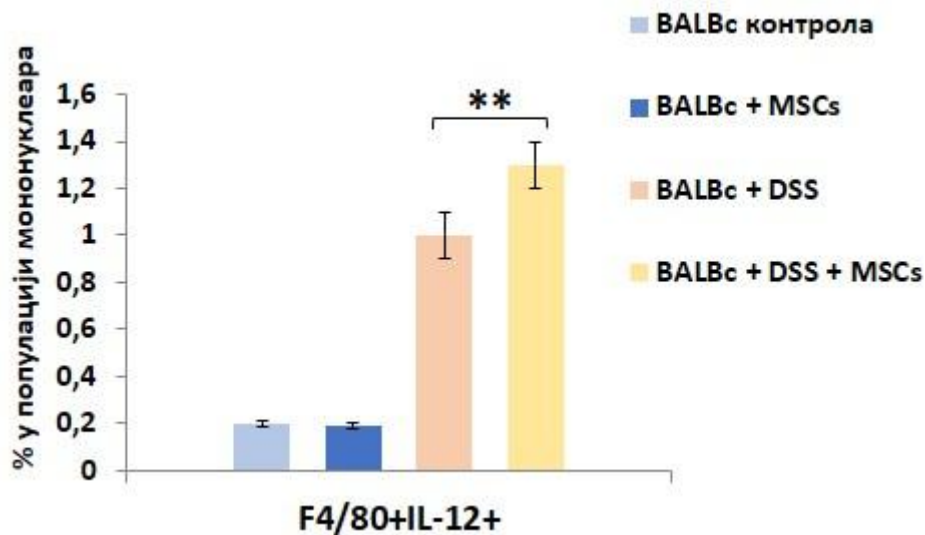
Слика 10. Карактеристични исечци зида дебелог црева после индукције DSS колитиса и апликације MSCs. Код DSS-ом третираних мишева соја BALBc које су примиле MSCs масовна инфилтрација имунских ћелија је била присутна док код мишева који су третирани DSS-ом ограниченог ћелијског инфилтрата нису уочена већа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

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

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



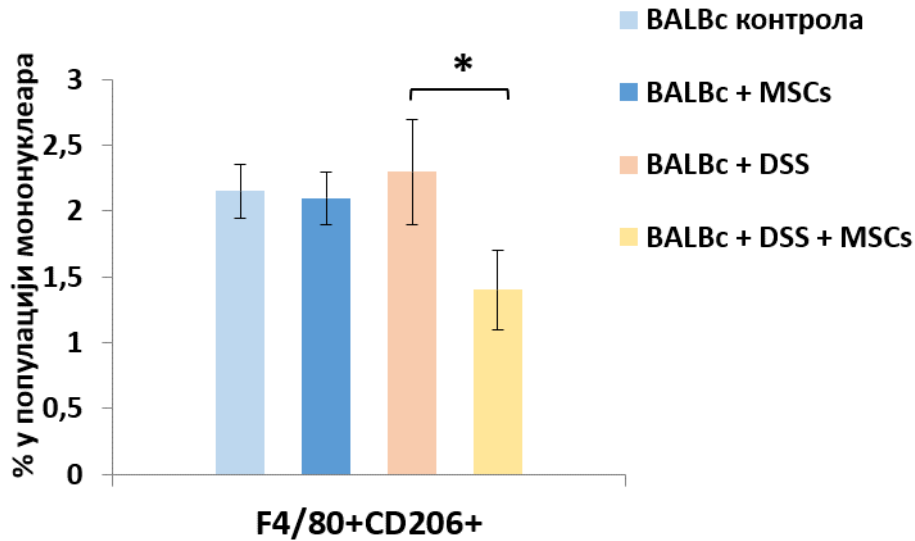
Графикон 47а



Графикон 47б

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

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

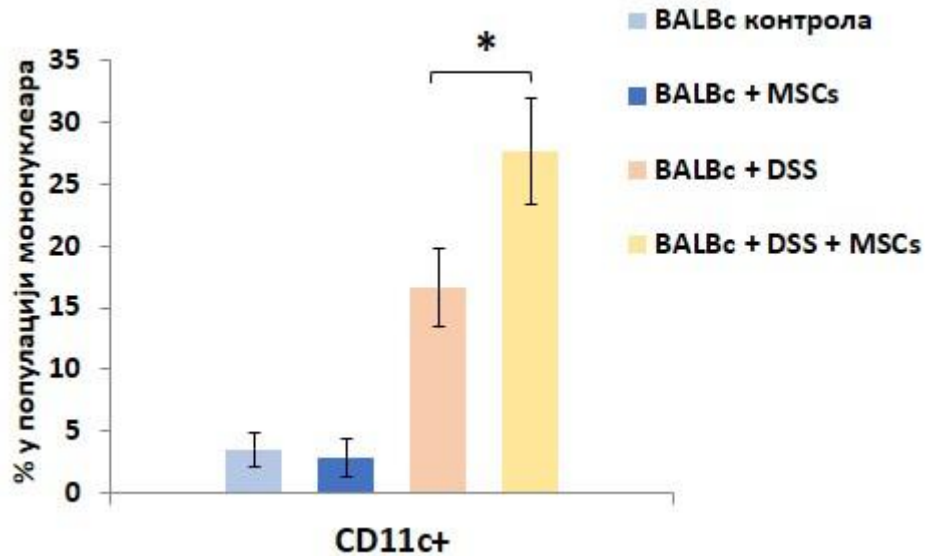


Графикон 48.

