

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Марија Р. Ракић

Утицај комплекса витамина Бе на  
неуроинфламацију и развој  
експерименталног аутоимунског  
енцефаломијелитиса

докторска дисертација

Београд, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija R. Rakić

The effects of vitamin B complex on  
neuroinflammation and development of  
experimental autoimmune encephalomyelitis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

МЕНТОР:

---

**др Биљана Божић Недељковић, редовни професор**  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

---

**др Александра Кораћ, редовни професор**  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

---

**др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор**  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

**др Сергеј Томић, виши научни сарадник**  
Универзитет у Београду, Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП

---

**др Јелена Репац, научни сарадник**  
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

---

**др Мина Перић, научни сарадник**  
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду

Датум одбране: \_\_\_\_\_

Утицај комплекса витамина Бе на неуроинфламацију и развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

**САЖЕТАК**

Дефицијенција витамина Бе повезана је са когнитивном дисфункцијом и различитим болестима централног нервног система, укључујући и мултиплу склерозу у чијој основи су неуроинфламаторни процеси. У овој тези испитан је утицај комплекса витамина Бе (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) на прогресију болести, процесе инфламације, као и на састав микробиоте црева у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису, животињском моделу мултипле склерозе. Поред тога, ефекат комплекса витамина Бе на функцију BV2 ћелија микроглије активираних липополисахаридом испитан је *in vitro*. Добијени резултати показали су да третман комплексом витамина Бе ублажава клиничку слику и доводи до бржег опоравка животиња, као и до смањеног степена инфламаторних процеса у ткивима од интереса. Такође, утврђено је да витамини групе Бе имају улогу у одржавању еубиозе микробиоте црева. *In vitro* анализа показала је да третман комплексом витамина Бе утиче на смањење продукције реактивних врста кисеоника, NO и про-инфламаторних цитокина *TNF- $\alpha$*  и *IL-6* од стране активираних ћелија микроглије, као и на промене у експресији специфичних маркера ка неуропротективном M2 фенотипу. Такође, показано је да третман комплексом витамина Бе утиче на смањење неуротоксичног ефекта медијатора продукованих од стране активираних ћелија микроглије према *SH-SY5Y* неуронским ћелијама. *In silico* анализа потенцијалног механизма деловања витамина Бе на протеине од интереса у оквиру инфламаторног пута *TLR4*, указала је на потенцијал витамина Бе да инхибирају кључне протеине у оквиру инфламаторног пута *TLR4*, као и *iNOS* протеин који представља један од важнијих маркера активације ћелија микроглије. На основу добијених резултата, може се закључити да витамини Бе комплекса имају потенцијал да се примењују као додатна терапија за мултиплу склерозу и сродне неуродегенеративне поремећаје у чијој основи је неуроинфламација.

**Кључне речи:** комплекс витамина Бе, неуроинфламација, мултипла склероза, експериментални аутоимунски енцефаломијелитис, ћелије микроглије

**Научна област:** Биологија

**Ужа научна област:** Имунобиологија



The effects of vitamin B complex on neuroinflammation and the development of  
experimental autoimmune encephalomyelitis

**SUMMARY**

Vitamin B deficiency has long been associated with cognitive dysfunction and various central nervous system diseases, including multiple sclerosis. The aim of the present thesis was to investigate the effects of the vitamin B complex (B1, B2, B3, B5, B6, and B12) on the disease progression, the inflammatory processes, and the gut microbiota composition in an experimental autoimmune encephalomyelitis, animal model of multiple sclerosis. In addition, the effects of the vitamin B complex on the function of lipopolysaccharide stimulated *BV2* microglial cells were examined *in vitro*. The obtained results showed that the vitamin B complex treatment attenuated the clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis during the disease, shortened the duration of experimental autoimmune encephalomyelitis, and also reduced the extent of inflammatory processes in the affected tissues. In addition, it was found that B vitamins have a role in maintaining gut microbiota homeostasis. *In vitro* analyses demonstrated that vitamin B complex treatment decreased the production of reactive oxygen species, NO and pro-inflammatory cytokines *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* by lipopolysaccharide-activated mouse *BV2* microglia, and also caused a shift in the microglial phenotype towards the neuroprotective M2 phenotype. Furthermore, treatment with vitamin B complex has been shown to mitigate the neurotoxic effect of mediators produced by activated microglial cells on *SH-SY5Y* neuronal cells. The *in silico* study on the potential mechanism of action of selected B vitamins revealed that various B vitamins have the potential to inhibit key proteins within the *TLR4* signaling pathway, as well as inducible nitric oxide synthase, a marker of microglial activation. Based on the obtained results, it is evident that B vitamins display a notable synergistic effect, suggesting their potential utility as complementary therapy for multiple sclerosis and related neurodegenerative disorders linked to neuroinflammatory processes.

**Key words:** vitamin B complex, neuroinflammation, multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, microglia cells

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Immunobiology

## Садржај

1	УВОД .....	1
1.1	Мултипла склероза .....	2
1.2	Механизми неуродегенерације у мултиплој склерози .....	3
1.3	Имунопатогенеза мултипле склерозе.....	5
1.3.1	Т помоћничке ћелије.....	6
1.3.2	CD8 цитотоксичне Т-ћелије.....	7
1.3.3	Урођено-убилачке Т-ћелије .....	8
1.3.4	γδ Т-ћелије .....	8
1.3.5	Инваријантни тип Т-ћелија мукозе .....	9
1.3.6	Регулаторне Т-ћелије .....	9
1.3.7	Б-ћелије .....	10
1.3.8	Макрофаги и микроглија.....	11
1.3.9	Дендритске ћелије.....	12
1.3.10	Супресорске ћелије мијелоидног порекла.....	12
1.4	Значај микробиоте црева у мултиплој склерози .....	13
1.5	Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис.....	17
1.6	Терапијски приступи у третману мултипле склерозе.....	18
1.7	Бе витамини као имуномодулатори .....	19
2	ЦИЉЕВИ .....	30
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	32
3.1	Хемикалије .....	33
3.2	Реагенси .....	34
3.3	Експерименталне животиње .....	35
3.3.1	Третман животиња комплексом витамина Бе .....	36
3.3.2	Процењивање клиничке слике и прогресије болести .....	36
3.3.3	Изоловање органа.....	37
3.3.4	Хистоморфолошка анализа и одређивање густине једара препарата лимфних чворова, нерава и мишића .....	38
3.3.5	Криопрезервација и хистоморфолошка анализа препарата мозга и кичмене мождине	38
3.3.6	Екстракција ДНК из узорака фецеса за анализу састава микробиоте црева секвенцирањем маркер гена за 16S рибозомалну РНК .....	40
3.4	Карактеризација састава и функције микробиоте црева .....	41
3.4.1	Биоинформатичка анализа података добијених секвенцирањем гена за 16S рибозомалну РНК.....	42

3.4.2	Одређивање релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија методом квантитативног <i>qPCR</i> у реалном времену.....	43
3.4.3	Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева пацова применом програма <i>MicFunPred</i> .....	43
3.5	<i>In vitro</i> анализа утицаја комплекса витамина Бе на функције ћелија микроглије и неурона.....	44
3.5.1	Култивација ћелијских линија .....	44
3.5.2	Активација <i>BV2</i> ћелија и третман комплексом витамина Бе .....	45
3.5.3	Одређивање метаболичке активности ћелија МТТ тестом .....	46
3.5.4	Одређивање продукције реактивних врста кисеоника НБТ тестом.....	46
3.5.5	Одређивање продукције азот-моноксида (нитрита) <i>Griess</i> -овим тестом.....	47
3.5.6	Модел трансфера супернатаната третираних <i>BV2</i> ћелија неуронским ћелијама..	47
3.5.7	Одређивање продукције цитокина <i>ELISA</i> тестом .....	48
3.5.8	Фенотипска анализа ћелија проточном цитофлуориметријом .....	49
3.6	Молекулски докинг.....	51
3.6.1	Припрема протеина и лиганата за анализу.....	51
3.6.2	Докинг процедура .....	52
3.7	Статистичка анализа.....	53
4	РЕЗУЛТАТИ.....	54
4.1	Утицај комплекса витамина Бе на клиничку слику и прогресију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.....	55
4.2	Хистоморфолошка анализа органа од интереса након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.....	58
4.2.1	Хистоморфолошка анализа поплитеалних лимфних чворова након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса .....	58
4.2.2	Хистоморфолошка анализа и одређивање густине једара периферног нерва и мишића квадрицепса.....	61
4.2.3	Хистоморфолошка анализа кичмене мождине након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.....	65
4.2.4	Хистоморфолошка анализа пресека предњег мозга након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса .....	73
4.3	Анализа утицаја третмана витаминима Бе комплекса на састав и функцију микробиоте црева.....	83
4.3.1	Таксономска анализа на нивоу раздела .....	83
4.3.2	Таксономска анализа на нивоу фамилије .....	85
4.3.3	Таксономска анализа на нивоу рода.....	88
4.3.4	Одређивање релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија	

4.3.5	Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева применом <i>MicFunPred</i> програма <sup>92</sup>	
4.4	<i>In vitro</i> испитивање анти-инфламаторних и неуропротективних својстава комплекса витамина Бе .....	97
4.4.1	Ефекти комплекса витамина Бе на функције активираних BV2 ћелија мишије микроглије .....	97
4.4.2	Ефекат третмана витаминима Бе комплекса на фенотип активираних BV2 ћелија мишије микроглије.....	98
4.4.3	Ефекат супернатаната BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса на неуронске SH-SY5Y ћелије.....	101
4.5	Молекулски докинг.....	102
4.5.1	Валидација протокола за молекулски докинг .....	102
4.5.2	Молекулски докинг одабраних витамина Бе са кључним протеинима TLR4/MD2 сигналног пута.....	102
5	ДИСКУСИЈА.....	113
6	ЗАКЉУЧАК.....	132
7	ЛИТЕРАТУРА.....	135
	<b>Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада .....</b>	<b>166</b>
	<b>Изјава о коришћењу .....</b>	<b>167</b>

*Експериментални део докторске дисертације урађен је на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у Виваријуму и лабораторијама Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“ и Института за зоологију, као и у Одељењу за имунологију и имунопаразитологију Института за примену нуклеарне енергије ИНЕП.*

*Захваљујем се свима који су допринели изради ове докторске дисертације:*

*Драгој менторки проф. Биљани Божић Недељковић велико хвала на посвећености, подршци, разумевању, ажурности и указаној помоћи током извођења ове докторске дисертације. Бескрајно хвала на приликама да напредујем, пренетом драгоценом знању и увођењу у свет имунологије и науке.*

*Посебно хвала драгим пријатељима и колегама из Имуно тима, др Бојану Божићу и др Јелени Репач на увођењу у свет биоинформатике, свим конструктивним саветима, указаној помоћи и подршци током извођења ове докторске дисертације. Велико хвала др Тањи Лунић, на константној подршци, несебичној помоћи, разумевању и свим заједничким тренуцима, смеху и раду у лабораторији.*

*Хвала др Катарини Митић на помоћи у експерименталном раду и пренетом знању.*

*Велико хвала колегама са Катедре за биологију ћелија и ткива, проф. др Александри Кораћ и др Марији Алексић на уступању лабораторије и реаганаса за извођење експеримената. Хвала на несебичној помоћи, пренетом знању, конструктивним саветима и сугестијама током експерименталног рада.*

*Др Мирјани Рајилић-Стојановић велико хвала на упознавању са светом микробиоте, пренетом знању и стручним саветима.*

*Посебну захвалност дугујем колегама са Института за примену нуклеарне енергије, др Сергеју Томићу, Марини Бекић и др Милану Марковићу на могућности за реализацију великог експерименталног дела ове докторске дисертације. Бескрајно хвала на издвојеном времену, уступљеном простору и регансима, пренетом знању, свим драгоценим саветима и сугестијама, несебичној помоћи и пријатној радној атмосфери.*

*Др Мини Перић бескрајно хвала на свој указаној помоћи, стрпљењу, смерницама, увођењу у рад са експерименталним животињама, несебичном дељењу знања и упознавању са многобројним експерименталним техникама које су допринеле квалитету ове докторске дисертације.*

*Хвала др Сањи Пековић на учествовању и извођењу *in vivo* експерименталног дела ове дисертације, као и у детаљној анализи хистолошких препарата. Хвала на увођењу у рад са експерименталним животињама, несебичној помоћи, ентузијазму и залагању.*

*Др Предрагу Недељковићу велико хвала на указаној помоћи у извођењу *in vivo* експерименталног дела. Хвала на пренетом знању и пружању стручних савета.*

*Хвала др Мариани Оалђе Павловић на указаној помоћи, пренетом знању и увођењу у експериментални рад са ћелијском културом који је допринео извођењу *in vitro* експерименталног дела ове докторске дисертације.*

*Хвала др Јовану Пешовићу на указаној помоћи током експеримената изоловања ДНК, анализи резултата и корисним саветима.*

*Хвала др Душану Радојевићу са Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство на уступљеним реагенсима и помоћи током одређивања СФБ, пренетом знању и на издвојеном времену за анализу резултата и пријатној атмосфери у лабораторији.*

*Највећу захвалност дугујем породици, супругу и пријатељима који су увек били уз мене на овом путу, хвала вам на неизмерној подршци, љубави и разумевању. Ову дисертацију посвећујем мојој мами, која је увек била ту за мене и без које не бих била ту где јесам.*

# **1 УВОД**

## 1.1 Мултипла склероза

Мултипла склероза (МС) је хронична аутоимунска болест централног нервног система (ЦНС). Главне карактеристике ове болести укључују инфламацију ЦНС-а, демиелинизацију, оштећење/губитак аксона и последичну неуродегенерацију [1, 2]. Широм света дијагностиковано је преко два милиона оболелих од МС, са двоструко већом инциденцом код жена у односу на мушкарце. МС се обично јавља код одраслих, у периоду од 20 до 45 година, али се може јавити и у детињству или каснијем добу [3].

Иако тачан узрок МС-е није потпуно разјашњен, сматра се да на развој ове болести утиче комбинација различитих фактора. Генетичка предиспозиција, вирусна мимикрија (инфекција *Epstein-Barr* вирусом), недостатак одговарајућих витамина (као што је витамин Д), аспекти животне средине (изложеност хемикалијама, конзумирање цигарета, исхрана, итд.) и географска локација (северна хемисфера – мањак сунчеве светлости) чине факторе који доприносе настанку и развоју ове болести [4]. МС је болест која започиње неуроинфламацијом што последично доводи до неуродегенерације (оштећења аксона и формирања лезија) у различитим деловима ЦНС-а. Услед веома променљивог и комплексног тока, МС се на основу клиничке слике може јасније дефинисати поделом у четири облика болести [3, 4]:

1. Релапсно-ремитентна МС (РРМС) – представља најчешћи облик који обухвата око 85% пацијената, окарактерисан појавом симптома праћеним периодима ремисије и смањењем/губитком симптома.
2. Секундарна прогресивна МС (СПМС) – може се јавити код пацијената са РРМС. У одсуству одговарајуће терапије, прогресија болести се наставља – долази до погоршања стања са или без периода ремисије/смањења симптома.
3. Примарна прогресивна МС (ППМС) – јавља се код 10% пацијената. Код ове форме МС долази до постепеног погоршања симптома, без присуства ремисије.
4. Прогресивно-релапсирајућа МС (ПРМС) – јавља се код само 5% пацијената, одликује се повременим појавама погоршања симптома, без присуства ремисије.

Клинички симптоми МС-е могу варирати међу пацијентима у зависности од тога која нервна влакна су захваћена. Међутим, најчешћи симптоми укључују сензорни губитак (парестезије/трњење), оптички неуритис (парцијални/потпуни губитак централног вида или двоструки вид), неуралгију тригеминуса, миокимију лица,



моторичку слабост екстремитета, поремећај координације покрета, вртоглавицу, умор, па чак и менталне поремећаје као што је депресија. Услед комплексног тока болести и варирања клиничких симптома међу пацијентима, не постоји јединствени тест за постављање дијагнозе МС-е. Болест се дијагностикује на основу клиничких налаза и комбинације неколико метода, као што су магнетна резонанца мозга и анализа цереброспиналне течности (ЦСТ). Дијагноза МС-е се утврђује на основу присуства лезија у белој маси ЦНС-а, хроничне инфламације ЦНС-а, као и појавом најмање две различите епизоде у току болести [3, 5].

## 1.2 Механизми неуродегенерације у мултиплој склерози

Процес неуроинфламације, који је у основи многих неуролошких обољења, укључујући и МС-у, одликује се измењеним или неадекватним имунским одговором који доводи до оштећења мијелинског омотача, губитка функције неурона и развоја болести. Мијелинска структура је специјализована мембрана која обавија аксоне нервних ћелија, формира заштитни омотач и омогућава ефикасан пренос нервних сигнала. Мијелински омотач стварају глијалне ћелије: олигодендроцити у ЦНС-у а Шванове ћелије у ПНС-у [6]. Дуж аксона налазе се и Ранвијеова сужења (немијелинизовани делови аксона) које карактерише велика густина канала за натријум. Оваква дисконтинуирана структурна организација значајно убрзава пренос нервних импулса и омогућава ефикасну трансмисију сигнала (акционих потенцијала) дуж аксона нервних ћелија. Главне компоненте мијелинског омотача су протеини и липиди. Најважнији протеини који учествују у изградњи мијелинског омотача су мијелин базни протеин (МБП), мијелин олигодендроцитни протеин (МОГ), протеолипидни протеин (ПЛП) и други. Вишеслојну липидну структуру чине холестерол, сфинголипиди и гликолипиди који граде изолациони слој око аксона. Висок садржај липида даје мијелину карактеристичан бели изглед [6]. Природа инфламаторног одговора се разликује између акутно/релапсног и прогресивног облика болести. Током раног периода, услед инфламације у региону мозга и кичмене мождине долази до демиелинизације и појаве лезија лоцираних унутар беле масе, док у прогресивном стадијуму болести, услед нарушене крвно-мождане баријере (КМБ), долази до кортикалне демиелинизације и дифузних оштећења аксона, као и ширења већ постојећих демиелинизационих лезија [1, 7, 8]. Истраживања су утврдила да је пропустљивост КМБ-е повећана код пацијената са МС-ом [7]. Иако није још са

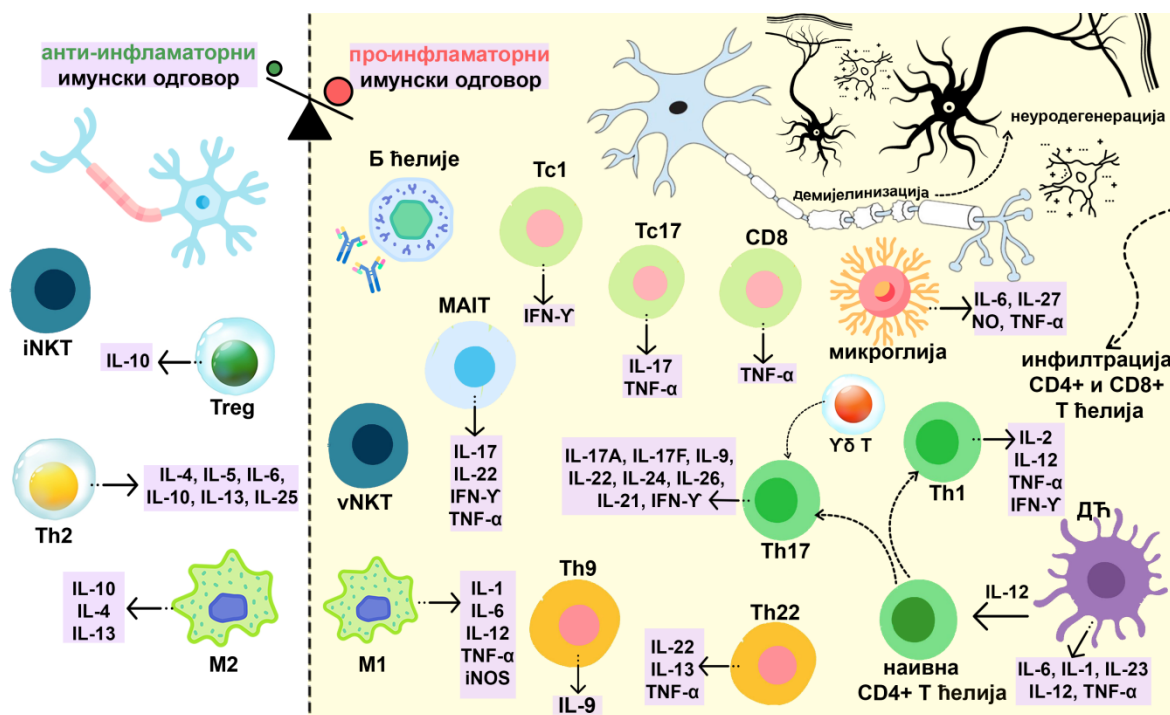
сигурношћу утврђено да ли је нарушени интегритет КМБ-е узрок или последица неуродегенерације у МС-и, јасно је да ови процеси доприносе имунопатогенези МС-е и да постоји корелација између пропустљивости КМБ-е и прогресије МС-е [9]. Микроваскулатура ЦНС-а представља сложен систем који се састоји од специјализованих ендотелних ћелија, које се још називају и ендотелне ћелије КМБ-е [9]. Овај специјализовани ендотел је обложен перицитима, астроцитима, као и васкуларном базалном мембраном формираном од специјализованих молекула ванћелијског матрикса [9, 10]. Додатно, треба напоменути да неурони и ћелије микроглије такође утичу на фенотип ћелија баријере продукцијом фактора који подржавају интегритет КМБ-е, истовремено индукујући експресију молекула који учествују у имунском одговору, као што су хемокини и адхезивни молекули, на ендотелним ћелијама КМБ-е [9]. Инфилтрација активираних леукоцита у ЦНС представља један од кључних догађаја код пацијената са МС-ом, који резултује демиелинизацијом аксона и формирањем лезија у мозгу и кичменој мождини. Активирани леукоцити директно или индиректно утичу на цереброваскуларни ендотел и пропустљивост КМБ-е, експресију и продукцију про-инфламаторних цитокина и других солубилних медијатора [9]. Инфламаторна каскада индукује промене у архитектури и локализацији протеина чврстих веза (као што су клаудини и оклудини) и спојних адхезивних молекула, који су кључни у регулацији пропустљивости КМБ-е. Као резултат тога, нарушени интегритет КМБ-е олакшава миграцију имунских ћелија које из периферне крви пролазе кроз КМБ-у и на тај начин промовишу инфламацију у ЦНС-у код пацијената са МС-ом [7, 11]. Имајући у виду да микроваскулатура ЦНС-а представља главно место уласка имунских ћелија које ће се наћи у инфилтратима, стога очување ових структура у ЦНС-у може допринети смањењу неуроинфламације и сходно томе ублажити клиничке знаке и прогресију болести. Поред процеса имунопатогенезе, механизми који такође доприносе прогресији МС-е су редистрибуција јонских канала и метаболичке промене настале услед процеса демиелинизације [12]. У лезијама код пацијената са МС-ом утврђена су дифузна оштећења митохондрија, што доводи до нарушене активности комплекса респираторног ланца и смањене производње енергије. Након процеса демиелинизације, потребе за енергијом се повећавају услед настанка прекида паранодалних мијелинских петљи [13]. Смањење продукције АТП-а у неуронима може узроковати дисфункцију  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  пумпе, стварајући константну натријумову струју, која

нарушава  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  измену и доводи до акумулације калцијума у аксону. Ово заузврат активира ензиме као што су протеазе, фосфолипазе и калпаине, што доводи до даљег оштећења неурона и/или аксона, као и смањене производње АТП-а [12]. Поред тога, оштећење аксона може бити узроковано и неадекватном трофичком потпором. Олигодендроцити користе глукозу из циркулације, разграђујући је на пируват или лактат који улазе у аксон где их митохондрије користе за синтезу АТП-а. Алтернативни извор енергије за аксоне долази из гликогена ускладиштеног у астроцитима, који се може трансформисати у глукозу и касније у пируват или лактат, у зависности од доступности кисеоника [12]. Последице ових абнормалности у неуронским ћелијама узрокују недостатак енергије, дегенерацију аксона и ћелијску смрт, доприносећи оштећењу ткива и стварању лезија. Хронична инфламација, демиелинизација и формирање лезија доприносе релапсо-ремитентној природи МС-е, односно јављању симптома током периода активне инфламације (релапси) и побољшању/стабилизовању симптома током фазе ремисије [6].

### 1.3 Имунопатогенеза мултипле склерозе

Прекомерни имунски одговор резултује активацијом инфламаторне каскаде која последично доводи до хроничне инфламације у ЦНС-у која је карактеристична за многе неуролошке болести. У процесима инфламације у МС-и учествују ћелије урођеног и адаптивног имунског одговора [8, 14] (слика 1). Један од основних патофизиолошких механизма МС-е посредован је аутореактивним Т-ћелијама које препознају различите компоненте мијелинског омотача. Ове компоненте укључују МБП, МОГ и ПЛП [2]. У неуроинфламаторним процесима такође учествују и остале ћелије имунског система [14].

Код пацијената са МС-ом, детектоване су промене у броју и функцији различитих ћелија имунског система укључујући: Т помоћничке ћелије (енгл. *T helper cells, Th*), Т цитотоксичне ћелије (енгл. *T cytotoxic cells, Tc*), Т регулаторне ћелије, урођено-убилачке Т-ћелије (енгл. *Natural killer T cells, NKT*),  $\gamma\delta$  Т-ћелије, инваријантни тип Т-ћелија мукозе, Б-ћелије, макрофаге и микроглију, дендритске ћелије и супресорне ћелије мијелоидног порекла (енгл. *Myeloid-derived suppressor cells, MDSC*) [1, 14]. Нарушена имунска хомеостаза доводи до индукције процеса демиелинизације, оштећења аксона и формирања лезија у разним деловима ЦНС-а, што резултира неуродегенерацијом [14].



Слика 1. Имунопатогенеза у мултиплој склерози.

Координисана интеракција имунских ћелија и одговарајућих цитокина у стању нарушене равнотеже између про- и анти-инфламаторног имунског одговора. Т помоћничке ћелије (енгл. *T helper cells*, **Th**), Т цитотоксичне ћелије (енгл. *T cytotoxic cells*, **Tc**), регулаторне Т ћелије (енгл. *T regulatory cells*, **Treg**), урођено-убилачке Т-ћелије (енгл. *Natural killer T cells*, **NKT**), инваријантни тип Т-ћелија мукозе (енгл. *Mucosal-associated Invariant T cells*, **MAIT**), дендритске ћелије (Дћ), инваријантни тип NKT ћелија (енгл. *Invariant natural killer T cells*, **iNKT**), варијантни тип NKT ћелија (енгл. *Variant natural killer T cells*, **vNKT**), макрофаги тип 1 и 2 (**M1** и **M2**). Преузето и модификовано из [14].

### 1.3.1 Т помоћничке ћелије

Наивне  $CD4^+$  (енгл. *Cluster of Differentiation*, CD) Т-ћелије препознају пептиде презентоване у оквиру *MHC II* (енгл. *The major histocompatibility complex*, MHC) молекула на површини антиген презентујућих ћелија (АПћ). На основу одговарајућег сигнала, ове ћелије се диференцирају у различите подтипове *Th* ћелија, међу којима су најзначајније *Th1* и *Th17*, које имају про-инфламаторну улогу и *Th2* ћелије које имају анти-инфламаторну функцију. Према досадашњим истраживањима сматра се да Т-ћелије играју централну улогу у процесима патогенезе МС-е [15]. *Th1* ћелије и њихови про-инфламаторни цитокини су присутни у високим нивоима у лезијама ЦНС-а код пацијената, као и у животињском моделу мултипле склерозе (експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису, ЕАЕ) код мишева или пацова [14]. Међутим,

недавно је показано да цитокини које продукују *Th1* ћелије, као што је *IL-12*, имају неуропротективну улогу и могу да смање неуроинфламацију у ЦНС-у код пацијената са МС-ом, као и у ЕАЕ моделу [16]. Досадашњи терапијски модели се базирају на инхибицији *Th1* имунског одговора и преусмеравању ка анти-инфламаторном *Th2* имунском одговору, путем модулације продукције цитокина као што су *IL-4* (енгл. *Interleukin, IL*), *IFN- $\gamma$*  (енгл. *Interferon, IFN*) и *IL-17* [14]. Поред тога, показано је да *Th17* ћелије такође играју важну улогу у патогенези МС-е [17]. Ове ћелије пролазе кроз КМБ-у у ЦНС-у, где продукују про-инфламаторне цитокине, укључујући и *IL-17A*, за који је показано да има неповољан утицај на процесе ремиелинизације [17]. Високи нивои цитокина *IL-17A* присутни су у лезијама ЦНС-а, као и ЦСТ-и и серуму пацијената [17]. Примена моноклонских антитела усмерених против *IL-17A* показала је смањење лезија код пацијената са МС-ом у поређењу са пацијентима који нису примали ову терапију [17]. Поред тога, цитокин *IL-27* такође има значајну улогу у функцији *Th1* помоћничких ћелија. Наиме, цитокин *IL-27* има улогу у промовисању *Th1* имунског одговора, што може допринети инфламаторним процесима у МС-и. Код 40% пацијената са РРМС-ом показано је да ниво *IL-27* у плазми значајно већи него код здравих особа [18]. Међутим, познато је да *IL-27* може промовисати и диференцијацију Т1 регулаторних Т-ћелија, што указује на двојну улогу овог цитокина [19]. Недавне студије су показале и присуство *Th9* ћелија (субпопулације *Th* ћелија) у лезијама ЦНС-а пацијената са МС-ом. Иако њихова улога у МС-и није потпуно разјашњена, код мишева је показано да *IL-9* и *Th9* ћелије доприносе инфламацији и индукцији ЕАЕ-а, док је код *IL-9 knock-out* мишева развој ЕАЕ-а био инхибиран [20]. Такође, истакнут је и значај *Th22* субпопулације *Th* ћелија које специфично препознају МБП и које су присутне у периферној крви и ЦСТ-и пацијената са активном РРМС-ом [21].

### 1.3.2 CD8 цитотоксичне Т-ћелије

Цитотоксичне Т-ћелије препознају пептиде у оквиру МНС I молекула, а такође елиминишу и ћелије које су инфициране вирусом, као и туморске ћелије. Иако њихова улога у патогенези МС-е није сасвим јасна, показано је да *CD8+* ћелије изоловане из ЦСТ пацијената са МС, специфично препознају МБП, МОГ, и ПЛП [22]. Иако се углавном сматра да у патогенези МС-е највећи допринос имају *CD4+* Т ефекторске ћелије, скорија истраживања указују и на важну улогу *CD8+* Т-ћелија. Наиме, показано је да *CD8+* Т-ћелије представљају примарну популацију Т-ћелија која је заступљена у лезијама у ЦНС-у код пацијената са МС-ом [15]. Висок ниво активираних *CD8+* Т-

ћелија и цитокина *IL-17* детектован је у оквиру лезија у ЦНС-у током акутне и хроничне фазе болести. У периферној крви пацијената са СПМС и РРМС детектован је повећан број *CD8+* Т-ћелија које продукују *IL-1* и *IL-17*, док је број *CD8+* Т-ћелија које продукују *IL-21* био повећан у фази ремисије РРМС, у поређењу са СПМС [14, 22].

### 1.3.3 Урођено-убилачке Т-ћелије

Урођено-убилачке Т-ћелије поседују карактеристике Т и *NK* ћелија и деле се у два типа: тип I, инваријантни тип *NKT* (енгл. *Invariant natural killer T cells, iNKT*) и тип II, варијантни тип *NKT* (енгл. *Variant natural killer T cells, vNKT*) [14]. У недавним истраживањима, показано је да су дефицијенција или губитак функције *iNKT* ћелија уско повезани са развојем аутоимунских обољења, укључујући и МС-у [23]. Наиме, код пацијената са МС-ом примећен је смањен број *iNKT* ћелија, док је у фази ремисије детектован повећан број ових ћелија [23]. Поред тога, *vNKT* ћелије могу да препознају гликолипиде који су присутни у мијелинском омотачу. Управо због тога се сматра да *vNKT* имају потенцијалну улогу у патогенези МС-и [24]. Насупрот томе, *iNKT* ћелије имају имунорегулаторну улогу у МС-и, путем ослобађања цитокина који подстичу диференцијацију наивних *CD4+* Т-ћелија у *Th2* ћелије, које имају анти-инфламаторну функцију [25]. Активиране *iNKT* ћелије ослобађају цитокине као што су *IL-4* и *IL-13* који стимулишу диференцијацију наивних *CD4+* Т-ћелија ка анти-инфламаторном типу, *Th2* ћелијама (које продукују *IL-10* и *IL-4*). Поред тога, *iNKT* ћелије ослобађају и *IL-2* и фактор трансформације раста (енгл. *Transforming growth factor beta, TGF-β*) који стимулишу продукцију регулаторних Т-ћелија [14]. Посредством ових продукованих цитокина, *iNKT* мењају равнотежу између про-инфламаторног (*Th17*, *Th1* и *CD8+* Т ћелијски одговор) и анти-инфламаторног имунског одговора (*Th2* и регулаторне Т-ћелије) у корист анти-инфламаторног, па имају важну улогу и у регулацији имунског одговора у ЦНС-у [3].

### 1.3.4 $\gamma\delta$ Т-ћелије

Популација  $\gamma\delta$  Т-ћелија обухвата 2-5% Т-ћелија у секундарним лимфним органима и периферној крви, док чини чак 50% интраепителних Т лимфоцита у цревима. Ову популацију Т-ћелија одликује мултифункционалност, јер продукују широк спектар цитокина, укључујући *IL-17A*, *IL-17F*, *IFN-γ*, *IL-22*, *IL-21*, *GM-CSF* (енгл. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF*) и *TNF-α* (енгл. *Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF-α*). Утврђено је да ове ћелије могу да секретују *IL-17* и *IL-21*

у одговору на *IL-1 $\beta$*  или *IL-18*, као и *IL-23* без ангажовања Т ћелијског рецептора. Такође,  $\gamma\delta$  Т-ћелије могу да продукују *IFN- $\gamma$*  у одговору на цитокине *IL-1 $\beta$*  и *IL-12* [26]. Захваљујући способности да брзо одговоре на стимулус, ове ћелије учествују у раним фазама инфламације код инфекција и аутоимунских болести, укључујући и ЕАЕ. Студије су утврдиле присуство инфилтрата  $\gamma\delta$  Т-ћелија које продукују *IL-17* у ЦНС-у у ЕАЕ-у, и на тај начин индиректно утичу на функцију олигодендрицита и демиелинизацију аксона тако што промовишу индукцију *Th17* ћелија, појачавају њихову ефекторску функцију и инфилтрацију у ЦНС. Анализа дистрибуције ових ћелија у моделу ЕАЕ-а, показала је да се њихова заступљеност знатно повећава током почетне фазе болести, док се њихов ниво смањује током фазе опоравка [26]. Такође, код пацијената са МС-ом, ове ћелије су детектоване у акутним лезијама у ЦНС-у као и у ЦСТ-и пацијената, указујући на значај функције  $\gamma\delta$  Т-ћелија током индукције процеса неуроинфламације у МС-и [27, 28].

### 1.3.5 Инваријантни тип Т-ћелија мукозе

Инваријантни тип Т-ћелија мукозе (енгл. *Mucosal-associated Invariant T – MAIT cells*.) су субпопулација Т-ћелија које играју кључну улогу у одбрани организма од инфекција. Активацијом *MAIT* ћелија долази до продукције про-инфламаторних цитокина који су карактеристични за *Th1* имунски одговор, као што су *IFN- $\gamma$*  и *TNF- $\alpha$* , али и за активацију *Th17* имунског одговора, што укључује продукцију цитокина *IL-17* и *IL-22* [14]. Неколико студија истакло је потенцијалну улогу ових ћелија у патогенези хроничних инфламаторних болести, укључујући и МС-у [29-31]. У досадашњим студијама код пацијената са МС-ом, примећено је да су *MAIT* ћелије присутне у великом броју на местима демиелинизације и инфламаторним лезијама у белој маси мозга [32]. Међутим, постоје и контрадикторни експериментални подаци који указују на имунорегулаторну функцију *MAIT* ћелија код пацијената са МС-ом, путем инхибиције *Th1* одговора [33].

### 1.3.6 Регулаторне Т-ћелије

Регулаторне Т-ћелије представљају важан анти-инфламаторни подтип Т-ћелија које имају кључну улогу у одржавању имунске толеранције према сопственим антигенима и регулацији имунске хомеостазе. У ЕАЕ-у, животињском моделу МС-е, истраживања су показала да трансфер регулаторних Т-ћелија из контролних мишева у мишеве са симптомима ЕАЕ-а може значајно ублажити клиничке манифестације

болести и спречити њен даљи напредак [34]. Такође, инхибиција активације регулаторних Т-ћелија применом анти-*CD28* моноклонског антитела повећала је подложност за индукцију и прогресију ЕАЕ-а [35]. Иако тачни узроци неадекватне функције регулаторних Т-ћелија нису у потпуности разјашњени, различите студије су указале да дисфункција супресивних молекула, попут смањене експресије *CTLA-4* (енгл. *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4*) на регулаторним Т-ћелијама, као и смањена продукција цитокина као што су *IL-10*, *TGF- $\beta$*  и *IL-35* могу допринети патогенези и прогресији болести [14, 35].

### 1.3.7 Б-ћелије

Поред промена у функцији Т-ћелија у патогенези МС-е, такође је детектована и прекомерна активација Б-ћелија и продукција антитела. Б-ћелије су саставни део хуморалног имунског одговора које се након препознавања и обраде антигена диференцирају у ефекторске плазма ћелије које имају способност продукције специфичних антитела. Б-ћелије регулишу процесе инфламације у ЦНС-у на неколико начина. Пре свега, Б-ћелије посредују у овим процесима као АПЋ које продукују про-инфламаторне, али и регулаторне (анти-инфламаторне) цитокине, који контролишу функцију осталих имунских ћелија. Иако их одликује двојна улога – могу и да повећају и да смање интензитет инфламације – про-инфламаторни ефекти ових ћелија су истакнути код пацијената са МС-ом [36, 37]. Доказано је присуство Б-ћелија у ЦНС-у и ЦСТ-и пацијената са МС-ом чији је повећан број био у корелацији са прогресијом болести. Код 95% пацијената показано је присуство олигоклонских трака у ЦСТ-и и паренхиму мозга, које су производ повећаног броја Б-ћелија и синтезе *IgG* (енгл. *Immunoglobulin, Ig*) у лезијама карактеристичним за МС-у [14, 38]. Такође, показано је да Б-ћелије изоловане из крви пацијената са МС-ом, испољавају промене у продукцији про-инфламаторних цитокина као што су *IL-6* и *TNF- $\alpha$* , у поређењу са здравим особама [39]. Поред тога, повишени нивои хемокина *CXCL13* (енгл. *Chemokine C-X-C motif ligand, CXCL*) у ЦСТ-и који привлаче Б-ћелије су повезани са инфламацијом у ЦНС-у и локалном производњом *IgG* код пацијената са МС-ом [36, 39]. Показано је да ЦНС код пацијената са МС-ом постаје место акумулације Б-ћелија и продукције антитела што доприноси патогенези МС-е [40], а олигоклонске траке представљају један од показатеља у имуно-дијагностици пацијената са МС-ом.



### 1.3.8 Макрофаги и микроглија

Макрофаги представљају популацију фагоцитних ћелија урођеног имунског система које се на основу фенотипа и цитокинског профила могу поделити у две категорије, M1 и M2. Макрофаги M1 типа продукују про-инфламаторне цитокине и хемокине укључујући *IL-1*, *IL-6*, *IL-12*, *TNF- $\alpha$* , *MCP-1* (енгл. *Monocyte chemoattractant protein-1*, *MCP-1*), као и индуцибилну синтазу азот монооксида (енгл. *Inducible nitric oxide synthase*, *iNOS*), док M2 макрофаги секретују анти-инфламаторне цитокине *IL-4*, *IL-10* и *TGF- $\beta$ 1* [14, 41]. Макрофаги играју кључну улогу у патогенези МС-е и веома су заступљени у лезијама током процеса демиелинизације, као и у раној фази ремиелинизације. Поред тога, у лезијама које се јављају у региону беле масе код пацијената са МС-ом, присутне су ћелије микроглије које представљају популацију резидентних макрофага у мозгу, као једне од главних имунских ефекторских ћелија специјализованих за одржавање и регулацију хомеостазе у ЦНС-у. Ћелије микроглије чине прву линију одбране у ЦНС-у, где обављају бројне функције као што су уклањање ћелијског дебриса фагоцитозом и елиминација патогена, а све у циљу одржавању имунске хомеостазе. Поред тога, ћелије микроглије утичу на развој ЦНС-а као и одржавање хомеостазе кроз блиску интеракцију са другим глијалним ћелијама присутним у ЦНС-у, укључујући и неуронске ћелије, астроците и олигодендроците [41, 42]. На месту инфламације, односно у лезијама у ЦНС-у, у одговору на различите стимулусе, ћелије микроглије продукују про-инфламаторне цитокине као што су *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, као и про-инфламаторне медијаторе, укључујући реактивне облике кисеоника (РОК) и азот-моноксид (NO) [41]. Дисрегулација ових процеса може изазвати хроничну инфламацију у ЦНС-у, што је карактеристика многих неуролошких/неуродегенеративних болести, укључујући и МС-у [3, 43]. Наиме, прекомерно ослобађање про-инфламаторних медијатора услед неконтролисане активације ћелија микроглије доводи до нарушавања КМБ-е, што олакшава инфилтрацију имунских ћелија у ЦНС, укључујући Т-ћелије (*CD4+* и *CD8+*), Б-ћелије, моноците, макрофаге и дендритске ћелије [44]. Све већи број података показује да неуроинфламаторни процеси играју кључну улогу у развоју различитих патологија ЦНС-а [43, 45]. Ови процеси су иницијално изазвани измењеним или неадекватним имунским одговором, посредованим различитим инфилтрираним периферним имунским ћелијама, као и резидентним имунским ћелијама ЦНС-а [3]. С обзиром да су, као што је већ наведено, ћелије микроглије резидентна популација специјализованих

макрофага у ЦНС-у, оне такође као и макрофаги ван ЦНС-а могу бити М1 и М2 типа. У лезијама код пацијената са МС-ом показано је присуство и интермедијарног фенотипа микроглије који експримира *CD40*, *CD74*, *CD86* и *CCL22* [14, 46]. У ЕАЕ-у, анималном моделу МС-е код миша, утврђена је и промена поларизације од М1 ка М2 фенотипу која је неопходна за ефикасну ремијелинизацију и опоравак неурона [14]. Користећи животињски модел МС-е, ЕАЕ, различите студије су показале да је прекомерна активација ћелија микроглије довела до погоршања симптома ЕАЕ-а [8, 47]. С друге стране, због двоструке улоге ћелија микроглије у ЦНС-у и њиховог неуропротективног дејства, такође је назначено да микроглија учествује у процесима ремијелинизације и неурогенезе, што доводи до смањења клиничких манифестација и смањене прогресије ЕАЕ-а [14, 41]. Ови налази сугеришу да модулација активације микроглије може утицати на ток болести и довести до брже неурорегенерације и опоравка.