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

4.16. Примена MSCs код оболелих мишева соја BALBc значајно смањује проценат толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10

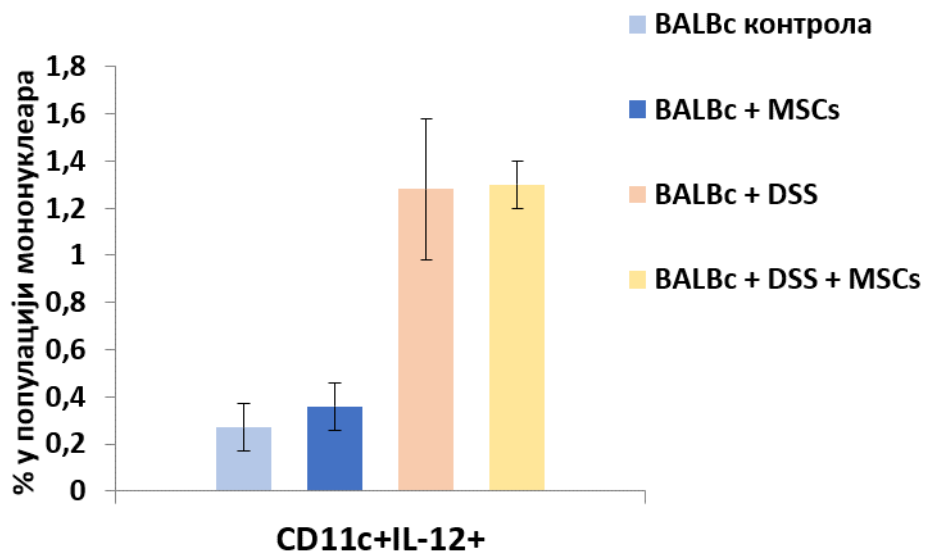
Дванаестог дана експеримента, из ламине проприје BALBc мишева којима су апликоване BALBc MSC изолован је знатно већи број CD11c⁺ дендритских ћелија. (Графикон 49)



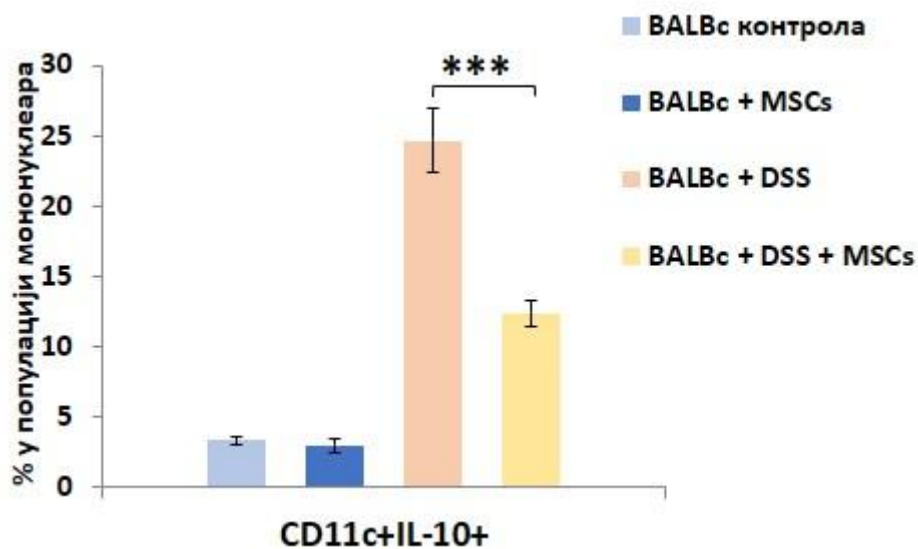
Графикон 49

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

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



Графикон 50а

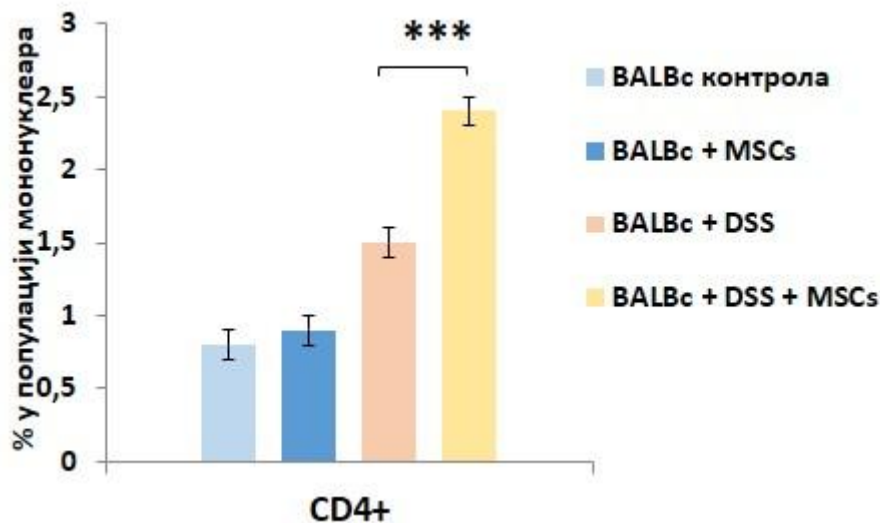


Графикон 50б

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

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

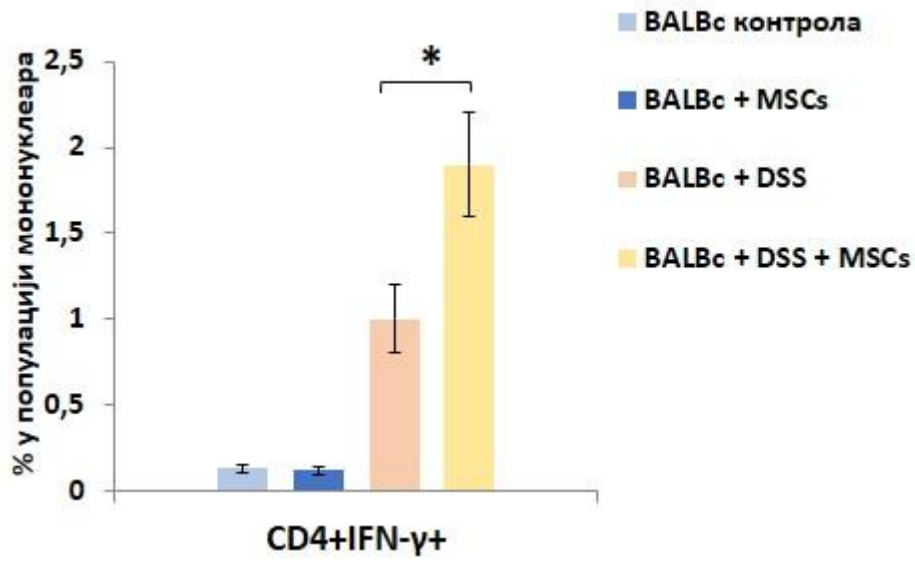
У колону оболелих BALBc мишева којима су апликоване MSC уочен је статистички значајно већи проценат CD4+ Т лимфоцита (Графикон 51).



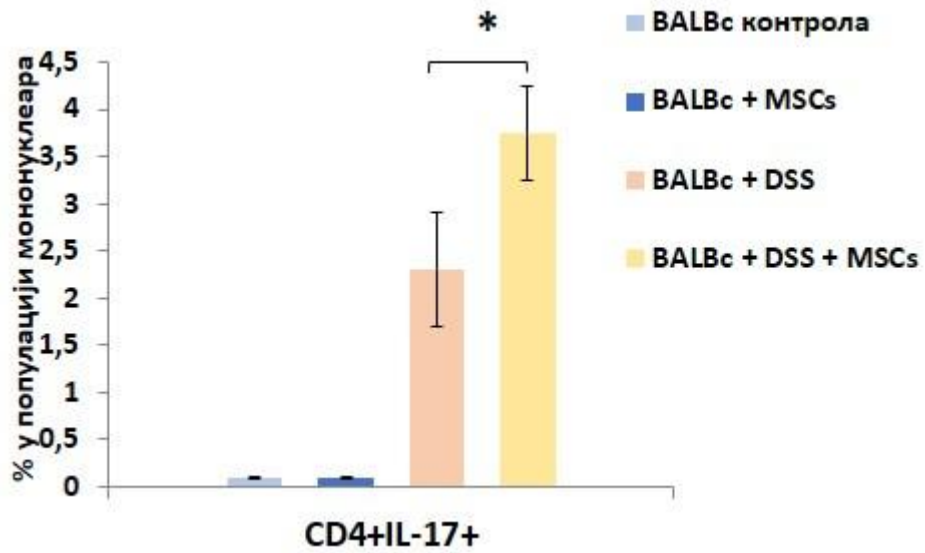
Графикон 51

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

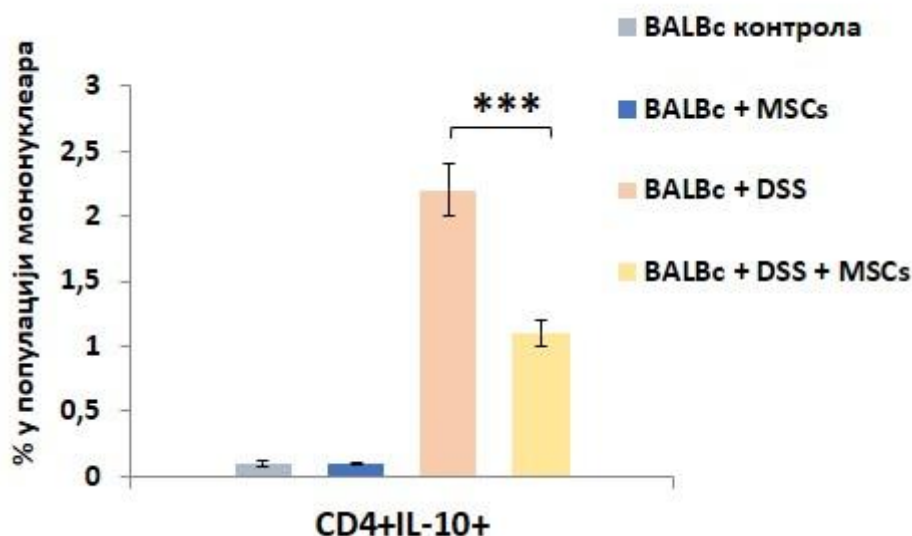
Уз то, статистички сигнификантно повећан % инфламацијских CD4+ Т лимфоцита (IFN- γ + и IL-17+), а сигнификантно смањен % имуносупресивних CD4+ лимфоцита (IL-10+) био је присутан у ламини проприји црева BALBc мишева којима су апликоване BALBc MSC (Графикон 52 а, б, в, г).