### 1.3.9 Дендритске ћелије

Због способности дендритских ћелија да активирају наивне Т-ћелије, оне играју важну улогу у патофизиологији МС-е [14, 48]. Ове ћелије су професионалне АПЋ чија је улога обрада и презентовање пептидних епитопа у комплексу са молекулима МНС I или МНС II на површини ћелија, што уз одговарајућу костимулацију доводи до активације ауто-реактивних *CD4+* или *CD8+* Т-ћелија специфичних за епитопе мијелина. Након активације ауто-реактивних *CD4+* или *CD8+* Т-ћелија и продукције про-инфламаторних цитокина, Т-ћелије пролазе кроз КМБ-у у ЦНС, где се даље активирају и доводе до демиелинизације и оштећења неурона. Код пацијената са МС-ом, показана је висока заступљеност дендритских ћелија у лезијама, ЦСТ-и и циркулацији, као и високи нивои про-инфламаторних цитокина укључујући *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$*  и *IL-6* [14]. Поред тога, код пацијената у РРМС и СПМС фази показана је и повећана експресија костимулаторних молекула (*CD40* и *CD80*) на дендритским ћелијама, што указује на њихову улогу у неуроинфламацији и патогенези МС-е [14].

### 1.3.10 Супресорске ћелије мијелоидног порекла

Супресорске ћелије мијелоидног (енгл. *Myeloid-derived suppressor cells, MDSC*) порекла потичу из исте линије као и макрофаги, дендритске ћелије и неутрофили. Међутим, за разлику од макрофага, дендритских ћелија и неутрофила, *MDSC* испољавају имуно-супресорске карактеристике и играју важну улогу у развоју тумора

и хроничној инфламацији [14]. Имуно-супресивни одговор ових ћелија заснива се на њиховој способности да секретују одређене инхибиторне ензиме (као што су индоламин 2,3-диоксигеназа, аргиназа-1 и индуцибилна азот-оксид синтаза) као и анти-инфламаторни цитокин *IL-10* [49]. На овај начин, *MDSC* промовишу анти-инфламаторни *Th2* ћелијски одговор. У једном истраживању, *MDSC* су изоловане из кичмене мождине мишева са ЕАЕ-ом и ко-култивисане су са Т ћелијама слезине стимулираним анти-*CD3/CD28* антителима. *MDSC* су индуковале апоптозу активираних Т-ћелија и спречиле развој клиничких симптома, што указује на важну улогу *MDSC* у контроли инфламаторних одговора, као и њихову потенцијалну примену у терапији пацијената са МС-ом [50]. Поред тога, постоје и контрадикторна запажања где је показано да *MDSC* могу промовисати и *Th17* имунски одговор и допринети развоју ЕАЕ-а [51]. Ове студије указују на двоструку улогу *MDSC* која зависи од типа *MDSC*, као и од фазе болести. Одржавање равнотеже између про- и анти-инфламаторног имунског одговора је од круцијалне важности за успостављање хомеостазе у ЦНС-у. Иако још увек није сасвим јасно да ли је код пацијената са МС-ом способност *MDSC* да инхибирају активацију аутореактивних Т-ћелија нарушена смањеним бројем или измењеном функцијом, испитивање утицаја ових ћелија на активацију анти-инфламаторног одговора могла би бити једна од стратегија за развој нових терапеутика за третман МС [14].

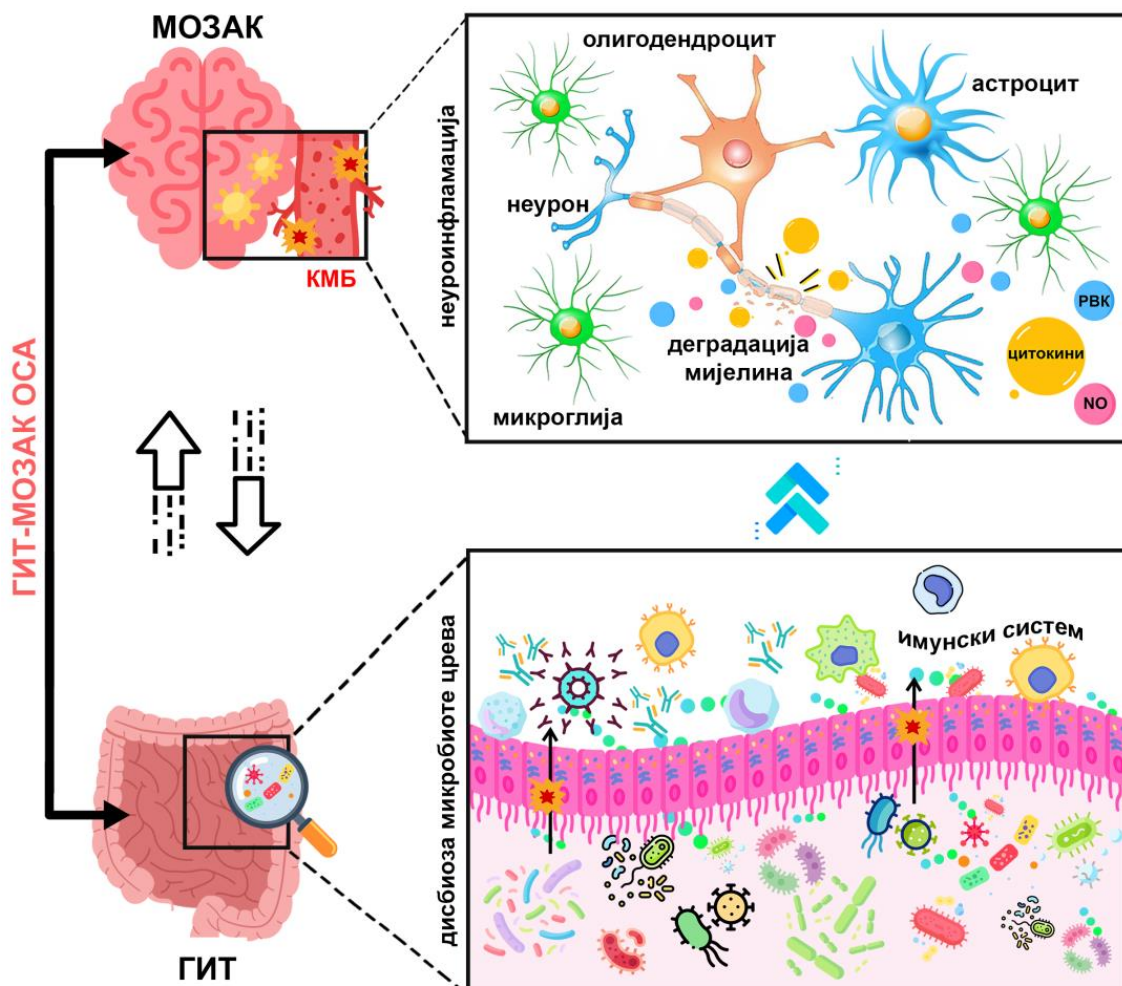
#### **1.4 Значај микробиоте црева у мултиплој склерози**

Гастроинтестинални тракт (ГИТ) људи колонизује до  $10^{14}$  ћелија различитих микроорганизама, укључујући бактерије, археје, протозое, гљивице и вирусе. У условима хомеостазе, ови микроорганизми доприносе одржавању покретљивости и пермеабилности црева; спречавају колонизацију црева патогенима; учествују у производњи витамина (витамини Бе и К групе); промовишу функције епитела црева, као што су апсорпција и секреција и утичу на правилно сазревање имунских ћелија и одржавање имунске хомеостазе [52-54]. Микробиота црева представља кључни фактор у активацији и регулацији функција урођеног и адаптивног имунског одговора. Неколико ћелијских типова урођеног имунског система које учествују у презентацији антигена реагују на микробне стимулусе повећањем производње специфичних цитокина и хемокина. Ови ћелијски типови укључују: (1) дендритске ћелије и макрофаге који чине прву линију одбране и учествују у модулацији адаптивног

имунског одговора (продукција *pro-IL-1β*); (2) *MAIT* ћелије које се налазе у мукозном ткиву, и продукују различите про-инфламаторне цитокине, као што су *IL-17*, *IFN-γ*, *TNF-α*, као и гранзим Б; (3) *NK* ћелије које продукују цитокине (*IL-4*, *IL-13* и *IFN-γ*) и промовишу продукцију хемокина *CXCL16* од стране епителних ћелија [54]. Урођени имунски одговор у цревима је кључан за одржавање епителне баријере, препознавање и толеранцију коменсалних микроорганизама, пружање брзе и неспецифичне одбране, као и регулисање инфламације [55]. Микробиота црева такође учествује и у модулацији адаптивног имунског одговора. Истраживања су показала да микробиота црева може да модулише имунски одговор домаћина мењајући равнотежу између про-инфламаторног (*Th1* и *Th17*) и анти-инфламаторног типа Т-ћелија (*Th2* и регулаторне Т-ћелије). Т помоћничке *Th17* ћелије су веома заступљене у цревима, где продукују цитокине као што су *IL-17A*, *IL-17F* и *IL-22* који учествују у процесима инфламације. Такође, показано је да је заступљеност регулаторних Т-ћелија много већа у ГИТ-у у односу на остала ткива. Важну улогу у одбрани од патогена у ГИТ-у имају и Б-ћелије, захваљујући продукцији *IgA* [54].

Састав „нормалне“ микробиоте још увек није дефинисан због сложености овог екосистема. Ипак, поређењем састава микробиоте пацијената и здравих утврђено је да постоје разлике, а састав микробиоте који је повезан са болешћу се назива дизбиозом. Микробиота у дизбиози директно модулишу имунски одговор и стога фундаментално доприноси развоју различитих инфламаторних болести [56]. Оно што је најважније, показано је да метаболити микробиоте црева утичу и на пермеабилност КМБ-е и самим тим на хомеостазу у ЦНС-у (слика 2) [57, 58]. Дибиоза може да индукује инфламацију у цревима, која се карактерише променама у имунској баријери у *lamina propria*-и и лимфном ткиву асоцираном са мукозом (енгл. *Gut-associated lymphoid tissue, GALT*). Један од значајних фактора имунске активације пореклом из микробиоте је липополисахарид (ЛПС) који је градивна компонента ћелијског зида грам (-) бактерија, и који је одговоран за про-инфламаторну активацију у мукози црева. Даља транслокација ЛПС-а и других бактеријских компоненти, као и целих бактерија у дубље слојеве зида црева и локалне секундарне лимфне органе, индукује диференцијацију и активацију циркулишућих Т-ћелија. Ове системске промене такође компромитују и интегритет КМБ-е и на тај начин омогућавају про-инфламаторним медијаторима да прођу кроз КМБ-у и уђу у ЦНС, где даље утичу на активацију

глијалних ћелија, као што су микроглија и астроцити, и на тај начин промовишу неуроинфламацију у ЦНС-у [54].



Слика 2. Оса мозак – гастроинтестинални тракт.

Утицај дисбиозе у цревима на функцију имунског система и процесе неуроинфламације у мозгу. ГИТ (гастроинтестинални тракт); КМБ (крвно-моздана баријера).

Бројне студије су показале да дисбиоза у цревима игра значајну улогу у различитим неуроинфламаторним болестима укључујући и МС-у, што је показано и у животињском моделу ЕАЕ-у [59]. Наиме, показано је да „*germfree*“ мишеви (мишеви гајени у контролисаним условима, у одсуству микроорганизама) нису развили тежак облик ЕАЕ-а, што указује на значај микробиоте у процесима индукције и прогресије болести [60]. Такође, код *germfree* животињских модела примећен је и нижи ниво про-инфламаторних цитокина *IFN- $\gamma$*  и *IL-17A* у цревима и у кичменој моздини, као и

повећање у броју  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  регулаторних Т-ћелија [61]. Значај микробиоте црева у имунском одговору додатно је потврђен на моделу ЕАЕ који се индукује адоптивним трансфером енцефалитогених Т-ћелија, где је показано да ове ћелије мигрирају у дебело црево и доводе до развоја ЕАЕ симптома [62]. Сматра се да се утицајем на биодиверзитет микробиоте црева може допринети ефикаснијој контроли имунопатолошких процеса у МС-и [63]. Студије на животињским моделима показале су да промена у саставу микробиоте црева може значајно модулисати процесе демиелинизације посредоване неадекватним имунским одговором [59]. Такође, занимљиво је да је показано да модулација болести функционише и на нивоу *GALT*-а и да је имунски систем црева кључан у регулацију ЕАЕ-а. У једној студији, показано је да *MDSC*, диференциране у присуству простагландина (*PGE2*), мигрирају у делове имунског система придружених цревима (Пејерове плоче и мезентеричне лимфне чворове) и утичу на смањење промена у саставу микробиоте црева изазваних индукцијом ЕАЕ-а [64]. Промене у саставу микробиоте црева доводе и до поремећаја у продукцији различитих метаболита који имају кључну улогу у регулацији имунског одговора у цревима, укључујући кратколанчане масне киселине, секундарне жучне киселине, незасићене масне киселине и метаболите триптофана [60, 65]. Наиме, показало се да кратколанчане масне киселине као што су пропионат и бутират, играју важну улогу у регулацији про- и анти-инфламаторног имунског одговора. Њихова имуномодулаторна функција огледа се у способности да утичу на диференцијацију наивних  $CD4^+$  Т-ћелија у регулаторне Т-ћелије и стога директно утичу на однос између *Th1*, *Th17* и регулаторних Т-ћелија који представља кључни елемент код имунски посредованих болести, као што је МС [60, 61]. Неки од метаболита као што су *p*-крезол сулфат, индоксил сулфат и *N*-фенилацетилглутамин (метаболити триптофана и фенилаланина) означени су као неуротоксични медијатори који посредују у комуникацији између црева и мозга код оболелих од МС-е [66]. Промене у продукцији ових молекула могу довести до поремећаја у регулацији имунског одговора и знатно утицати на процесе патогенезе у МС-и. У случају МС-е, прогресији болести може допринети смањен број или неадекватна функција регулаторних Т-ћелија [61]. Разумевање утицаја микробиоте црева на функцију Т-ћелија и имунопатогенезу у МС-и је од великог значаја јер инфилтрација *Th1* и *Th17*  $CD4^+$  Т-ћелија у ЦНС-у представља једну од главних карактеристика МС-е [65, 67].

## 1.5 Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис

Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис представља један од најчешће коришћених животињских модела МС-е, који се карактерише клиничким и патолошким процесима специфичним за МС-у, као што су демиелинизација и инфилтрација различитих имунских ћелија у ЦНС [68, 69]. Модел ЕАЕ-а се може се успоставити на два начина. Први начин представља активну имунизацију протеином пореклом из мијелина (као што је МБП, МОГ или ПЛП) у комбинацији са адјувансом – бактеријском компонентом која промовише активацију урођеног имунског одговора [70]. Молекулски обрасци повезани са патогеном (енгл. *Pathogen associated molecular patterns, PAMPs*) пореклом од микробних компоненти (нпр. *Mycobacterium tuberculosis* инактивирана топлотом) активирају сигналне путеве урођеног имунског одговора, као и Т-ћелија, нарушавајући имунску толеранцу и на тај начин покрећу аутоимунски одговор у ЦНС-у. Други начин за индукцију ЕАЕ је пасивни пренос активираних  $CD4^+$  Т лимфоцита специфичних за мијелин. У зависности од протокола имунизације и соја мишева/пацова који се користе, ЕАЕ може попримити акутни, прогресивни хронични или релапсно-ремитентни ток болести [68]. ЕАЕ је добро установљен модел који се у великој мери примењује у преклиничким истраживањима намењеним истраживању МС-е. Захваљујући ЕАЕ моделу, развијени су терапеутици за лечење МС-е као што су глатирамер ацетат и *Natalizumab* [71]. Иако је неколико тестираних третмана успешно преведено са ЕАЕ модела на пацијенте са МС-ом, постоје и многа ограничења овог модела. На пример, примена *IFN- $\gamma$*  и *TNF- $\alpha$*  је смањила/спречила клиничке манифестације и прогресију болести у ЕАЕ моделу, али је довела до погоршања МС код пацијената [71]. Наиме, услед комплексног тока болести, као и широког спектра симптома и клиничких манифестација, разлике између ЕАЕ као животињског модела МС-е и пацијента са МС-ом постоје на више нивоа: (1) разлике у урођеном и адаптивном имунском одговору услед еволуционе удаљености између глодара и човека; (2) разлике у сојевима – ЕАЕ модели глодара обухватају ограничен број генетички хомогених сојева мишева или пацова, који се узгајају у специфичним условима и у одсуству патогена (енгл. *specified pathogen free, SPF*) који омогућавају контролу утицаја животне средине; (3) имунски систем таквих сојева није изложен факторима животне средине који утичу и обликују имунски систем човека; (4) МС се код људи развија спонтано, док ЕАЕ индукција подразумева вештачку процедуру, примену аутоантигена у комбинацији са одговарајућим бактеријским адјувансима [69].

Имунопаталогске механизме у класичном моделу ЕАЕ карактерише присуство *Th1* ћелија које производе *IFN-γ* и *Th17* ћелије које производе *IL-17A* [69]. ЕАЕ код глодара који је индукован инјектовањем емулзије мијелинског антигена у комплетном Фројндовом адјувансу доводи до развоја различитих карактеристика специфичних за МС. У овом моделу, *Th1* и *Th17* ћелије које су активирани на периферији, се транслоцирају у ЦНС, што је праћено пермеабилитетом КМБ-е. По уласку у ЦНС услед нарушене КМБ-е, Т-ћелије се реактивирају локалним и инфилтрираним активираним АПЋ, што резултира активацијом инфламаторне каскаде и на крају демиелинизацијом и оштећењима аксона, односно неуродегенерацијом [71]. Поред тога, постоје јасне разлике у саставу Т ћелијских инфилтратата у лезијама код ЕАЕ животиња у односу на пацијенте са МС-ом. У моделу ЕАЕ-а доминантне су *CD4+* Т-ћелије, док су за лезије код пацијената са МС-ом карактеристичне *CD8+* Т-ћелије [69].

## 1.6 Терапијски приступи у третману мултипле склерозе

Тренутне терапије за МС-у подразумевају дугорочну употребу лекова (као што су кортикостероиди и адреналокортикотропни хормони) који дугорочно могу довести до супримирања функције имунског система, што доводи до повећаног ризика од различитих инфекција, али и појаве тумора [72]. Алтернативни приступи лечења МС-е заснивају се на терапијама које ефикасно модулишу имунски одговор – спречавају неадекватну активацију различитих ћелија имунског система и индукују толеранцу на сопствене антигене. Примена оваквих терапијских модалитета може довести до поновног успостављања имунске хомеостазе и самим тим ублажити/спречити прогресију болести. На тај начин, могуће је обезбедити дугорочну неуропротекцију, а не само краткорочно побољшање симптома. До данас, Америчка управа за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration, FDA*) је одобрила неколико терапеутика за третман РРМС-е, за које је показано да повољно утичу на смањење лезија и оштећења неурона карактеристичних у МС [73]. Ефикасно дејство овако дизајнираних лекова заснива се на њиховом утицају на одговарајуће молекуле и ћелије имунског система који учествују у прогресији болести. Ови лекови укључују: *Alemtuzumab* (смањује број лимфоцита), *Daclizumab* (блокира рецептор за *IL-2*), *Dimethylfumarat* (комбинује карактеристике имуномодулаторног и имunosупресивног деловања), *Fingolimod* (модулише систем рецептора за сфингозин), *Natalizumab*

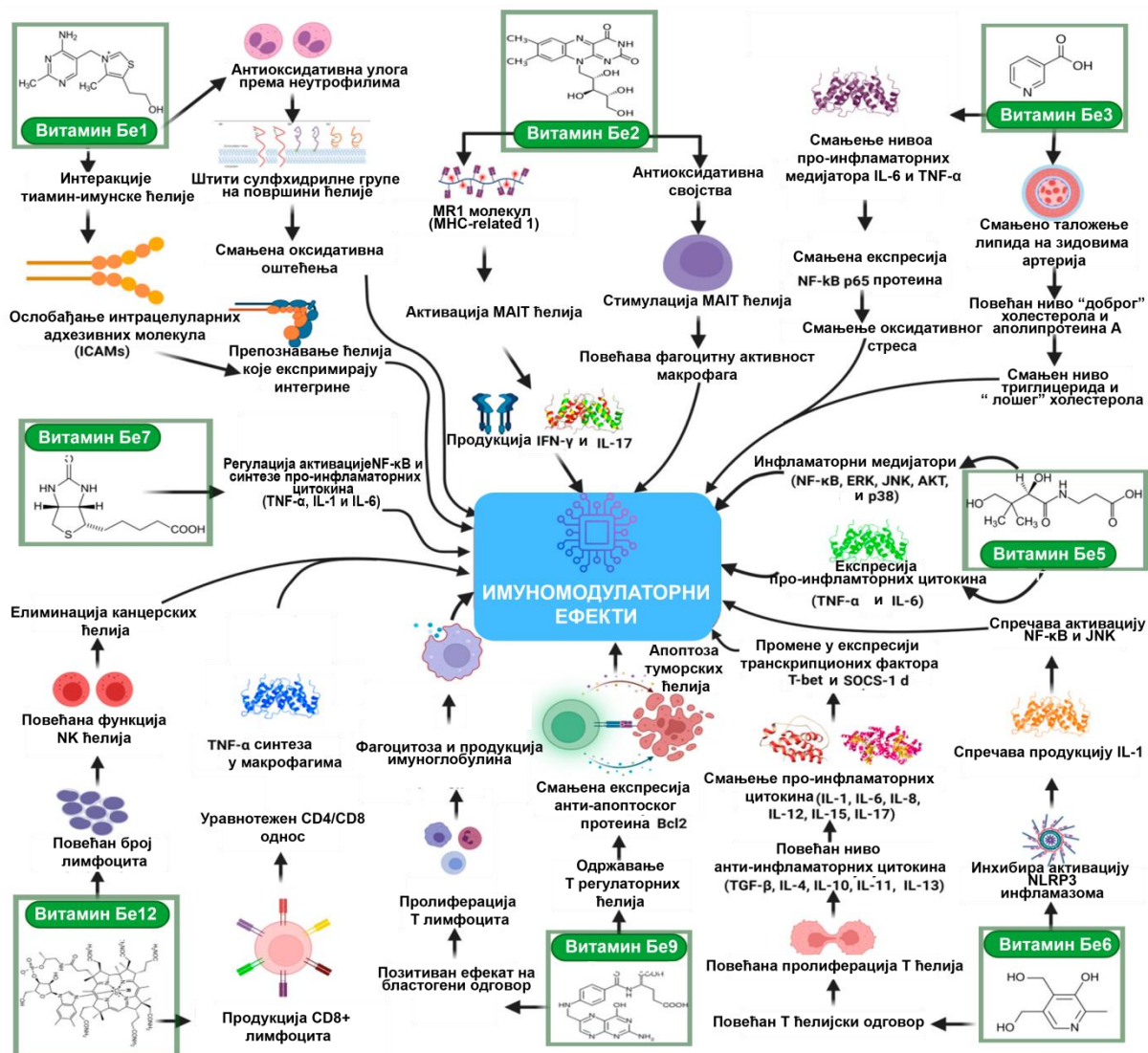


(антагонист  $\alpha 4$ -интегрин, инхибира миграцију, раст и преживљавање ћелија) и *Teriflunomid* (инхибира активирани Т и В-ћелије). Такође, као имуномодулаторни агенс користи се и *IFN- $\beta$*  који одржава равнотежу у експресији про- и анти-инфламаторних цитокина у мозгу и смањује број инфламаторних ћелија које пролазе КМБ-у. Поред тога, показано је да *IFN- $\beta$*  утиче и на смањење популације *Th17* ћелија и цитокина *IL-17* за које је познато да су укључени у патогенезу МС-е. Имуномодулаторни агенси који се користе у терапији МС-е су и *кополимер глатирамер ацетат* (инхибира везивање МБП-а за *MHC II* молекуле на површини АПЋ), *азатиоприн* и *циклофосфамид* (инхибирају ДНК синтезу). Иако је главна улога имуномодулаторних лекова промоција анти-инфламаторног имунског одговора у фази релапса МС-е, демјелинизација која доводи до хроничног оштећења неурона и даље остаје нерешен проблем у МС-и [73, 74]. Важно је напоменути да су услед веома комплексних и различитих клиничких манифестација и тока МС-е, и сами терапијски приступи комплексни и разноврсни, а развој нових терапија и даље је предмет истраживања.

## 1.7 Бе витамини као имуномодулатори

Имуномодулатори представљају биолошка или синтетичка једињења која могу да стимулишу, инхибирају или регулишу различите компоненте имунског система. Према дејству, могу се класификовати у две главне категорије: имуностимулаторна и имуносупресивна средства. Имуномодулатори се примењују у терапији многих имунских поремећаја, укључујући аутоимунска и неуролошка обољења. Ови лекови се обично примењују у комбинацији са другим стандардним лековима и тако доприносе ефикаснијој контроли функције имунског система [75]. Захваљујући својим многобројним функцијама и учешћем у интеракцији са различитим компонентама имунског система, многи витамини испољавају имуномодулаторне карактеристике. Витамини су есенцијални микронутријенти који играју кључну улогу у многим физиолошким и биохемијским реакцијама. То су хемијски хетерогена група једињења које човек не синтетише а који су неопходни за нормално одвијање метаболичких процеса човека. Они имају веома различите функције, делују као коензими и кофактори у бројним процесима, укључујући енергетски метаболизам, антиоксидативну заштиту, неуролошке функције и имунски одговор [76]. Витамини групе Бе припадају групи витамина растворљивих у води који су од суштинског значаја у процесима добијања енергије и учествују у метаболизму угљених хидрата,

протеина и липида као коензими у регулацији многих ензимских реакција. Увелико је познато да витамини групе Бе повољно утичу на процесе неурорегенерације, а данас је све више студија чији је предмет истраживања веза између недостатка витамина Бе и развоја различитих неуродегенеративних стања, укључујући и МС-у. Такође, показано је да микробиота црева продукује и користи витамине Бе комплекса као кофакторе у бројним метаболичким путевима, што их чини једним од важних чинилаца у регулисању хомеостазе микробиоте црева. Услед тога, измењен метаболизам витамина Бе може бити повезан и са дизбиозом, узрокујући поремећај имунске хомеостазе и последичну колонизацију црева патогеним сојевима, који директно утичу на регулацију имунског одговора у цревима [76, 77]. Оно што је најважније, витамини групе Бе представљају моћне модулаторе имунског одговора и фундаментални су у одржавању правилног развоја и функционисања нервног система [75]. Као што је приказано на слици 3, Бе витамини испољавају многе имуномодулаторне функције, што их чини важним чиниоцима у регулацији имунског одговора и одржавању имунске хомеостазе.



Слика 3. Имуномодулаторна функција витамина групе Бе.

Преузето и модификовано из [75].

**Витамин Бе1** (тиамин) има улогу кофактора за неколико ензима и неопходан је за синтезу нуклеинских киселина, масних киселина, стероида и ароматичних аминокиселина. Такође, витамин Бе1 има значајну улогу у енергетском метаболизму и функцији имунских ћелија [75]. Тиамин испољава анти-оксидативна дејства и на тај начин инхибира активацију нуклеарног фактора κВ (енгл. *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, *NF-κB*) посредовану оксидативним стресом и последично инхибира продукцију про-инфламаторних цитокина у макрофагима. Захваљујући својим анти-оксидативним карактеристикама, тиамин такође штити сулфхидрилне групе мембранских протеина који се налазе на неутрофилима од

оксидативног оштећења. Показано је и да, посредством интеракција са имунским ћелијама, витамин Б<sub>1</sub> учествује у ослобађању интрацелуларног адхезивног молекула 1 (енгл. *Intercellular adhesion molecules, ICAM*) и на тај начин учествује у регулисању миграције имунских ћелија [75, 77, 78]. Поред тога, витамин Б<sub>1</sub> је неопходан наивним Б-ћелијама у Пејеровим плочама за настанак аденозин-трифосфата и диференцијацију у плазма ћелије које производе имуноглоблин *IgA*, који представља кључни фактор у одржавању хомеостазе имунског система у цревима [79, 80]. Недостатак тиаминa је повезан и са процесима неуроинфламације, инфилтрацијом Т-ћелија и прекомерном експресијом про-инфламаторних цитокина (*IL-1*, *IL-6* и *TNF-α*). Поред тога, показано је да дефицијенција тиаминa повећава експресију *CD40* и *CD40L* од стране микроглије и астроцита, изазивајући апоптозу неурона [81]. Такође, утврђено је да бенфотиамин (синтетички тиамин) значајно смањује инфламаторни одговор *BV2* ћелија микроглије активираних ЛПС-ом. Бенфотиамин је у *BV2* ћелијама активираним ЛПС-ом смањивао експресију про-инфламаторних медијатора укључујући *NO*, циклооксигеназу-2 (енгл. *Cyclooxygenase-2, COX-2*), протеин топлотног шока 70 (енгл. *Heat shock protein 70*), *IL-6* и *TNF-α*, док је повећао продукцију анти-инфламаторног цитокина *IL-10* [75, 82]. Прелиминарни налази указују на потенцијалну везу између дефицијенције тиаминa и осећаја хроничног умора као једног од симптома који је изражен код пацијената са МС-ом. Наиме, у једној пилот студији, код 15 испитаника са МС-ом у фази ремисије, примена високих доза тиаминa (600 – 1500 mg/дан) довела је до регресије умора. Упркос високој дози коришћеног тиаминa (препоручени дневни унос је 1,2 mg), нису пријављени нежељени ефекти [83]. Недостатак тиаминa доводи до измењеног оксидативног метаболизма, што изазива низ симптома који су такође карактеристични и за МС-у, као што су исцрпљеност/умор, повећање оксидативног стреса, лактатна ацидоза, дисфункција астроцита, нарушавање КМБ-е, смањење нивоа глукозе у ћелијама и хронична инфламација [84]. У мишијем моделу МС-е, ЕАЕ-у, тежина клиничке слике је била погоршана код тиамин-дефицијентних мишева, у поређењу са контролним мишевима. Код мишева са дефицијенцијом тиаминa утврђене су патолошке промене у кичменој мождини, активација микроглије, повећана инфилтрација *Th1* и *Th17* ћелија, као и повећана експресија хемокина *CCL2* и његовог рецептора у кичменој мождини [85, 86]. Одређене врсте бактерија у цревима човека као што су *Bacteroides fragilis*, *Prevotella copri*, *Clostridium difficile*, *Lactobacillus* spp., *Ruminococcus lactaris* и *Bifidobacterium* spp. могу да продукују витамин Б<sub>1</sub> у облику

слободног тиамина и у облику тиамин пирофосфата који су кључни за стварање енергије у цревима [79, 87].

**Витамин Бе2** (рибофлавин) и његови деривати флавин аденин динуклеотид и флавин мононуклеотид служе као кофактори у различитим ензимским процесима укљученим у метаболизам угљених хидрата, липида и протеина [88]. Он учествује и у неутралисању слободних радикала, као што су РОК и одржавање нормалне функције вида, црвених крвних зрнаца, нервног система и формирања мијелина [86]. Такође, рибофлавин ступа и у интеракцију са витаминима Бе6 и Бе9, конвертујући их у њихове активне облике. Поред антиоксидативног дејства, рибофлавин испољава и анти-инфламаторна својства и такође је укључен у регулацију диференцијације имунских ћелија. Показано је да су деривати рибофлавина важни за активацију *МАИТ-ћелија*, које производе про-инфламаторне цитокине попут *IFN-γ* и *IL-17* и учествују у одбрани домаћина од патогена, али су такође повезане са развојем аутоимунских и инфламаторних болести [89]. Показано је да недостатак витамина Бе2 инхибира активност ацил-*CoA* дехидрогеназе (енгл. *Coenzyme A, CoA*) укључене у оксидацију масних киселина, као и стварање ацетил-*CoA* који митохондрије користе за производњу аденозин-трифосфата у Кребсовом циклусу. Како је оксидација масних киселина укључена у активацију, диференцијацију и пролиферацију имунских ћелија стварањем ацетил-*CoA* [90], витамин Бе2 може допринети бољој контроли диференцијације и функције различитих ћелија, па и имунских [75]. Током хроничног стреса који је карактеристичан за МС-у, нивои РОК су знатно повећани што доводи до оксидативног оштећења мембранских липида, протеина, РНК (Рибонуклеинска киселина) и ДНК (Дезоксирибонуклеинска киселина). Ови процеси даље узрокују нарушавање КМБ-е, индукујући неуроинфламацију, демијелинизацију и стварање лезија [86]. Неколико студија је испитало клинички ефекат рибофлавина код пацијената са МС-ом. У једној студији на 197 пацијената са МС-ом, уочена је негативна корелација између вишег уноса рибофлавина и појаве симптома МС-е [91]. Међутим, у једној студији у којој је 29 пацијената са МС-ом примало рибофлавин (10 mg, током 6 месеци) није забележено побољшање ефеката клиничких симптома МС-е, у поређењу са плацебо групом [92]. У другој студији, група од 53 пацијената са РРМС-ом и СПМС-ом у акутној фази, примала је терапију цитофлавина (5 mg рибофлавин мононуклеотида). Око 41,5% пацијената лечених цитофлавином нису имали потребу за кортикостероидима, а такође је уочено и значајно смањење клиничких симптома и

побољшање когнитивне функције код пацијената, у поређењу са групом која није примала овај лек [93, 94]. Поред тога, на ЕАЕ-у животињском моделу, ниво неуротрофичног фактора мозга, кључног фактора за сазревање и заштиту неурона, био је повећан у мозгу и кичменој мождини мишева третираних рибофлавином, а дневни клинички симптоми су били значајно смањени у поређењу са контролним мишевима [94, 95]. Ове студије указују на потенцијално имуномодулаторно дејство рибофлавина, међутим неопходна су даља истраживања како би се детаљно утврдила улога рибофлавина у МС-и. Рибофлавин такође производе неке бактерије микробиоте црева човека, као што су *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. fermentum*, *B. fragilis*, *P. copri*, *C. difficile* и *R. lactaris* могу да производе рибофлавин [79].

**Витамин Бе3** (ниацин/никотинска киселина/никотинамид) је прекурсор никотинамид аденин динуклеотида, коензима који је кључан за низ метаболичких функција, првенствено као редокс кофактор [88]. Такође, ниацин делује као кофактор у конверзији угљених хидрата у глукозу, помаже у производњи масних киселина и холестерола и обезбеђује нормално функционисање нервног система. Дефицијенција витамина Бе3 повезана је са хроничним умором, деменцијом и депресијом [86]. Истраживања су показала да витамин Бе3 испољава и анти-инфламаторна својства. Утврђено је да снижава нивое про-инфламаторних цитокина, укључујући *IL-6*, *IL-1* и *TNF- $\alpha$* , а поред тога, утиче и на диференцијацију регулаторних Т-ћелија, што га чини битним фактором за одржавање имунске хомеостазе [79, 96]. У једној студији, ниацин је смањио нивое *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  и *TNF- $\alpha$*  у ЛПС-ом активираним алвеоларним макрофагима, као и активацију *NF- $\kappa$ B* пута инхибицијом фосфорилације *NF- $\kappa$ B p65* и фосфорилације *NFIB* (енгл. *Nuclear factor-1 B*, *NFIB*) [75, 97]. Такође, показано је да ниацин учествује у регулацији имунског одговора и процесима фагоцитозе мијелинског дебриса посредством активације рецептора хидроксикарбоксилне киселине 2 и на тај начин смањује неуроинфламацију [98]. Показано је и да примена ниацина поспешује процесе ремјелинизације у ЦНС-у код старих мишева. Наиме, утврђено је да ниацин промовише фагоцитну активност макрофага/микроглије у лезијама у ЦНС-у, као и да утиче на повећање броја прогениторских ћелија олигодендроцита. Ова студија такође истиче ниацин као потенцијалну терапију за хроничне демјелинизирајуће болести као што је МС [99]. У истраживањима на пацијентима са МС-ом, показано је да су високе дозе никотинамида (100 mg) и тиамина (300 - 500 mg) довеле до побољшања клиничких симптома МС-е [86, 100]. На

животињским моделу ЕАЕ-у, дозе од 500 mg/kg никотинамида значајно су побољшале клиничку слику животиња, са одложеним почетком болести и нижим клиничким скоровима за ЕАЕ. Такође, уочено је мање подручје инфилтрације имунских ћелија, као и нижи степен демиелинизације, у поређењу са контролом [101]. Поред *in vivo* студија, у *in vitro* моделу за неуротоксичност посредовану ћелијама микроглије активираних ЛПС-ом утврђено је да је третман никотинамидом смањио оштећења аксона, што указује на могућу неуропротективну улогу никотинамида [86]. Поред тога, разне бактерије црева човека могу да синтетишу витамин Бе3, укључујући *B. fragilis*, *P. copri*, *R. lactaris*, *C. difficile*, *Bifidobacterium infantis*, *Helicobacter pylori* и *Fusobacterium varium* [79]. Стога, ниво синтезе витамин Бе3 може бити у функцији састава микробиоте црева и такође допринети функционисању епителних ћелија црева и одржавању епителне баријере црева.

**Витамин Бе5** (пантотенска киселина) игра важну улогу као прекурсор за *CoA* који је кључна компонента у синтези ацетил-*CoA*. Ово једињење учествује у низу метаболичких путева, укључујући Кребсов циклус, синтезу неуротрансмитера и оксидацију масних киселина [87]. Витамин Бе5 доприноси одбрамбеним механизмима организма тако што промовише функцију урођеног и адаптивног имунитета. Показано је да витамин Бе5 покреће фагоцитозу и производњу про-инфламаторних цитокина, као што су *IL-6* и *TNF- $\alpha$*  и на тај начин индукује *Th1* и *Th17* имунски одговор код мишева инфицираних бактеријом *Mycobacterium tuberculosis* [77, 102]. Пантотенска киселина је учествујеи у регулацији нивоа гвожђа, који је кључан у процесима као што су транспорт кисеоника у мозгу, пренос електрона, синтеза неуротрансмитера, као и производња и регенерација мијелина. Међутим, високи нивои гвожђа могу бити штетни и довести до повећане производње слободних радикала и потенцијалне неуротоксичности. Висок ниво гвожђа у мозгу је примећен код бројних неуролошких поремећаја, укључујући и МС-у [86], међутим ефекти пантотенске киселине у неуродегенеративним болестима нису детаљно истраживани. Различите бактерије у цревима човека, укључујући *B. fragilis*, *P. copri*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Salmonella typhimurium* и *H. pylori* могу да синтетишу витамин Бе5 [79].

**Витамин Бе6** (пиридоксин, пиридоксал и пиридоксамин) је прекурсор пиридоксал фосфата и пиридоксамин фосфата, који су важни коензими за многобројне ћелијске функције. Поред улоге у синтези и разградњи аминокиселина, учествује и у метаболизму масних киселина и угљених хидрата [88]. Витамин Бе6 такође игра

значајну улогу у регулацији имунитета црева тако што утиче на метаболизам сфингозин 1-фосфата (енгл. *Sphingosine-1-phosphate, SIP*), медијатора који контролише миграцију лимфоцита [79]. Поред тога, показано је да пиридоксал и пиридоксал-фосфат могу да регулишу ниво активних форми одређених цитокина. Наиме, утврђено је да долази до инхибиције активности ензима каспазе-1 и самим тим продукције *IL-1* и *IL-18* од стране ЛПС-ом активираних макрофага након третмана пиридоксал и пиридоксал-фосфатом. Такође, у *in vivo* експериментима је утврђено да пиридоксал и пиридоксал-фосфат смањују производњу *IL-1β* инхибирањем активације инфламазома *NLRP3* (енгл. *Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3, NLRP3*) код мишева [75, 103]. Недостатак пиридоксина у исхрани код мишева, довео је до промена у одговору Т-ћелија, укључујући супресију пролиферације Т-ћелија, смањене нивое *IL-2*, повећане нивое *IL-4*, као и измењену експресију транскрипционих фактора *T-bet* и *SOCS-1* који контролишу експресију различитих про-инфламаторних цитокина [75, 104]. У ранијим студијама на животињским моделима мишева и пацова показано је да дефицијенција пиридоксина директно доводи до појаве демјелинизације [105]. Поред тога, ослабљен имунски одговор код пацијената са МС-ом и дефицијенција пиридоксина су узајамно повезани у смислу утицаја на нарушавање функције антитела и настанка реакција преосетљивости [86]. Метагеномска анализа црева човека идентификовала је неколико бактерија које имају капацитет за биосинтезу витамина Бе6, укључујући *B. fragilis*, *P. copri*, *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens* и *H. pylori* [79]. Дефицијенција витамина Бе6 је повезана са развојем инфламаторних болести као што су алергија, реуматоидни артритис и инфламаторне болести црева. Познато је да недостатак витамина Бе6 нарушава равнотежу између *Th1* и *Th2* одговора, истовремено изазивајући промене у диверзитету микробиоте црева, као и у продукцији одговарајућих метаболита [79, 87].