Графикон 52а



Графикон 52б

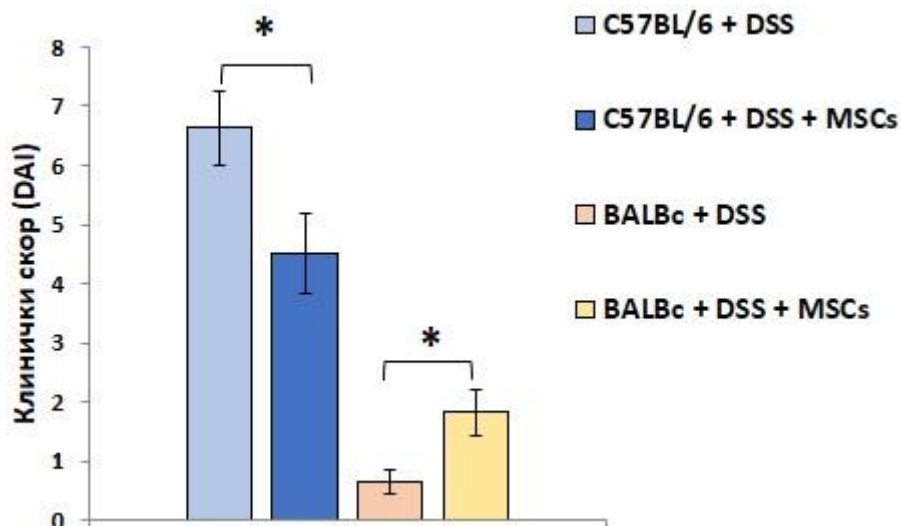


Графикон 52в

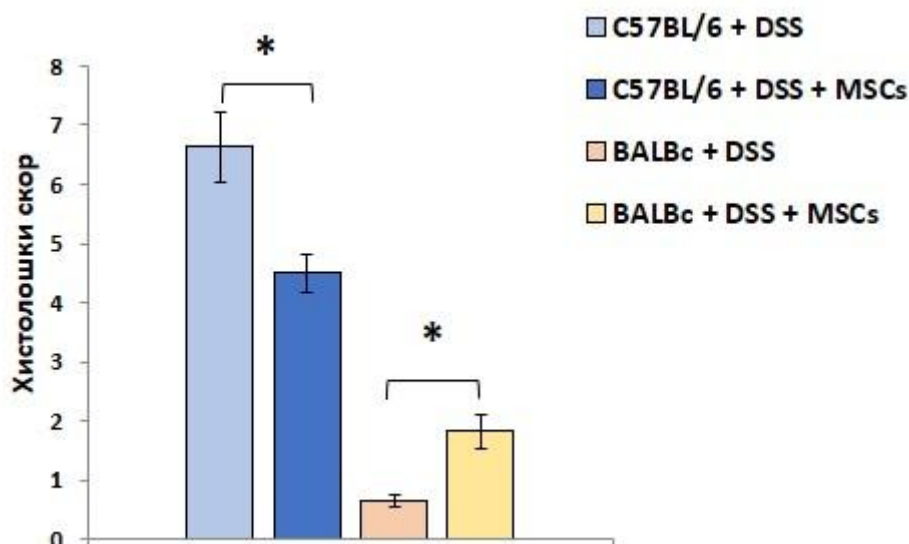
Графикон 52. Из колона мишева који су примили MSCs изоловани су Th1 ($CD4+ IFN-\gamma+$)(а) и Th17($CD4+ IL-17+$)(б) у знатно већем проценту док су $CD4+$ ћелије које продукују IL-10 (в) биле присутне у знатно мањем проценту

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

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



Графикон 53а

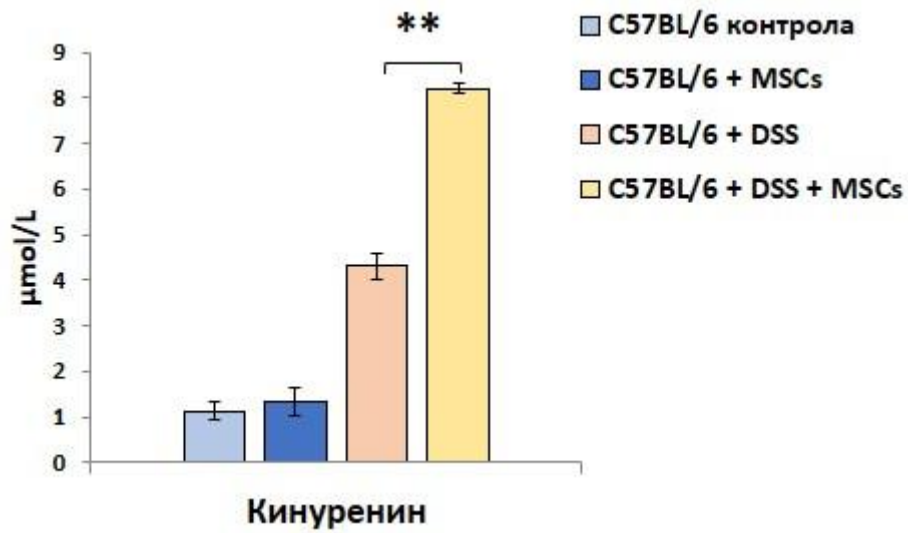


Графикон 53б

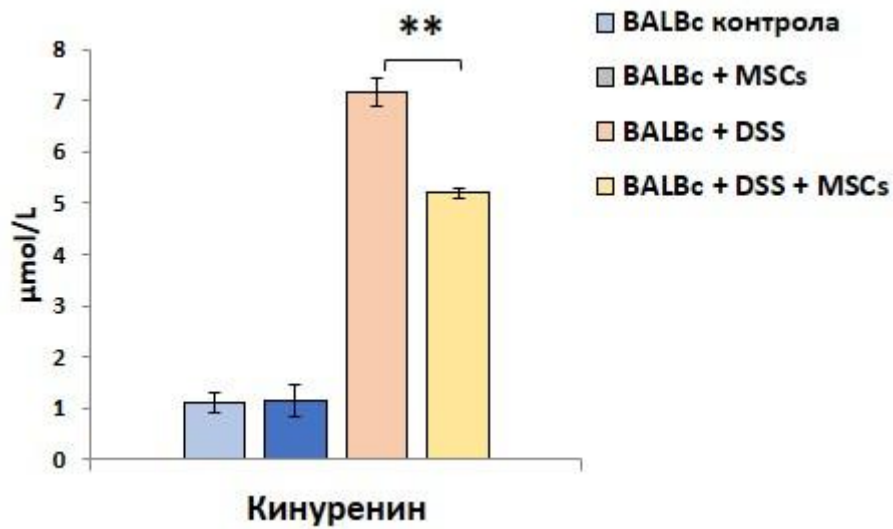
Графикон 53. Разлике у клиничком(а) и хистолошком скору(б) између различитих сојева мишева након апликације MSCs

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

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



Графикон 54а



Графикон 54б

Графикон 54. Концентрације измереног кинуренина у серуму животиња након апликације MSCs су знатно веће код животиња соја C57BL/6(а) док се код мишева BALB/c (б) соја детектују знатно ниже концентрације имуносупресивног кинуренина

5. ДИСКУСИЈА

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

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

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

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

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

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

CD4⁺ T лимфоците ка имуносупресивним CD4⁺FoxP3⁺Treg лимфоцитима (135, 140, 142).

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

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

ненарушена архитектоника слузнице епитела праћена минималним леукоцитним инфилтратом (Слика 2).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

И у фецесима оболелих од улцерозног колитиса уочене се значајно веће концентрације кинуренина него код здравих испитаника. У групи оболелих са спонтаном регенерацијом слузнице црева измерене су значајно веће концентрације кинуренина у фецесу него у групи са хроничним перзистентним обликом болести (Графикон 27). Такође, веће концентрације кинуренина праћене су значајно мањим концентрацијама IL-17, TNF- α , фекалног калпротектина као и CXCL11 у фецесу (Графикон 28а-г), а већим концентрацијама имуносупресивног IL-10 у серумима и фецесима оболелих (Графикон 30а,б). Повећање концентрације кинуренина у серумима и фецесима прати повећање броја имуносупресивних CD4+FoxP3+, CD4+IL-10+ Treg лимфоцита, CD56+IL-10+ NK ћелија и смањење броја инфламацијских CD4+ IFN- γ + T и CD56+IL-17+ NK ћелија у ламини проприји црева оболелих са улцерозним колитисом који су у ремисији болести (Графикон 31а-ђ). Ови резултати указују да уз вредност фекалног калпротектина, концентрација фекалног кинуренина може представљати допунски дијагностичког параметар за праћење успешности терапије и оболелих од улцерозног колитиса.