**Витамин Бе7** (биотин) је кључни коензим за различите биохемијске процесе укључене у метаболизам глукозе, аминокиселина и масних киселина [88]. Као одговор на недостатак витамина Бе7, покреће се активација транскрипције *NF-κB*, што указује на улогу витамина Бе7 у инхибицији активације *NF-κB* и експресије гена за про-инфламаторне цитокине, као што су *TNF-α*, *IL-1* и *IL-6* [79, 106]. Поред тога, у једној студији која је рађена на 154 пацијента са прогресивном МС-ом, утврђено је да је суплементација високим дозама биотина (100 mg) довела до смањења клиничких симптома пацијената, у поређењу са плацебо групом [86, 107]. Метагеномском



анализом црева човека утврђено је да одређене бактерије као што су *B. fragilis*, *P. copri*, *F. varium*, и *Campylobacter coli* поседују пут биосинтезе за витамин Бе7 [79].

**Витамин Бе9** (фолат, фолна киселина) функционише као коензим у различитим метаболичким процесима, укључујући синтезу ДНК и аминокиселина. Витамин Бе9 је кључан у процесима метилације у ЦНС-у, очувању мембранских липида неурона и глијалних ћелија, као и метаболизма неуротрансмитера укључујући серотонин и допамин [88]. Осим тога, витамин Бе9 доприноси одржавању имунске равнотеже утичући на функцију регулаторних Т-ћелија, чиме се спречава појава прекомерног инфламаторног одговора [79]. Такође, показано је да витамин Бе9 има позитиван ефекат на пролиферацију Т лимфоцита, фагоцитозу и производњу имуноглобулина [75, 79]. Поред тога, у условима дефицијенције фолата у *in vitro* култури регулаторних Т-ћелија, поред смањеног степена преживљавања регулаторних Т-ћелија, примећена је и смањена експресија анти-апоптотског протеина *Bcl2* (енгл. *B-cell lymphoma 2*, *Bcl2*) [108]. Недостатак витамина Бе9 у исхрани код мишева узроковао је повећану осетљивост на инфламацију у цревима [79, 109]. Поред тога, утврђено је да ниски нивои фолата и магнезијума корелишу са повећаним осећајем умора/исцрпљености код пацијента са МС-ом [110]. Занимљиво је да је суплементација фолне киселине (200-300 µg/дан) код пацијената са МС-ом побољшала неуролошки статус пацијената, подстакла регенерацију мијелина и побољшала опште стање пацијената [111]. У једној студији, упоређена је клиничка слика 22 пацијента са МС-ом који су примали имуносупресивну терапију (циклофосфамид 400-500 mg) и 20 пацијената са МС-ом који су примали фолну киселину (1 mg, 5 пута недељно, током 2 недеље). Иако није установљен позитиван ефекат суплементације фолатом, пацијенти из обе групе су показали сличну прогресију болести [86, 112]. Метагеномском анализом црева човека утврђено је да бактерије *B. fragilis*, *P. copri*, *C. difficile*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *F. varium* и *Salmonella enterica* поседују пут биосинтезе фолата [79].

**Витамин Бе12** (кобаламин) игра важну улогу у правилном развоју и функционисању ЦНС-а, као и у производњи црвених крвних зрнаца. Његови активни облици, метилкобаламин и аденозилкобаламин, представљају важне доноре метил групе у процесу синтезе нуклеинских киселина, као и у метаболизму протеина и липида. Витамин Бе12 делује и као кофактор за синтезу метионина, олакшавајући конверзију аминокиселине хомоцистеина у метионин [88]. Поред тога, студије су

откриле да витамин Be12 има имуномодулаторна својства и да утиче на активност CD8+ T и NKT ћелија [79, 113]. Наиме, показано је да недостатак витамина Be12 доводи до смањене регулације лимфоцита, као и да утиче на функционалност NK ћелија [114]. У поређењу са здравим особама, удео CD4+ T популације лимфоцита је био значајно већи код пацијената са дефицијенцијом витамина Be12, што је резултирало високим односом CD4+ : CD8+ T-ћелија [115]. Витамин Be12 је један од најбоље истражених витамина групе Бе у неуродегенеративним обољењима, укључујући и MS-у. Бројне студије су утврдиле корелацију између измењеног метаболизма витамина Be12 и нивоа витамина Be12 у серуму и ЦСТ-и пацијената оболелих од MS-е [86, 116-118]. Међутим, у студији која је укључивала 24 пацијента са MS-ом, 73 пацијента са другим неуролошким поремећајима и 21 здравог испитаника, није примећено побољшање клиничке слике након суплементације витамином Be12 [119]. У овој студији, висока доза метил витамина Be12 (60 mg сваки дан током 6 месеци) је примећена код шест пацијената са хроничном прогресивном MS-ом. Иако се моторни инвалидитет није клинички смањено, показана је тенденција ка побољшању визуелних и аудиторних евоцираних потенцијала током терапије. Ипак, терапија високим дозама метил витамина Be12 представља потенцијалну терапију за MS-у, као додатак имуносупресивним терапијама [119]. Поред тога, у једној мета-анализи је установљена корелација између ниских нивоа витамина Be12 и повишених нивоа хомоцистеина са патогenezом MS-е. Повишени нивои хомоцистеина су асоцирани са различитим клиничким манифестацијама MS-е, а посебно је истакнут његов утицај на ЦНС [120, 121]. Измењен катаболизам хомоцистеина се поред дефицијенције витамина Be12, доводи и у везу са дефицијенцијом витамина Бе6 и Бе9. Истраживања су показала да унос ових витамина може потенцијално да смањи ризик од настанка неуродегенеративних стања смањујући ниво хомоцистеина [88, 122]. Метагеномска анализа црева човека је показала да бактерије као што су *P. copri*, *C. difficile*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *R. lactaris*, *Bifidobacterium animalis*, *B. infantis*, *B. longum* и *F. varium* имају способност синтезе витамина Be12 [79].

Иако је утврђено да витамини групе Бе имају важну регулаторну улогу у патофизиолошким процесима у неуродегенеративним обољењима, неопходна су даља истраживања како би се детаљно утврдио утицај комплекса витамина Бе на клиничку слику пацијената са MS-ом, процесе ремиелинизације и неурорегенерације.

Дефицијенција витамина Бе се често доводи у везу са когнитивном дисфункцијом и различитим неуролошким болестима као што је МС. Симптоме дефицијенције витамина Бе и МС-е одликују сличне карактеристике, укључујући разне клиничке манифестације, као што су хронични умор, нарушен имунски одговор и демиелинизација неурона [86]. Поред промена у ЦНС-у код пацијената са МС-ом, детектују се и промене у периферним нервима, што је присутно и у животињском моделу МС-е, ЕАЕ-у [123, 124]. Претходни радови показали су да третман комплексом витаминима групе Бе, (Бевиплекс<sup>®</sup> – Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) побољшава регенерацију моторних нерава и опоравак функције мишића инервисаних датим нервом на моделу повреде периферног нерва [125]. Укратко, третман витаминима групе Бе смањивао је експресију про-инфламаторних и повећао експресију анти-инфламаторних цитокина, чиме је допринео смањењу неуроинфламације. Такође, витамини групе Бе смањили су број М1, а повећали број М2 макрофага што указује на њихову улогу у М1/М2 транзицији током опоравка периферног нерва након повреде [126]. Овакав ефекат витамина групе Бе утицао је на смањење оштећења мијелинске овојнице и тиме убрзао регенерацију аксона и опоравак функције њиме инервисаног мишића [127].

Сходно томе, примена комплекса витамина групе Бе у терапији МС-е, могла би повољно утицати и на промене у периферним нервима, као и на побољшање њихове функције. Поред тога што су неуропротективни ефекти појединачних витамина групе Бе познати, очекује се да би се постигао бољи ефекат удруженим деловањем више Бе витамина, односно применом испитиваног комплекса. Поред тога, захваљујући својим имуномодулаторним карактеристикама, Бе витамини могу имати улогу у регулацији про-инфламаторног одговора, као и промовисању поновног формирања имунске хомеостазе у ЦНС-у, која је предуслов за опоравак и процес неурорегенерације. На основу претходних резултата добијених на моделу повреде периферног нерва, терапија комплексом Бе витамина могла би да обезбеди помоћни терапијски приступ и за ефикаснију контролу инфламаторних процеса који леже у основи прогресије МС-е, као и бржи опоравак пацијената.

## **2 ЦИЉЕВИ**

Основни циљ ове докторске дисертације је да се испита утицај третмана комплексом витамина Бе (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) на прогресију ЕАЕ-а и процесе неуроинфламације применом (1) *in vivo*, (2) *in vitro* и (3) *in silico* истраживања.

У складу са основним циљем истраживања, дефинисани су следећи експериментални задаци који ће се извести у оквиру три типа испитивања:

1. ***In vivo* студија** на животињском моделу МС-е, ЕАЕ-у код *Dark Agouti* пацова – Испитати утицај терапије комплексом Бе витамина (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6, Бе12) на (1) клиничке знаке прогресије болести, (2) промене у густини једара захваћеног периферног нерва и њиме инервисаном мишићу квадрицепса, (3) процесе у дренажућим лимфним чворовима, (4) хистолошке промене у кичменој моздини и великом мозгу (5), као и на (6) састав и функцију микробиоте црева у различитим временским тачкама током болести (почетак, пик и крај).
2. ***In vitro* студија** – Испитати (1) анти-инфламаторни потенцијал комплекса витамина Бе на експресију површинских молекула и продукцију РОК, NO и про-инфламаторних цитокина *TNF- $\alpha$*  и *IL-6* од стране ЛПС-ом активираних мишиће *BV2* микроглије и (2) неуропротективну активност комплекса Бе витамина коришћењем модела трансфера супернатанта третираних *BV2* ћелија микроглије на *SH-SY5Y* неуроне.
3. ***In silico* студија** – Испитати (1) утицај третмана комплексом витамина Бе на састав микробиоте црева пацова са експерименталним аутоимунским енцефаломијелитисом и (2) потенцијални механизам деловања одабраних витамина Бе комплекса на протеине од интереса у оквиру инфламаторног пута *TLR4* индукованог ЛПС-ом.

## **3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1 Хемикалије

Комплекс Бе витамина – Бевиплекс® ампула (произвођач – Галеника а.д. Београд, Србија) садржи Бе1 (тиамин хидрохлорид, 40 mg), Бе2 (рибофлавин натријум фосфат, 4 mg), Бе3 (никотинамид, 100 mg), Бе5 (калцијум пантотенат, 10 mg), Бе6 (пиридоксин хидрохлорид, 8 mg) и Бе12 (цијанокобаламин, 4 µg). Диметилсулфоксид (ДМСО), еозин Y, калијум дихидроген фосфат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), калијум хлорид (KCl), липополисахарид (ЛПС), литијум карбонат (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), LFB (енгл. *Luxol Fast Blue*), Мајеров хематоксилин, монобазни натријум фосфат (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ), натријум азид (NaN<sub>3</sub>), N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, натријум бикарбонат (NaHCO<sub>3</sub>), натријум додецил сулфат (енгл. *Sodium dodecyl sulfate, SDS*), натријум хлорид (NaCl), натријум карбонат (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), нитроплави тетразолијум хлорид (НБТ), RPMI (енгл. *Roswell Park Memorial Institute*) медијум за ћелијску културу и сулфаниламид набављени су од Sigma-Aldrich, САД. Анхидрована D(+)-глукоза и D(+)-сахароза је набављена од Carl Roth, Немачка. Медијум за калуљњење Killik набављен је од Bio-Optica, Италија. Говеђи серум албумин, BSA (енгл. *Bovine Serum Albumin*) и DPX лепак за монтирање препарата су набављени од Thermo Fischer Scientific, САД. Ћелијске линије су набављене од америчке колекције култура АТСС (енгл. *American Tissue Culture Collection*, Manassas, САД). Етанол 96%, етанол 100%, изопропил-алкохол, ксилол и хлороводонична киселина (HCl) су набављени од Zorka Pharma, Србија. Фосфорна киселина је набављена од Honeywell, САД. Фетални говеђи серум, FBS (енгл. *Fetal Bovine Serum*) је набављен од Gibco, Invitrogen, САД. Натријум нитрит (NaNO<sub>2</sub>) је купљен од Dispochem, Велика Британија. Пеницилин/стрептомицин је купљен од PAA Laboratories GmbH, Аустрија. Трипсин-ЕДТА 0,5% набављен је од Capricorn Scientific, Немачка.

## 3.2 Реагенси

Табела 1. Називи и састав коришћених пуфера, раствора и медијума.

Назив	Састав
Слани раствор фосфатног пуфера (0,01 М PBS; pH = 7,4)	NaCl 8 g KCl 0,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,14 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g Дестилована вода до 1 L
Фосфатни пуфер (0,2 М PB; pH = 7,4)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O 5,52 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidrovani) 8,52 g Дестилована вода до 1 L
RPMI 1640 медијум (pH = 7,4)	RPMI 1640 1 паковање NaHCO <sub>3</sub> 2 g Дејонизована вода до 1 L
Трипсин 0,25%	Трипсин-ЕДТА 0,5% 0,01 М PBS
4% параформалдехид (pH = 7,4)	Параформалдехид 40 g 1X PBS до 1 L
Грисов реагенс (А:Б = 1:1)	Компонента А (0,1% N-1-нафтилетилендиамин-дихидрохлорид раствор) Компонента Б (1% сулфаниламид у 5% фосфорној киселини )
Раствор SDS-а	10% SDS 0,1% 1 N HCl
Раствор <i>Luxol Fast Blue</i>	<i>LFB</i> 0,05 g 95% етанол 100 mL 10% сирћетна киселина



Раствор литијум карбоната	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05 g
	Дестилована вода 100 mL

**Табела 2.** Списак назива и произвођача коришћених комерцијално доступних комплета

Назив	Произвођач
Комплет за одређивање <i>IL-6</i> цитокина, Mouse <i>IL-6</i> Quantikine ELISA Kit	R&D systems
Комплет за одређивање <i>TNF-α</i> цитокина, Mouse <i>TNF-alpha</i> Quantikine ELISA Kit	R&D systems
Комплет за фиксацију и пермеабилizацију узорака за проточну цитометрију, Flow cytometry fixation and permeabilization kit I	R&D systems
Комплет за изоловање ДНК, GenElute™ Stool DNA Isolation Kit	Sigma Aldrich
Комплет за qPCR, FastGene 2X IC Green Universal ROX	Nippon Genetics

### 3.3 Експерименталне животиње

За *in vivo* експериментални део истраживања коришћен је модел експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса, као један од најчешће коришћених анималних модела МС-е. Испитивања су рађена на мужјацима пацова *Dark Agouti (DA)* соја старости 2-2,5 месеца (тежине између 220 и 250 g), добијених из одгајивачке колоније на Војномедицинској академији (Београд, Србија). Решењем управе за ветерину, Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, бр. 323-07-6180/2019-05 и бр. 323-07-06858/2021-05, одобрене су све експерименталне процедуре на животињама. Животињама је болест индукована субкутаном применом емулзије хомогената кичмене мождине (50% w/v у физиолошком раствору) и комплетног Фројндовога адјуванса (енгл. *Complete Freund's adjuvant*, CFA) у леву задњу шапу (150 µL).

### 3.3.1 Третман животиња комплексом витамина Бе

Животиње (укупно 47 животиња) су биле расподељене у четири експерименталне групе, у стандардним кавезима (3 животиње по кавезу) и у конвенционалним условима: константна температура и влажност, циклус светло/мрак 12h, уз слободан приступ води и храни. Парализоване животиње су биле мануелно храњене.

#### 3.3.1.1 Експерименталне групе

1. Прва група (**Е**) – животиње којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (17 животиња). Ова група животиња је добијала сваког дана инјекцију физиолошког раствора (интраперитонеално, 0,2 mL) како би се елиминисао утицај стреса који је изазван давањем инјекције коктела Бе витамина у другој групи животиња.
2. Друга група (**ЕТ**) – животиње којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис и које су од дана индукције болести до термина жртвовања третиране комплексом витамина Бе (Бевиплекс®) интраперитонеално свакодневно у дози Бе1 (37 mg/kg), Бе2 (3,7 mg/kg), Бе3 (93 mg/kg), Бе5 (9,3 mg/kg), Бе6 (7,4 mg/kg) и Бе12 (3,7 µg/kg) (18 животиња).
3. Трећа група (**СФА**) – животиње које су примиле само комплетни Фројндов адјуванс (6 животиња).
4. Четврта група (**К**) – интактне животиње (6 животиња).

На основу прогресије болести, животиње из **Е** и **ЕТ** експерименталних група праћене су у три временске тачке: почетак (**о**), пик (**п**) и крај (**к**) болести и подељене су у следеће подгрупе: нетретиране животиње **Ео** (5 животиња), **Еп** (5 животиња), **Ек** (7 животиња) и животиње третиране витаминима Бе комплекса **Ето** (5 животиња), **Етп** (5 животиња), **Етк** (7 животиња).

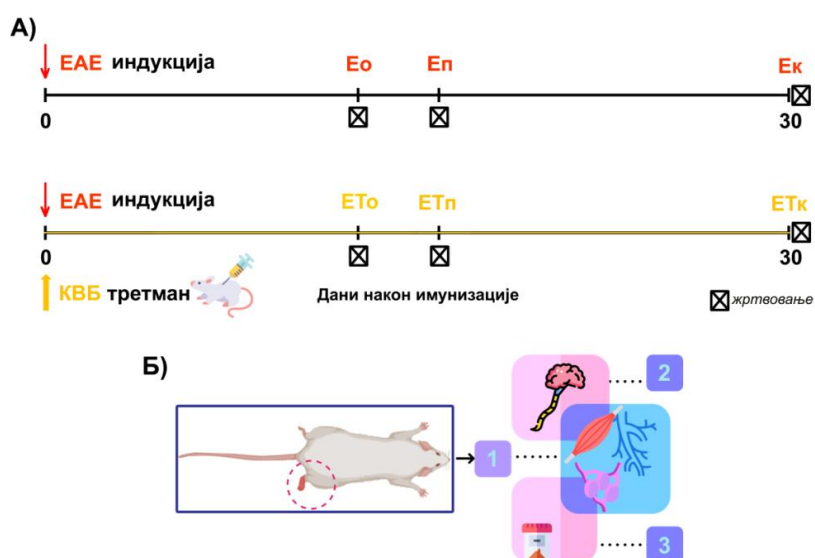
### 3.3.2 Процењивање клиничке слике и прогресије болести

У периоду од 30 дана након имунизације, животиње су свакодневно праћене, процењивана је клиничка слика болести и мерена је телесна маса. Клиничка слика процењивана је према стандардној скали прогресије ЕАЕ оценама од 0 до 5: **0** – без

клиничких знакова; **0,5** – делимични губитак/смањени тонус репа и немогућност увијања дисталног краја репа; **1** – губитак/смањени тонус репа; **1,5** – благо/умерено неспретан ход, оштећена способност правилног кретања; **2** – слабост задњих екстремитета, пареза; **2,5** – делимична парализа задњих екстремитета; **3** – потпуна парализа задњих екстремитета; **3,5** – потпуна парализа задњих екстремитета и слабост предњих екстремитета; **4** – квадриплегија и **5** – морибундно стање или смрт. Средње вредности клиничких резултата за животиње у свакој од експерименталних група израчунате су на крају периода евалуације. Током прогресије болести, разликовале су се три фазе: почетак болести, пик болести и крај болести.

### 3.3.3 Изоловање органа

На основу клиничке слике, као и временског периода од дана имунизације, животиње су биле жртвоване у три временске тачке: почетак, пик и крај болести (слика 4). Након жртвовања животиња декапитацијом, изолована су ткива од интереса (мозак, кичмена мождина, феморални нерви и мишићи квадрицепса левог и десног задњег екстремитета, поплитеални лимфни чворови) и сакупљен је фецес (слика 4). Сакупљена ткива су се користила за хистоморфолошку анализу (мозак, кичмена мождина, феморални нерв, мишић квадрицепс и поплитеални лимфни чворови), а фецес за изолацију ДНК за анализу састава микробиоте црева у различитим експерименталним групама.



Слика 4. Илустрација експерименталног дизајна и временских тачака жртвовања животиња.

(А) Експериментални дизајн и временске тачке жртвовања животиња; (Б) Схема изоловања органа од интереса, 1 – феморални нерв, мишић квадрицепса и поплитеални лимфни чвор; 2 – мозак и кичмена мождина ; 3 – фецес; Група животиња третираних комплексом витамина Бе (ЕТ); Нетретирана група животиња (Е);  
Временске тачке прогресије болести и жртвовања животиња: почетак (о), пик (п) и крај (к) болести.

### **3.3.4 Хистоморфолошка анализа и одређивање густине једара препарата лимфних чворова, нерава и мишића**

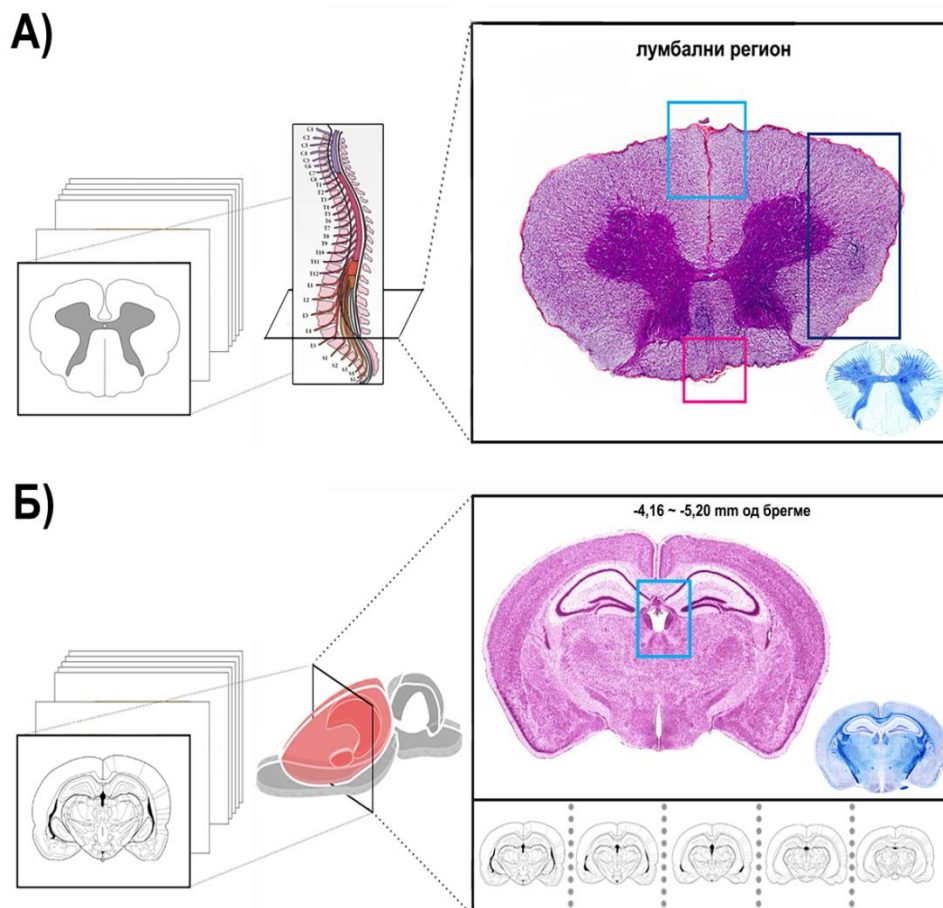
Поступак хематоксилин/еозин (Х/Е) бојења представља једну од најчешће коришћених метода за хистолошка бојења. Хематоксилин боји ћелијска једра тамноплавом бојом, док еозин боји цитоплазму и остале ћелијске структуре ружичастом бојом. На тај начин, ово двоструко бојење омогућава јасно разликовање ткивних и ћелијских компоненти, као и насталих промена у њиховој структури [128].

Поплитеални лимфни чворови, феморални нерви и мишићи квадрицепса инервисани овим нервима (левог и десног задњег екстремитета, од четири до пет животиња по групи) испрани су физиолошким раствором, фиксирани у 4% параформалдехиду и припремљени за Х/Е бојење (Лабораторија Oculus, Београд, Србија) према стандардном протоколу. Парафински пресеци (дебљина 20  $\mu\text{m}$ ) нерава и мишића посматрани су на увећању 40  $\times$ , док су пресеци лимфних чворова посматрани под увећањем 5  $\times$ , 10  $\times$  и 40  $\times$  на светлосном микроскопу (Leica, LAS v 4.11). За одређивање промене густине једара у захваћеном периферном нерву и њиме инервисаном мишићу (број једара/ $\text{mm}^2$ ) коришћен је *ImageJ* софтвер. Имајући у виду да су микрографије сликане на увећању 40  $\times$  представљале приказ делова региона пресека, нужно је било направити по најмање осам, а највише 20 фотографија различитих региона (у зависности од величине пресека) како би се направио мозаик целог пресека, на основу чега је омогућено лакше бројање једара и одређивање њихове густине (број једара/ $\text{mm}^2$ ).

### **3.3.5 Криопрезервација и хистоморфолошка анализа препарата мозга и кичмене мождине**

Након изоловања, мозак и кичмена мождина су испрани у хладном физиолошком раствору и пребачени у 4% параформалдехид. Након 24 h, ткива су дехидратисана растућим концентрацијама раствора сахарозе у фосфатном пуферу, у

периоду од 3 дана (први дан – 10% раствор сахарозе, други дан – 20% раствор сахарозе и трећи дан – 30% раствор сахарозе) и чувана на +4 °C. Након одливања сахарозе, ткива су пажљиво фиксирана у криомодле са *Killik* фиксационим гелом. Калупи ткива су чувани на -80 °C. Ткива су сечена на криотому (*Leica CM1850 Cryostat*, САД), при чему су прављени пресеци дебљине 20 μm и фиксирани на плочицама *SuperFrost* (Thermo Scientific, Немачка). Пазећи на оријентацију ткива, прављене су серије короналних пресека лумбалног дела кичмене мождине (две животиње по групи, пет пресека по плочици) и каудалног међумозга (лат. *Caudal Diencephalon*) (две животиње по групи, два пресека по плочици) (слика 5). Припремљене плочице чуване су на -20 °C до поступка бојења.



**Слика 5. Схематски приказ припреме ткивних пресека кичмене мождине и предњег мозга.**

(А) Коронални пресек лумбалног дела кичмене мождине. (Б) Коронални пресек предњег мозга (серија пресека у региону -4,16 ~ -5,20 mm од брегме). Означене регије на X/E пресецима представљају главне регије испитивања.

Пре поступка бојења, плочице које су складиштене на - 20 °C су темперирани на собној температури 20 минута. Како би се ткива рехидратисала и фиксациони гел растворио, плочице су испране у *PBS*-у (pH = 7,4) 10 минута. Након испирања у *PBS*-у, плочице су испране у дестилованој H<sub>2</sub>O и потопљене у раствор хематоксилина (2 минута). Након бојења једара хематоксилином, плочице су испране најпре у чесменској води, затим у дестилованој и на крају у 96% етанолу. Пресеци су обојени еозином (1 минут) и дехидратисани како би се направио трајни пресек следећим редоследом растварача: 96% етанол, 100% етанол и ксилол (2-5 минута у сваком растварачу). Покровно стакло је монтирано на плочице коришћењем *DPX* лепка. Након сушења, пресеци су посматрани под микроскопом (*Leica, LAS v 4.11*), на увељачањима 5 ×, 10 ×, 20 × и 40 ×.

Како би се одредио степен демјелинизације, препарати лумбалног дела кичмене мождине и предњег мозга бојени су *Luxol Fast Blue (LFB)* бојом која боји мијелин. Препарати су темперирани на собној температури 20 минута а потом су рехидратисани у *PBS*-у (pH = 7,4) 10 минута. Након испирања у *PBS*-у, плочице су испране у 100% етанолу 2 минута, а затим у 95% етанолу 2 минута. Плочице су потопљене у раствор 0,05% *LFB* боје и инкубирани 1 сат на 60 °C . Након бојења, плочице су испране у 95% етанолу (3 минута), а затим у дестилованој води (1 минут). Након тога, боја је диференцирана у 0,05% литијум карбонату (30 секунди), а затим су плочице испране у 70% етанолу (1 минут) и у дестилованој води (2 минута). Овај поступак поновљен је још једном, како би се сива маса што више обезбојила. Пресеци су дехидратисани како би се направио трајни пресек следећим редоследом растварача: 96% етанол, 100% етанол и ксилол (2-5 минута у сваком растварачу). Покровно стакло је монтирано на плочице коришћењем *DPX* лепка. Након сушења, пресеци су посматрани под микроскопом (*Leica, LAS v 4.11*), на увељачању 5 × и 10 ×.

### **3.3.6 Екстракција ДНК из узорка фецеса за анализу састава микробиоте црева секвенцирањем маркер гена за 16S рибозомалну РНК**

Узорци фецеса сакупљени су за сваку групу животиња (**К, СФА, Ео, Еп, Ек, ЕТо, ЕТп, ЕТк**) за сваку временску тачку (почетак, пик и крај болести). Изоловање ДНК урађено је према упутству произвођача комерцијално доступног комплета за изоловање ДНК из узорка фецеса (*GenElute<sup>TM</sup> Stool DNA Isolation Kit*). Лизати су припремљени додавањем пуфера за лизу на 80 mg сваког узорка. Након корака

центрифугирања (2 минута, 14 000 rpm), 600  $\mu\text{L}$  супернатанта је пребачено у тубицу за елуирање и додато је 100  $\mu\text{L}$  везујућег пуфера 1. Одвојени чврсти остаци су одстрањени и у 700  $\mu\text{L}$  супернатанта је додата једнака запремина 70% етанола. Пречишћени лизат (600  $\mu\text{L}$ ) је пребачен у тубицу са колоном и центрифугиран је 1 минут на 6000 rpm. ДНК који је везан за колону је испран са 500  $\mu\text{L}$  пуфера за испирање, колона је пребачена у тубицу за елуирање и додато је 70  $\mu\text{L}$  пуфера за елуирање. Након 10-15 минута, садржај тубице је центрифугиран 2 минута на 2000 rpm, а затим 1 минут на 14 000 rpm. Овај корак је понављан све док укупна запремина није била елуирана. Контрола квалитета изоловане ДНК је процењена електрофорезом на 1% агарозном гелу. Узорак за сваку групу је припремљен за секвенцирање гена за 16S рибозомалну РНК (рРНК) у коначној концентрацији ДНК од 10 ng/ $\mu\text{L}$ . Уколико је у неким узорцима концентрација ДНК била нижа од 10 ng/ $\mu\text{L}$ , узорци су упарени тако што је 60  $\mu\text{L}$  узорка инкубирано у термоблоку 1,5 h на 60 °C до достизања запремине од 20  $\mu\text{L}$ . За сваку групу животиња (К, СФА, Ео, Еп, Ек, ЕТо, ЕТп и ЕТк), узорци (четири до пет животиња по групи) су били сједињени у финалној запремини од 50  $\mu\text{L}$  и секвенцирани (*Novogene*, Велика Британија).

### 3.4 Карактеризација састава и функције микробиоте црева

Секвенцирање гена који кодира синтезу 16S рРНК користи се за идентификацију, класификацију и квантификацију микробних заједница присутних у одговарајућем узорку. 16S рРНК је РНК компонента 30S субјединице прокариотских рибозома. Структура гена за 16S рРНК одликује се високо конзервираним и варијабилним регионима чија секвенца је карактеристична за одређену микробиолошку врсту. Имајући у виду да је степен варијације секвенце у функцији сродности микроорганизама, секвенцирање гена за 16S рРНК омогућава идентификацију микробних таксона [129]. Висока конзервираност омогућава идентификацију микробног састава узорка (бактерије и архее), док хиперваријабилни региони омогућавају диференцијацију таксона чак и до нивоа врсте (али најчешће рода). Уз примену одговарајућих прајмера, техником ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) умножава се ДНК из узорка и генеришу се ампликони 16S рРНК гена који обухватају варијабилне регионе. Након тога, умножени регион се секвенцира и добијена читавања се анализирају помоћу одговарајућих биоинформатичких алата. Добијене секвенце се даље користе за идентификацију

таксона коришћењем одговарајућих база података које похрањују секвенце гена за 16S рРНК.

### 3.4.1 Биоинформатичка анализа података добијених секвенцирањем гена за 16S рибозомалну РНК

Како би се испитао утицај комплекса витамина Бе на промене у саставу микробиоте црева код пацова са експерименталним аутоимунским енцефаломијелитисом, урађено је секвенцирање гена за 16S рРНК помоћу *Illumina NovaSeq 6000* платформе. *PCR* амплификација урађена је употребом прајмера обележених бар кодом за V4-V5 варијабилне регионе гена за 16S рРНК: 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') и 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'). Укупно 672 480 читавања је генерисано из осам узорака, са просеком од  $84\ 060 \pm 14\ 184$  читања по узорку. Добијени подаци су обрађени коришћењем *R* програмског језика верзије 4.1.2 [130] и коришћењем *Bioconductor 3.14* програма [131]. Применом *Microeco* пакета [132], необрађене секвенце су филтриране и након процене квалитета скраћене на дужину од 200 базних парова. Након тога применом *DADA2* алгоритма уклоњени су делови секвенце лошег квалитета и химере чиме је генерисана табела варијанти секвенци ампликона (енгл. *Amplicon Sequence Variants, ASV*) [133].

Након уклањања наквалитетних секвенци, добијено је 476 009 читања са опсегом читања од 42 311 до 77 952 по узорку (просечан број читања  $61\ 554 \pm 10\ 924$ ). Таксономска идентификација је урађена коришћењем референтне базе података за рРНК, *SILVA 138* [134]. Даља анализа састава микробиоте црева је изведена применом *Microeco* пакета за *R* програм верзије 0.6.5 и релативна заступљеност *ASV* је коришћена за конструкцију табела података од нивоа раздела до нивоа рода [132]. Испитиване су разлике у саставу микробиоте црева између експерименталних група, а таксони са релативном заступљеношћу нижом од 0,1% су били искључени из анализе. Разноврсност микробне заједнице унутар и између узорака процењена је мерењем алфа и бета индекса диверзитета, редом. Као мера разноликости алфа диверзитета израчунат је *Shannon*-ов индекс диверзитета [135], док је бета разноврсност процењена извођењем *weighted UniFrac* матрице удаљености [135] чији су резултати представљена на дијаграму (енгл. *Principal Component Analysis, PCoA*). Корелација између релативне заступљености 50 најзаступљенијих родова микроорганизама и клиничких знакова болести унутар испитиваних група животиња, процењена је израчунавањем



Пирсоновог коефицијента корелације. Статистички значајне разлике у заступљености бактерија између различитих узорака одређене су *metastat* анализом, која је имплементирана у *Microeco* пакету.

### **3.4.2 Одређивање релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија методом квантитативног *qPCR* у реалном времену**

Анализа релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија (СФБ) урађена је применом методе квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *quantitative Polymerase-Chain Reaction, qPCR*) применом *7500 real-time PCR system* (Applied Biosystems, САД) према протоколу произвођача *FastGene 2X IC Green Universal ROX* (Nippon Genetics, Јапан). Узорци изоловане ДНК из фецеса пацова чувани су на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Пре *qPCR* анализе, концентрација ДНК и чистоћа узорка проверена је коришћењем *BioSpec-nano* (Shimadzu) уређаја. На основу добијених података о концентрацији ДНК, сви узорци су нормализивани на 100 ng пре nanoшења на микротитарску плочу. У бунариће је наношено укупно 10  $\mu\text{L}$  *master mix*-а (5  $\mu\text{L}$  IC Green, 1  $\mu\text{L}$  Forward прајмера, 1  $\mu\text{L}$  Reverse прајмера,  $\mu\text{L}$  Rox low 1 и 2  $\mu\text{L}$  комплементарне ДНК). Примењен је програм који се састојао од три циклуса: (1) иницијална денатурација на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 2 минута; (2) денатурација на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 5 секунди; (3) хибридизација прајмера и елонгација на  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 30 секунди. Прајмери који су били коришћени су *Bact 1369 Forward* 5'-CGG TGA ATA CGT TCC CGG-3'; *Prok 1492 Reverse* 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'; *SFB specific 16S rRNA gene Forward* 5'-AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC-3' и *Universal 16S rRNA gene Reverse* 5'-TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG-3'. Сваки узорак је испитан у техничком дупликату. Нормализација резултата је урађена у односу на референтни ген (*Actb* ген за  $\beta$ -актин пацова који представља ендогену контролу). Резултати су приказани као релативна заступљеност гена од интереса применом  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  методе.

### **3.4.3 Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева пацова применом програма *MicFunPred***

Витамини групе Бе индукују промене у саставу микробиоте црева, чиме се посредно фаворизују метаболичке путање присутне код датих таксона. Да би се утврдио ефекат комплекса витамина Бе на промене у метаболичким путевима микробне заједнице црева код животиња којима је индукован ЕАЕ, урађена је биоинформатичка анализа применом програма *MicFunPred* [136]. *MicFunPred*

предвиђа метаболички капацитет микробиоте црева на основу података о диверзитету и релативној заступљености *ASV* секвенци у узорку/групи од интереса, добијених анализом података након секвенцирања гена за 16S рРНК. [136]. Први корак је нормализација релативних заступљености таксона у узорцима и таксономска анотација *ASV* секвенци користећи *BLAST* алгоритам (енгл. *Basic Local Alignment Search Tool*, *BLAST*), уз проценат идентитета поравнања > 97% на нивоу рода. Нормализована табела релативне заступљености се даље користила за предвиђање главних гена за специфични таксон, укључујући неколико база података *KEGG Orthology* (KO), *Cluster Of Genes* (COG), *TIGRFAM*, *Enzyme Commission* (EC) и *Protein Family* (Pfam). У последњем кораку, за предвиђање метаболичких путева коришћен је *MinPath* програм, како би се избегле/минимизовале погрешне процене метаболичких путева. Користећи конзервативнији приступ, *MinPath* програм даје процену минималног броја метаболичких путева довољних да опишу присуство одређеног метаболита у узорку [136]. На основу добијених података, за приказ резултата су одабрани метаболички путеви чије су промене асоциране са инфламацијом и развојем МС-е. Резултати приказани као релативне заступљености метаболичких путева су нормализовани у односу на контролу и представљени као *Log2* односа вредности за тест групу у односу на контролну групу (енгл. *Log2 Fold Change*, *Log2FC*). За поређење релативних заступљености предвиђених метаболичких путева између различитих група током прогресије болести, примењена је *LefSe* (енгл. *Linear discriminant analysis (LDA) effect size*, *LEfSe*) статистичка анализа користећи *Galaxy* платформу (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

### **3.5 *In vitro* анализа утицаја комплекса витамина Бе на функције ћелија микроглије и неурона**

#### **3.5.1 Култивација ћелијских линија**

Како би се испитали ефекти комплекса витамина Бе на метаболичку активност-ћелија и њихове функције, култивисане су две ћелијске линије – *BV2* (мишја микроглија) и *SH-SY5Y* (ћелије неурона човека). Након одмрзавања, ћелије су ресуспендоване у 10 mL комплетног медијума и центрифугиране 5 минута на 1640 rpm. Ћелијски талог је затим пажљиво ресуспендован у 2 mL комплетног медијума. У зависности од њиховог броја, ћелије су засејане на флашкове одговарајуће површине T-25 (25 cm<sup>2</sup>) и T-75 (75 cm<sup>2</sup>). Ћелијске линије су одржаване у комплетном медијуму за

ћелијску културу на 37 °C, у влажној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>. Комплетни медијум за ћелијску културу састојао се од *RPMI 1640* медијума са 10% инактивираног *FBS*-а, 1% глукозе и 1% антибиотика (пеницилин/стрептомицин). Након достигања конфлуентности, односно формирања ћелијског монослоја који покрива око 80% површине флашка, ћелије су пасажирани. Из флашка у којем су ћелије култивисане, одливан је медијум и флашк је испран 3 пута *PBS*-ом. У флашк је додат 0,25 % раствор трипсин-*EDTA* (2 mL за мањи, T25 флашк и 4 mL за већи, T75 флашк) и ћелије су инкубирани на 37 °C 2-5 минута. После инкубације, односно одлепљивања ћелија са дна флашка, додат је комплетни медијум како би се инактивирао трипсин (4 mL за мањи, T25 флашк и 8 mL за већи, T75 флашк). Садржај је пребачен у тубице и центрифугиран је 5 минута на 1800 rpm. Након одливања супернатанта, ћелијски талог је ресуспендован у 1 mL комплетног медијума. Након ресуспендовања ћелијског талоба, 20 µL ћелијске суспензије је разблажено са 180 µL раствора трипан плавог како би се одредио број живих ћелија за засејавање и поставку експеримента. Употребом хемоцитометра, ћелије су избројане под светлосним микроскопом и изражене као број ћелија по милилитру суспензије.

### **3.5.2 Активација BV2 ћелија и третман комплексом витамина Бе**

За испитивање ефекта комплекса витамина Бе на функције ћелија микроглије коришћене су BV2 ћелије, као добро окарактерисан и широко коришћен модел систем за испитивање процеса неуроинфламације. Ћелије су засејане (100 µL  $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу) на микротитарску плочу са 96 бунарића. За стимулацију BV2 ћелија коришћен је ЛПС (пореклом из *E.coli*) у финалној концентрацији од 10 µg/mL. Након 24 h, када су ћелије постигле конфлуентност, стимулисане су ЛПС-ом (50 µL по бунарићу), третиране различитим концентрацијама комплекса витамина Бе (50 µL по бунарићу) и инкубирани још 48 h. За третман BV2 ћелија користиле су се три различите концентрације комплекса витамина Бе. Разблажења (C1, C2 и C3) су направљена у односу на концентрацију витамина Бе1, док су концентрације осталих Бе витамина прерачунате на основу познатих концентрација присутних у комплексу (табела 3). Као контрола коришћене су ћелије стимулисане само ЛПС-ом, култивисане у комплетном медијуму.

**Табела 3.** Концентрације комплекса витамина Бе коришћених за *in vitro* анализу.

Бе витамини	C1 ( $\mu\text{M}$ )	C2 ( $\mu\text{M}$ )	C3 ( $\mu\text{M}$ )
Бе <sub>1</sub>	50	100	250
Бе <sub>2</sub>	3,52	7,04	17,62
Бе <sub>3</sub>	344	688	1720
Бе <sub>5</sub>	8,84	17,68	44,22
Бе <sub>6</sub>	16,36	32,72	81,80
Бе <sub>12</sub>	$1,24 \times 10^{-3}$	$2,48 \times 10^{-3}$	$6,22 \times 10^{-3}$

### 3.5.3 Одређивање метаболичке активности ћелија МТТ тестом

Ефекти комплекса витамина Бе на метаболичку активност ћелија одређени су МТТ колориметријским тестом. Код метаболички активних ћелија, у присуству митохондријалног ензима *NADPH*-зависне оксидоредуктазе, МТТ – жута тетразолијумова со редукује се у једињење љубичасте боје – формазан [137]. Количина продукованог формазана, односно интензитет љубичасте боје, пропорционалан је проценту (%) метаболички активних ћелија. Након периода инкубације од 48 h, из сваког бунарића је одливано 100  $\mu\text{L}$  медијума и додато је 10  $\mu\text{L}$  МТТ раствора (5 mg/mL). Након 3 h инкубације (на 37 °C у влажној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>), додато је 100  $\mu\text{L}$  10% SDS са 1 N хлороводоничном киселином за заустављање реакције. Након растварања преципитираних кристала формазана, апсорбанца је измерена на 540 nm употребом аутоматског читача апсорбанци за микротитарске плоче (*LKB 5060-006, LKB Instruments*, Аустрија). Резултати су представљени као % метаболичке активности (један репрезентативан експеримент од три независна експеримента, рађених у кватрипликату), у односу на нестимулисане ћелије чија је метаболичка активност означена као 100%.

### 3.5.4 Одређивање продукције реактивних врста кисеоника НБТ тестом

Ефекат комплекса витамина Бе на продукцију реактивних врста кисеоника (РОК) испитан је применом НБТ теста. НБТ је колориметријски тест који се користи за одређивање продукције РОК (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sup>•</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). У присуству РОК, НБТ – жуто обојена со, редукује се у једињење љубичасте боје – формазан. Количина добијеног формазана,

односно интензитет љубичасте боје, пропорционална је концентрацији продукованих РОК [138]. Поставка експеримента била је идентична оној која је коришћена за МТТ тест. Након инкубације од 48 h, из сваког бунарића одливано је 100  $\mu\text{L}$  медијума и додато је 10  $\mu\text{L}$  НБТ раствора (5 mg/mL). Након 3 h инкубације (на 37 °C у влажној атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>), додато је 100  $\mu\text{L}$  10% SDS са 1 N хлороводоничном киселином за заустављање реакције. Након растварања преципитираних кристала формазана, мерена је апсорбанца на 540 nm употребом аутоматског читача апсорбанци за микротитарске плоче (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Резултати су изражени као средња вредност НБТ индекса, израчуната према апсорбанцама узорака рађених у кватрипликату (један репрезентативан експеримент од три независна експеримента), у односу на нестимулисане ћелије чији је индекс означен као 1.

### 3.5.5 Одређивање продукције азот-моноксида (нитрита) Griess-овим тестом

Ефекат комплекса витамина Бе на продукцију азот-моноксида (NO) испитиван је применом Griess-овог теста. Принцип Griess-ове реакције заснива се на мерењу концентрације нитрита, као крајњег продукта краткоживећег NO. Griess-ов реагенс се састоји од две компоненте, *N*-1-нафтилетилендиамин-дихидрохлорид растворен у води (реагенс А) и сулфаниламид у 5% фосфорној киселини (реагенс Б). Након периода инкубације од 48 h, у 50  $\mu\text{L}$  супернатанта је додато 50  $\mu\text{L}$  Griess-овог реагенса (А:Б = 1:1). Након 10 минута инкубације у мраку, мерена је апсорбанца раствора на таласној дужини од 520 nm, употребом аутоматског читача апсорбанци за микротитарске плоче (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Уколико су у узорку присутни нитритни јони долази до формирања диазонијум соли и ружичастог обојења раствора чији је интензитет директно пропорционалан концентрацији нитрита у испитиваном узорку, а индиректно концентрацији продукованог NO [139]. Резултати су представљени као концентрација NO изражена у  $\mu\text{M}$  (један репрезентативан експеримент од три независна експеримента, рађених у кватрипликату), у односу на контролу, нестимулисане ћелије.

### 3.5.6 Модел трансфера супернатаната третираних BV2 ћелија неуронским ћелијама

Ефекат комплекса витамина Бе на метаболичку активност неурона испитан је применом модела трансфера супернатаната ћелијске културе [139]. У овом моделу, супернатант који садржи солубилне продукте секретоване од стране ЛПС-ом

активирани микроглије, у присуству и у одсуству комплекса витамина Бе, преноси се неуронским ћелијама. Ефекат супернатанта културе и потенцијална неуропротективна активност комплекса витамина Бе процењена је мерењем метаболичке активности неурона. Након третмана ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија комплексом витамина Бе (као што је описано у поглављу 3.5.2), 100  $\mu\text{L}$  супернатанта је пребачено у микротитарску плочу са 96 бунарића, засејану неуронским ћелијама SH-SY5Y (у густини од  $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Микротитарске плоче су инкубирани 24 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) и затим је одређена метаболичка активност неурона применом МТТ теста (као што је описано у поглављу 3.5.3).

### 3.5.7 Одређивање продукције цитокина ELISA тестом

Ефекат комплекса витамина Бе на продукцију про-инфламаторних цитокина *TNF- $\alpha$*  и *IL-6* од стране ЛПС-ом стимулираних ћелија микроглије испитиван је применом ензимског имуносорбентног теста (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*). *ELISA* тестови омогућавају детекцију антигена/антитела у течним узорцима применом специфичног антитела обележеног ензимом [140]. Принцип визуелизације заснива се на промени боје супстрата под дејством ензима која се детектује на спектрофотометру. Испитивани узорци били су супернатанти ЛПС-ом стимулираних ћелија микроглије, као и супернатанти стимулираних ћелија микроглије третираних витаминима Бе комплекса. У овом тесту примењена је директна „сендвич“ *ELISA*, у којој је микротитарска плоча обложена хватајућим антителом које препознаје епитоп испитиваног антигена од интереса. Детектујуће антитело које препознаје други епитоп истог антигена, обележено је ензимом, што омогућава детекцију антигена у испитиваном узорку, уз додатак одговарајућег супстрата.

За одређивање нивоа *IL-6* цитокина, микротитарска плоча са 96 бунарића обложена је хватајућим антителом (100  $\mu\text{L}$  по бунарићу) разблаженим 1:120 у *PBS*-у, док је за одређивање нивоа *TNF- $\alpha$*  цитокина, хватајуће антитело разблажено 1:125 у *PBS*-у. Након инкубације преко ноћи на +4 °C, плоче су испране пуфером за испирање (3 x 200  $\mu\text{L}$  0,05% *Tween 20/PBS*). За сатурацију плоче, односно блокирање неспецифичних места везивања, додато је 200  $\mu\text{L}$  1% *BSA/PBS* по бунарићу и инкубирано 1 h на собној температури. Након испирања плоча пуфером за испирање, у бунариће су наливени узорци или стандарди (100  $\mu\text{L}$ ) и плоча је инкубирана 2 h на собној температури. Стандард за *TNF- $\alpha$*  цитокин је припремљен у опсегу 31,3-2000

pg/mL, док је стандард за *IL-6* цитокин тестиран у опсегу 15,6-1000 pg/mL. Након поновног испирања, у бунариће је наливено 100  $\mu$ L антитела конјугованог биотином, разблаженог 1:60 у 1% *BSA/PBS* и плоча је инкубирана 2 h на собној температури. Након испирања плоча пуфером за испирање, додат је СтрептАвидин-*HRP* разблажен 1:40 у 1% *BSA/PBS* и инкубиран 20 минута на собној температури. Након испирања, у бунариће наливено је 100  $\mu$ L ТМБ супстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и плоча је инкубирана у мраку. Након развијања боје, реакција је прекинута наливањем 50  $\mu$ L 2N  $H_2SO_4$  у бунариће. Прекидом реакције, апсорбанца насталог жуто обојеног раствора мерена је на 450 nm на спектрофотометру (*LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија*).

### **3.5.8 Фенотипска анализа ћелија проточном цитофлуориметријом**

Флуоресцентно сортирање ћелија (енгл. *Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*) омогућава квантитативно сортирање ћелија на основу специфичних карактеристика сваке ћелије (величина/сложеност-ћелија) и пружа информације о постојећим променама у експресији одговарајућих маркера. Принцип анализе заснива се на флуоресцентном обележавању површине ћелија или интрацелуларних структура употребом антитела обележених одговарајућом флуорохромом. Овако обележене ћелије у суспензији пролазе кроз канал у струји течности (млазу) кроз који пролази један или више ласерских снопова. Мерење емитоване светлости (флуоресценције) се детектује помоћу фотомултипликаторских цеви након чега се сигнали учитавају и обрађују одговарајућим софтвером [141].

Како би се испитао ефекат комплекса витамина Бе на експресију специфичних површинских и интрацелуларних маркера присутних код ЛПС-ом стимулираних ћелија микроглије, урађена је фенотипска анализа применом проточне цитометрије. Фенотипска анализа комплексом витамина Бе третираних ћелија микроглије изведена је на *BD LSRII* проточном цитометру (*BD Biosciences*). Након поступка трипсинизације, припремљене су ћелијске суспензије. Пре поступка бојења ћелија, ћелије су испране једном у *PBS*-у и инкубиране у присуству 2% мишјег серума током 15 минута на 4 °C. За поступак површинског бојења, ћелије су инкубиране са антителима припремљеним у препорученим разблажењима у *PBS*-у који је садржао 0,01%  $NaN_3$  (табела 4). За детекцију интрацелуларних маркера, ћелије су даље припремљене према упутству из комерцијално доступног комплета за фиксацију и пермеабилizацију (*R&D Systems*) са антителима припремљеним у препорученим разблажењима (табела 4). Након испирања

ћелија у *PBS*-у, ћелије су ресуспендоване у 0,5 mL фиксационог пуфера и инкубиране током 20 минута. Након фиксације, ћелије су испране и додато је 100  $\mu$ L пуфера за пермеабилizацију. Затим су додата антитела у одговарајућој концентрацији и ћелије су инкубиране током 30 минута на 4 °C. Након инкубације, ћелије су испране пуфером за пермеабилizацију. За сваку анализу одабрано је више од 10 000 ћелија према њиховим специфичним *SSC/FSC* својствима (енгл. *Side-scatter, SSC*; *Forward-scatter, FSC*), уз уклањање дублета. Преклапање сигнала између канала је компензовано пре сваког експеримента коришћењем појединачних обележених ћелија; неспецифична флуоресценција је одређена коришћењем одговарајућих изотипских контрола као и контрола за вишеструка обојења које обухватају све флуорохроме које су се користиле (енгл. *Fluorochrome minus one control*).

**Табела 4.** Карактеристике коришћених антитела за фенотипску анализу применом проточне цитометрије.

Специфичност	Флуоресцентни конјугат	Порекло/Изотип	Произвођач
<i>CX3CR1</i>	<i>Phycoerythrin Cyanine PE-Cy7</i>	Миш/IgG2а, к	<i>BioLegend</i>
<i>Arginase I</i>	<i>Phycoerythrin Cyanine PE-Cy7</i>	Миш/IgG2b, к	<i>BioLegend</i>
<i>Ly-6C</i>	<i>Alexa Fluor 647</i>	Пацов/IgG2с, к	<i>BioLegend</i>
<i>CD85k</i>	<i>Alexa Fluor 647</i>	Миш/IgG1, к	<i>BioLegend</i>
<i>CD11b</i>	<i>Phycoerythrin Cyanine PE-Cy7</i>	Пацов/IgG2b, к	<i>BioLegend</i>
<i>CD11c</i>	<i>Allophycocyanin APC-Cy7</i>	Хрчак/ IgG	<i>BioLegend</i>
<i>CD86</i>	<i>Phycoerythrin Cyanine PE-Cy5</i>	Пацов/IgG2а, к	<i>eBioscience</i>
<i>CD86</i>	<i>Allophycocyanin (APC)</i>	Пацов/IgG2а, к	<i>Invitrogen</i>
<i>CD163</i>	<i>Phycoerythrin (PE)</i>	Зеџ/IgG	<i>Bioss</i>
<i>IL-4</i>	<i>Alexa Fluor 488</i>	Пацов/IgG1, к	<i>BioLegend</i>
<i>NRF2</i>	<i>Alexa Fluor 488</i>	Зеџ/IgG	<i>Cell Signalling Technology</i>



**Табела 5.** Карактеристике коришћених изотипских контрола за фенотипску анализу применом проточне цитометрије.

Антитело	Флуоресцентни конјугат	Порекло/Изотип	Произвођач
<b>IgG1</b>	<i>Phycoerythrin (PE)</i>	Миш/IgG1, κ	<i>BioLegend</i>
<b>IgG1</b>	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)</i>	Миш/IgG1, κ	<i>BioLegend</i>
<b>IgG1</b>	<i>Allophycocyanin (APC)</i>	Миш/IgG1, κ	<i>BioLegend</i>
<b>IgG1</b>	<i>APC-Cyanine7 (Cy7)</i>	Миш/IgG1, κ	<i>BioLegend</i>
<b>IgG1</b>	<i>Alexa Fluor 488</i>	Миш/IgG1, κ	<i>Invitrogen</i>
<b>IgG1</b>	<i>PE-Cy7</i>	Миш/IgG1	<i>Invitrogen</i>

### 3.6 Молекулски докинг

Молекулски докинг је техника која омогућава предвиђање механизма интеракција између два или више молекула. На основу анализе молекулског докинга могуће је проценити јачину интеракција и могућих конформација између испитиваног лиганда и протеина од интереса. На овај начин могу се одабрати лиганди који имају најповољније структурне и енергетске карактеристике за формирање стабилног комплекса са испитиваним протеином [142].

#### 3.6.1 Припрема протеина и лиганда за анализу

У циљу утврђивања потенцијалног анти-инфламаторног механизма деловања комплекса витамина Бе, урађена је анализа молекулског докинга. Испитане су интеракције структурно различитих витамина Бе са активним местом протеина укључених у ЛПС-ом индукован сигнални пут активације ћелија микроглије. На основу анализе молекулског докинга, предвиђен је афинитет везивања витамина Бе комплекса и аминокиселинских остатака активних места протеина од интереса: ЛПС-везујући протеин (енгл. *LPS-binding protein, LBP*; *Protein Data Bank identifier (PDB ID): 4M4D*), кластер диференцијације 14 (енгл. *Cluster of differentiation, CD14*; *PDB ID: 1WWL*), рецептор сличан *Toll*-у 4/мијелоидни фактор диференцијације 2 комплекс (енгл. *Toll like receptor, TLR4/Myeloid factor of differentiation, MD2*; *PDB ID: 3VQ2*) и индуцибилна азот оксидаза (енгл. *Inducible nitric oxide synthase, iNOS*; *PDB ID: 1QW4*).

Тродимензионалне структуре протеина коришћених за ову анализу преузете су из базе која садржи податаке о 3D структури биолошких макромолекула – *RCSB Protein Data Bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) у *.pdb* формату. Пре анализе протеини су припремљени у програму *BIOVIA Discovery Studio 2021* [143], тако што су уклоњени сви лиганди, молекули воде и кофактори, док су аминокиселински остаци који су недостајали (у случају *CD14* протеина) додавани у програму *Modeller 10.1* [144]. За подешавање протонације хистидина у складу са рН експеримента, додавање поларних водоника и *Kollman*-ових наелектрисања протеинима примењен је *AutoDockTools* (*ADT*) програм [145].

Све испитиване структуре витамина Бе преузете су у *.sdf* форматима из *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) базе података, док је структура за витамин Бе12 преузета из *RCSB Protein Data Bank* базе података (*PDB ID: 5YSC*). Геометрија лиганада је додатно оптимизована применом *UFF* (енгл. *Universal Force Field*) имплементираног у *Avogadro* софтверу. Енергије лиганада су минимизоване како би се осигурало да се енергетски најнижа структура користи за анализу молекулског докинга, а *Gasteiger*-ова наелектрисања су додата лигандима коришћењем *ADT* графичког интерфејса [145].

### 3.6.2 Докинг процедура

Симулација молекулског докинга рађена је у софтверу *AutoDock* (верзија 4.2.6) опремљеним *ADT* графичким интерфејсом. Пре саме анализе, за сваки протеин подешене су димензије координатне мреже (енгл. *Gridbox*) према позицијама аминокиселина укључених у везивање ЛПС-а (N- и C-терминални регион *LBP* и *CD14* протеина; A, B и C ланац *TLR4/MD2* комплекса), као и активно место *iNOS* ензима. За *LBP* N-терминал координате су биле (X= -13,959, Y= -47,977, Z= 101,043) и C-терминал (X= 41,7, Y= -9,01, Z= 15,376); за *CD14* N- терминал (X= 21,823, Y= 47,806, Z= -5,189) и C- терминал (X= 14,392, Y= 11,095, Z= 11,885); за *TLR4/MD2* X= -28,830, Y= -15,412, Z= 22,638 и за *iNOS* (X= -55,258, Y= 135,368, Z= 43,323). За *LBP*, *TLR4/MD2* и *iNOS* димензије x, y и z координатне мреже биле су 60 Å × 60 Å × 60 Å, док су за *CD14* биле 70 Å × 70 Å × 70 Å, са тачкама на удаљености од 0,375 Å. Због комплексне структуре витамина Бе12 димензије x, y и z координатне мреже су повећане на 90 Å × 90 Å × 90 Å када је у питању овај витамин. За сваки испитивани витамин Бе, симулирано је 200 различитих конформација, док су сви остали параметри подешени

на подразумеване вредности. За одређивање енергетски најповољнијих конформација испитиваних витамина Бе комплекса и активног места испитиваних протеина, коришћен је *Lamarckian*-ов генетски алгоритам, након чега су одабране конформације са најнижом енергијом добијеном за највећи број кластера. Добијени резултати су анализирани и визуелизовани коришћењем *BIOVIA Discovery Studio 2021* и *ADT* програма. Како би се потврдила валидност резултата, изведена је анализа молекулског докинга лиганда који су присутни у кристалној структури *LBP*, *TLR4/MD2* и *iNOS* протеина (1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин за *LBP*, 2-деокси-3-О-(3P)-3-хидрокситетрадеканол]-2-(3P)-3-хидрокситетрадеканол-4-О фосфоно-β-D-глюкопираноза за *TLR4/MD2* и N-омега-пропил-L-аргинин за *iNOS*), према горе описаном протоколу [146]. Након тога, израчуната је вредност корена средњег квадрата одступања (енгл. *Root Mean Square Deviation, RMSD*) између „доковане“ и кристалне конформације. У резултатима су представљене вредности Гибсове слободне енергије везивања лиганда ( $\Delta G$ ) и константа инхибиције ( $K_i$ ). Слободна Гибсова енергија се често користи за процену јачине везивања између молекула лиганда и циљног протеина. Уз вредност Гибсове енергије, као мера процене стабилности формираног комплекса користи се и константа инхибиције ( $K_i$ ) која представља параметар који описује јачину везивања између рецептора и одговарајућег лиганда. Висока вредност  $K_i$  указује на слабо везивање лиганда за циљни протеин, док ниска вредност  $K_i$  указује на снажно везивање.

### 3.7 Статистичка анализа

Резултати *in vivo* истраживања приказани су као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Резултати *in vitro* истраживања приказани су као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка једног репрезентативног експеримента (урађеног у кватрипликату) од урађена три независна експеримента. Приликом обраде података коришћени су одговарајући статистички тестови за анализу добијених резултата у склопу *SPSS* (енгл. *Statistical Package for the Social Sciences*), *Microeco* и *LEfSe* статистичких пакета. У случају поређења две групе коришћен је Т-тест, док је за поређење више група коришћен *Kruskal Wallis* или *ANOVA* тест (минимална вредност вероватноће  $p < 0,05$  је сматрана као значајна).

## **4 РЕЗУЛТАТИ**

#### 4.1 Утицај комплекса витамина Бе на клиничку слику и прогресију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис индукован је пацовима *DA* соја, конвенционалним протоколом имунизације, употребом енцефалитогене емулзије за имунизацију добијене мешањем једнаких делова хомогената кичмених мождина пацова истог соја (50% w/v у физиолошком раствору) и комплетног Фројндовога адјуванса. Сви имунизовани пацови у експерименталној (**E**) групи (17/17) су развили акутну монофазну болест, док је 17/18 пацова у експерименталној групи третираној витаминима Бе комплекса (**ET**) развило клиничке знаке ЕАЕ. Животиње којима је убризган само комплетни Фројндов адјуванс (**СFA** група) нису развиле клиничке знаке болести (0/6).

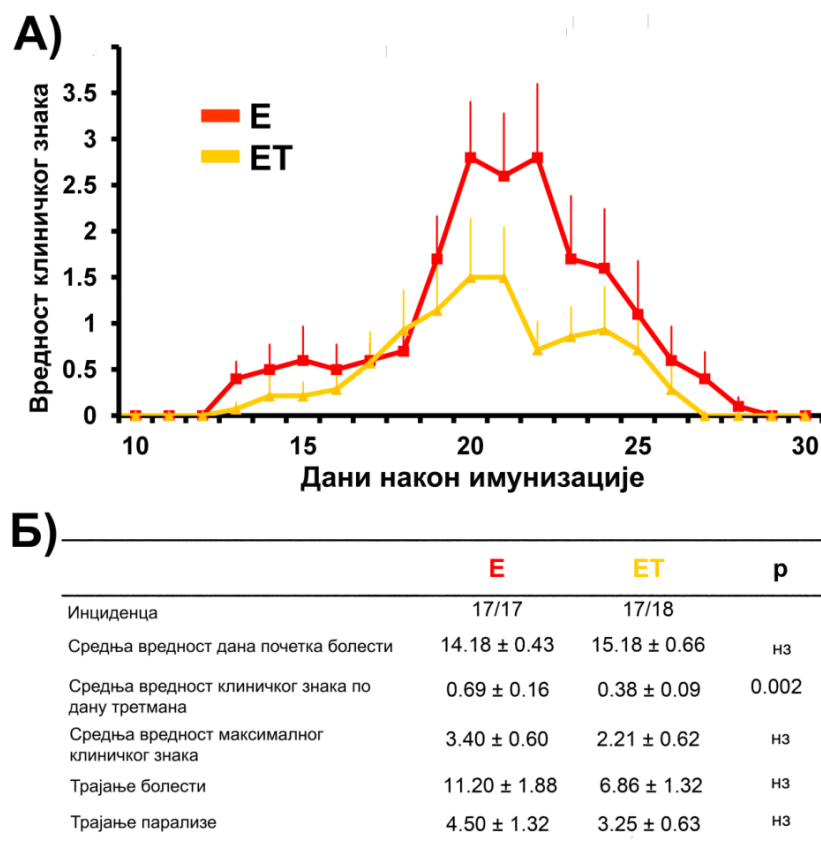
Током трајања болести, код сваке појединачне животиње праћени су клинички знаци болести и следећи параметри са средњим вредностима су представљени у табели у оквиру слике б:

- Инциденца болести (број животиња које су развиле било који клинички знак након индукције ЕАЕ);
- Дан почетка развоја болести (дан када су детектовани први клинички знаци болести);
- Скор вредности процењиваних клиничких знакова болести на дневном нивоу;
- Максимална вредност клиничког знака током трајања болести;
- Трајање болести (број дана када је код животиња детектовано присуство клиничких знакова болести);
- Трајање парализе (број дана када су животиње имале парализу);

Индекс тежине болести = (максимална вредност клиничког знака) × (трајање болести) × (инциденца).

У **E** групи, први клинички знаци у просеку су примећени  $14 \pm 0,43$  дана након имунизације, док су животиње из **ET** групе прве клиничке знаке у просеку испољиле  $15 \pm 0,66$  дана након имунизације. Током периода опоравка, клинички знаци су се постепено смањивали код свих животиња у свим групама. ЕАЕ животиње третиране КВБ (**ET** група) развиле су блажи облик болести (15,16), мерен индексом тежине болести (према формули: индекс тежине болести = средња вредност максималног

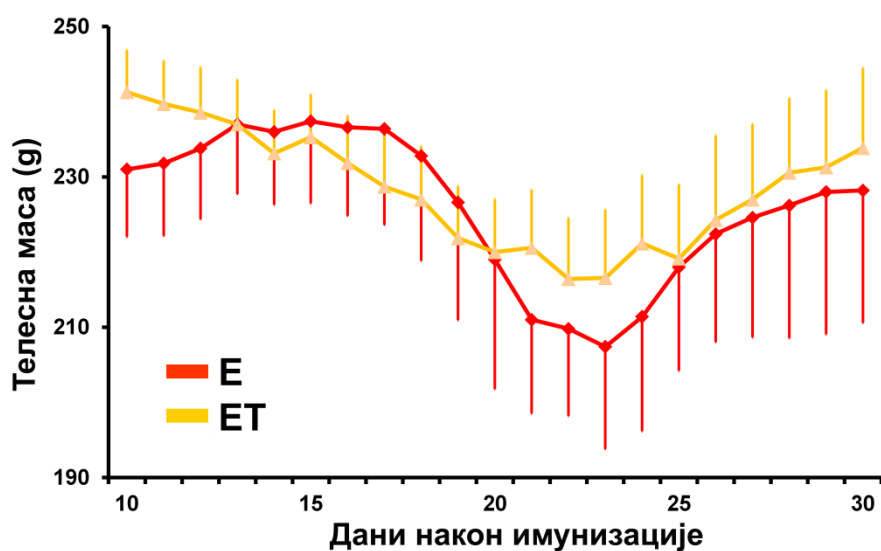
клиничког знака × трајање болести), у поређењу са нетретираним ЕАЕ животињама (Е група), код којих је индекс тежине болести био 38,08. Поред тога, третман витаминима Бе комплекса је довео до краћег трајања болести ( $6,86 \pm 1,32$  дана) у ЕТ групи, у односу на Е групу ( $11,20 \pm 1,88$  дана), али без статистичке значајности. Такође, средња вредност максималног клиничког знака у ЕТ групи ( $2,21 \pm 0,62$ ) је била нижа у поређењу са вредностима у Е групи ( $3,40 \pm 0,60$ ), а средњи скор клиничких знакова по дану је био статистички значајано мањи у ЕТ групи ( $0,38 \pm 0,09$ ) у односу на Е групу ( $0,69 \pm 0,16$ ) ( $p=0,002$ , слика 6). На графику на слици 6А се јасно уочава да је површина испод криве која приказује средње вредности клиничких знакова животиња током болести у Е групи, била већа у односу на површину испод криве за ЕТ групу. Овај ефекат комплекса витамина Бе на ток ЕАЕ-а додатно је потврђен поређењем површина испод крива за клинички ток болести појединачних животиња у групи Е ( $26,50 \pm 6,14$ ) и групи ЕТ ( $15,25 \pm 3,75$ ), чиме је показано да су површине испод криви за животиње ЕТ групе биле статистички значајно мање ( $p=0,03$ ) у поређењу са површинама испод криви за животиње Е групе.



**Слика 6. Клиничка слика и прогресија експерименталног аутоимунског енцефаломјелитиса.**

(А) Вредност клиничких знакова болести нетретираних ЕАЕ животиња (Е) наспрам ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) током прогресије болести. (Б) Утицај третмана витаминима Бе комплекса на параметре болести. Резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка; нз – није статистички значајно.

Додатно, тренд смањења телесне масе током прогресије болести је уочен у обе експерименталне групе животиња (Е и ЕТ). Међутим, поређењем средњих вредности телесне масе испитиваних група животиња, примећене су мање промене у телесној маси током прогресије болести код КВБ третираних ЕАЕ животиња (ЕТ) него у групи нетретираних ЕАЕ животиња (Е) (график 1). Ипак, ове промене нису биле статистички значајне, што је последица високе стандардне девијације, односно индивидуалних разлика у промени телесне масе међу животиња.



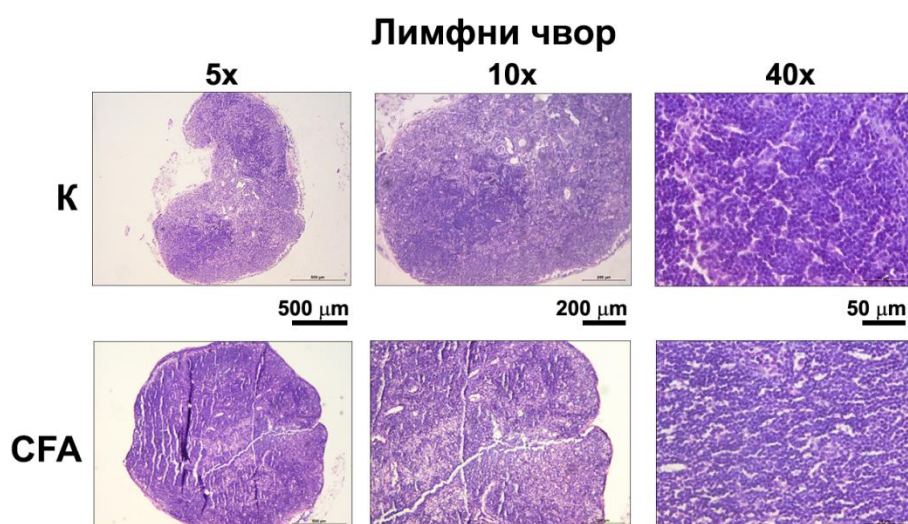
**График 1. Промене у телесној маси током прогресије експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.**

Нетретиране ЕАЕ животиње (Е) у поређењу са ЕАЕ животињама третираним витаминима Бе комплекса (ЕТ).

## 4.2 Хистоморфолошка анализа органа од интереса након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

### 4.2.1 Хистоморфолошка анализа поплитеалних лимфних чворова након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

Хистоморфолошка анализа пресека поплитеалних, дренажујућих лимфних чворова обе контролне групе, интактних животиња (**К**) и животиња којима је убризган само комплетни Фројндов адјуванс (**СФА**) представљена је на слици 7. Као што се уочава на пресецима ткива обојених хематоксилин/еозином, у кортексу лимфних чворова животиња из обе контролне групе налази се неколико примарних лимфних фоликула, углавном слабо развијених и без видљивих герминалних центара, који су били интензивно обојени.



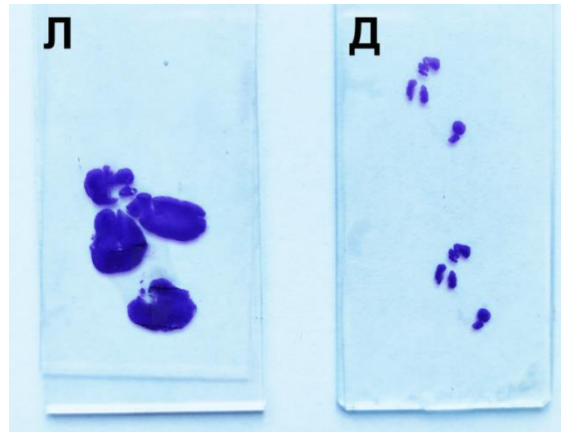
**Слика 7. Хистолошка анализа пресека поплитеалних лимфних чворова.**

Микрографије попречних пресека лимфних чворова контролне интактне групе животиња (**К**) и групе животиња које су примиле само комплетни Фројндов адјуванс (**СФА**).

Хематоксилин/еозин бојење. Увећање 5x (скала 500  $\mu\text{m}$ ), 10x (скала 200  $\mu\text{m}$ ) и 40x (скала 50  $\mu\text{m}$ ).

Као што је и очекивано, макроскопски видљива разлика у величини поплитеалних лимфних чворова левог и десног задњег екстремитета је примећена након индукције ЕАЕ (слика 8).

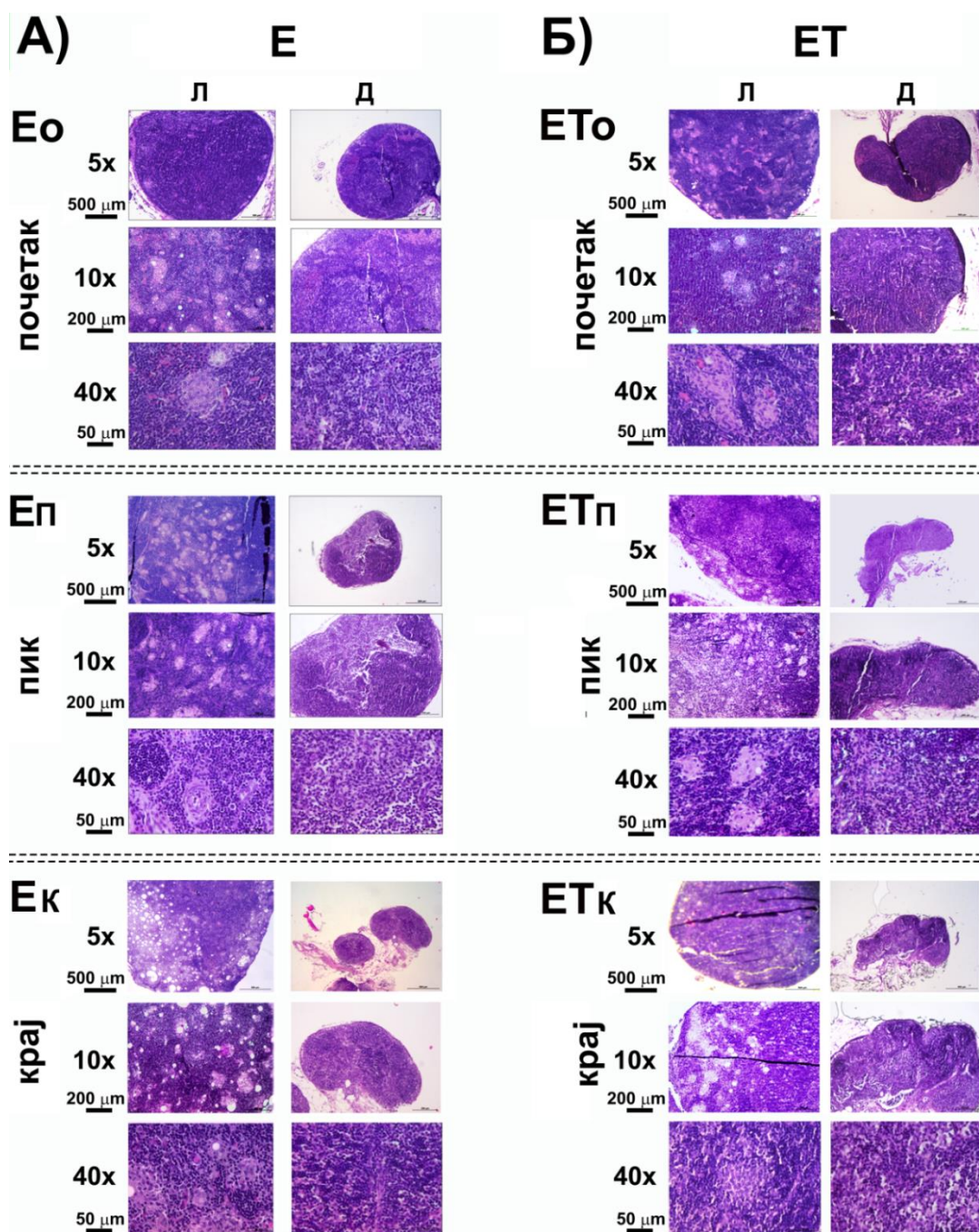




**Слика 8. Макроскопски изглед пресека поплитеалних лимфних чворова животиња којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис.**

Разлика између величине пресека поплитеалног лимфног чвора изолованог из левог (Л) и десног (Д) задњег екстремитета након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

На слици 9А је приказан хистоморфолошки преглед поплитеалних лимфних чворова изолованих из нетретираних животиња (Е група). Квалитативном анализом у лимфним чворовима изолованим у временској тачки означеној као почетак болести, **Ео** (енгл. *Onset* - **о**) уочено је смањење у дебљини кортекса са медуларном хиперплазијом, као и секундарни лимфни фоликули са истакнутим герминалним центром и мали епителоидни грануломи (слика 9А). Хистолошка анализа пресека поплитеалних лимфних чворова нетретираних животиња у пику болести (**Еп**), указала је на присуство великог броја ћелија који по морфолошкој процени припадају групи макрофага. Овај тип ћелија је распоређен по целом пресеку и простиру се до региона медуле. Такође, на увеличању 40х, примећени су и велики епителоидни грануломи који садрже епителоидне ћелије које формирају гранулом, окружен лимфоцитима, а уочена је и атрофија кортекса (слика 9А). Слична запажања су примећена и на пресецима лимфних чворова изолованих на крају болести (**Ек**), али са мањим бројем секундарних лимфоидних фоликула са герминативним центром и мањим епителоидним грануломима (слика 9А). Хистоморфолошком анализом пресека поплитеалних лимфних чворова животиња третираних витаминима Бе комплекса изолованих на почетку болести (**ЕТо** група), уочен је мањи број лимфоидних фоликула у зони кортекса, док су на пику и на крају болести детектовани епителоидни грануломи мање величине, у односу на Е групу (слика 9Б).

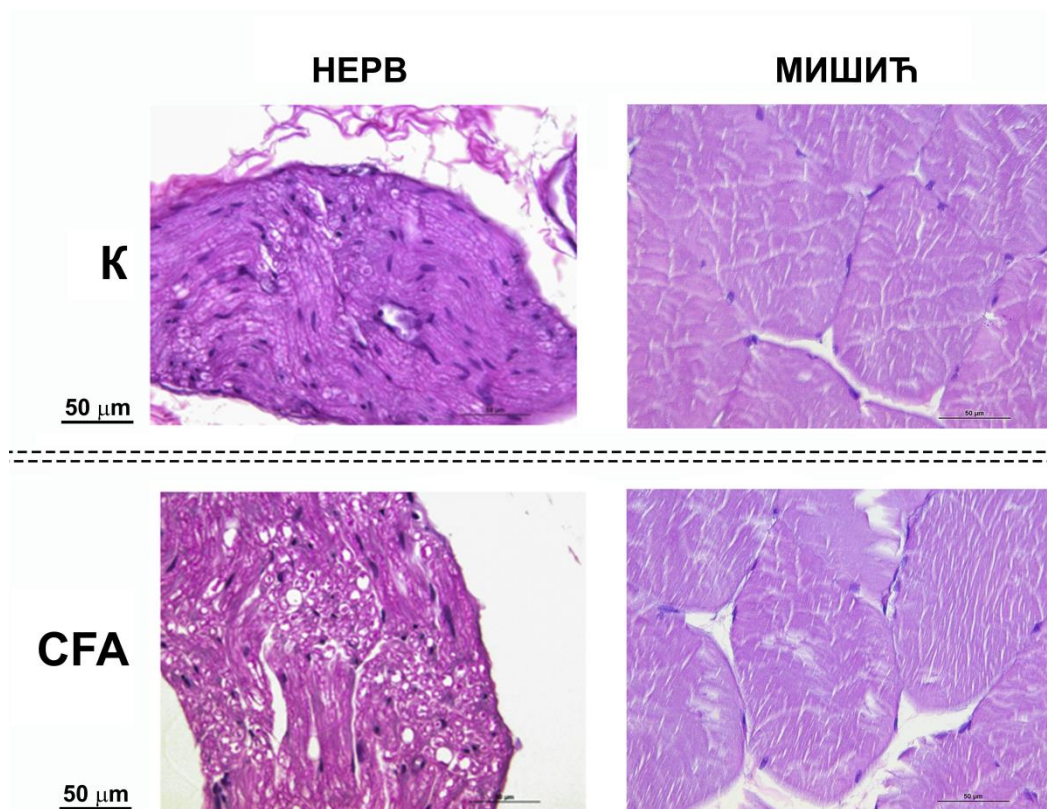


**Слика 9. Хистолошке промене у структури поплитеалних лимфних чворова.**

(А) Микрографије попречних пресека лимфних чворова изолованих из нетретираних ЕАЕ животиња (Е). (Б) Микрографије попречних пресека лимфних чворова изолованих из ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ). Л – леви лимфни чвор; Д – десни лимфни чвор; три различите временске тачке: почетак (о), пик (п) и крај (к) болести. Хематоксилин/еозин бојење. Увећање 5х (скала 500 μm), 10х (скала 200 μm) и 40х (скала 50 μm). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно четири анализирана пресека.