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

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

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

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

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

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

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

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

MSCs директним контактом као и продукцијом солубилних медијатора, утичу на миграцију, фенотип и ефекторске функције ћелија имунског система. MSCs супримирају инфламацијске M1 макрофаге и промовишу њихову конверзију у имуносупресивне M2 ћелије (179). Такође, MSCs супримирају сазревање DCs и мењају њихов цитокински профил тако што инхибирају продукцију проинфламацијских цитокина (IFN- γ , IL-12) (180).

IDO/кинуренин сигнални пут има важну улогу за имуносупресивне карактеристике MSCs и за њихов потенцијал да супримирају ефекторске Т лимфоцита и цитотоксичне NK ћелије (183, 184). Након стимулације IFN- γ , MSCs продукују IDO, при чему инхибирају Т и В ћелијски одговор и инхибирају цитотоксичност, пролиферацију и продукцију инфламацијских цитокина у NK ћелијама (185-192). Већа активност IDO-а и следствено пораст концентрације кинуренина у серуму узроковала је веће присуство имуносупресивних CD4⁺ FoxP3+IL-10 ћелија у ламини проприји црева оболелих мишева (Графикон 42) што је резултирало смањење инфламације и бржу регенерацију оболеле слузнице.

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

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

6. ЗАКЉУЧАК

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

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

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

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

Закључке смо извели на основу следећих резултата:

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

РЕФЕРЕНЦЕ

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

Cureus [Internet]. 2019 Sep 18 [cited 2020 Feb 13]; Available from: <https://www.cureus.com/articles/21456-relationship-between-ulcerative-colitis-and-rheumatoid-arthritis-a-review>

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

disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014 Apr;63(4):588–97.

19. Bianco AM. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12296.

20. Zeng Z, Mukherjee A, Zhang H. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease. *Front Genet*. 2019 Oct 31;10:1017.

21. Antoni L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1165.

22. Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan;145(1):16–27.

23. Tatiya-aphiradee N, Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018 Dec 19;30(1):1–10.

24. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(27):6296.

25. Halme L. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(23):3668.

26. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011: *Am J Gastroenterol*. 2015 Apr;110(4):564–71.

27. Nanki K, Fujii M, Shimokawa M, Matano M, Nishikori S, Date S, et al. Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium. *Nature*. 2020 Jan;577(7789):254–9.

28. Uhlig HH, Muise AM. Clinical Genomics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Genet*. 2017 Sep;33(9):629–41.

29. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;10(6):352–61.

30. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012 Nov;380(9853):1606–19.
31. Abraham C, Dulai PS, Vermeire S, Sandborn WJ. Lessons Learned From Trials Targeting Cytokine Pathways in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Jan;152(2):374-388.e4.
32. Flannigan KL, Geem D, Harusato A, Denning TL. Intestinal Antigen-Presenting Cells. *Am J Pathol*. 2015 Jul;185(7):1809–19.
33. Kmiec Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci*. 2017 Mar;62(1):1–16.
34. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, et al. Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Play a Key Role in Th1-Dominant Chronic Colitis through Excess Production of IL-12 and IL-23 in Response to Bacteria. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6900–8.
35. Reimund J-M, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol*. 1996 May;16(3):144–50.
36. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*. 2007 Feb 1;56(2):293–303.
37. Zhang S, Zhao X, Zhang D. Cellular and Molecular Immunopathogenesis of Ulcerative Colitis. *Mol Immunol*. 2006;3(1):6.
38. Moldoveanu AIC, Diculescu M, Braticevici CF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom J Intern Med*. 2015 Jun 1;53(2):118–27.
39. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4280.

40. Strober, Warren et al. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. Volume 140(Issue 6):1756-1767.e1.
41. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 2008 May 12;205(5):1063–75.
42. Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm*. 2014;2014:1–14.
43. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Castaño L, Carlos Vitoria J, Ramon Bilbao J. T H 17 (and T H 1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity*. 2009 Jan;42(1):69–73.
44. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226(1):87–102.
45. Kaplan, M., Sun, Y., Hoey, T. et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. 382, 174–177 (1996). <https://doi.org/10.1038/382174a0>. *Nature*. 1996;382.:174–177.
46. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. 1996 Jul 11;382(6587):171–4.
47. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547–9.
48. Cominelli F. Cytokine-Based Therapies for Crohn’s Disease — New Paradigms. *N Engl J Med*. 2004 Nov 11;351(20):2045–8.
49. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):121–33.
50. Diny NL, Rose NR, Čiháková D. Eosinophils in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2017 Apr 27;8:484.

51. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):967–74.
52. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):335–43.
53. Muthas D, Reznichenko A, Balendran CA, Böttcher G, Clausen IG, Kärrman Mårdh C, et al. Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Scand J Gastroenterol.* 2017 Feb;52(2):125–35.
54. Schoultz I, Keita Å. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease—Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells.* 2019 Feb 22;8(2):193.
55. Tan CXW, Brand HS, de Boer NKH, Forouzanfar T. Gastrointestinal diseases and their oro-dental manifestations: Part 2: Ulcerative colitis. *Br Dent J.* 2017 Jan;222(1):53–7.
56. Elahi M, Telkabadi M, Samadi V, Vakili H. Association of oral manifestations with ulcerative colitis. :6.
57. Katz J, Shenkman A, Stavropoulos F, Melzer E. Oral signs and symptoms in relation to disease activity and site of involvement in patients with inflammatory bowel disease. *Oral Dis.* 2003 Jan;9(1):34–40.
58. Field EA, Allan RB. Oral ulceration - aetiopathogenesis, clinical diagnosis and management in the gastrointestinal clinic. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Nov;18(10):949–62.
59. Tan CXW, Brand HS, de Boer NKH, Forouzanfar T. Gastrointestinal diseases and their oro-dental manifestations: Part 1: Crohn's disease. *Br Dent J.* 2016 Dec;221(12):794–9.