#### 4.2.2 Хистоморфолошка анализа и одређивање густине једара периферног нерва и мишића квадрицепса

Хистоморфолошка анализа густине једара периферног нерва и мишића квадрицепса за обе контролне групе (**К** и **СФА**) приказана је на слици 10.



**Слика 10. Густина једара периферног нерва и мишића квадрицепса контролних животиња.**

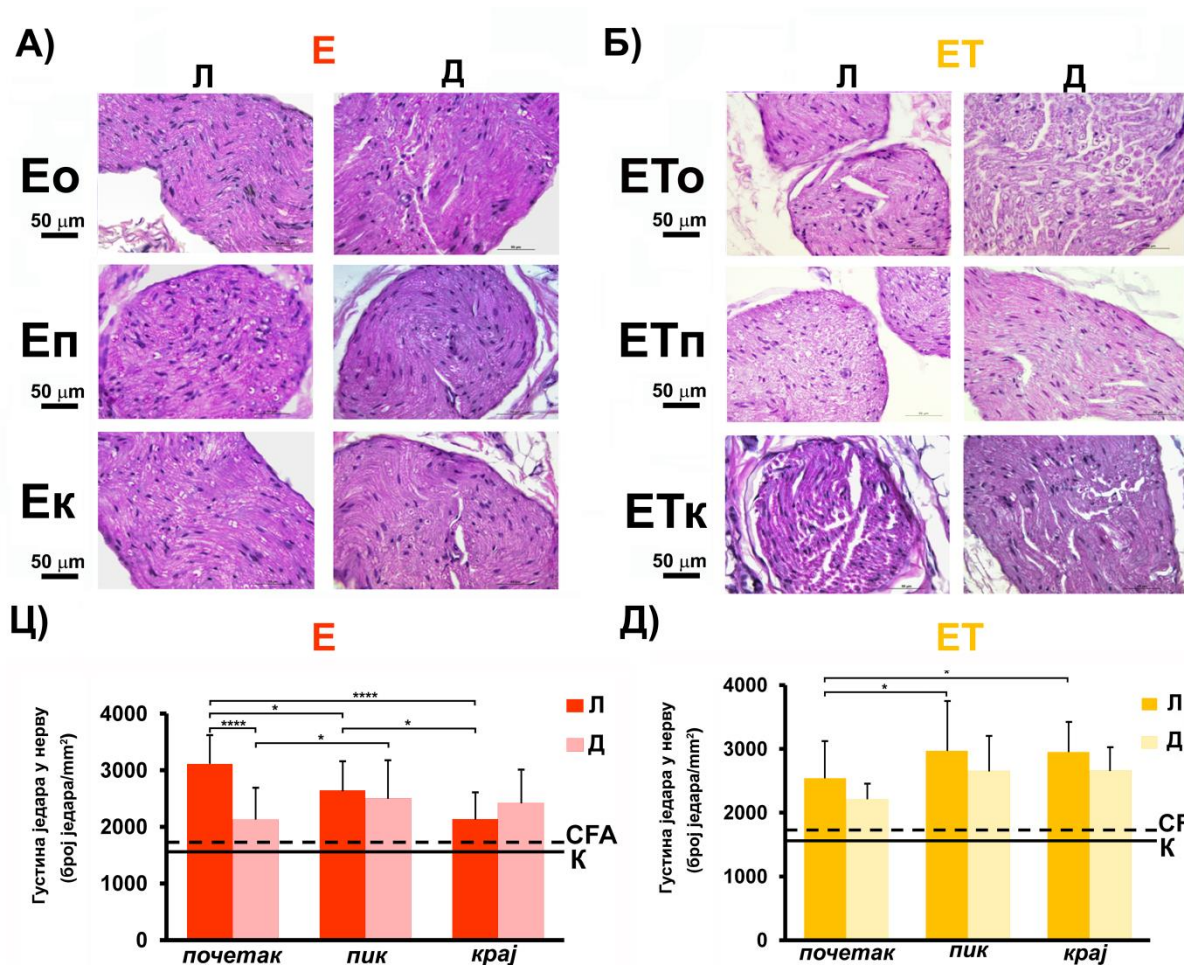
Микрографије попречних пресека периферног нерва и мишића квадрицепса контролне интактне групе животиња (**К**) и животиња које су примиле само комплетни Фројндов адјуванс (**СФА**). Хематоксилин/еозин бојење. Увећање 40x (скала 50  $\mu\text{m}$ ). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека за мишић и четири анализирани пресека за нерв.

##### 4.2.2.1 Промена густине једара у захваћеном периферном нерву

Микрографије попречних пресека феморалног нерва на којим се уочавају изражене промене густине једара представљене су на слици 11. Анализа густине једара изолованих феморалних нерава у три различите временске тачке тока болести, показала је да се у нетретираној групи ЕАЕ животиња (**Е**) ова карактеристика значајно



променила у односу на групу ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) (слика 11).

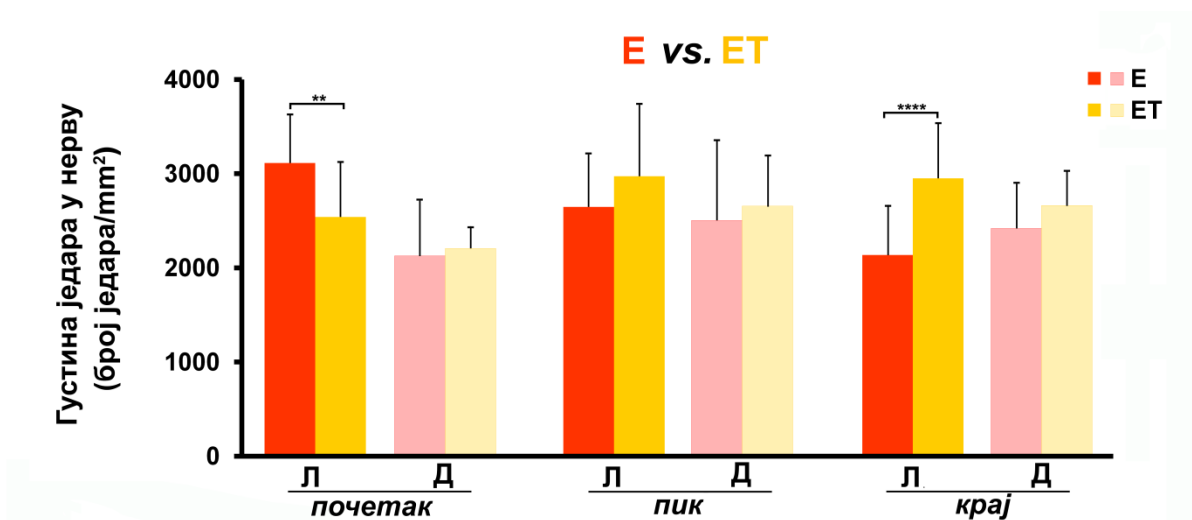


**Слика 11. Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара у феморалном нерву током прогресије ЕАЕ.**

Густина једара је праћена у три различите временске тачке: почетак (о), пик (п) и крај (к) болести. Контролна интактна група животиња (К); животиње које су примиле само комплетни Фројндов адјуванс (СФА); нетретиране ЕАЕ животиње (Е); ЕАЕ животиње третиране комплексом Бе витамина (ЕТ); леви (Л) и десни (Д) нерв. Хематоксилин/еозин бојење. Увећање 40х, скала 50  $\mu\text{m}$ . На графицима су резултати представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Приказане су репрезентативне микрографије од укупно четири анализирана пресека.

Анализом густине једара на хистолошким пресецима феморалног нерва нетретираних (Е) и животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ), уочено је значајно повећање густине једара у нерву у односу на густину једара у нерву код животиња из обе контролне групе (К и СФА,  $p < 0,01$ ). У групи ЕАЕ животиња на

почетку болести (**Е<sub>0</sub>**), у левом феморалном нерву уочен је значајан пораст броја једара/mm<sup>2</sup> (3112 ± 523) у поређењу са десним феморалним нервом (2127 ± 576,  $p < 0,001$ ) (слика 11Ц). Значајне промене у броју једара/mm<sup>2</sup> током пика болести примећене су у обе групе (**Е** и **ЕТ**) (Слика 11Ц и 11Д). Поред тога, број једара/mm<sup>2</sup> левог феморалног нерва на почетку болести у **ЕТ** групи био је значајно смањен (2540 ± 594), у поређењу са левим феморалним нервом у **Е** групи (3112 ± 523,  $p < 0,01$ ), график 2. Насупрот томе, на крају болести (**ЕТ<sub>к</sub>** група), уочено је повећање броја једара у левом феморалном нерву (2950 ± 480), у поређењу са **Е** групом (2136 ± 451,  $p < 0,001$ , график 2).

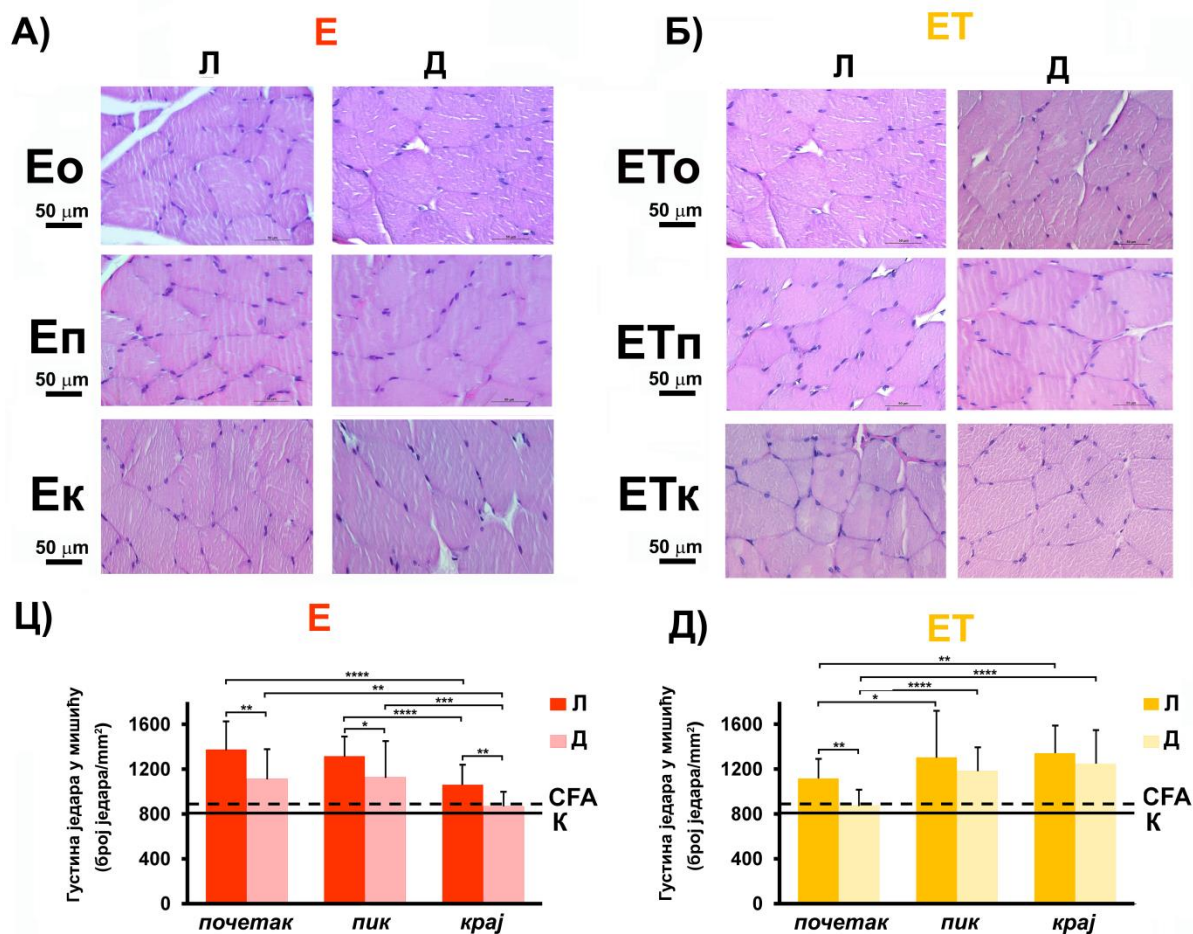


**График 2. Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара у феморалном нерву током прогресије ЕАЕ.**

Поређење промена у густини једара феморалног нерва између **Е** и **ЕТ** групе. Густина једара је праћена у три различите временске тачке: почетак (**о**), пик (**п**) и крај (**к**) болести. Леви (**Л**) и десни (**Д**) нерв. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2.2 Промена густине једара у захваћеном мишићу квадрицепса

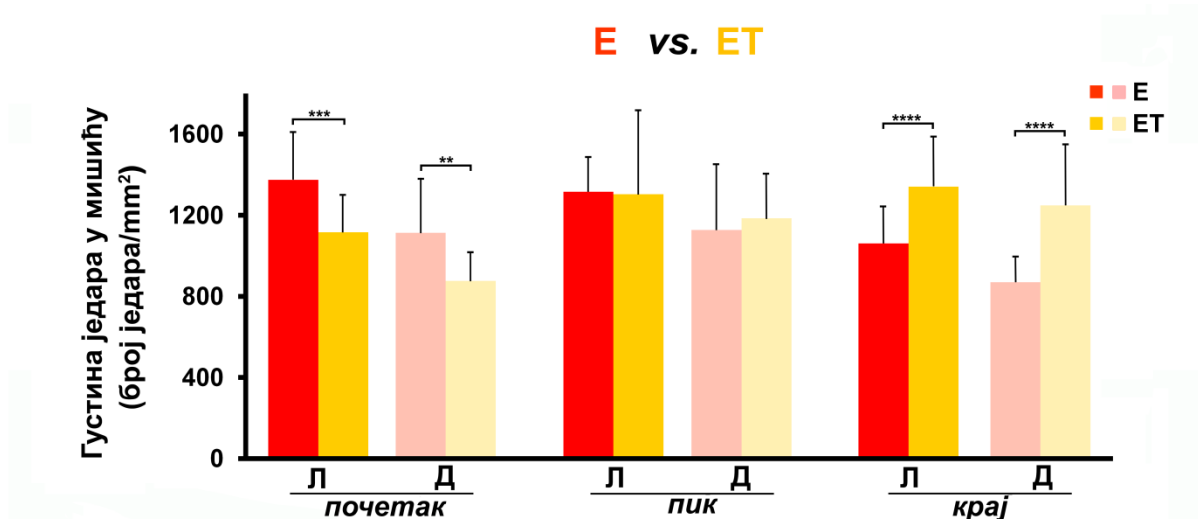
Микрографије попречних пресека мишића квадрицепса са уоченим истакнутим променама у густини једара представљене су на слици 12А и 12Б. Анализа густине једара у изолованим мишићима квадрицепса у различитим временским тачкама болести за обе групе (**Е** и **ЕТ**) указале су на значајно повећање ( $p < 0,0001$ ) густине једара у поређењу са контролним групама (**К** и **СФА**). За све временске тачке болести у **Е** групи и време почетка болести у **ЕТ** групи, уочено је значајно повећање густине једара у левом мишићу, у поређењу са десним мишићем (слика 12Ц и 12Д).



**Слика 12. Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара мишића квадрицепса током прогресије ЕАЕ.**

Густина једара је праћена у три различите временске тачке: почетак (о), пик (п) и крај (к) болести. Контролна интактна група животиња (К); животиње које су примиле само комплетни Фројндов адјуванс (СФА); леви (Л) и десни (Д) мишић. Хематоксилин/еозин бојење. Увећање 40x, скала 50  $\mu\text{m}$ . Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека.

Занимљиво је да су промене у мишићној густини једара пратиле исти тренд промена који је уочен за густину једара у нерву. Наиме, на почетку болести, у левом мишићу у ЕТ групи, примећено је смањење броја једара/ $\text{mm}^2$  ( $1116 \pm 180$ ), у поређењу са левим мишићем у Е групи ( $1375 \pm 255$ ). Насупрот томе, на крају болести, у левом мишићу у ЕТ групи, примећено је повећање броја једара/ $\text{mm}^2$  ( $1341 \pm 250$ ), у поређењу са левим мишићем у Е групи ( $1061 \pm 181$ ), слика 14. Такође, исти тренд је показан и за број једара/ $\text{mm}^2$  за десне мишиће из Е и ЕТ групе (график 3).



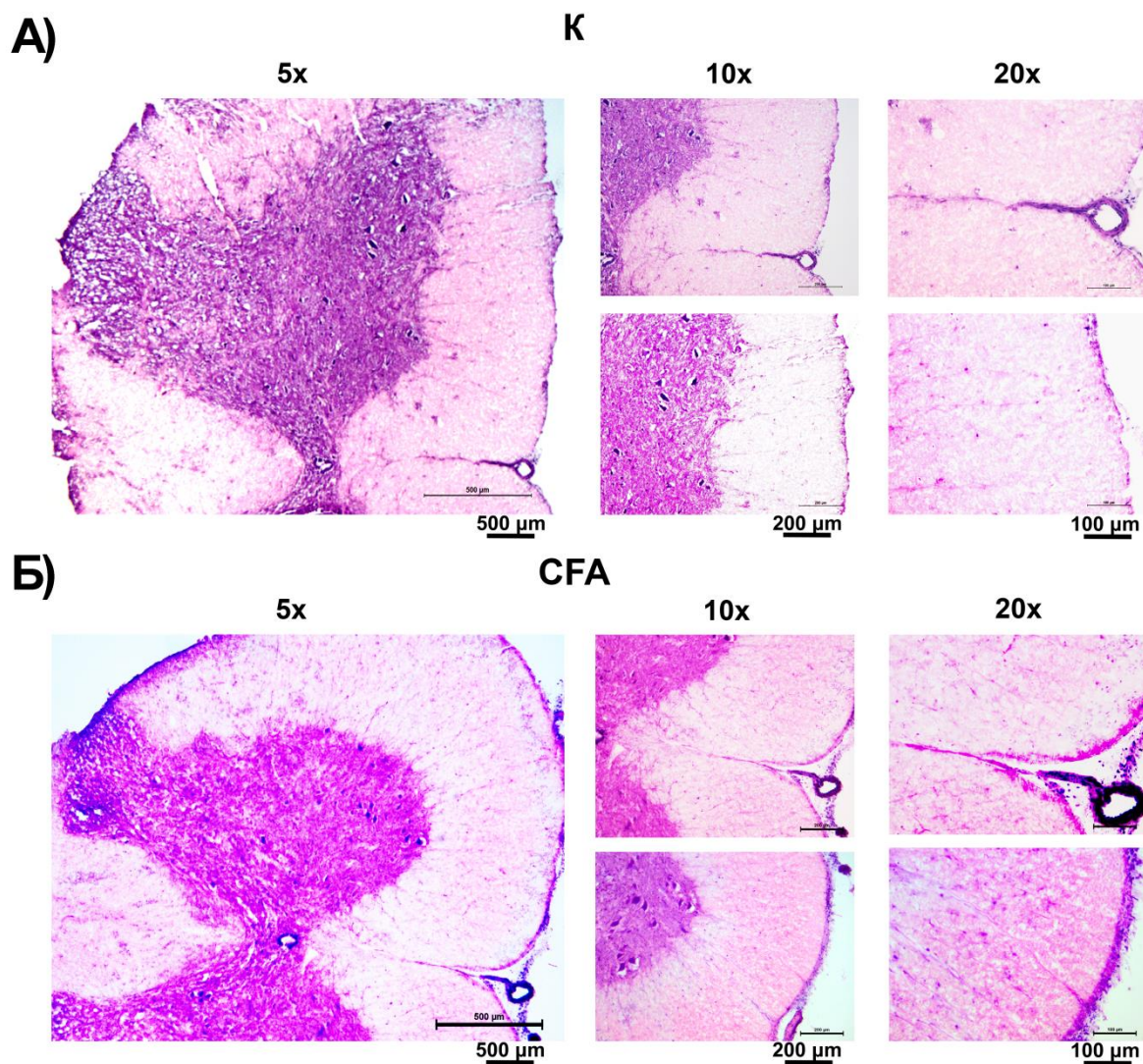
**График 3. Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара мишића квадрицепса током ЕАЕ.**

Поређење промена у густини једара мишића квадрицепса између Е и ЕТ групе. Густина једара је праћена у три различите временске тачке: почетак (о), пик (п) и крај (к) болести. Леви (Л) и десни (Д) нерв. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

#### **4.2.3 Хистоморфолошка анализа кичмене мождине након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса**

За испитивање ефекта третмана витаминима Бе комплекса на степен инфилтрације ћелија у кичменој моздини током прогресије ЕАЕ, серија ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине обојена је хематоксилин/еозином. Репрезентативне микрографије настале коришћењем различитих увећања (5x, 10x и 20x) (слике 14-16) указују на разлике у присуству и локализацији инфилтрата ћелија између нетретираних (Е) и животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ). Морфолошким анализом инфилтрата ћелија уочава се присуство различитих имунских ћелија, као што су моноклеарне ћелије (макрофаги и лимфоцити), као и полиморфонуклеарни леукоцити. Хистоморфолошким анализом ткивних пресека кичмене мождине утврђено је повећање инфилтрације ћелија у латералним и вентралним деловима беле масе кичмене мождине (слике 15-17), које се не детектује у контролним групама животиња (К и СФА) (слика 13).





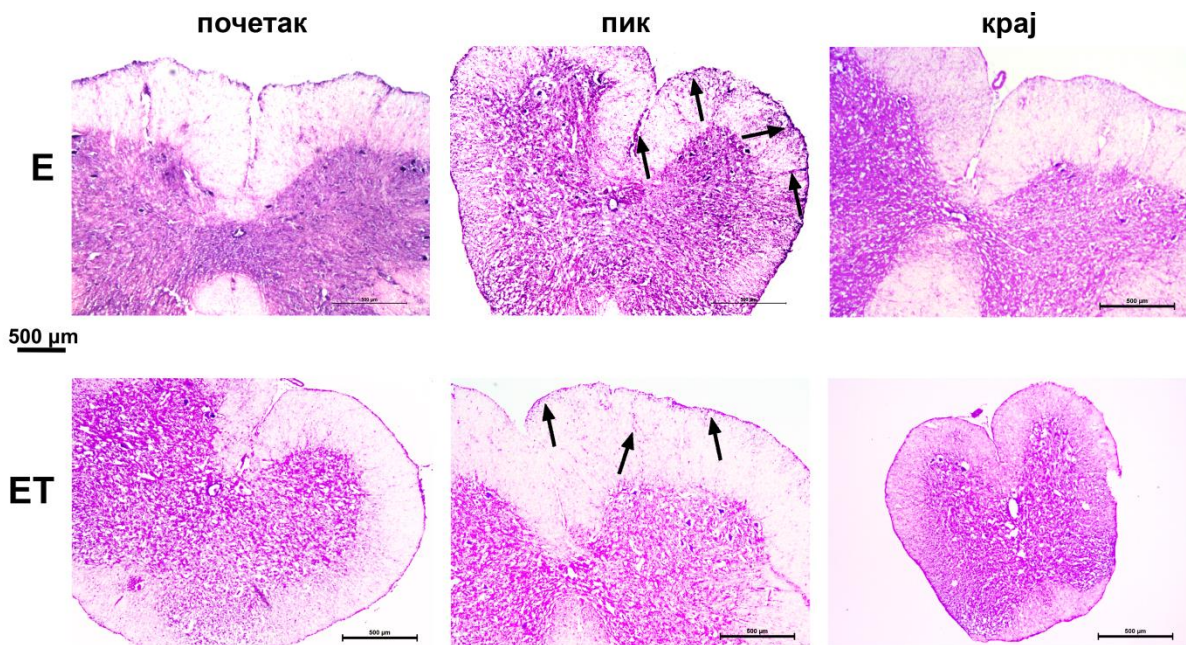
**Слика 13. Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене  
 мождине контролних животиња.**

(А) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине изоловане из контролне групе животиње (К). (Б) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине изоловане из СФА групе животиња. Хематоксилин-еозин бојење, увећање 5x (скала 500  $\mu\text{m}$ ), 10x (скала 200  $\mu\text{m}$ ) и 20x (скала 100  $\mu\text{m}$ ). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).

Као што се са микрографија лумбалног дела кичмене мождине животиња уочава, на почетку болести детектована је повећана инфилтрација инфламаторних ћелија у делу предње фисуре и уз овојницу кичмене мождине код ЕАЕ животиња из Е групе у односу на ЕТ групу. Најзначајнија разлика детектована је у пику болести (слике 14-16), где се примећује интензивно обојена област инфилтрата ћелија, у делу



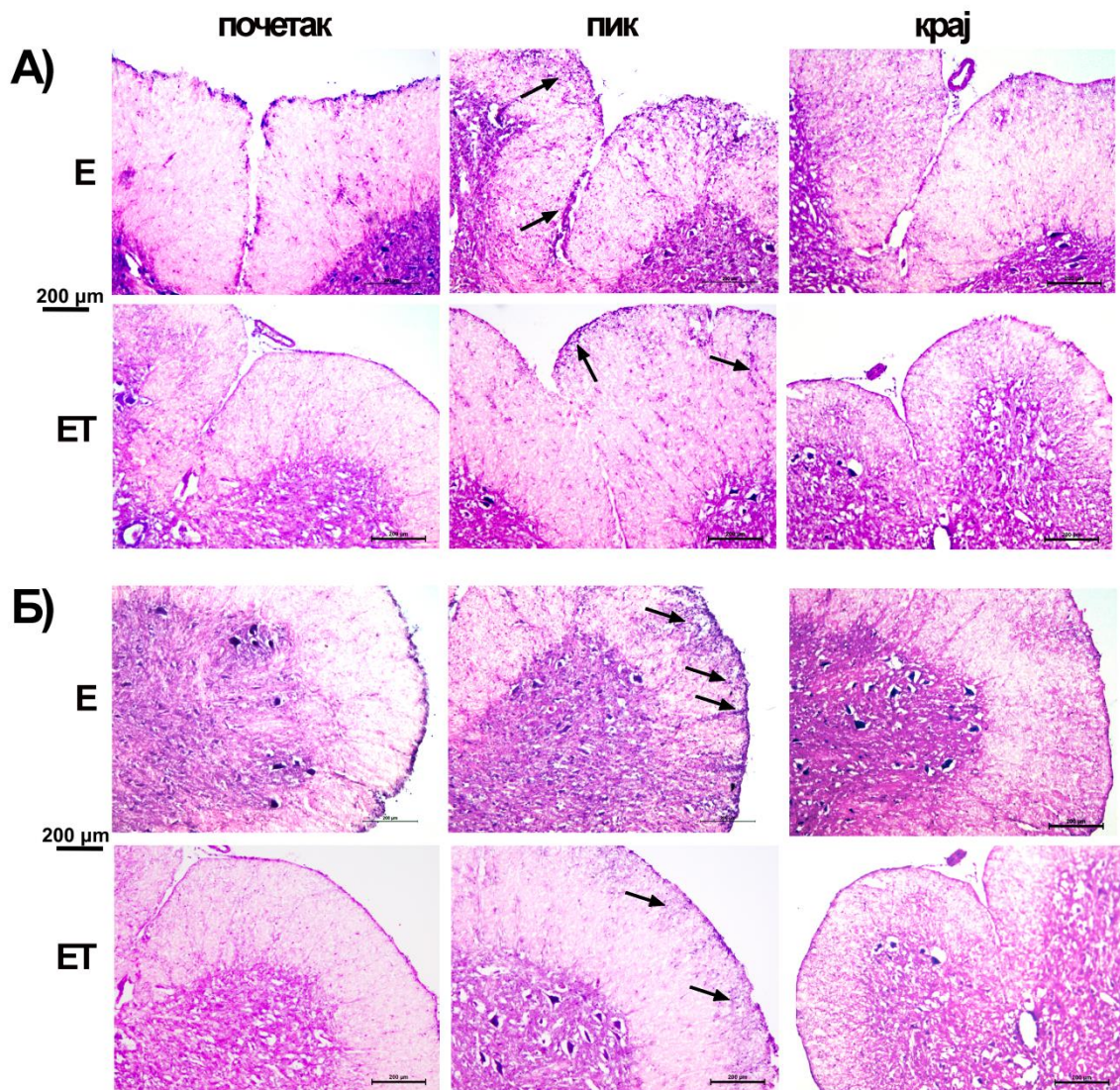
предње фисуре, као и у простору уз субпијалну овојницу. Такође, за разлику од области захваћених у почетку болести, у пик у болести могуће је уочити и појаву инфилтрата у паренхиму и то дубоко унутар беле масе у периваскуларним просторима (на сликама 14-16 означено стрелицама). Насупрот томе, у групи животиња третираних витаминима Бе (ЕТ), уочава се мањи степен инфилтрације ћелија у поређењу са Е групом, што је у корелацији и са мање израженом клиничком сликом ЕАЕ и нижим клиничким скоровима у овој групи. Мањи број инфилтрата ћелија примећен је у области предње фисуре и овојнице, а посебно у белој маси и дубљем паренхиму, у поређењу са нетретираним животињама (Е). На крају болести, када су се животиње опоравиле, детектован је смањен степен инфламације у обе групе (Е и ЕТ), без значајнијих разлика између самих група.



**Слика 14. Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине на увеличању 5х.**

Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине. Нетретирана група ЕАЕ животиња (Е); ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. Хематоксилин-еозин бојење, скала 500 µm.

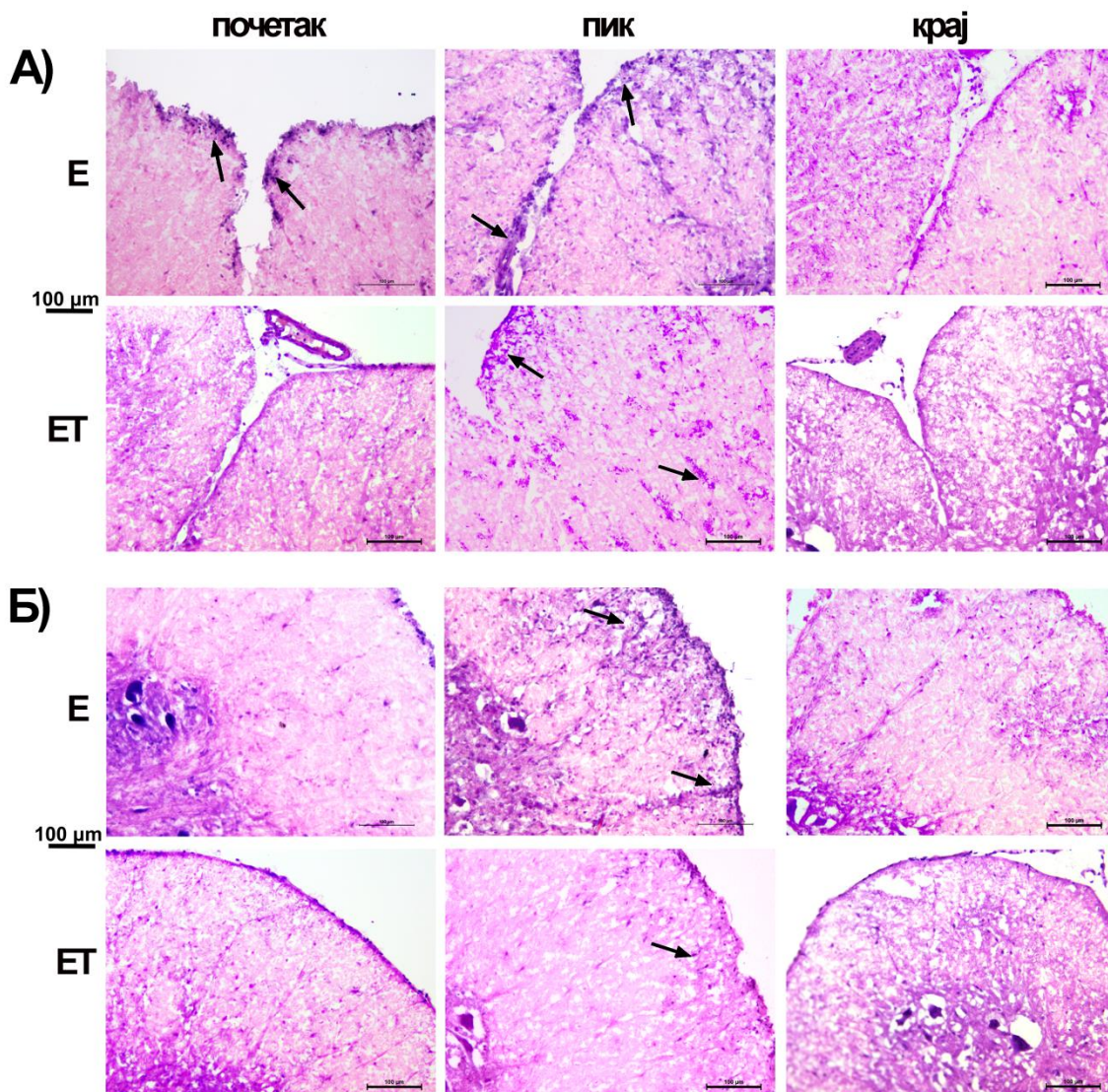
Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).



**Слика 15. Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене  
 мождине на увељичању 10х.**

(А) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине у региону предње фисуре. (Б) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине у региону латералне фуникуле. Нетретирана група ЕАЕ животиња (Е); ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. Хематоксилин-еозин бојење, скала 200 µm. Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).





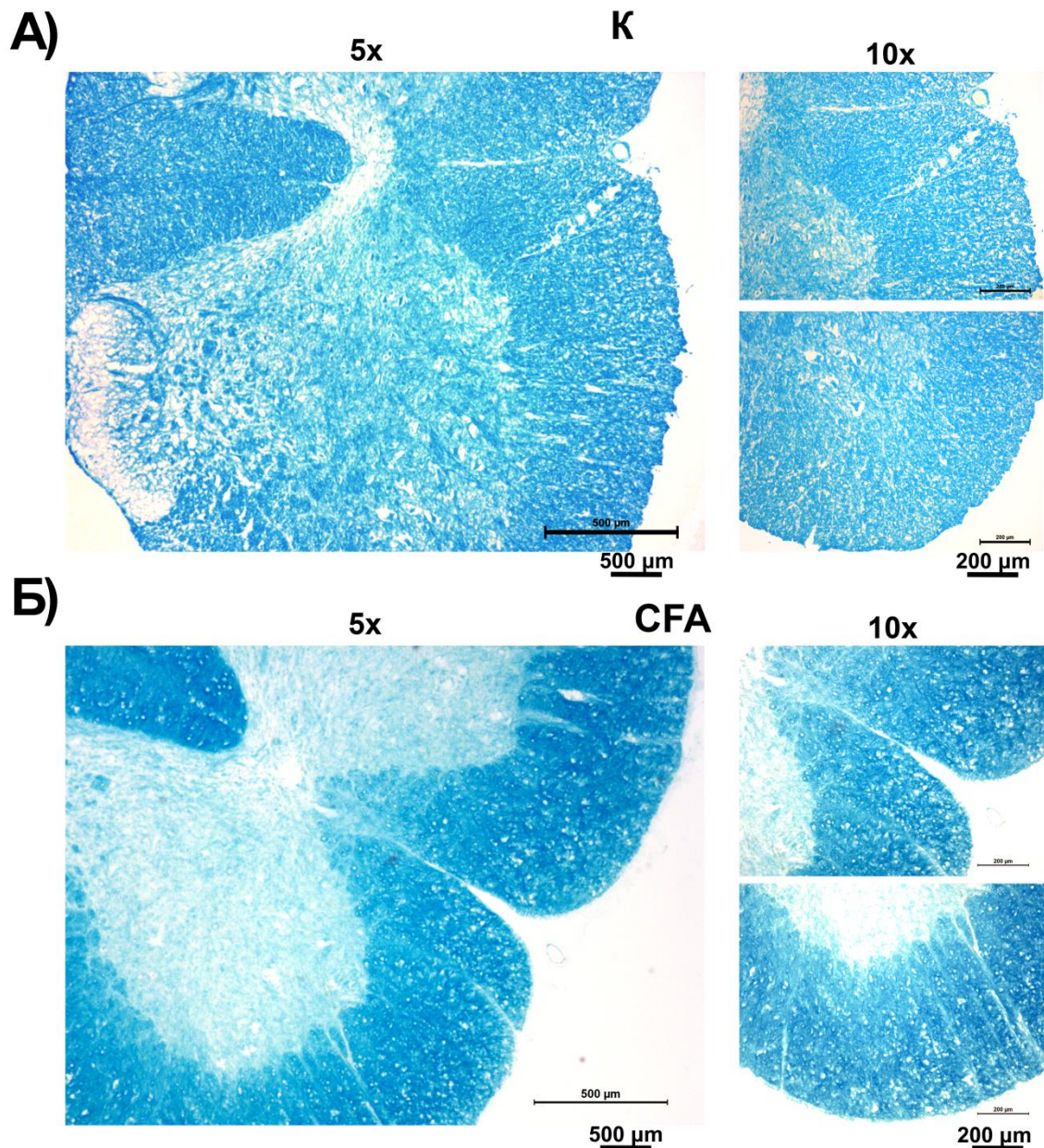
**Слика 16. Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене  
 мождине на увеличању 20х.**

(А) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине у региону предње фисуре. (Б) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине у региону латералне фуникуле. Нетретирана група ЕАЕ животиња (Е); група ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. Хематоксилин-еозин бојење, скала 100  $\mu\text{m}$ . Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).

Утицај третмана витаминима Бе комплекса на степен демиелинизације у лумбалном делу кичмене мождине ЕАЕ животиња испитан је коришћењем *LFB* боје која боји мијелин у плаво. Зоне демиелинизације посматране су у белој маси



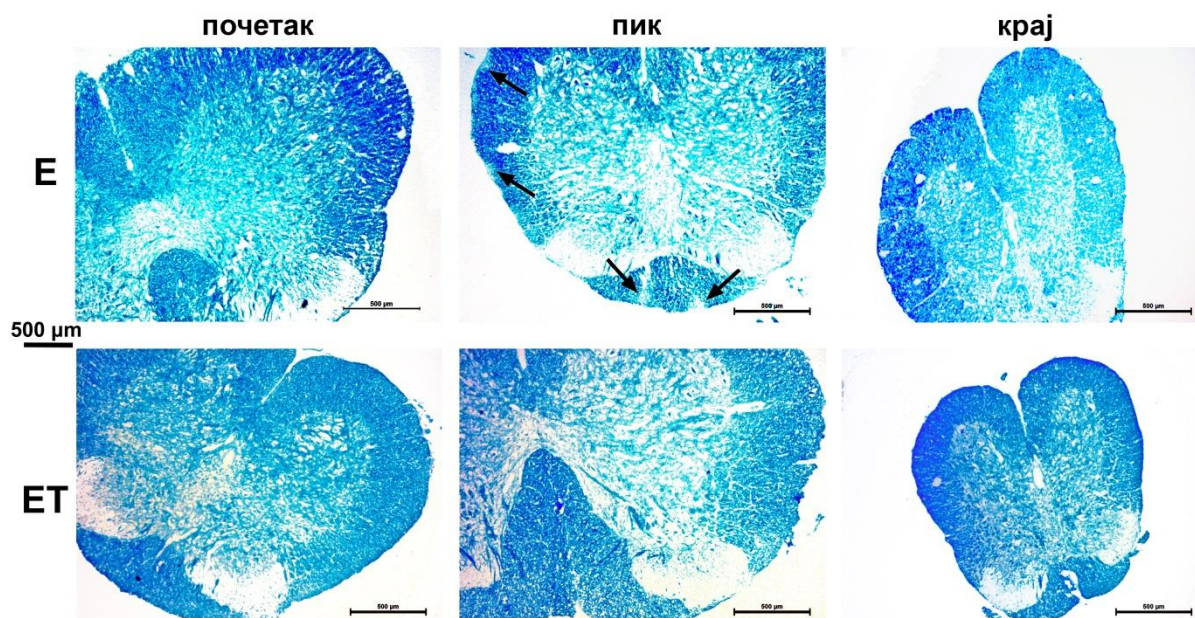
лумбалног дела кичмене мождине, која представља карактеристично обележје оштећења ткива у ЕАЕ моделу. Као што је приказано на репрезентативним микрографијама на сликама 18 и 19, изражен губитак мијелина примећен је у пику болести код нетрететираних ЕАЕ животиња (Е) у антериорној, постериорној и латералној фуникули, који није детектован у контролним групама животиња (К и СФА) (слика 17).



**Слика 17. Хистолошки преглед мијелинских структура лумбалног дела кичмене мождине контролних животиња.**

(А) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине изоловане из контролне групе животиње (К). (Б) Микрографије попречних пресека лумбалног дела кичмене мождине изоловане из СГА групе животиња. *LFB* (*Luxol Fast Blue*) бојење, увећање 5x (скала 500  $\mu\text{m}$ ) и 10x (скала 200  $\mu\text{m}$ ). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).

Места демиелинизације примећују се као просветљене/обезбојене регије које су стрелицама означене на сликама 18 и 19. Регије демиелинизације детектоване су у зонама блиским зонама инфилтрације имунских ћелија (слике 18 и 19), посебно у делу уз овојницу кичмене мождине. Уочене демиелинизационе промене су у корелацији са пропраћеном клиничком сликом, као и тешком парализом уоченом у пику болести у Е групи животиња. Међутим, овакве промене су значајно мање уочљиве у групи животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ), а посебно у латералној фуникули. Иако су примећена и места просветљења у регији средишњег постериорног сулкуса, степен демиелинизације није био значајно изражен, осим у пику болести у групи нетретираних животиња (Е) (слике 18 и 19). На почетку и крају болести нису уочене значајне промене мијелинских структура, у поређењу са контролним животињама (слика 17).



**Слика 18.** Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације у лумбалном делу кичмене мождине ЕАЕ животиња на увећању 5x.





пик и крај болести. *LFB (Luxol Fast Blue)* бојење, скала 200  $\mu\text{m}$ . Приказане су репрезентативне микрографије од укупно 20 анализираних пресека (две животиње по групи, 10 пресека по животињи).

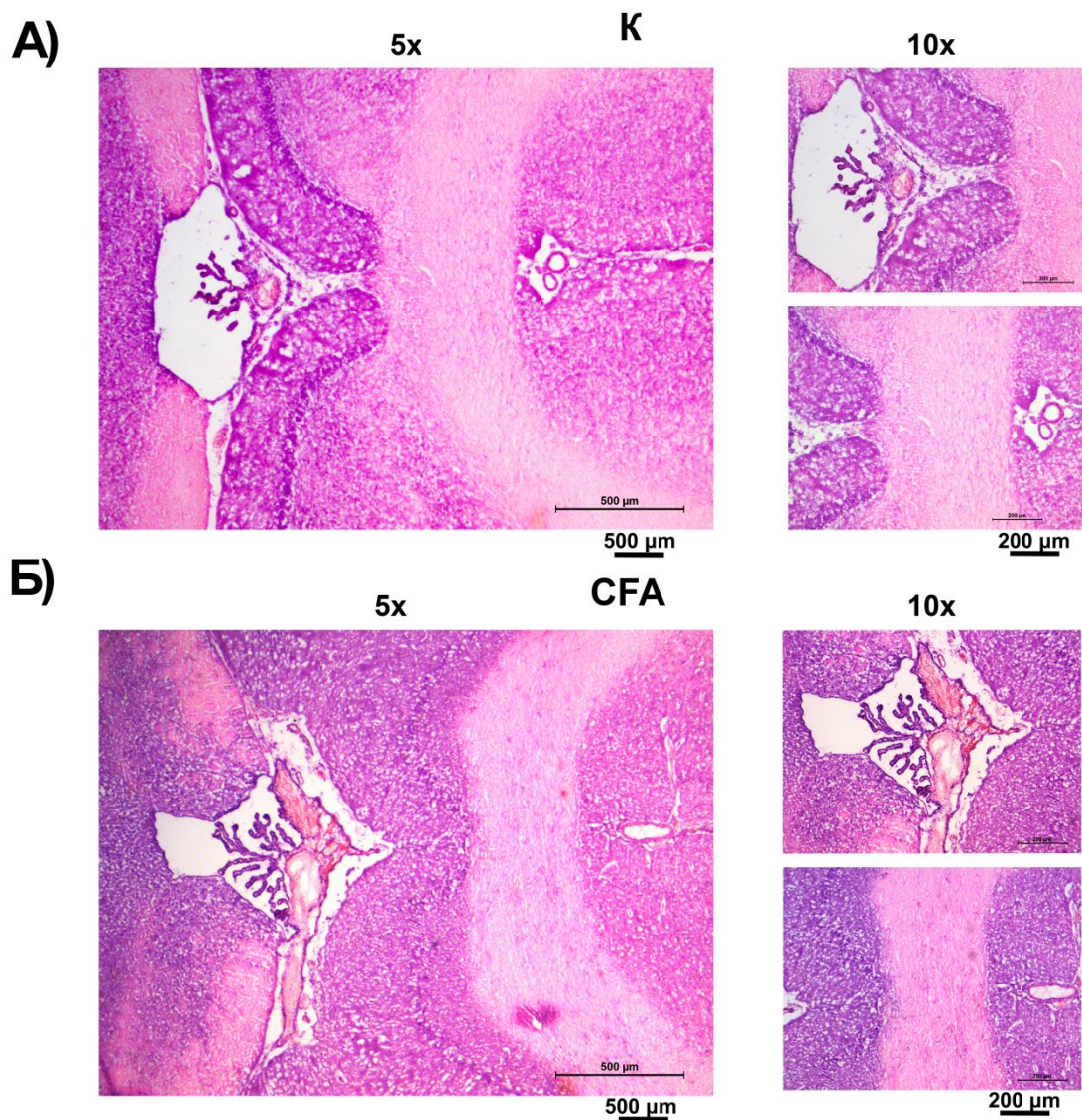
#### **4.2.4 Хистоморфолошка анализа пресека предњег мозга након индукције експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса**

Хистопатолошка процена развоја ЕАЕ-а обухвата анализу присуства инфилтратата имунских ћелија, као и појаву поља демјелинизације и промене у густини и организацији мијелинских влакана у предњем мозгу. Квалитативном анализом испитан је утицај третмана витаминима Бе комплекса на ове процесе.

##### **4.2.4.1 Испитивање утицаја третмана витаминима Бе комплекса на степен инфилтрације имунских ћелија**

У циљу процене степана инфилтрације имунских ћелија у предњи мозак током развоја ЕАЕ-а примењено је бојење хематоксилин/еозином. Приказане су репрезентативне микрографије региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), -4,16 ~ -5,20 mm од брегме, на три увеличања (5x, 10x и 40x). Коронални пресеци (дебљине 20  $\mu\text{m}$ ) испитиваног региона мозга обухватају хипокампус, *corpus callosum*, трећу вентрикулу, таламус, хипоталамус, хабенуларна и амигдалоидна једра. Као што се види на микрографијама контролних (К и СФА) група животиња (слика 20) није уочено присуство инфилтратата.





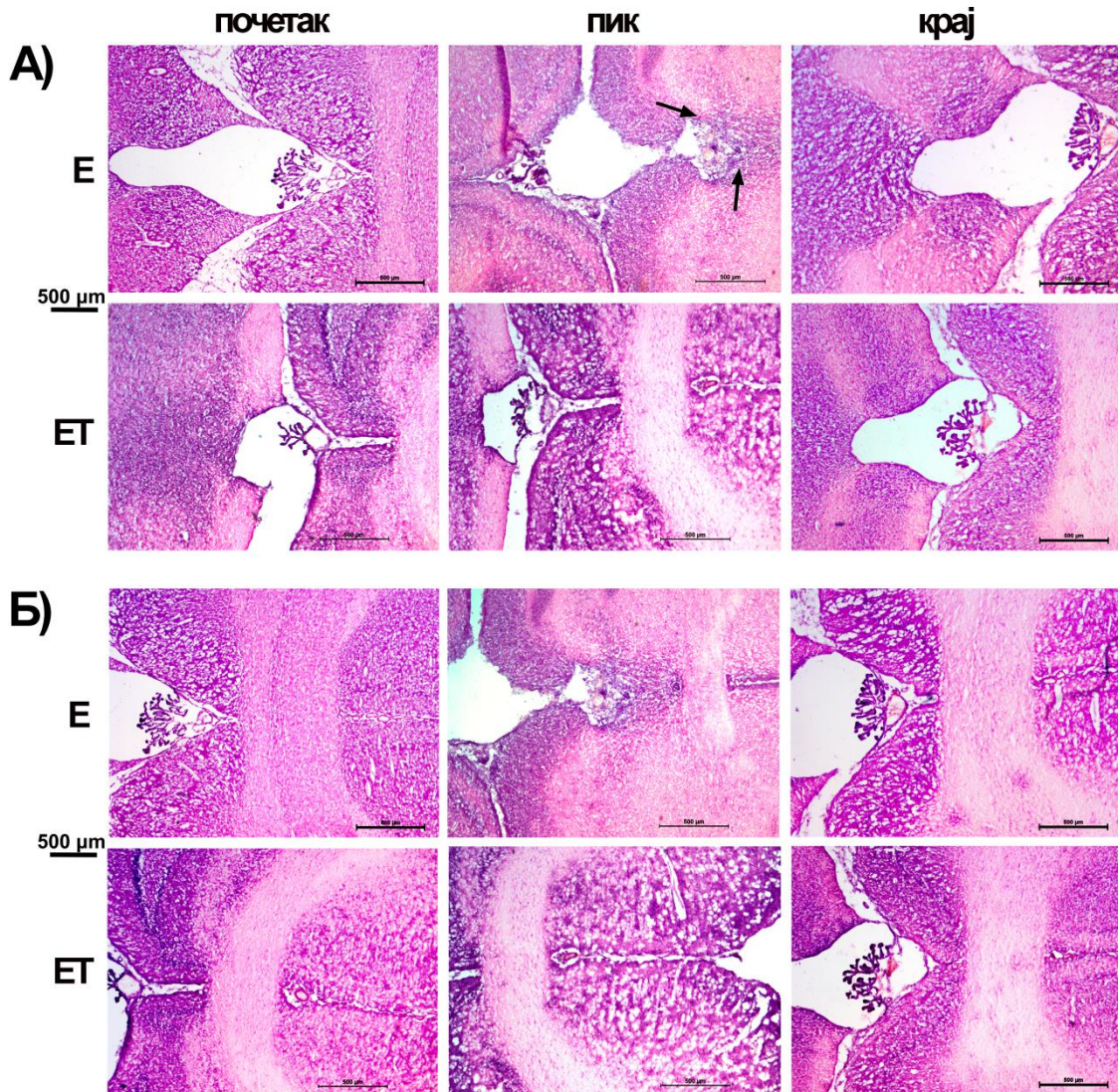
**Слика 20. Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга контролних животиња.**

Хистолошки преглед ткивних пресека региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), -4,16 ~ -5,20 mm од брегме, у зони треће вентрикуле и *corpus callosum*-а. (А) Микрографије попречних пресека предњег мозга изолованог из контролне групе животиње (К). (Б) Микрографије попречних пресека предњег мозга изолованог из **СФА** групе животиња. Хематоксилин/еозин бојење. Увеличање 5x (скала 500 μm) и 10x (скала 200 μm). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).

С друге стране, на микрографијама на сликама 21 и 22, у различитим фазама болести (почетак, пик и крај) степен инфилтрације имунским ћелијама се мења. У



пикку болести у животињама **Е** групе је присутан највећи степен инфилтрације, док је у **ЕТ** групи животиња мањи. Највеће присуство инфилтарата уочено је у региону треће вентрикуле и то у непосредној близини медијалног хабенуларног једра. У почетку и на крају болести, у обе групе (**Е** и **ЕТ**) у односу на пик болести присутан је мањи степен инфилтрације имунских ћелија. Додатно, на почетку и крају болести нема значајније разлике у присуству инфилтарата између **Е** и **ЕТ** групе (слике 21 и 22).

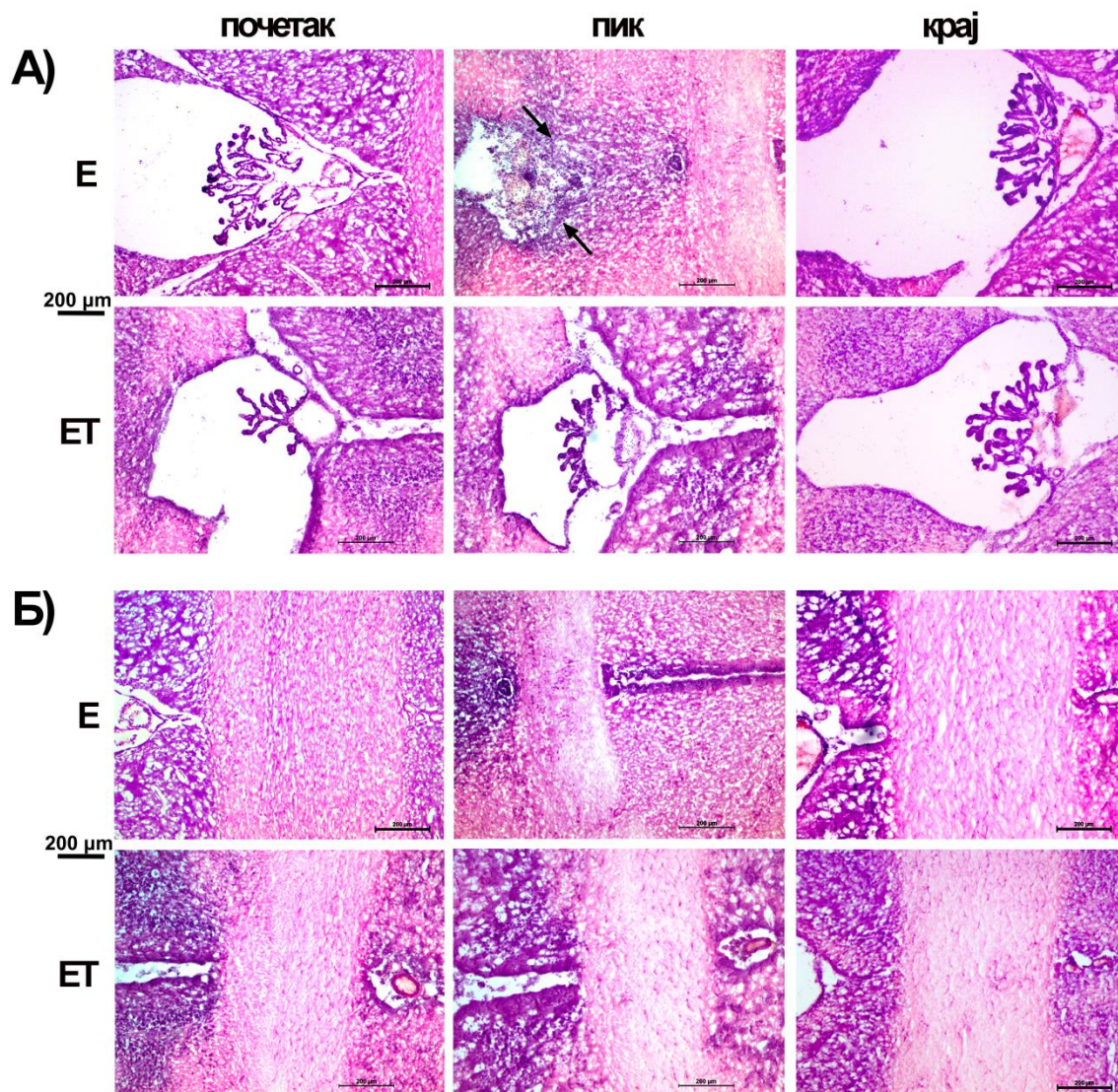


**Слика 21. Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у предњем мозгу код ЕАЕ животиња на увеличању 5x.**

Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), - 4,16 ~ -5,20 mm од брегме. (**А**) Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони треће вентрикуле (**Б**) Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони *corpus callosum*-а. Нетретирана група ЕАЕ животиња (**Е**); група ЕАЕ животиња



третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. Хематоксилин/еозин бојење, скала 500  $\mu\text{m}$ . Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).



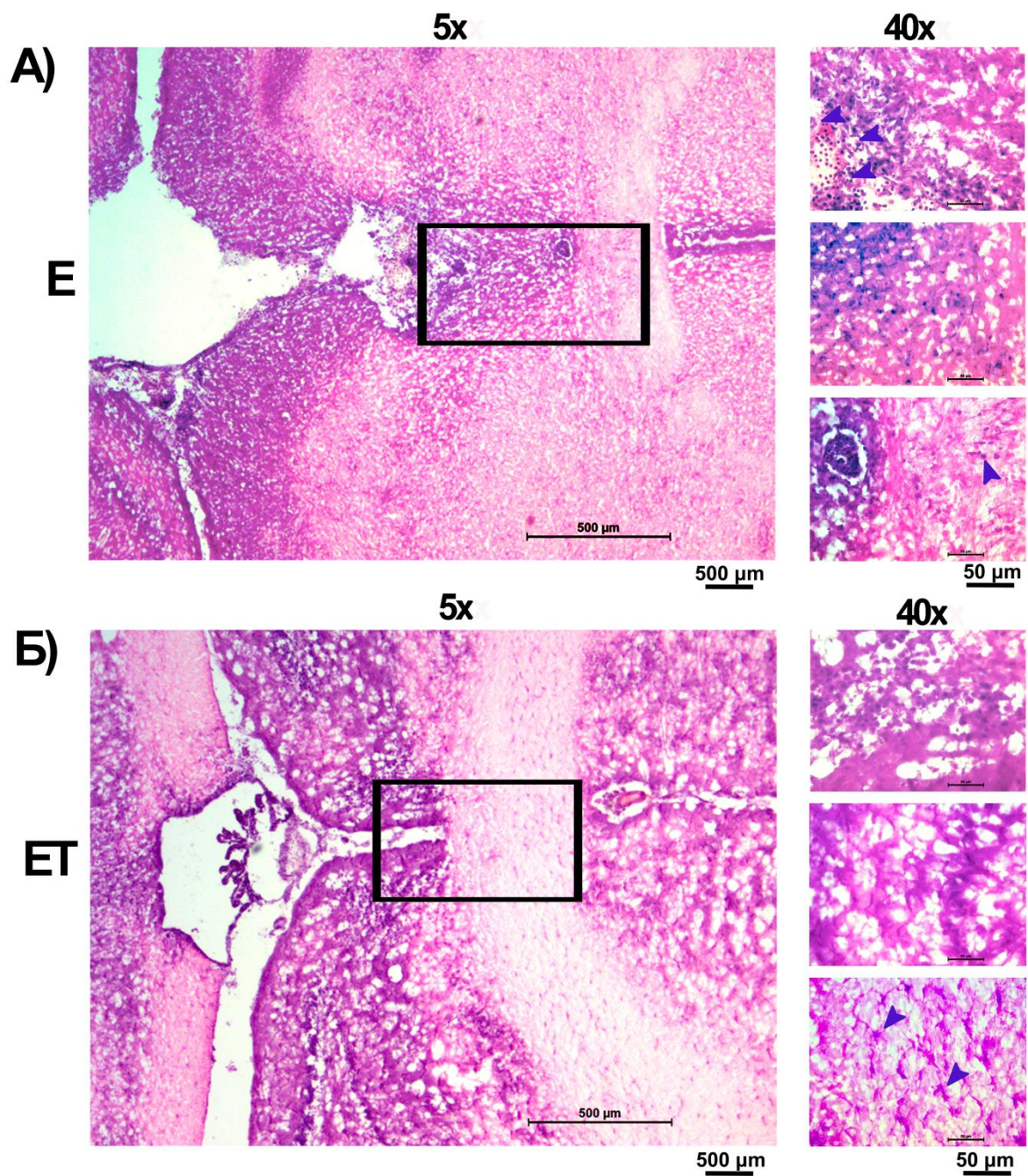
**Слика 22. Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у предњем мозгу код ЕАЕ животиња на увећању 10х.**

Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), - 4,16 ~ -5,20 mm од брегме. (А) Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони треће вентрикуле (Б) Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони *corpus callosum*-а. Нетретирана група ЕАЕ животиња (Е); група ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. Хематоксилин/еозин бојење, скала 200  $\mu\text{m}$ . Приказане су репрезентативне

микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).

Поред разлика у нивоу инфилтрације имунским ћелијама у пику болести, у зони *corpus callosum*-а, се уочавају и разлике у броју ћелија које по морфологији подсећају на глијалне ћелије (врх стрелице, слика 23). Тако, квалитативном анализом у **ЕТ** групи примећен је већи број глијалних ћелија са разгранатим цитоплазматским наставцима, у поређењу са **Е** групом. Такође, у **Е** групи у зони хороидног плексуса уочено је присуство већег броја периваскуларних моноцита, док је у **ЕТ** групи примећен мањи број ових ћелија (слика 23).





**Слика 23. Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у предњем мозгу у пику болести код ЕАЕ животиња.**

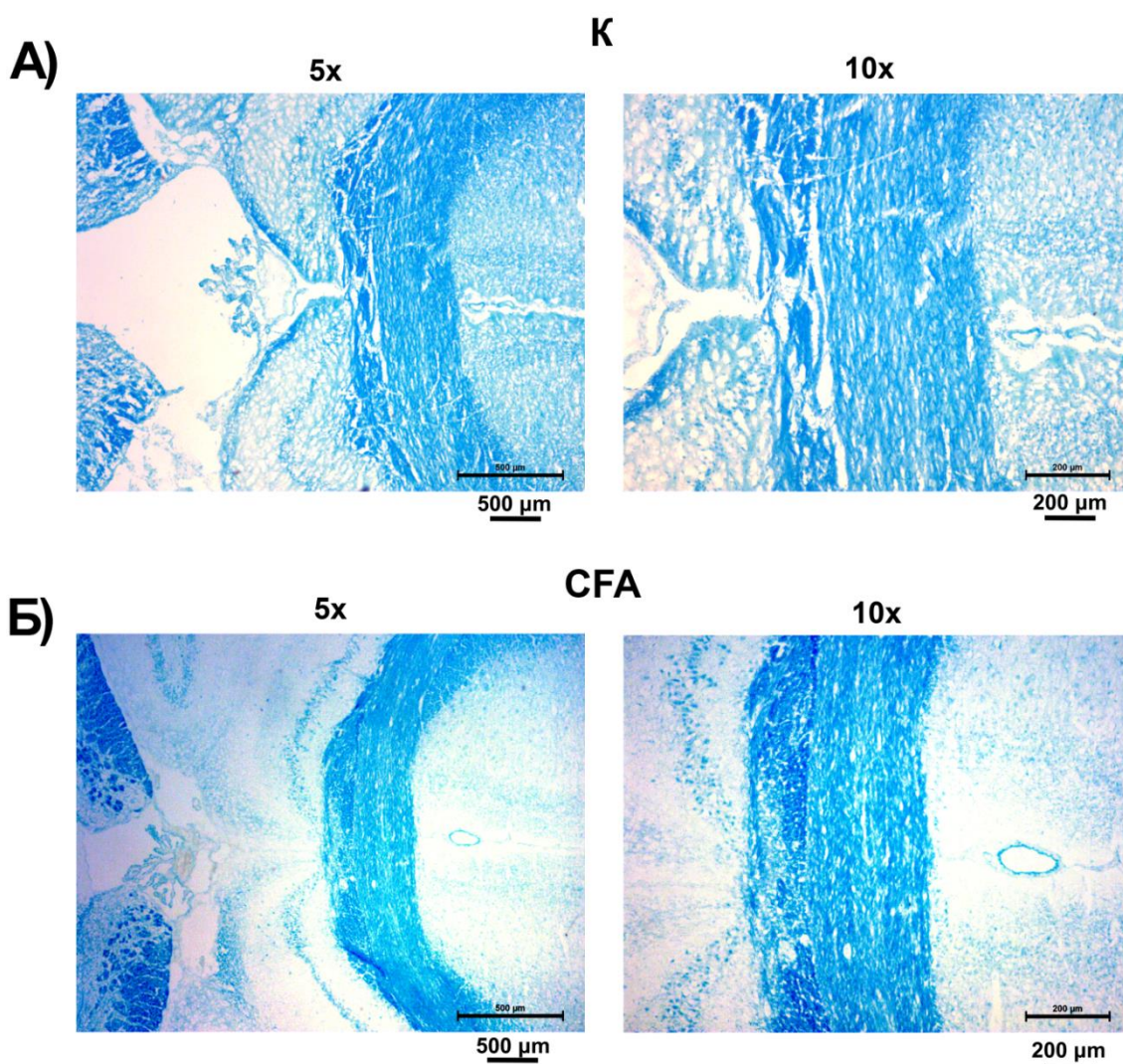
Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга у пику болести. Регион каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), -4,16 ~ -5,20 mm од брегме, у зони треће вентрикуле и *corpus callosum*-а. (А) Микрографије попречних пресека предњег мозга изолованог из нетретиране групе ЕАЕ животиња (Е); (Б) Микрографије попречних пресека предњег мозга изолованог из групе ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ).

Хематоксилин/еозин бојење. Увеличање 5x (скала 500 μm) и 40x (скала 50 μm).



#### 4.2.4.2 Испитивање утицаја третмана витаминима Бе комплекса на густину и организацију мијелинских влакана предњег мозга

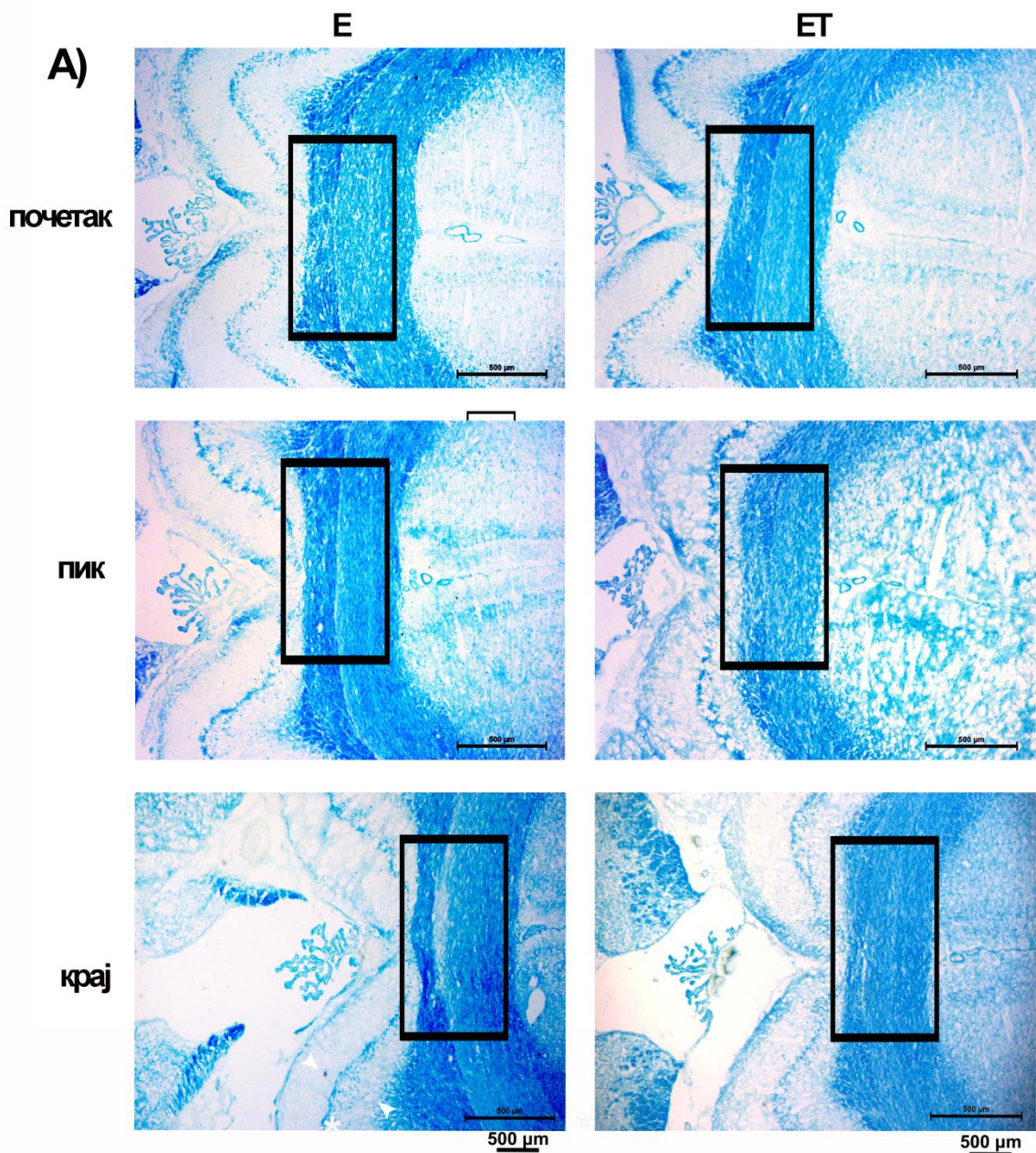
Ефекат третмана витаминима Бе комплекса на степен демиелинизације у регионима предњег мозга ЕАЕ животиња испитан је применом *LFB* бојења којим семијелин боји у плаво. Главно обележје акутних лезија у МС-у, као и у њеном најпознатијем анималном моделу, ЕАЕ-у, су перивенуларна инфилтрација лимфоцита и моноцита, поља демиелинизације, као и губитак аксона. У овој докторској дисертацији, квалитативном анализом пресека предњег мозга, зоне демиелинизације посматране су у региону *corpus callosum*-а.



Слика 24. Изглед организације мијелинских влакана предњег мозга у региону *corpus callosum*-а контролних група животиња.

Микрографије попречних пресека предњег мозга у региону *corpus callosum*-а контролне **К** групе животиња (**А**) и **СФА** групе животиња (**Б**). *LFB* (*Luxol Fast Blue*) бојење. Увеличање 5x (скала 500  $\mu\text{m}$ ) и 10x (скала 200  $\mu\text{m}$ ). Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).

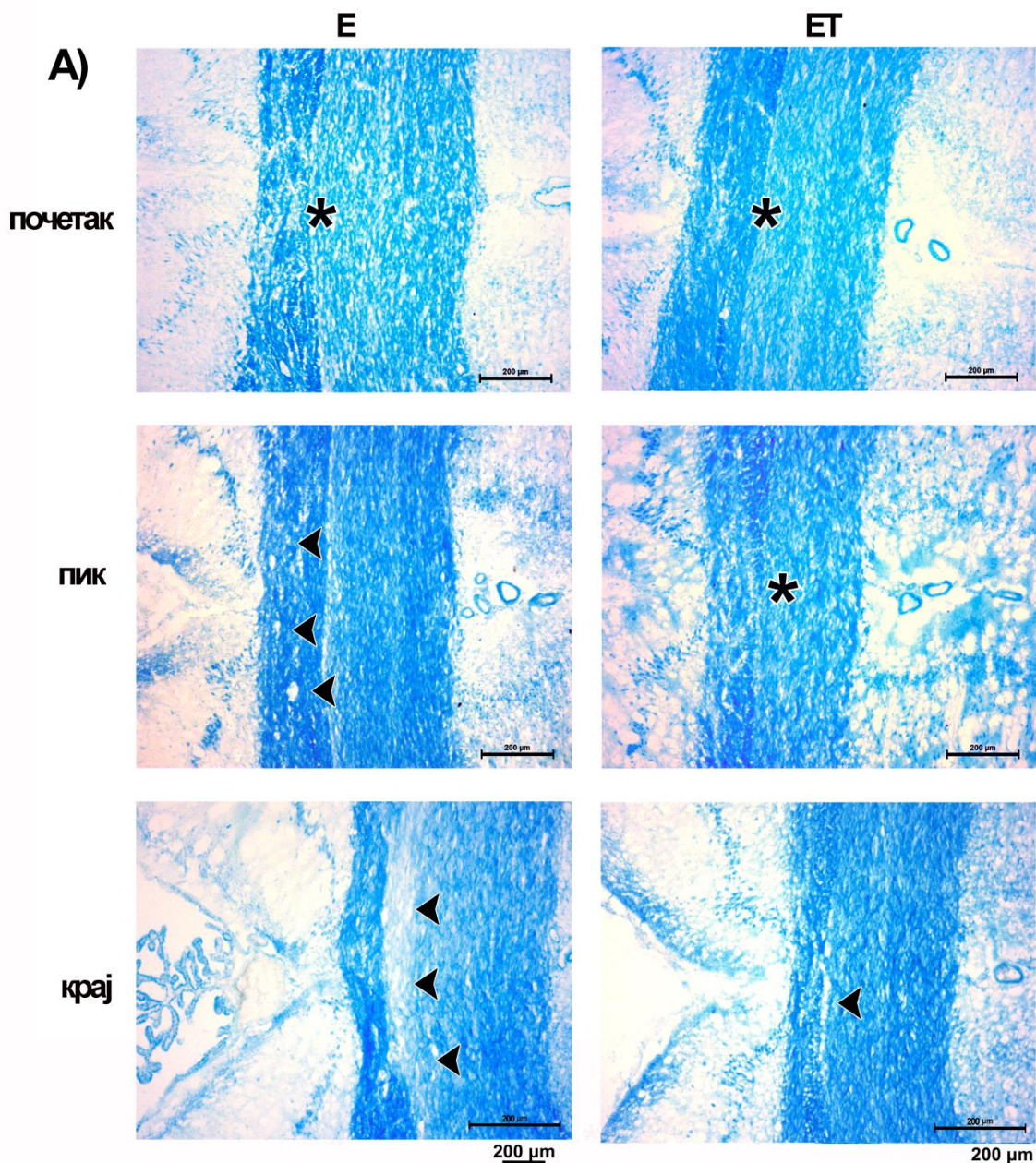
Као што је и очекивано, места демиелинизације, као и промене у густини и организацији мијелинских влакана нису уочене у контролним, **К** и **СФА**, групама (слика 24). С друге стране, у зависности од фазе болести (почетак, пик и крај) и примене третмана витаминима Бе комплекса на микрографијама на сликама 25 и 26, уочавају се различити нивои промена у густини и организацији мијелинских влакана, као и у појави поља демиелинизације (просветљене зоне). На слици 25 уоквирени су региони *corpus callosum*-а који су на већем увеличању приказани на слици 26.



**Слика 25. Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демијелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 5х.**

Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), - 4,16 ~ -5,20 mm од брегме. Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони треће вентрикуле и *corpus callosum*-а. Нетретирана ЕАЕ група животиња (Е); ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. *LFB* (*Luxol Fast Blue*) бојење, скала 500 μm. Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).





**Слика 26. Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 10х.**

Хистолошки преглед ткивних пресека предњег мозга региона каудалног међумозга (лат. *Caudal diencephalon*), - 4,16 ~ -5,20 mm од брегме. Микрографије попречних пресека предњег мозга у зони треће вентрикуле и *corpus callosum*-а. Нетретирана група ЕАЕ животиња (Е); ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ); три различите временске тачке: почетак, пик и крај болести. *LFB* (*Luxol Fast Blue*) бојење, скала 200 µm. Врх стрелице означава поља демиелинизације, звездица означава организацију мијелинских влакана. Приказане су репрезентативне микрографије од укупно осам анализираних пресека (две животиње по групи, четири пресека по животињи).



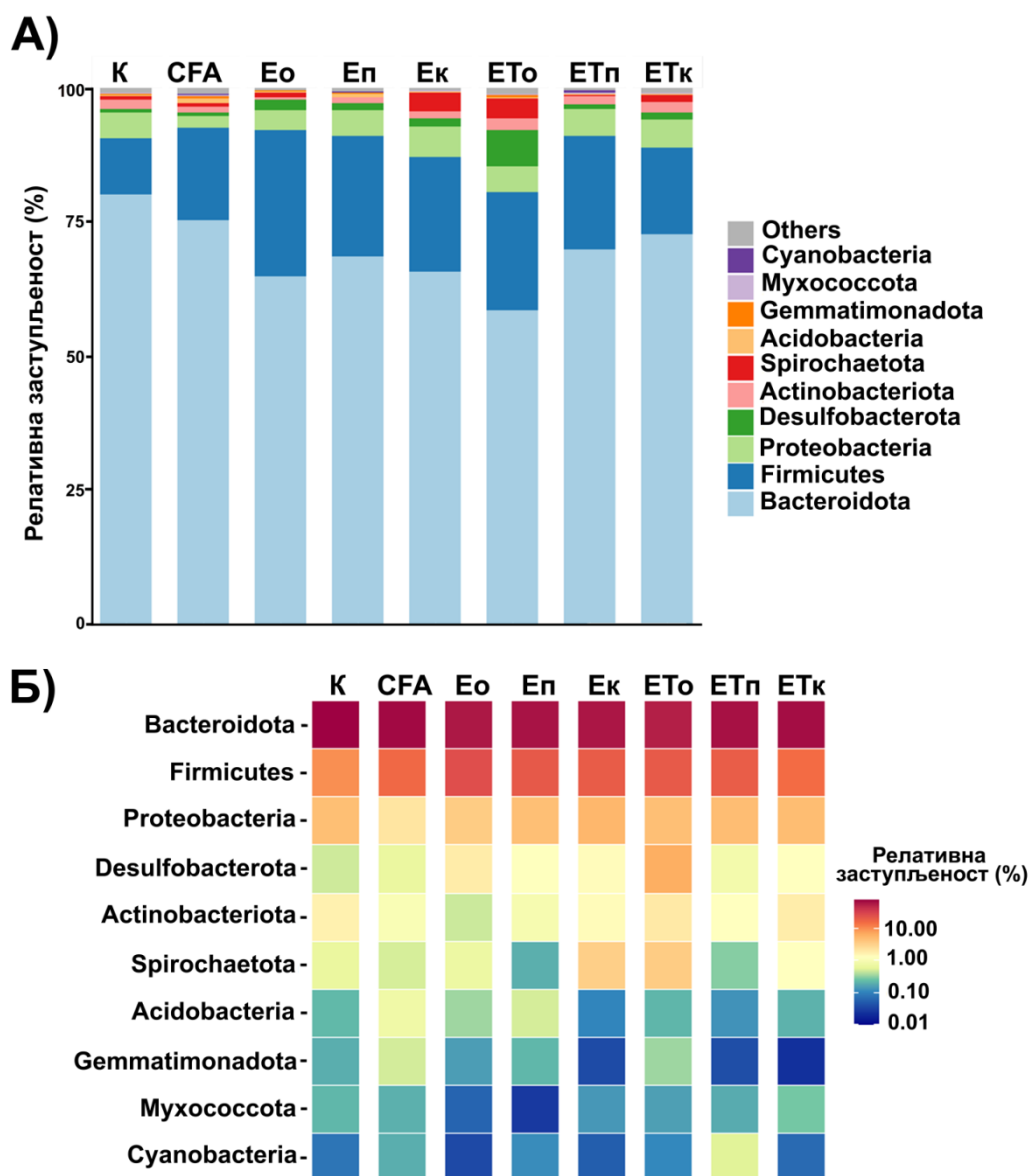
**На почетку болести** (слика 26) у региону *corpus callosum*-а животиња **Е** групе долази до дезорганизације мијелинских влакана (означено звездицом) која показују растреситу структуру са малим пољима демиелинизације, док је у **ЕТ** групи очувана организација мијелинских влакана која су густо пакована (означено звездицом). **У пику болести**, у **Е** групи се запажа више мањих поља демиелинизације (обележена врхом стрелице), а у **ЕТ** групи се уочавају промене у организацији мијелинских влакана (означено звездицом) које су сличне онима у почетку болести код животиња **Е** групе. **На крају болести** у **Е** групи присутна су већа поља демиелинизације (просветљене зоне означене врхом стрелице), за разлику од **ЕТ** групе где су поља демиелинизације мања (врх стрелице) и много ређа, а мијелинска влакна имају компактну организацију слично као што се може запазити у овој групи на почетку болести (означено звездицом).

### **4.3 Анализа утицаја третмана витаминима Бе комплекса на састав и функцију микробиоте црева**

Како би се испитао утицај комплекса витамина Бе на састав микробиоте црева током прогресије ЕАЕ, узорци фецеса сакупљени су од сваке животиње у групи и након екстракције ДНК сједињени по групама за три временске тачке (почетак (о), пик (п) и крај (к) болести) (**К**, **СФА**, **Ео**, **Еп**, **Ек**, **ЕТо**, **ЕТп** и **ЕТк**). Промене у саставу микробиоте црева између нетретираних ЕАЕ животиња и ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса, као и контролних животиња испитане су секвенцирањем маркер гена за 16S рРНК.

#### **4.3.1 Таксономска анализа на нивоу раздела**

Таксономска анализа састава микробиоте црева на нивоу раздела (лат. *ylum*) за све испитиване групе животиња у свим испитиваним временским тачкама приказана је на слици 27.



**Слика 27. Анализа микробиоте црева на нивоу раздела.**

(А) Релативна заступљеност (%) 10 најзаступљеније идентификованих раздела у узорцима. (Б) “*Heatmap*”, 10 најзаступљенијих раздела у узорцима. Нетретирана ЕАЕ група животиња (Е), ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) у три различите временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к); контролна група животиња (К); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (СФА).