60. Patil DT, Moss AC, Odze RD. Role of Histologic Inflammation in the Natural History of Ulcerative Colitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2016 Oct;26(4):629–40.
61. Lankarani KB. Oral manifestation in inflammatory bowel disease: A review. *World J Gastroenterol*. 2013;19(46):8571.
62. Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Perillo L, Dell’Ermo A, Cirillo N. Pyostomatitis vegetans: A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;4.
63. Ruiz-Roca JA, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Pyostomatitis vegetans. Report of two cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2005 Apr;99(4):447–54.
64. Siegel MA, Jacobson JJ. Inflammatory bowel diseases and the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1999 Jan;87(1):12–4.
65. Jurge S, Hegarty AM, Hodgson T. Orofacial manifestations of gastrointestinal disorders. *Br J Hosp Med*. 2014 Sep 2;75(9):497–501.
66. Brito F, Barros FC de, Zaltman C, Pugas Carvalho AT, de Vasconcellos Carneiro AJ, Fischer RG, et al. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Jun;35(6):555–60.
67. Habashneh RA, Khader YS, Alhumouz MK, Jadallah K, Ajlouni Y. The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among Jordanians: a case-control study: Inflammatory bowel disease and periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012 Jun;47(3):293–8.
68. Grossner-Schreiber B, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2006 Jul;33(7):478–84.

69. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol*. 2000;19(1):51–62.
70. Wirtz S, Neurath M. Mouse models of inflammatory bowel disease☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Sep 30;59(11):1073–83.
71. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007 Mar;2(3):541–6.
72. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KRV, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology*. 2014 Aug;22(4):219–33.
73. L. Pasteur. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. (in French). *Bull Soc Chim Paris*. 1861;30-31.
74. Bailey RW, Bourne EJ. Intracellular Glycosidases of Dextran-producing Bacteria. *Nature*. 1961 Jul;191(4785):277–8.
75. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2020 Feb 13];104(1).
76. Ohkusa T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi Jpn J Gastro-Enterol*. 1985 May;82(5):1327–36.
77. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990 Mar;98(3):694–702.
78. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue Distribution of Dextran Sulfate Sodium(DSS) in the Acute Phase of Murine DSS-Induced Colitis. *J Vet Med Sci*. 1999;61(1):67–70.
79. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Exp Anim*. 2000;49(1):9–15.

80. HIRONO^a I, GOLBERG^b L. CARCINOGENICITY OF DEXTBAN SULFATE SODIUM IN RELATION TO ITS MOLECULAR WEIGHT. :6.
81. Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: Some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol.* 1994 Aug;29(4):430–8.
82. Breider MA, Eppinger M, Gough A. Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis in Rats. *Vet Pathol.* 1997 Nov 1;34(6):598–604.
83. Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut.* 1992 Nov 1;33(11):1521–7.
84. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis.* 2000 Apr 1;21(4):757–68.
85. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1993 Aug;69(2):238–49.
86. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible Involvement of Tight Junctions, Extracellular Matrix and Nuclear Receptors in Epithelial Differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–10.
87. Laprise P. Emerging Role for Epithelial Polarity Proteins of the Crumbs Family as Potential Tumor Suppressors. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–9.
88. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J Surg Res.* 2007 Jun;140(1):12–9.

89. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, et al. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. Bereswill S, editor. PLoS ONE. 2009 Jun 29;4(6):e6073.
90. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim.* 1999 Jul;48(3):137–43.
91. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut.* 1996 Aug;39(2):234–41.
92. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Oct 29;99(22):14338–43.
93. Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000 Mar;12(3):267–73.
94. Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Germ-Free IQI/Jic Mice. *Exp Anim.* 2001;50(5):387–95.
95. Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol.* 2001 Dec;1(1):3.
96. Axelsson L-G, Landström E, Goldschmidt TJ, Grönberg A, Bylund-Fellenius A-C. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: Effects in CD4⁺-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res.* 1996 Apr;45(4):181–91.

97. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994 Dec;107(6):1643–52.
98. Perše M, Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–13.
99. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. THE IMMUNOLOGY OF MUCOSAL MODELS OF INFLAMMATION. *Annu Rev Immunol*. 2002 Apr;20(1):495–549.
100. Siegmund B, Lehr H-A, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Nov 6;98(23):13249–54.
101. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1 β targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov;337(2):647–54.
102. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. *Immunity*. 2009 Apr;30(4):556–65.
103. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674–7.
104. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 β release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci*. 2007 Jul;81(5):362–71.
105. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, et al. Regulation of Murine Intestinal Inflammation by Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: Divergent Roles of Superoxide and Nitric Oxide. :12.

106. Nolan KF, Strong V, Soler D, Fairchild PJ, Cobbold SP, Croxton R, et al. IL-10-Conditioned Dendritic Cells, Decommissioned for Recruitment of Adaptive Immunity, Elicit Innate Inflammatory Gene Products in Response to Danger Signals. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2201–9.
107. Berndt BE, Zhang M, Chen G-H, Huffnagle GB, Kao JY. The Role of Dendritic Cells in the Development of Acute Dextran Sulfate Sodium Colitis. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):6255–62.
108. Boxer LA. Role of neutrophils in genetic disorders of phagocyte function leading to IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Apr;46 Suppl 1:E17.
109. D’Odorico A, D’Inca R, Mestriner C, Leo VD, Ferronato A, Sturniolo GC. Influence of Disease Site and Activity on Peripheral Neutrophil Function in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2000;45(8):7.
110. Steinbeck J, Roth JA, Kaeberle L. Activation of Bovine Neutrophils by Recombinant Interferon- γ . :8.
111. Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, et al. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol.* 2013 Sep;6(5):1016–26.
112. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002 Feb;24(1):15–8.
113. Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol.* 2009 Jul;31(2):185–205.
114. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, et al. Immunopathogenesis of Experimental Ulcerative Colitis Is Mediated by Eosinophil Peroxidase. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5664–75.
115. Shichijo K. Antibody to eosinophil cationic protein suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol.* 2005;11(29):4505.

116. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, et al. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*. 2000 Jul;119(1):119–28.
117. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol*. 2013 Mar;6(2):347–57.
118. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inghin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of Acute Murine Dextran Sodium Sulphate Colitis: Cytokine Profile and Dose Dependency. *Digestion*. 2000;62(4):240–8.
119. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 1999 Jan 22;34(1):66–74.
120. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Jul 1;163(1):143–7.
121. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*. 1994 Feb;106(2):533–9.
122. Dieleman, Palmen, Akol, Bloemena, Pena, Meuwissen, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998 Dec;114(3):385–91.
123. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun;23(6):716–24.
124. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol Endocrinol*. 2014 Aug;28(8):1221–38.
125. Palego L, Betti L, Rossi A, Giannaccini G. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J Amino Acids*. 2016;2016:1–13.

126. Keszthelyi d., troost f. j., masclee a. a. m. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil.* 2009 Dec;21(12):1239–49.
127. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, et al. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol.* 2018 Jan 31;9:151.
128. Keszthelyi D, Troost FJ and Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1239–1249.
129. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, et al. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol* 2018; 9: 151.
130. Bilir C and Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci* 2017; 3: 52–56.
131. Van Baren N and Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol* 2015; 6: 34.
132. Pallotta MT, Fallarino F, Matino D, Macchiarulo A, Orabona C. AhR-Mediated, Non-Genomic Modulation of IDO1 Function. *Front Immunol.* 2014 Oct 15 [cited 2020 Feb 13];5.
133. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-Degrading Enzymes in Tumoral Immune Resistance. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2020 Feb 13];6.
134. Pfefferkorn ER. Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Med Sci.* :5.
135. Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 2004 Nov 23;2004(260):tr8.
136. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* 2016 Mar;37(3):193–207.

137. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase–expressing Dendritic Cells. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):447–57.
138. Lee S-M, Lee Y-S, Choi J-H, Park S-G, Choi I-W, Joo Y-D, et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett*. 2010 Aug;132(1–2):53–60.
139. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor ζ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6752–61.
140. Larussa T, Leone I, Suraci E, Nazionale I, Procopio T, Conforti F, et al. Enhanced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa modulates Th1/Th2 pathway and interleukin 17 production. *Helicobacter*. 2015 Feb;20(1):41–8.
141. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*. 2010 May 1;59(5):595–604.
142. Luu M, Steinhoff U, Visekruna A. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clin Transl Immunol*. 2017 Sep 22;6(9):e156.
143. Fougeray S, Mami I, Bertho G, Beaune P, Thervet E, Pallet N. Tryptophan Depletion and the Kinase GCN2 Mediate IFN- γ -Induced Autophagy. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2954–64.
144. Metz R, Rust S, DuHadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *OncoImmunology*. 2012 Dec;1(9):1460–8.

145. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: From catalyst to signaling function: HIGHLIGHTS. *Eur J Immunol*. 2012 Aug;42(8):1932–7.
146. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011 Sep;12(9):870–8.
147. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, et al. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature*. 2014 Jul;511(7508):184–90.
148. Sharma MD, Hou D-Y, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6102–11.
149. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. 2008;111(3):7.
150. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Hatano Y, Tomita H, et al. IDO1 Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate–Induced Colitis in Mice. *J Immunol*. 2013 Sep 15;191(6):3057–64.
151. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, et al. Erratum to: Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*. 2012 Sep;47(9):1061–2.
152. Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, et al. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Dec;153(6):1504–1516.e2.
153. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-

regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. *Ther Adv Gastroenterol*. 2018 Jan;11:175628481879355.

154. Wolf A. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol*. 2004 Oct;113(1):47–55.

155. Ito H, Ando T, Arioka Y, Saito K, Seishima M. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity enhances the anti-tumour effects of a Toll-like receptor 7 agonist in an established cancer model. *Immunology*. 2015 Apr;144(4):621–30.

156. Ciorba MA, Bettonville EE, McDonald KG, Metz R, Prendergast GC, Newberry RD, et al. Induction of IDO-1 by Immunostimulatory DNA Limits Severity of Experimental Colitis. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3907–16.

157. Tu L, Chen J, Zhang H, Duan L. Interleukin-4 Inhibits Regulatory T Cell Differentiation through Regulating CD103+ Dendritic Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2020 Feb 13];8

158. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. 2009;22.

159. Ferdinande L, Demetter P, Perez-Novo C, Waeytens A, Taideman J, Rottiers I, et al. Inflamed Intestinal Mucosa Features a Specific Epithelial Expression Pattern of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008 Apr;21(2):289–95.

160. Harrington L, Srikanth CV, Antony R, Rhee SJ, Mellor AL, Shi HN, et al. Deficiency of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Enhances Commensal-Induced Antibody Responses and Protects against *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Infect Immun*. 2008 Jul 1;76(7):3045–53.

161. Zhao L, Suolang Y, Zhou D, Tang Y, Zhang Y. *Bifidobacteria* alleviate experimentally induced colitis by upregulating indoleamine 2, 3-dioxygenase expression: *Bifidobacteria* alleviate colitis. *Microbiol Immunol*. 2018 Feb;62(2):71–9.

162. Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, et al. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother*. 2018 Apr;100:426–32.
163. Markovic BS, Kanjevac T, Harrell CR, et al. Molecular and cellular mechanisms involved in mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory bowel diseases. *Stem Cell Rev* 2018;14: 153–165.
164. Moon JS, Cheong NR, Yang SY, Kim IS, Chung HJ, Jeong YW, et al. Lipopolysaccharide-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 2013 Mar;n/a-n/a.
165. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787–98.
166. Özdemir AT, Özgül Özdemir RB, Kırmaz C, Sarıboyacı AE, Ünal Halbutoğlları ZS, Özel C, et al. The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. *Cell Immunol*. 2016 Dec;310:108–15.
167. Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, Le AD. DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF- α /IDO Axis. *J Dent Res*. 2016 Oct;95(11):1274–81.
168. Đokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Čolić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells: Immunomodulation. *Eur J Immunol*. 2013 Jul;43(7):1862–72.
169. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Dzitko K, Kur B, Tarkowski M, Kurnatowska A, et al. Dysfunction of CD4+CD25^{high} T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis: Regulatory T cells in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar 3;37(8):454–61.

170. Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Mahanonda R, Takikawa O. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression and Regulation in Chronic Periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Jan;80(1):114–21.
171. Mao F, Tu Q, Wang L, Chu F, Li X, Li HS, et al. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget*. 2017 Jun 6 [cited 2020 Feb 13];8(23).
172. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 May 9;119(11):2204–13.
173. Nowarski R, Jackson R, Flavell RA. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell*. 2017 Jan;168(3):362–75.
174. Păunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, T?anasie G, Bunu C, et al. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med*. 2007 May;11(3):502–8.
175. Ferrand J, Noël D, Lehours P, Prochazkova-Carlotti M, Chambonnier L, Ménard A, et al. Human Bone Marrow-Derived Stem Cells Acquire Epithelial Characteristics through Fusion with Gastrointestinal Epithelial Cells. Ludgate M, editor. *PLoS ONE*. 2011 May 5;6(5):e19569.
176. Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1–11.
177. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro: Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS*. 2004 May;22(3):377–84.
178. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. Kerkis I, editor. *PLoS ONE*. 2012 Oct 4;7(10):e46842.
179. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal

stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity*. 2010 Jun;43(4):255–63.

180. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2025–32.

181. Kong Q, Sun B, Bai S, Zhai D, Wang G, Liu Y, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF- β . *J Neuroimmunol*. 2009 Feb;207(1–2):83–91.

182. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction: Immunomodulation. *Eur J Immunol*. 2013 Jan;43(1):182–7.

183. Alipour R, Karimi MM, Hashemi-Beni B. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Dispensable for The Immunomodulatory Function of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *CELL J*. 2017;18(4):12.

184. Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Muraro M, Defedele D, et al. Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol*. 2016 Feb;44(2):138-150.e1.

185. Deng Y, Zhang Y, Ye L, Zhang T, Cheng J, Chen G, et al. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep*. 2016 Dec;6(1):37566.

186. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, et al. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol*. 2017 Aug 28;8:1042.

187. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem

Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression: Transplantation. 2010 Dec;90(12):1312–20.

188. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.

189. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619–21.

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

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

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

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

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

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

196. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut*. 2000 Sep;47(3):404–9.
197. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Oct;24(10):1110–6.
198. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, et al. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:8031328.
199. Kostas A, Siakavellas SI, Kosmidis C, Takou A, Nikou J, Maropoulos G, et al. Fecal calprotectin measurement is a marker of short-term clinical outcome and presence of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017 Nov 7;23(41):7387–96.
200. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, et al. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1998 May;112(2):205–15.
201. Jovanovic M, Simovic Markovic B, Gajovic N, Jurisevic M, Djukic A, Jovanovic I, et al. Metabolic syndrome attenuates ulcerative colitis: Correlation with interleukin-10 and galectin-3 expression. *World J Gastroenterol*. 2019 Nov 21;25(43):6465–82.
202. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, et al. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages. *J Crohns Colitis*. 2016 May;10(5):593–606.
203. Whitem CG, Williams AD and Williams CS. Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium. *J Vis Exp* 2010; 35: 1652.

204. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol*. 1999 May;116(2):238–45.
205. Zhang X, Yang Y, Zhang L, Lu Y, Zhang Q, Fan D, et al. Mesenchymal stromal cells as vehicles of tetravalent bispecific Tandab (CD3/CD19) for the treatment of B cell lymphoma combined with IDO pathway inhibitor D-1-methyl-tryptophan. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2017 23;10(1):56.
206. Gonçalves F da C, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18228–39.
207. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2002 Aug;Chapter 15:Unit 15.19.
208. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1–2):107–24.
209. Ahrens B, Freund T, Rha R-D, Dittrich A-M, Quarcoo D, Hutloff A, et al. Lipopolysaccharide Stimulation of Dendritic Cells Induces Interleukin-10 Producing Allergen-Specific T Cells in Vitro but Fails to Prevent Allergic Airway Disease. *Exp Lung Res*. 2009 Jan 1;35(4):307–23.
210. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*. 2010 May 1;59(5):595–604.
211. An Anti-CD103 Immunotoxin Promotes Long-Term Survival of Pancreatic Islet Allografts - Zhang - 2009 - *American Journal of Transplantation*
212. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, Mo J-H, Shen C, Shenouda S, et al. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation

independently of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 23;104(43):17022–7.

213. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol*. 2015 Feb;45(2):531–43.

214. Setiady YY, Coccia JA, Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fcγ3+ phagocytes. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):780–6.

215. Yang S-H, Park M-J, Yoon I-H, Kim S-Y, Hong S-H, Shin J-Y, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009 May 31;41(5):315–24.

216. Shevryev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol*. 2020;10.

217. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):48–57.

218. Kučan Brlić P, Lenac Roviš T, Cinamon G, Tsukerman P, Mandelboim O, Jonjić S. Targeting PVR (CD155) and its receptors in anti-tumor therapy. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(1):40–52.

219. Tsuchida Y, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Tsuchiya H, et al. TGF-β3 Inhibits Antibody Production by Human B Cells. *PLOS ONE*. 2017 Apr 1;12(1):e0169646.

220. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*. 2012;3:51.

221. Florholmen J. Mucosal healing in the era of biologic agents in treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Jan;50(1):43–52.

222. Di Ruscio M, Vernia F, Ciccone A, Frieri G, Latella G. Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? *Inflamm Bowel Dis*. 2017 19;24(1):78–92.
223. Kristensen V, Røseth A, Ahmad T, Skar V, Moum B. Fecal Calprotectin: A Reliable Predictor of Mucosal Healing after Treatment for Active Ulcerative Colitis .*Gastroenterology. Research and Practice*. 2017
224. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar;1098:216–29.
225. Kurdukar DPA, Kurdukar DAA, Mahale DSA, Beldar DAM. Biomarkers in Gingival Crevicular Fluid. :6.

Биографија

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

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

Библиографија

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