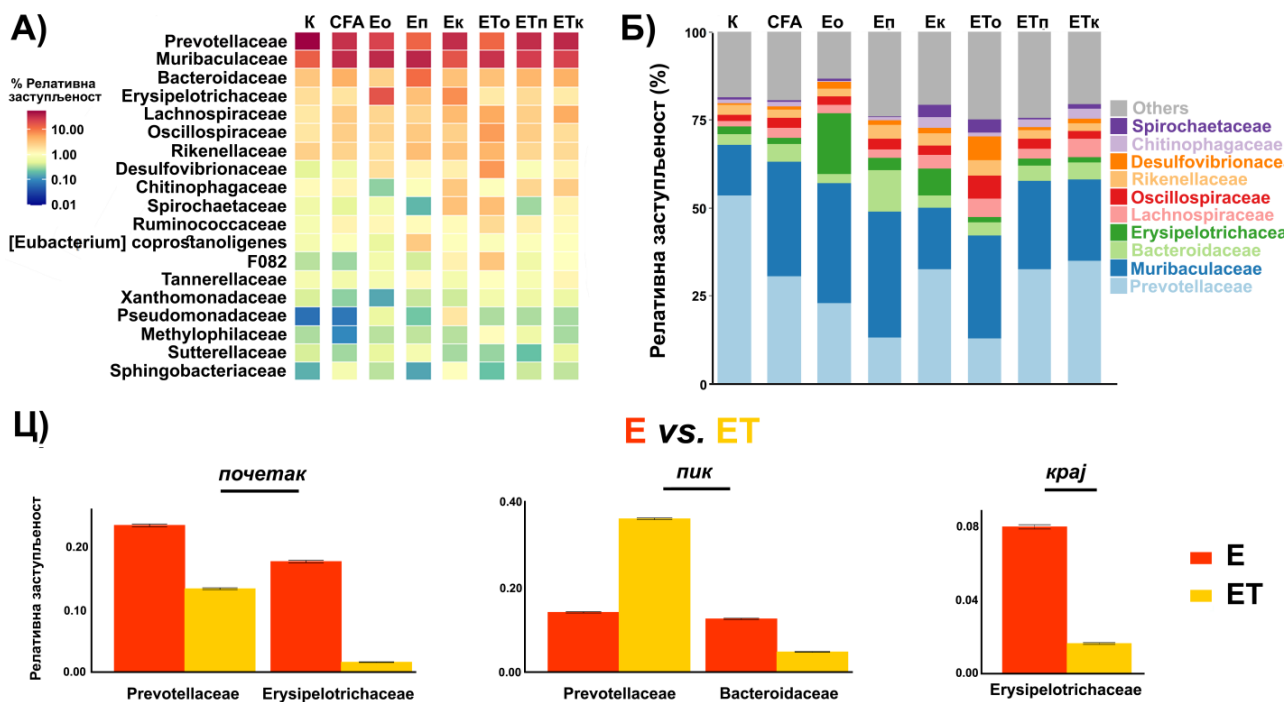
Један од најчешће коришћених маркера за описивање промена у саставу микробиоте је однос раздела Firmicutes/Bacteroidetes (F:B), који је био повећан код нетретираних ЕАЕ животиња током болести (почетак, пик и крај: F:B - 0,42, 0,33 и 0,33), у поређењу са контролним животињама (К) (F:B - 0,13). У ЕТ групи, F:B однос раздела је такође био повећан у поређењу са контролним животињама, иако са нижим

вредностима у односу на нетретиране животиње (почетак, пик и крај: 0,38, 0,30 и 0,22) што указује на могућу улогу третмана комплексом витамина Бе у реверзији дизбиозе микробиоте црева узроковане прогресијом ЕАЕ.

#### 4.3.2 Таксономска анализа на нивоу фамилије

Таксономска анализа на нивоу фамилије показала је истакнуте разлике у саставу микробиоте црева између животиња у ЕТ и Е групе (слика 28А и 28Б). На слици је приказано 10 најзначајнијих фамилија бактерија на нивоу фамилије, укључујући *Prevotellaceae*, *Muribaculaceae*, *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Chitinophagaceae* и *Spirochaetaceae*. Према приказаним резултатима, најистакнутије промене су биле у смањењу заступљености фамилија *Prevotellaceae* и *Muribaculaceae* у обе групе, Е и ЕТ, у поређењу са контролним животињама (К).

У пику болести, примећен је значајан пораст у заступљености фамилије *Bacteroidaceae* у нетретираној ЕАЕ групи животиња (Е), док је у групи ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ), заступљеност ове фамилије остала конзистентна током свих временских тачака болести (слика 28Б). Поред тога, повећање у заступљености фамилије *Erysipelotrichaceae* је детектовано у нетретираној групи на почетку (Е<sub>0</sub>) и на крају (Е<sub>к</sub>) болести (слика 29Б). На основу резултата *metastat* анализе (слика 28Ц), значајно смањење релативне заступљености фамилија *Prevotellaceae* и *Erysipelotrichaceae* детектовано је у почетку болести у групи животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ<sub>0</sub>), у поређењу са нетретираном групом животиња (Е<sub>0</sub>). Током пика болести, у групи животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ<sub>п</sub>), примећен је значајан пораст у заступљености фамилије *Prevotellaceae*, уз значајно смањење у заступљености фамилије *Bacteroidaceae*. На крају болести, значајне разлике између Е и ЕТ група показане су само за фамилију *Erysipelotrichaceae*, чија је релативна заступљеност била значајно нижа у ЕТ групи (слика 28Ц).



**Слика 28. Анализа састава микробиоте црева на нивоу фамилије.**

(А) “Heatmap”, 20 најзаступљенијих фамилија бактерија. (Б) Релативна заступљеност (%) 10 најзаступљеније идентификованих фамилија бактерија. (Ц) Разлике у релативној заступљености датих бактерија између назначених група. Нетретирана ЕАЕ група животиња (Е), ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) у три различите временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к); контролна група животиња (К); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (СФА).

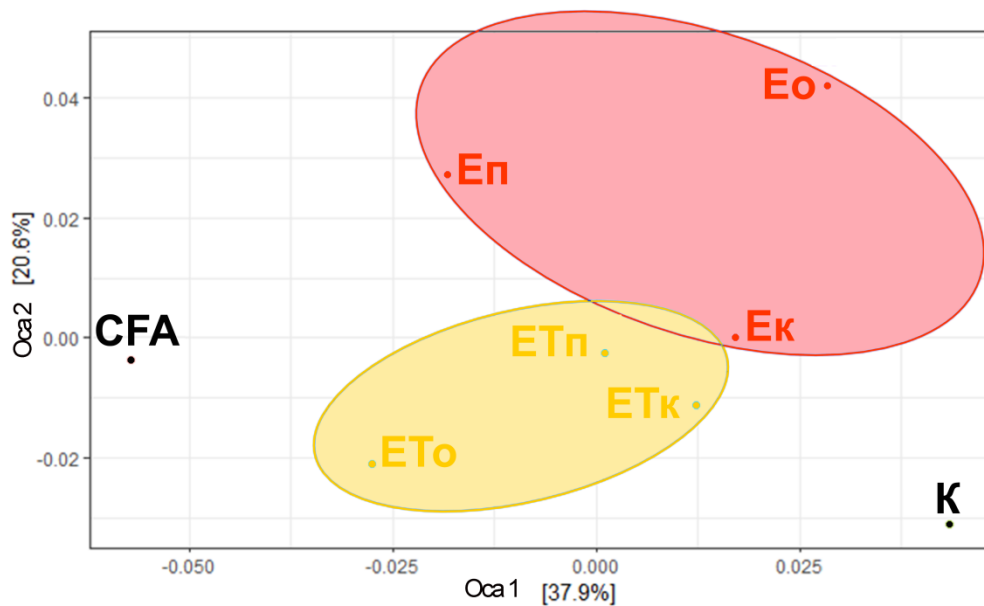
#### 4.3.2.1 Алфа и бета диверзитет

Како би се утврдила разноврсност микробне заједнице у оквиру исте групе животиња, као и између група животиња, одређен је алфа и бета диверзитет. Као мера разноликости алфа диверзитета израчунат је *Shannon*-ов индекс диверзитета који представља меру разноврсности еколошке заједнице. Није детектована значајна разлика у алфа диверзитету микробиоте анализираних група животиња. Прорачуном *weighted UniFrac* матрице удаљености процењена је бета разноврсност анализираних узорака који су разврстани по групама болест без третмана (Е) и болест са третманом (ЕТ). Резултати су представљени на дијаграму (слика 30). *Weighted UniFrac* матрица удаљености је кванитативна мера бета диверзитета, која поред броја различитих таксона и њихове релативне заступљености у микробној заједници узима у обзир и информацију о филогенетској сродности таксона идентификованих у групама узорака

који се упоређују. На основу ове анализе показана је јасна разлика у саставу микробиоте црева, где је примећено мање одступање у саставу микробиоте код ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса у односу на ЕАЕ нетретиране животиње, у поређењу са контролном групом. На основу прорачуна *weighted UniFrac* индекса удаљености између контроле и свих узорака (табела 6), показано је да је састав микробиоте животиња на крају третмана, када су се све животиње опоравиле, био најсличнији саставу микробиоте црева контролних животиња, што сугерише на значајну улогу микробиоте црева у процесу опоравка. Вредности *weighted UniFrac* матрице удаљености показали су да се удаљеност од контролне групе животиња смањивала двоструко већом брзином у ЕТ групи, у поређењу са Е групом (*UniFrac* индекс удаљености: ЕТ:Е = 8,3:4,5) за цео ток болести, иако је вредност *UniFrac* индекса имала највећу бројну вредност за третиране животиње у тренутку настанка болести. На основу приказаног дијаграма, уочава се потенцијал комплекса витамина Бе да супримира дисбиозу састава микробиоте црева која настаје током прогресије болести, док се у нетретираној групи животиња јасно уочава веће одступање састава микробиоте црева између испитиваних временских тачака болести.

**Табела 6.** Бета диверзитет прерачунат и изражен као *weighted UniFrac* индекс удаљености између узорака.

	<b>К</b>	<b>СФА</b>	<b>Ео</b>	<b>Еп</b>	<b>Ек</b>	<b>ЕТо</b>	<b>ЕТп</b>	<b>ЕТк</b>
<b>К</b>	0	0.173535	0.284747	0.284667	0.19407	0.326013	0.246003	0.159983
<b>СФА</b>	0.173535	0	0.186428	0.1637	0.164375	0.225354	0.163207	0.10299
<b>Ео</b>	0.284747	0.186428	0	0.14472	0.18184	0.202293	0.160026	0.187298
<b>Еп</b>	0.284667	0.1637	0.14472	0	0.211488	0.167999	0.150631	0.187482
<b>Ек</b>	0.19407	0.164375	0.18184	0.211488	0	0.209439	0.189718	0.115997
<b>ЕТо</b>	0.326013	0.225354	0.202293	0.167999	0.209439	0	0.199031	0.210075
<b>ЕТп</b>	0.246003	0.163207	0.160026	0.150631	0.189718	0.199031	0	0.135509
<b>ЕТк</b>	0.159983	0.10299	0.187298	0.187482	0.115997	0.210075	0.135509	0

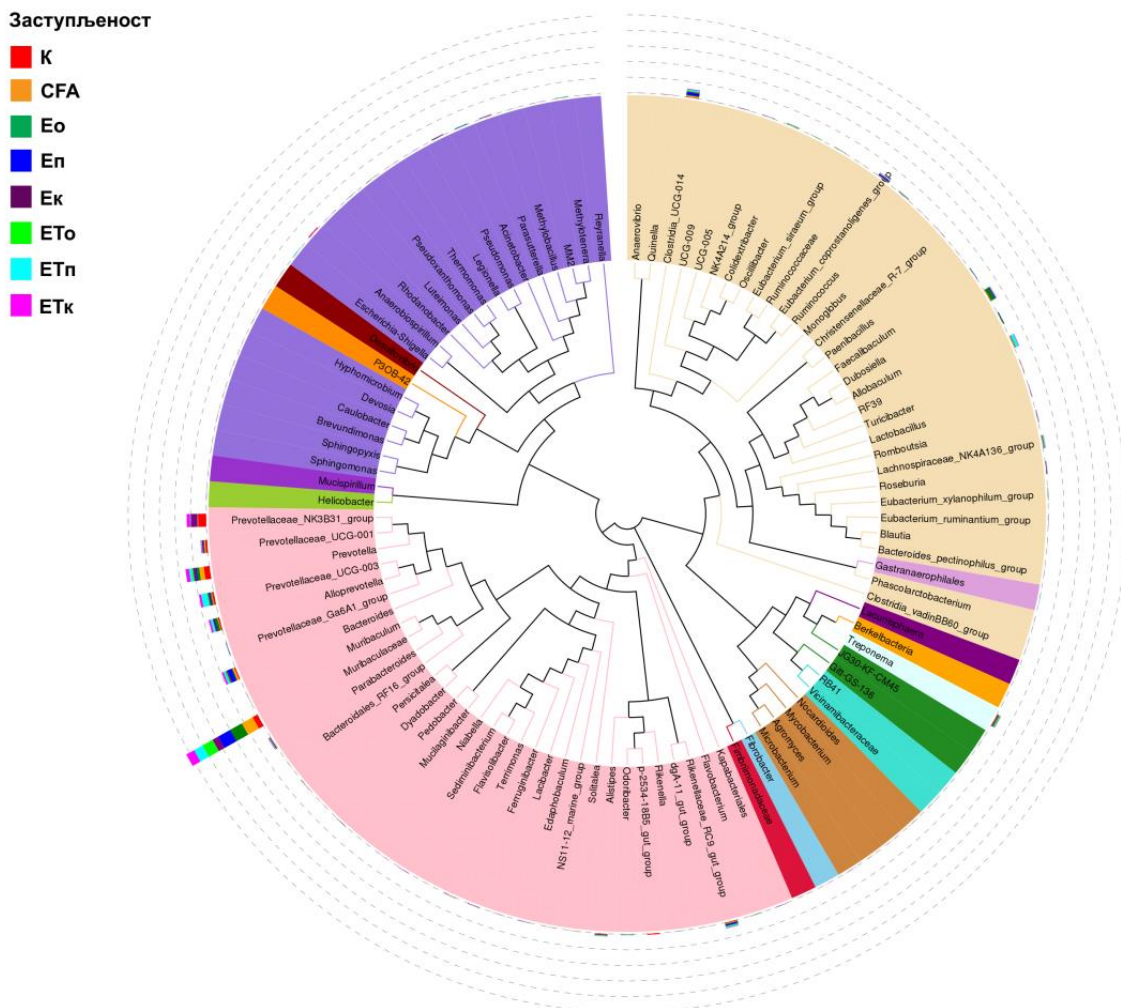


**Слика 29. PCoA (енгл. *Principal Component Analysis*) дијаграм и кластеровање бактеријских заједница на основу *Weighted UniFrac* матрице удаљености.**

Нетретирана ЕАЕ група животиња (Е), ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) у три различите временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к); контролна група животиња (К); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (CFA).

#### 4.3.3 Таксономска анализа на нивоу рода

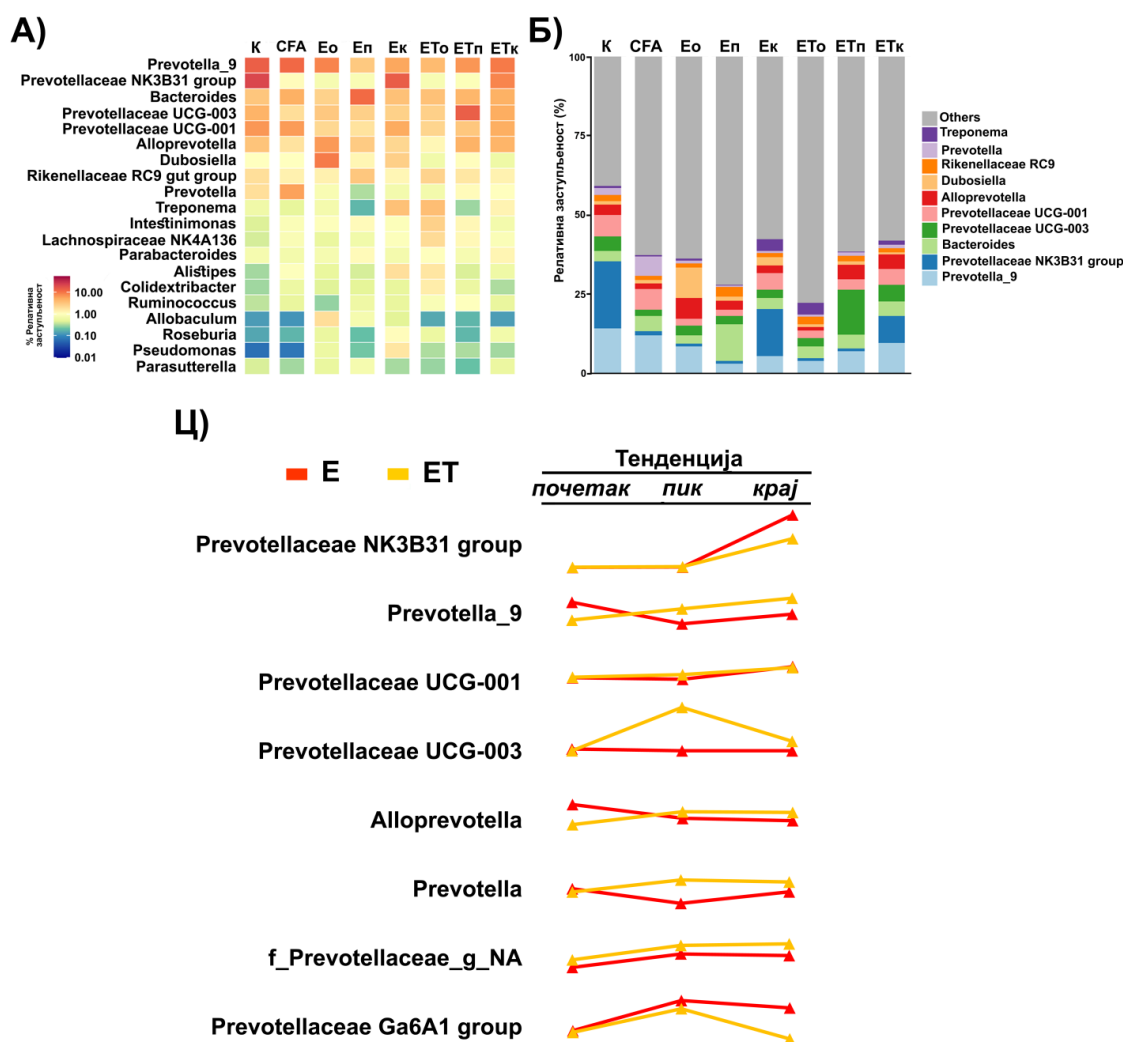
На основу података филогенетског дрвета микробиоте црева приказаног на нивоу рода (слика 30), примећено је да највише заступљени родови припадају разделима Bacteroidetes и Firmicutes, укључујући *Muribaculaceae*, *Prevotella*, *Prevotellaceae\_NK3B31\_group*, *Prevotellaceae\_UCG-003*, *Bacteroides*, *Clostridia\_UCG-014* и *Dubosiella*.



**Слика 30. Филогенетско стабло микробиоте црева на нивоу рода.**

Релативна заступљеност сваког рода је приказана изван круга различитим бојама за сваку групу животиња (**К**, **СФА**, **Ео**, **Еп**, **Ек**, **ЕТо**, **ЕТп** и **ЕТк**). Гране филогенетског дрвета означене различитим бојама представљају различите разделе најзаступљенијих родова: раздели *Bacteroidetes* (розе) и *Firmicutes* (беж). Нетретирана ЕАЕ група животиња (**Е**), ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (**ЕТ**) у три различите временске тачке болести: почетак (**о**), пик (**п**) и крај (**к**); контролна група животиња (**К**); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (**СФА**).

У испитиваним узорцима примећено је присуство неколико родова из фамилије *Prevotellaceae*, а разлике у њиховој заступљености уочене су између **Е** и **ЕТ** група у различитим фазама болести (слика 31).



**Слика 31. Анализа састава микробиоте црева на нивоу рода.**

(А) “Heatmap”, 20 најзаступљенијих бактеријских родова. (Б) Релативна заступљеност (%) 10 најзаступљеније идентификованих родова бактерија. (Ц) Тренд промене релативне заступљености родова унутар фамилије *Prevotellaceae* за нетретиране ЕАЕ животиње (Е) и ЕАЕ животиње третиране витаминима Бе комплекса (ЕТ) у три различите временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к); контролна група животиња (К); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (СФА).

Бактерије фамилије *Prevotellaceae* на основу коришћене Silva базе укључују родове *Prevotellaceae NK3B31*, *Prevotella\_9*, *Prevotellaceae UCG-001* и *Prevotellaceae UCG-003* за које су примећене истакнуте промене у заступљености током прогресије болести, праћењем у три временске тачке. Значајна негативна корелација у заступљености рода *Prevotellaceae UCG-001* и клиничких знакова (Пирсонов



коэффициент корелације – 0.719,  $p = 0.044$ ) указује да је смањење клиничких симптома можда праћено повећањем заступљености представника наведеног бактеријског рода (табела 6). Такође, показано је да је однос заступљености рода *Prevotella* на крају болести, у Е и ЕТ групама, био сличан ономе који је уочен код контролне групе (К). Тренд промене релативне заступљености родова унутар фамилије *Prevotellaceae* (слика 31Ц) представљен је на основу датих вредности приказаних у табели 7.

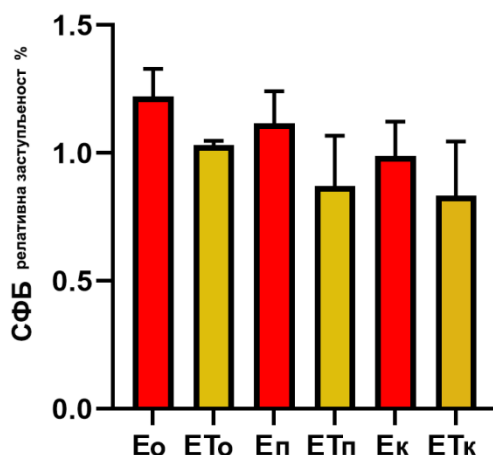
**Табела 7.** Релативна заступљеност родова унутар фамилије *Prevotellaceae* у различитим узорцима.

Род	К	Ео	Еп	Ек	$E_{average}$	ЕТо	ЕТп	ЕТк	$ET_{average}$
<i>Prevotellaceae NK3B31</i>	0.2125 <sup>а,б,ц,д,е</sup>	0.0081 <sup>а</sup>	0.0088 <sup>б</sup>	0.1476	0.1476	0.0084 <sup>и</sup>	0.0096 <sup>т</sup>	0.0843 <sup>с</sup>	0.0341
<i>Prevotella_9</i>	0.1415 <sup>ф,г,х</sup>	0.0855	0.0305 <sup>ф</sup>	0.055 <sup>г</sup>	0.0570	0.0400 <sup>х</sup>	0.0688	0.0960	0.0683
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	0.0682	0.0226	0.0184	0.0527	0.0312	0.0240	0.0313	0.0500	0.0351
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	0.0456 <sup>и</sup>	0.0305	0.0261 <sup>и</sup>	0.0261	0.0276	0.0261	0.1429 <sup>а,х</sup>	0.0514	0.0735
<i>Alloprevotella</i>	0.0335 <sup>ј</sup>	0.0654 <sup>ј,к</sup>	0.0292	0.0232	0.0393	0.0125	0.0464	0.0449 <sup>к</sup>	0.0346
<i>Prevotella</i>	0.0199	0.0085	0.0034	0.0075	0.0065	0.0074	0.0116	0.0109	0.0100
<i>f_Prevotellaceae_g_NA</i>	0.0108	0.0055	0.0081	0.0078	0.0071	0.0070	0.0098	0.0100	0.0089
<i>Prevotellaceae Ga6A1 group</i>	0.0017	0.0025	0.0062	0.0053	0.0047	0.0023	0.0052	0.0015	0.0030

Слова а-к означавају парове узорака код којих су детектоване разлике у релативној заступљености бактерија унутар фамилије *Prevotellaceae* на основу статистичке анализе *metastat* имплементираних у *Microeco* пакету. Нетретиране ЕАЕ животиње (Е); ЕАЕ животиње третиране витаминима Бе комплекса (ЕТ); контролна група животиња (К); група животиња којима је инјектован само комплетни Фројндов адјуванс (СФА); три различите временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к).

#### 4.3.4 Одређивање релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија

Анализа релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија (СФБ) урађена је применом *qPCR* анализе. Резултати су приказани као релативна заступљеност прерачуната применом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  методе (график 4). Значајне разлике између група нису детектоване, међутим, могуће је уочити тренд промене који прати ток болести. У поређењу са Е групом, примећен је тренд смањења у заступљености СФБ у ЕТ групи, за све три временске тачке болести: почетак, пик и крај.



**График 4. Релативна заступљеност сегментисаних филаментозних бактерија.**

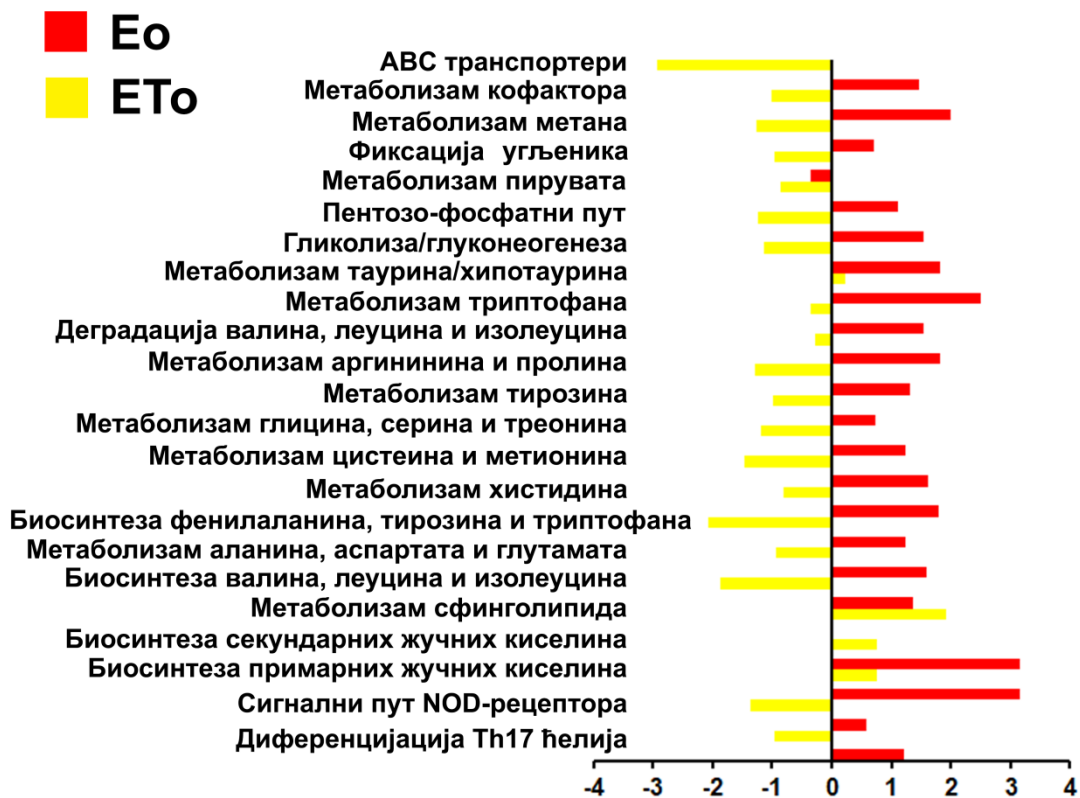
Резултати су приказани као средња вредност и стандарда грешка релативне заступљености СФБ. Нетретирана ЕАЕ група животиња (Е) и ЕАЕ група животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ), три временске тачке болести: почетак (о), пик (п) и крај (к).

#### **4.3.5 Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева применом *MicFunPred* програма**

Утицај комплекса витамина Бе на промене у метаболичком капацитету микробиоте црева у ЕАЕ, испитан је применом *MicFunPred* програма који предвиђа метаболички/функционални капацитет микробиоте црева. На сликама 36-38 су приказане предвиђене разлике у метаболичком капацитету микробиоте црева као релативне заступљености предвиђених метаболичких путева (нормализоване у односу на контролу (К) и представљени као Log2 односа вредности за тест и контролну групу, Log2FC). На основу добијених података, за приказ репрезентативних резултата одабрани су метаболички путеви добијени на основу *KEGG Orthology* (КО) базе, која обухвата најдетаљнији опис метаболичких путева класификованих у три нивоа. Резултати *LefSe* анализе показали су да не постоје значајне разлике у заступљености предвиђених метаболичких путева између Е и ЕТ група, односно да испитиване разлике у вредностима заступљености метаболичких путева не достижу LDA праг значајности > 2. Иако значајне разлике нису детектоване, уочен је тренд промене извесних метаболичких путева између испитиваних Е и ЕТ група. *MicFunPred* анализа генерисала је укупно 284 идентификованих (KEGG) ортолога (КО) у сваком узорку, од којих су за представљање резултата одабрани метаболички путеви чије су промене биле најпроминентније и које су у литератури асоциране са инфламацијом и развојем

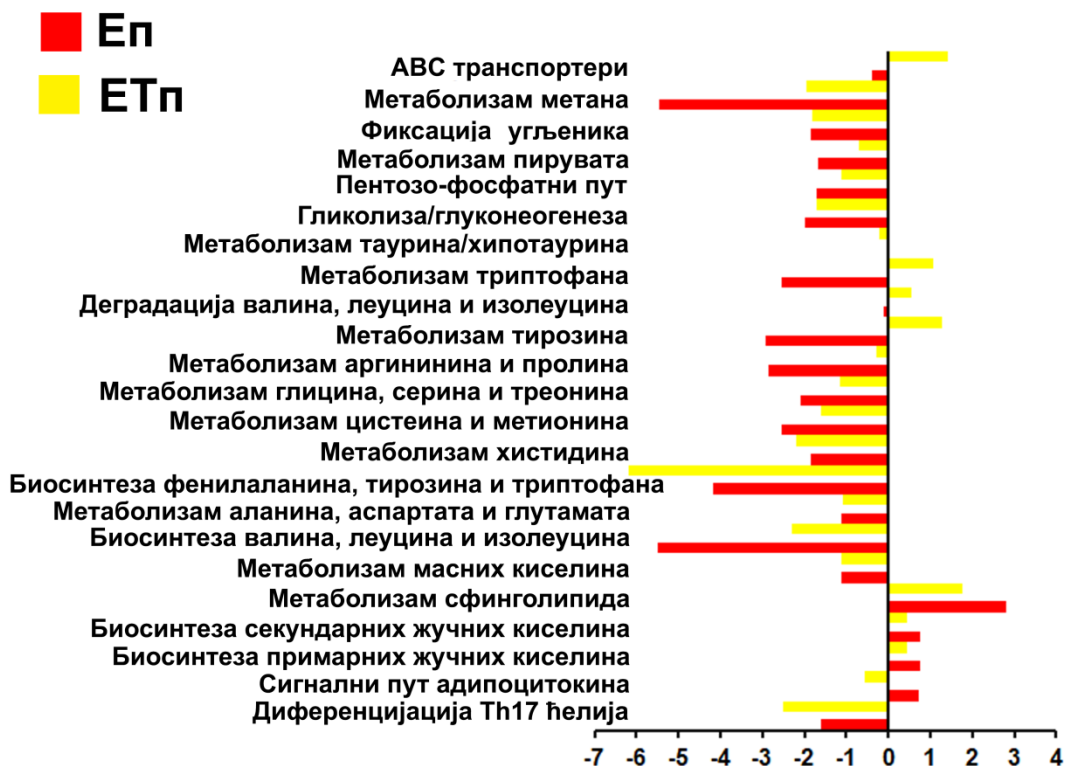
мултипле склерозе. *KEGG* ортолози представљају групе гена који су конзервирани у различитим врстама и асоцирани са одређеним процесима/метаболичким путањама. За одабране метаболичке путеве, урађен је *Wilcoxon signed-rank test (False discovery rate (FDR) < 0,05)*. За ову анализу, упоређене су *Log2FC* вредности између две групе (Е и ЕТ) за сваку временску тачку болести. Резултати статистичке анализе указали су на постојање значајности у почетку и на крају болести ( $p < 0,0005$ ), док у пику болести није детектована значајност између група.

Предикциона анализа урађена је за све три испитиване временске тачке болести (почетак, пик и крај), приказано на сликама 32-34. Класификација *KEGG* метаболичких путева на првом нивоу показала је да је категорија „Метаболизам“ најзаступљенија, а затим следе „Обрада информација о животној средини“ и „Органски системи“. Следећи подниво категорије „Метаболизам“, показао је да је метаболизам аминокиселина, угљених хидрата и липида најизраженији, а такође и енергетски метаболизам. Резултати анализе метаболичког капацитета показали су да су најчешће промене детектоване у метаболизму аминокиселина за све три испитиване временске тачке болести. Као што је приказано на графику 5, на почетку болести, најзначајније промене између Е и ЕТ групе биле су уочене за следеће метаболичке путеве: “АВС транспортери (енгл. *ATP-binding cassette*)”, “Биосинтеза фенилаланина, тирозина и триптофана”, “Биосинтеза примарних жучних киселина”, “Биосинтеза секундарних жучних киселина” и “Метаболизам таурина/хипотаурина”. У пику болести, у Е групи је примећено значајно повећање у заступљености путева: “Биосинтеза валина, изолеуцина и леуцина”, “Метаболизам аргинина и пролина”, “Метаболизам тирозина” и “Метаболизам метана”, за које је показано да су били смањени у ЕТ групи (график б). На крају болести, промене у продукцији метаболита који утичу на метаболичке путеве као што су “Диференцијација *Th17* ћелија”, “Биосинтеза валина, изолеуцина и леуцина”, “Биосинтеза примарних жучних киселина”, “Биосинтеза секундарних жучних киселина”, “Биосинтеза фенилаланина, тирозина и триптофана”, “Метаболизам цистеина и метионина”, “Деградација валина, изолеуцина и леуцина”, “Метаболизам триптофана” и “Фиксација угљеника” су примећене у обе групе (график 7). У Е групи, идентификовано је повећање заступљености ових путева, док је у ЕТ групи примећено смањење заступљености ових метаболичких путева. Добијени резултати указују на потенцијалну улогу третмана витаминима Бе комплекса у модулацији функције микробиоте црева код пацова са ЕАЕ-ом.

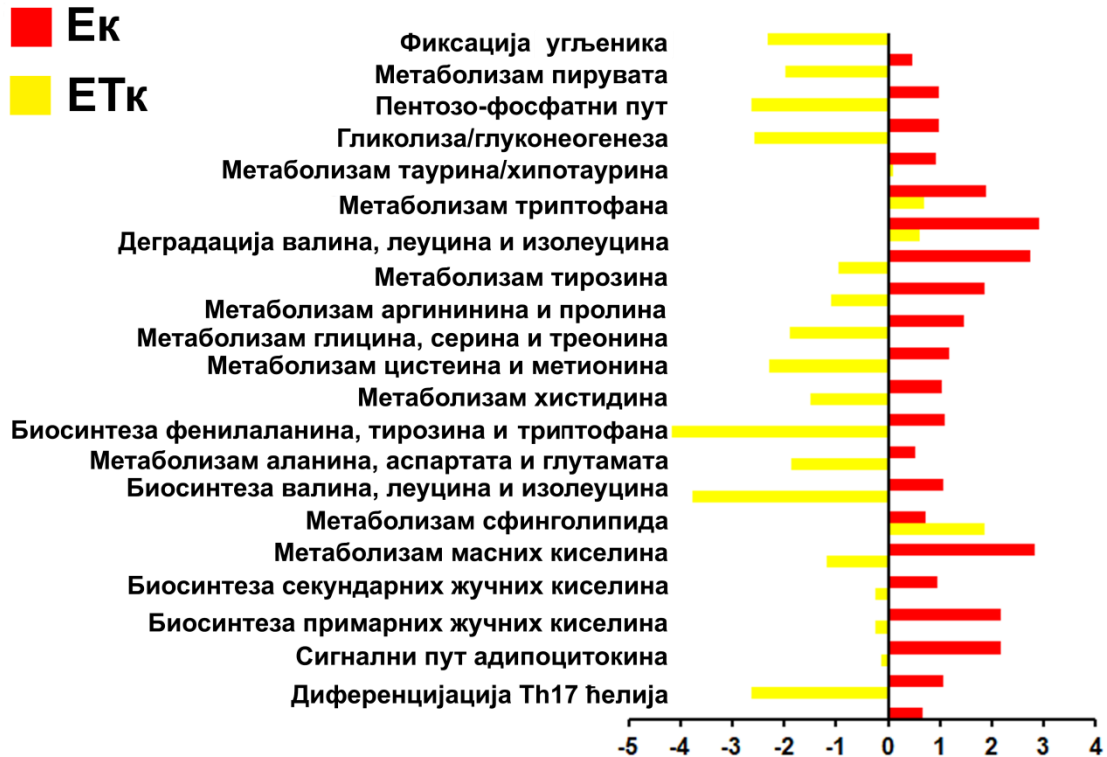


**График 5. Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева на почетку развоја болести.**

*MicFunPred* анализа предвиђања метаболичких путева у узорцима нетретираних ЕАЕ животиња (Е) и ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) на почетку болести (о). Репрезентативни резултати су представљени као релативне заступљености (нормализоване у односу на контролу и представљени у функцији  $\text{Log}_2\text{FC}$ ) на основу *KEGG Orthology* (КО) идентификације метаболичких путева.



**График 6. Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева у пику болести.** *MicFunPred* анализа предвиђања метаболичких путева у узорцима нетретираних ЕАЕ животиња (Е) и ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) у пику болести (п). Репрезентативни резултати су представљени као релативне заступљености (нормализоване у односу на контролу и представљени у функцији  $\text{Log}_2\text{FC}$ ) на основу *KEGG Orthology* (КО) идентификације метаболичких путева.



**График 7. Предвиђање метаболичког капацитета микробиоте црева на крају болести.**

*MicFunPred* анализа предвиђања метаболичких путева у узорцима нетретираних ЕАЕ животиња (Е) и ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса (ЕТ) на крају болести (к). Репрезентативни резултати су представљени као релативне заступљености (нормализоване у односу на контролу и представљени у функцији *Log2FC*) на основу *KEGG Orthology* (КО) идентификације метаболичких путева.

#### 4.4 *In vitro* испитивање анти-инфламаторних и неуропротективних својстава комплекса витамина Бе

У циљу испитивања утицаја комплекса витамина Бе на функције ћелије микроглије, једних од кључних посредника хроничне инфламације у ЦНС-у, анализирана су анти-инфламаторна својства, као и потенцијална неуропротективна активност комплекса витамина Бе.

##### 4.4.1 Ефекти комплекса витамина Бе на функције активираних BV2 ћелија мишије микроглије

Применом МТТ теста утврђен је потенцијал комплекса витамина Бе да модулишу метаболичку активност липополисахаридом (ЛПС) активираних BV2 ћелија. Као што је приказано у табели 8, услед стимулације ЛПС-ом метаболичка активност BV2 ћелија је смањена, у поређењу са нестимулисаним ћелијама. Међутим, метаболичка активност ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија била је значајно повећана након третмана комплексом витамина Бе, у све три испитиване концентрације (табела 8).

Табела 8. Ефекти комплекса витамина Бе на функције активираних BV2 ћелија мишије микроглије.

	Контрола	ЛПС	КВБ + ЛПС (µМ)		
			50	100	250
МТТ (%)	100.00 ± 3.75	78.37 ± 1.15 <sup>#</sup>	98.94 ± 1.76 <sup>****</sup>	101.94 ± 3.85 <sup>**</sup>	101.10 ± 4.33 <sup>**</sup>
НБТ (индекс)	1.00 ± 0.05	1.48 ± 0.05 <sup>#</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>****</sup>	0.90 ± 0.04 <sup>****</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>****</sup>
NO (µМ)	0.64 ± 0.55	29.00 ± 0.68 <sup>#</sup>	16.77 ± 0.33 <sup>****</sup>	15.44 ± 0.50 <sup>****</sup>	8.53 ± 0.81 <sup>****</sup>
IL-6 (pg/mL)	1.9 ± 0.095	255.6 ± 6.1 <sup>####</sup>	143.8 ± 6.19 <sup>****</sup>	95.6 ± 5.1 <sup>****</sup>	40.6 ± 3.4 <sup>****</sup>
TNF-α (pg/mL)	159.4 ± 7.97	1539.4 ± 17.1 <sup>####</sup>	1506.4 ± 26.0 <sup>**</sup>	1312.4 ± 19.5 <sup>****</sup>	1009.4 ± 16.8 <sup>****</sup>

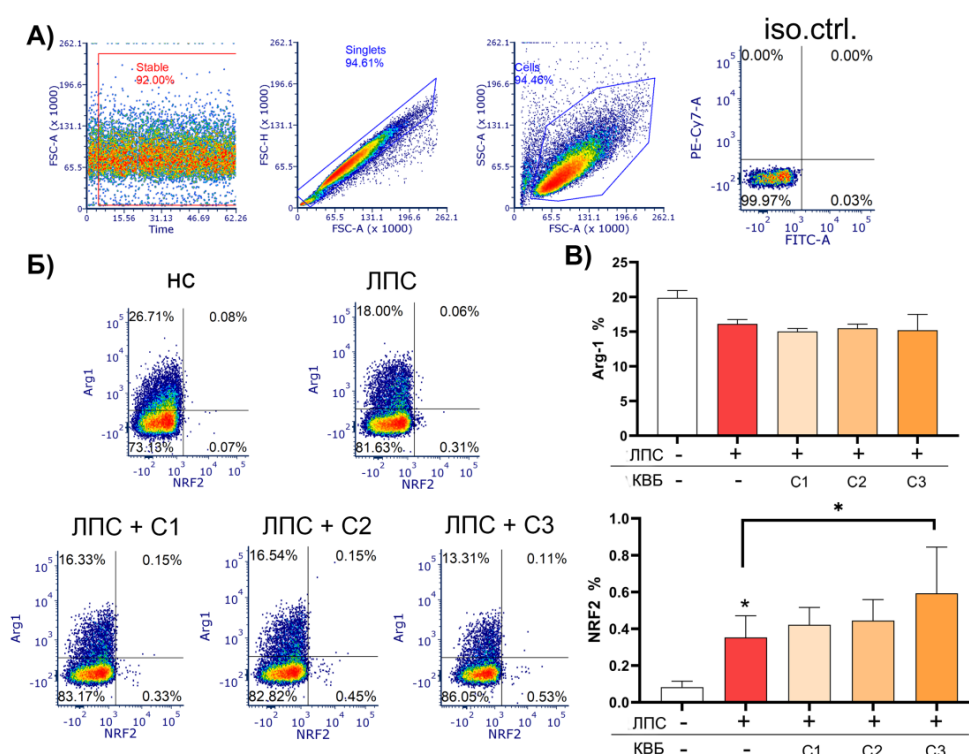
Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка, из репрезентативног експеримента од три независна експеримента изведена у кватрипликату за МТТ, НБТ и NO тестове. За IL-6 и TNF-α резултати су представљени као концентрација (pg/mL), из репрезентативног експеримента од два независна експеримента изведена у кватрипликату. КВБ (комплекс витамина Бе); ЛПС (липополисахарид); #p<0,05 vs. нестимулисане ћелије, ####p<0,0001 vs. нестимулисане ћелије; \*p<0,05 vs. ЛПС, \*\*\*\*p<0,0001 vs. ЛПС.

Као што је и очекивано, стимулација BV2 ћелија ЛПС-ом довела је до повећане продукције инфламаторних медијатора, укључујући РОК, NO и про-инфламаторне цитокине (IL-6 и TNF-α) (табела 8), у поређењу са нестимулисаним ћелијама. Добијени резултати су показали да је третман витаминима Бе комплекса у све три испитиване концентрације значајно смањио продукцију инфламаторних медијатора од стране

ЛПС-ом стимулираних *BV2* ћелија, а третман у највишој концентрацији (250  $\mu$ M) је испољио и најзначајнији ефекат (табела 8).

#### 4.4.2 Ефекат третмана витаминима Бе комплекса на фенотип активираних *BV2* ћелија мишје микроглије

Како би се испитало да ли су анти-инфламаторни ефекти комплекса витамина Бе у корелацији са експресијом специфичних маркера ћелија микроглије, применом проточне цитометрије упоређена је експресија различитих протеина код ЛПС-стимулисаних *BV2* ћелија и *BV2* ћелија третираних витаминима Бе комплекса. *Arg1* је кључни маркер М2 ћелија микроглије укључених у анти-инфламаторни одговор [147], док је недавно показано да је *NRF-2* укључен у регулацију оксидативног стреса у неуроинфламацији [148]. Као што је и очекивано, ЛПС је смањио експресију *Arg1* и повећао експресију *NRF-2* (слика 32), док третман витаминима Бе комплекса није даље модулирао експресију *Arg1*, али је значајно повећао експресију *NRF-2*. Битно је нагласити да је експресија *NRF-2* била повећана услед стимулације ЛПС-ом, чија је експресија додатно повећана након третмана витаминима Бе комплекса (слика 32).

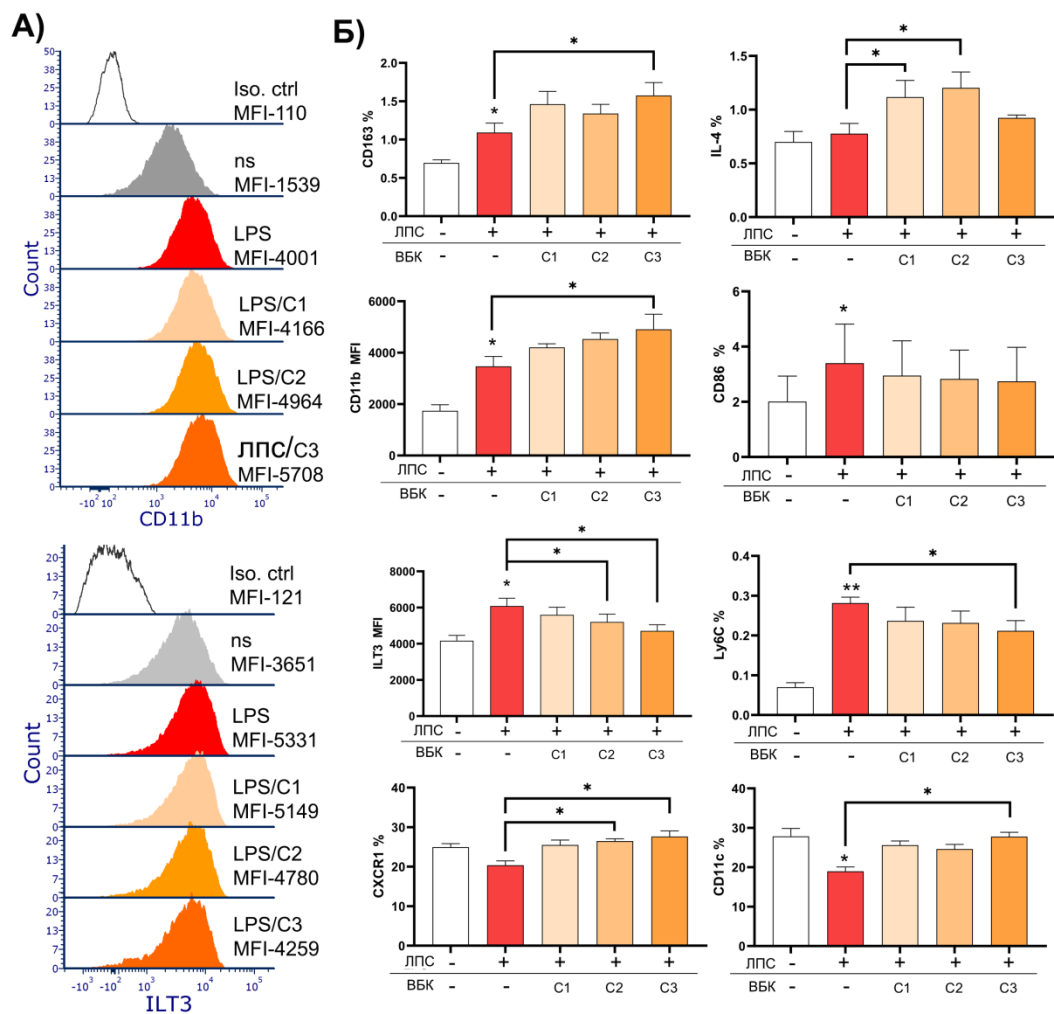


Слика 32. Ефекат третмана витаминима Бе комплекса на фенотиске карактеристике ЛПС-ом стимулираних *BV2* ћелија.



(А) „Gating“ стратегија – поступак одабира циљних ћелија за сортирање у зависности од њихових специфичних *SSC/FSC* карактеристика (енгл. *Side Scattering, SSC; Forward Scattering, FSC*), након уклањања дублета у складу са *(FSC)-A/FSC-H*. (Б) Тачкасти графикони експресије *Arg1* и *NRF-2* на нестимулисаним и ћелијама третираним витаминима Бе комплекса у три различите концентрације. (В) Ефекти комплекса витамина Бе на експресију *Arg1* и *NRF-2* на нестимулисане и ћелије третиране витаминима Бе комплекса, у три различите концентрације. Сва мерења су урађена у кватрипликату и у три независна експеримента, рачунајући средњу вредност ± стандардна девијација. Приказани су репрезентативни резултати. \* $p < 0,05$  у поређењу са одговарајућим контролама. Липополисахарид (ЛПС); Комплекс витамина Бе (КВБ).

Као што је представљено (слика 33), експресија *IL-4* и *CD163* је значајно повећана код ЛПС-ом стимулираних *BV2* ћелија третираних витаминима Бе комплекса, у поређењу са нетретираним ЛПС-ом стимулираним *BV2* ћелијама. Поред тога, експресија *CXCR1* и *CD11c* је повећана након третмана витаминима Бе комплекса, у поређењу са нетретираним ЛПС-ом стимулираним *BV2* ћелијама (слика 33). Добијени резултати су такође показали повећање експресије *ILT-3* и *LybC* код ЛПС-ом стимулираних *BV2* ћелија у поређењу са контролом (нестимулисаним *BV2* ћелијама), док је експресија ових протеина била значајно смањена након третмана витаминима Бе комплекса (слика 33). У поређењу са контролом, ниво експресије *CD11b* и *CD86* био је повећан након ЛПС стимулације, у поређењу са нестимулисаним *BV2* ћелијама (слика 33). Након третмана витаминима Бе комплекса, експресија *CD11b* је додатно повећана од стране *BV2* ћелија, док је експресија *CD86* показала тенденцију смањења. Добијени резултати указују на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у модулацији фенотипског профила ЛПС-ом стимулираних *BV2* ћелија.

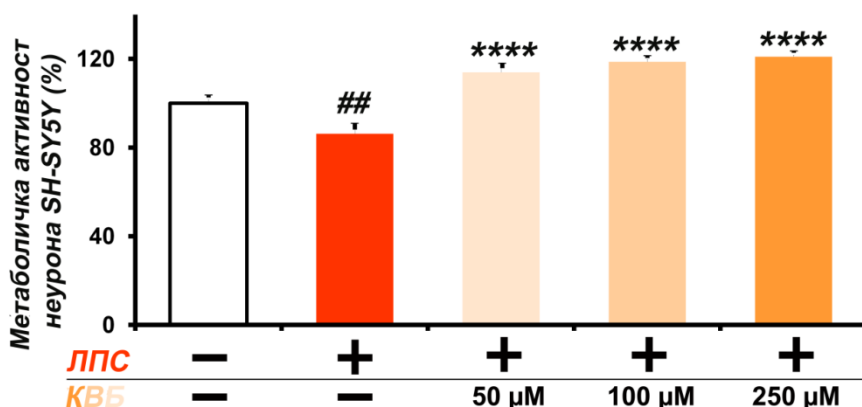


**Слика 33. Ефекти комплекса витамина Бе на експресију одабраних маркера код ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.**

(А) Ефекти комплекса витамина Бе на експресију CD11b и ILT3 на нестимулисане и ћелије стимулисане ЛПС-ом, у три различите концентрације, представљени као средњи интензитет флуоресценције (енгл. *Mean Fluorescence Intensity*, MFI). (Б) Ефекти комплекса витамина Бе на експресију CD163, IL-4, CD11b, CD86, ILT3, Ly6C, CXCR1 и CD11c код нестимулисаних и ћелија третираних комплексом витамина Бе, у три различите концентрације, представљене као MFI или проценат (%). Сва мерења су урађена у кватрипликату у три независна експеримента, рачунајући средњу вредност  $\pm$  стандардну девијацију. Приказани су репрезентативни резултати. \* $p < 0,05$  у поређењу са одговарајућим контролама. Липополисахарид (ЛПС); Комплекс витамина Бе (КВБ).

#### 4.4.3 Ефекат супернатаната BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса на неуронске SH-SY5Y ћелије

Ефекат супернатаната ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија микроглије третираних витаминима Бе комплекса на метаболичку активност SH-SY5Y неурона приказан је на графику 8. Након инкубације ћелија неурона у присуству супернатанта ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија микроглије третираних витаминима Бе комплекса, проценат метаболичке активности неурона био је значајно повећан у поређењу са неуронима третираним супернатантима само ЛПС-ом стимулираних ћелија микроглије.



**График 8. Ефекат супернатаната ЛПС-стимулираних BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса на метаболичку активност SH-SY5Y ћелија.**

Резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, из репрезентативног експеримента од три независна експеримента изведена у кватрипликату. ## $p < 0,01$  ЛПС-ом стимулисане BV2 ћелије vs. нестимулисане ћелије. \*\*\*\* $p < 0,0001$  ЛПС-ом стимулисане BV2 ћелије третиране витаминима Бе комплекса vs. ЛПС-ом стимулисане BV2 ћелије.

Липополисахарид (ЛПС); Комплекс витамина Бе (КВБ).

Метаболичка активност SH-SY5Y неурона третираних супернатантима нестимулираних BV2 ћелија није се значајно разликовала од контролних ћелија третираних само комплетним медијумом, док је третман супернатантима културе ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија значајно смањио проценат метаболичке активности неуронских ћелија. Међутим, показано је да је третман витаминима Бе комплекса елиминисао неуротоксични ефекат супернатаната културе ЛПС-ом активираних BV2 ћелија. Показано је да су супернатанти ЛПС-ом активираних BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса у све три испитиване концентрације повећале метаболичку активност неуронских ћелија (график 8). Ови резултати указују на потенцијал витамина Бе да ублаже/спрече неуротоксични ефекат посредован медијаторима

продукованим од стране активираних ћелија микроглије. На овај начин, комплекс витамина Бе може да инхибира/смањи неуродегенерацију изазвану неуроинфламацијом, што ове витамине чини једним од потенцијалних неуропротективних агенаса.

## 4.5 Молекулски докинг

Како би се испитали потенцијални анти-инфламаторни механизми испитиваног комплекса витамина Бе (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) према кључним протеинима ЛПС-индукованог инфламаторног пута (*LBP*, *CD14* и *TLR4/MD2*) у ћелијама микроглије, као и према *iNOS* протеину, урађена је анализа молекулског докинга. Вредности енергије везивања ( $\Delta G$ ), константе инхибиције ( $K_i$ ) и интеракције између аминокиселинских остатака места везивања протеина од интереса и свих витамина из комплекса представљени су у табелама 9-14. На основу добијених резултата, показано је да скоро сви испитани витамини имају висок потенцијал везивања за протеине овог сигналног пута.

### 4.5.1 Валидација протокола за молекулски докинг

Валидација протокола за молекулски докинг је изведена анализом ко-кристализованих лиганата са њиховим природним рецепторима и поређењем RMSD вредности између постојећих кристалографских конформација и оних добијених њиховим поновним докингом. Утврђено је да су RMSD вредности 1,56 Å за *LBP*, 2,35 Å за *TLR4/MD2* и 1,26 Å за *iNOS*, што указује на високу ефикасност као и валидност протокола за молекулски докинг који се користио у анализи. Валидација протокола за *CD14* протеин није могла да се изврши услед недостатка кристалне структуре са ко-кристализованим лигандом за овај протеин.

### 4.5.2 Молекулски докинг одабраних витамина Бе са кључним протеинима *TLR4/MD2* сигналног пута

#### 4.5.2.1 Молекулски докинг одабраних витамина Бе са *LBP* протеином

Анализа молекулског докинга показала је да су витамини Бе1, Бе2 и Бе5 испољили најбољи потенцијал везивања за N-терминални регион *LBP* протеина, у поређењу са осталим витаминима из комплекса (табела 9). Процењене слободне енергије везивања витамина Бе1, Бе2 и Бе5 за N-терминални регион су биле сличне, са одговарајућим вредностима (-5,11 kcal/mol, -5,17 kcal/mol, и -5,19 kcal/mol), као и

константама инхибиције (178,23  $\mu\text{M}$ , 162,31  $\mu\text{M}$  и 157,93  $\mu\text{M}$ ). Витамини Бе1, Бе2 и Бе5 су показали могућност интеракција са аминокиселинским остацима укљученим у место везивања ЛПС-а (Arg119, Lys120 и Lys124), укључујући и хидрофобне интеракције и водоничне везе са аминокиселинским остацима изван активног места *LBP* протеина.

**Табела 9.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака N-терминалног региона *LBP* протеина и појединачних витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Интеракције са ЛПС везујућим местом*	Интеракције изван ЛПС везујућег места*
Бе1	-5,11	178,23	Arg119, Lys124	Lys117, Ser63, Tyr76, Leu125
Бе2	-5,17	162,31	Arg119, Lys120	Asp65, Gly72, Arg73
Бе3	-3,94	1300,00	Arg119	Lys117, Leu125
Бе5	-5,19	157,93	Lys124	Lys115, His79, Trp116, Leu125
Бе6	-3,74	1810,00	Arg119, Lys124	Lys117, Ser63, Tyr76, Gln75
Бе12	-3,24	4250,00	/	Lys117, Ser63, Gly64, Asp65, Tyr76, Glu77, Val118, Leu125

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису приказане у овој табели.

Аминокиселински остаци Arg-119, Lys-120 и Lys-124 чине везујуће место *LBP* протеина за ЛПС.

Као што је приказано (табела 9), предвиђено је да витамин Бе1 може остварити интеракције са аминокиселинским остацима Ser63, Tyr76 и Leu125 (конвенционалне водоничне везе), са аминокиселинским остацима Arg119 и Lys124 (хидрофобне интеракције, алкил и Pi-алкил), и Pi-катјонску интеракцију са Lys117 аминокиселинским остатком. За витамин Бе2 је предвиђено да потенцијално може да формира конвенционалне водоничне везе са аминокиселинама Arg73, Arg119 и Lys 120, угљеникове водоничне везе са остатком Gly72, Arg119 и Lys120, хидрофобне интеракције (алкил и Pi-алкил) са Arg73 и Pi-катјонску и Pi-ањонску интеракцију са Asp65 и Arg73. За витамин Бе5 предвиђен је највећи афинитет везивања преко конвенционалних водоничних веза са Trp116, Lys124, Leu125 и Gly127, као и кроз хидрофобне интеракције (алкил и Pi -алкил) са His79 и Lys115 (слика 34А).

Поред тога, урађена је и анализа молекулског докинга на С-терминалном домену везивања ЛПС-а за *LBP* протеин, за који се такође показало да је укључен у пренос ЛПС-а [149]. Витамини Бе1, Бе2 и Бе6 су показали најбољи потенцијал везивања за С-терминални домен, са вредностима енергија везивања (-5,54 kcal/mol, -4,78 kcal/mol и -4,65 kcal/mol) и константама инхибиције (86,28  $\mu$ М, 314,07  $\mu$ М и 388,13  $\mu$ М), сличним онима уоченим за N-терминални домен. Витамини Бе1 и Бе2 су такође показали интеракције са кључним аминокиселинским остацима за пренос ЛПС-а (Lys 319 и Arg322) (табела 10).

**Табела 10.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака С-терминалног региона *LBP* протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

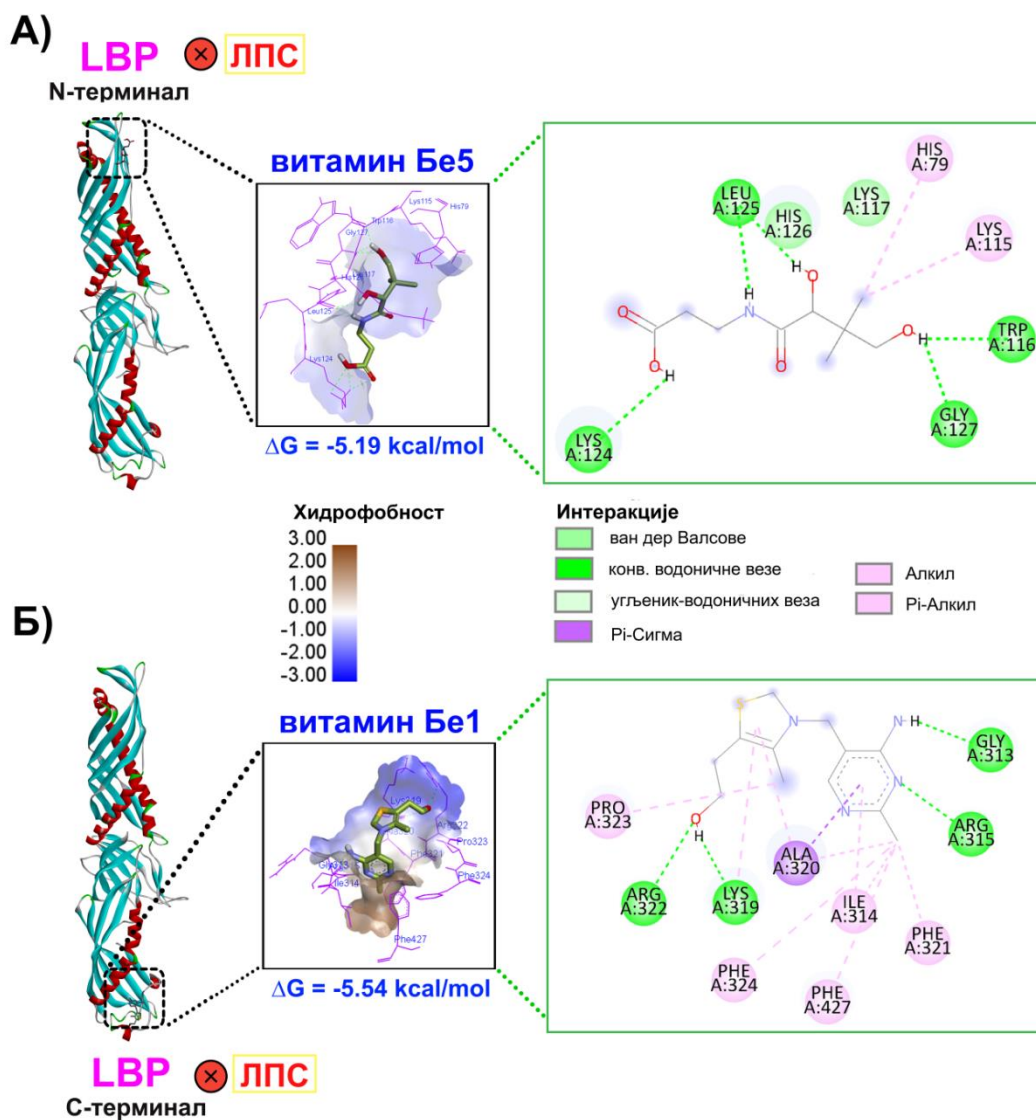
Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu$ М)	Интеракције са ЛПС везујућим местом*	Интеракције изван ЛПС везујућег места*
Бе1	-5,54	86,28	Lys319, Arg322	Pro323, Ala320, Phe324, Ile314, Phe427, Phe321, Gly313, Arg315
Бе2	-4,78	314,07	Lys319, Arg322	Arg315, Ala320, Pro323, Leu423, Phe324, Phe427
Бе3	-4,20	839,70	/	Phe424, Leu428, Ile314, Tyr431
Бе5	-4,28	729,53	Lys319, Arg322	Ala320, Gly313, Arg315, Phe427
Бе6	-4,65	388,13	/	Phe321, Phe427, Phe324, Ile314, Ala320, Arg315, Gly313
Бе12	-5,12	175,54	Lys319, Arg322	Arg315, Ala320, Phe427, Gly313, Asn317, Pro323, His310, Ser312, Asp311

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису приказане у овој табели.

Аминокиселински остаци Lys319 и Arg322 представљају везујуће место *LBP* протеина за ЛПС.

Витамин Бе1 је предвиђен највећи потенцијал везивања кроз хидрофобне интеракције (алкил и Pi-алкил) са Pro323, Phe321, Phe324, Phe427 и Ile314, као и кроз Pi-Сигма интеракцију са Ala320 и конвенционалним водоничним везама са Gly313 и Arg315 (слика 34Б). Такође, као што је приказано (табела 10), предвиђено је да витамин Бе2 је оствари алкил, Pi-алкил и Pi-Сигма интеракције са Arg315, Ala320, Pro323, Leu423, Phe324, Phe427 аминокиселинским остацима, као и конвенционалне водоничне везе са Arg315 и Ala320 остацима. За витамин Бе6 није детектован потенцијал за формирање интеракција са кључним аминокиселинским остацима који учествују у

везивању ЛПС-а, међутим већи број интеракција (алкил, Pi-алкил и Pi-Сигма) је примећен са другим аминокиселинским остацима, укључујући Phe321, Phe427, Phe324, Ile314, Ala320, Arg315 и Gly313.

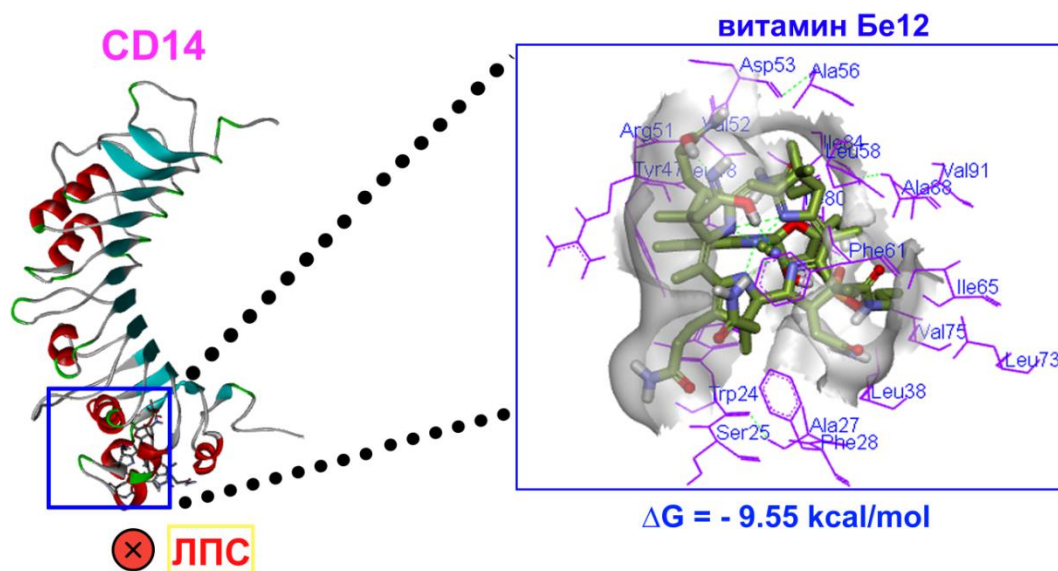


**Слика 34.** Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и остварене интеракције/везе са аминокиселинским остацима места везивања (А) витамина Бе5 са N-терминалом *LBP* протеина; (Б) витамина Бе1 са C-терминалом *LBP* протеина.

#### 4.5.2.2 Молекулски докинг одабраних витамина Бе са *CD14* протеином

Најбољи потенцијал везивања за N-терминални домен *CD14* протеина показао је витамин Бе12, са одговарајућом енергијом везивања од -9,55 kcal/mol. Примарне

предвиђене интеракције између витамина Бе12 и места везивања *CD14* протеина (N-терминални регион, остаци 20-171) укључивале су конвенционалне и угљеникове водоничне везе са остацима Arg51, Thr54, Ala56 и Ile84, као и хидрофобне интеракције (алкил, Pi-алкил, Pi-сигма) са Phe28, Phe61, Ala27, Ala88, Leu58, Leu45, Leu48 и Trp24 аминокиселинским остацима (слика 35).



**Слика 35. Најбоље позиције добијене у анализи молекуларног докинга и предвиђене интеракције/везе витамина Бе12 са аминокиселинским остацима места везивања N-терминала *CD14* протеина.**

Такође, витамин Бе1 је показао релативно висок афинитет везивања у односу на друге витамине из комплекса (табела 11), са процењеном енергијом везивања од -5,88 kcal/mol. Као што је представљено (табела 11), предвиђене интеракције/везе између витамина Бе1 и места везивања *CD14* укључивале су водоничне везе (конвенционалне и угљеник водоник) са аминокиселинским остацима Ser69, Leu70, Ala33, Ala27 и Cys30, као и хидрофобне интеракције (алкил, Pi-Pi T-облика и Pi-алкил) са Phe28, Val36, Leu68, Ile64, Ile65 и Phe61 аминокиселинским остацима. Поред ниже слободне енергије везивања добијене за Бе12, константа инхибиције,  $K_i$  (табела 11), такође је била значајно нижа (0,01  $\mu\text{M}$ ) од  $K_i$  процењене за Бе1 витамин (48,67  $\mu\text{M}$ ), што указује на значајно бољи потенцијал везивања витамина Бе12 за активно место *CD14* протеина. Од осталих витамина Бе из комплекса, витамин Бе6 је такође показао релативно добар афинитет везивања (-4,49 kcal/mol), иако са значајно вишом константом инхибиције (507,83  $\mu\text{M}$ ) (табела 11).



**Табела 11.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака N-терминалног региона места везивања *CD14* протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )	Интеракције са ЛПС везујућим местом* (N-терминални регион)*
Бе1	-5,88	48,67	Ser69, Leu70, Cys30, Ala33, Ala27, Phe28, Val36, Leu68, Ile64, Ile65, Phe61
Бе2	-3,98	1210,00	Ala27, Cys30, Phe28, Ile65, Phe61, Leu58, Val91, Leu68
Бе3	-4,67	375,25	Gly32, Ser69, Ala33, Leu68, Val36, Leu70
Бе5	-3,59	2330,00	Tyr47, Arg51, Trp24, Val52, Leu48
Бе6	-4,49	507,83	Leu70, Ala27, Cys30, Cys15, Val36, Leu38, Leu68
Бе12	-9,55	0,01	Arg51, Thr54, Ala56, Ile84, Phe28, Phe61, Ala27, Ala88, Leu58, Leu45, Leu48, Trp24

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису приказане у овој табели.

N-терминални регион (аминокиселински остаци 20-171) чине везујуће место за ЛПС.

Анализа молекулског докинга урађена је и на С-терминалном домену CD-14 протеина, који је такође описан као ЛПС везујуће место [149]. Резултати били су слични онима за N-терминални регион, осим за витамин Бе12, који је показао најнижи афинитет везивања за С-терминални домен CD-14 протеина. Најбољи капацитет везивања за С-терминални домен је примећен за витамин Бе6, са енергијом везивања од -6,52 kcal/mol (табела 12).

**Табела 12.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака С-терминалног региона места везивања *CD14* протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )	Кључни остаци за ЛПС трансфер*	Интеракције са везујућим местом* (С-терминални регион)*
Бе1	-5,00	215,74	/	Phe262, Ser239, Asn238, Arg285, Lys266, Asp242
Бе2	-4,49	511,14	Asp280	His237, Phe262, Asn259, Ser261, Tyr283, Lys304
Бе3	-5,18	158,50	/	Pro296, Ala274, Leu272, Gly271, Pro269, Glu294
Бе5	-3,62	$2,23 \times 10^3$	Asp280	Lys304, Ser261, Asn259, Phe262
Бе6	-6,52	16,66	/	Ala243, Lys270, Pro269, Ala244, Arg241, Ser217
Бе12	-1,85	$44,3 \times 10^3$	Asp280, Asp234	Asn300, Leu301, Ser302, Ser282, Leu279, Val278, Ser261, Asn259, Ser236, His237, Val205

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису приказане у овој табели.

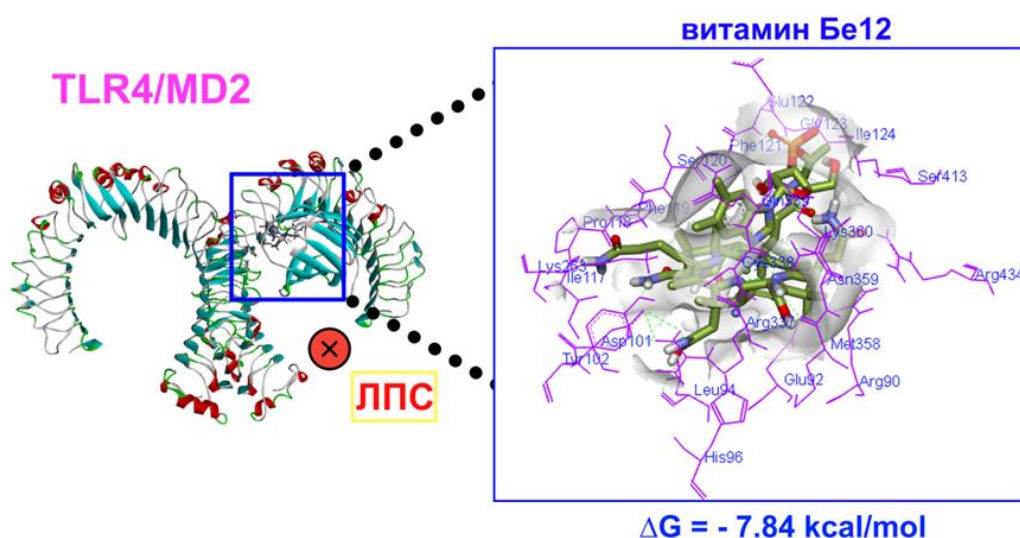
Аминокиселински остаци Asp234 и Asp280 представљају везујуће место *CD14* протеина за ЛПС.

Главне предвиђене интеракције између витамина Бе6 и *CD14* укључивале су аминокиселинске остатке Ala243, Lys270, Pro269, Ala 244, Arg241 и Ser217, међутим нису показане интеракције са кључним остацима који учествују у везивању ЛПС-а (Asp 234 и Asp280) [149]. Поред тога, витамини Бе1, Бе2 и Бе3 су показали релативно сличан афинитет везивања са енергијом везивања од -5,00 kcal/mol, -4,49 kcal/mol и -5,18 kcal/mol (табела 12). Као што је представљено у табели 12, само витамини Бе2 и Бе5 су показали интеракције са једним од кључних остатака (Asp280) за пренос ЛПС-а, међутим уочени афинитет везивања био је већи за витамин Бе2. Иако витамини нису показали одговарајући број интеракција са кључним остацима, велики број интеракција (конвенционалне водоничне везе, угљеник водоничне везе и Рi-алкил интеракције) показан је са осталим аминокиселинским остацима на месту везивања (табела 12), што указује на потенцијалну улогу витамина Бе у инхибицији преноса ЛПС-а.

#### 4.5.2.3 Молекулски докинг одабраних витамина Бе са *TLR4/MD2* комплексом

Резултати молекуларног докинга између различитих Бе витамина и *TLR4/MD2* комплекса су показали да витамини Бе1, Бе2 и Бе12 имају најбољи потенцијал

везивања кроз водоничне (конвенционалне водоник и угљеник-водоник) везе, хидрофобне (алкил, Pi-алкил, Pi-сигма и Pi-Pi), Pi-сумпор, као и ван-дер-Валсове интеракције. Најнижа слободна енергија везивања показана је за витамин Бе12 (-7,84 kcal/mol), затим -6,19 kcal/mol за Бе1, и -5,91 kcal/mol за витамин Бе2 (табела 13). У овој *in silico* анализи предвиђена је могућност да витамин Бе12 формира највећи број конвенционалних водоничних веза са кључним остацима активног места *TLR4/MD2* комплекса (А: Lys263, С:Glu122, В:Arg434 и С:Ile124), као и са остацима изван места везивања, укључујући Gly123, Pro118, Leu94 и Met358 (слика 36).



**Слика 36. Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и предвиђене интеракције/везе витамина Бе12 са аминокиселинским остацима места везивања *TLR4/MD2* комплекса.**

За витамин Бе1 је такође предвиђено успостављање интеракције унутар активног места (С:Тyr131, В:Phe438, В:Arg434 и С:Ile124), али и изван места везивања (Arg90, Glu437 и Leu87). Витамин Бе2 је такође би могао да буде укључен у интеракције са остацима места везивања (А:Lys263, С:Ser120, С:Phe119, С:Val61, С:Leu94 и С:Ile117), као и са остацима изван везујућег места (Тyr102, Pro118 и Phe104) (табела 13). Добијени резултати показали су да витамин Бе12 има најбољи потенцијал везивања за *TLR4/MD2* комплекс, са значајно нижом константом инхибиције (1,79  $\mu\text{M}$ ), у односу на остале витамине Бе1 и Бе2 (28,78  $\mu\text{M}$  и 46,24  $\mu\text{M}$ ) (табела 13).

**Табела 13.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака места везивања *TLR4/MD2* комплекса и витамина (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )	Интеракције са ЛПС везујућим местом*	Интеракције изван ЛПС везујућег места*
Бе1	-6,19	28,78	Tyr131, Phe438, Arg434, Ile124	Arg90, Glu437, Leu87
Бе2	-5,91	46,24	Lys263, Ser120, Phe119, Val61, Leu94, Ile117	Tyr102, Pro118, Phe104
Бе3	-4,37	628,92	Ser413, Arg434, Phe438	Arg90
Бе5	-4,43	562,63	Lys360	Arg337, Asp101, Leu94, His96, Tyr102
Бе6	-4,52	482,28	Lys263	Asp101, Met358, Arg337
Бе12	-7,84	1,79	Lys263, Glu122, Arg434, Ile124	Gly123, Pro118, Leu94, , Met358

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису приказане у овој табели.

Аминокиселински остаци Lys263, Lys360 (**А ланац**), Ser413, Arg434, Phe438 (**В ланац**) и Ile46, Ile52, Leu54, Val61, Val63, Phe65, Leu74, Phe76, Leu78, Leu94, Ile117, Phe119, Ser120, Phe121, Glu122, Ile124, Phe126, Tyr131, Ala135, Phe147, Leu149, Phe151, Ile153 (**С ланац**) *TLR4/MD2* протеина представљају везујуће место за ЛПС.

#### 4.5.2.4 Молекулски докинг одабраних витамина Бе са *iNOS* протеином

Анализа молекуларног докинга за *iNOS* протеин показала је да витамини Бе1 и Бе2 испољавају највећи капацитет везивања за активно место овог ензима, са одговарајућим енергијама везивања од -7,06 kcal/mol и -8,47 kcal/mol (табела 14).

**Табела 14.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака места везивања *iNOS* протеина и витамина (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).

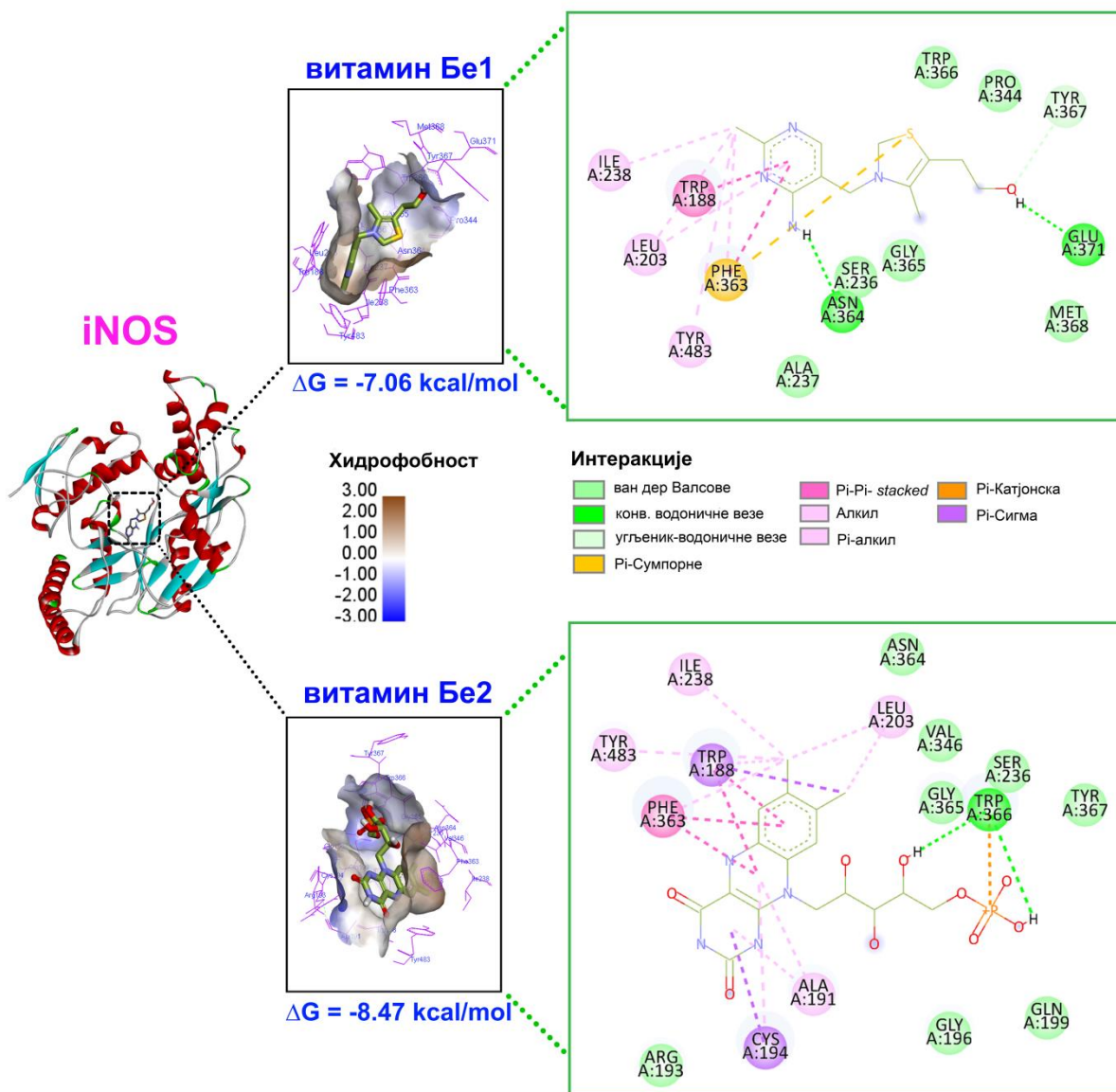
Витамин	$\Delta G$ (kcal/mol)	Ki ( $\mu M$ )	Интеракције са ЛПС везујућим местом*	Интеракције изван ЛПС везујућег места*
Бе1	-7,06	6,68	Glu371, Tyr367	Asn364, Phe363, Trp188, Cys194, Leu203, Ile238
Бе2	-8,47	0,61	Trp366	Cys194, Trp188, Phe363, , Leu203, Tyr483, Ala191
Бе3	-4,91	251,29	/	Tyr483, Ala237, Asn364, Ser236, Trp188, Phe363
Бе5	-4,49	511,38	Glu371, Trp366	Ile195, Gly196, Arg193, Ala433, Met368, Met428
Бе6	-5,21	150,59	/	Asn364, Trp188, Phe363, Ala191, Tyr483
Бе12	-5,78	57,70	Gln257	Ser112, Ile113, Met114, Asn115, Arg260, Ala275, Ala276, Thr277, Leu278, Ser250, Glu279, Phe280, Asn348, Glu488, Trp490, Asp379, Arg375, Arg382, Gln381, Trp457

\*Ван-дер-Валсове интеракције нису укључене у овој табели.

Аминокиселински остаци Gln257, Tyr341, Trp366, Tyr367 и Glu371 представљају активно место *iNOS* протеина.

У *in silico* анализи су за оба витамина предвиђене сличне вредности за слободну енергију везивања, међутим Ki за витамин Бе2 је била значајно нижа (0,61  $\mu M$ ) у поређењу са Ki витамина Бе1 (6,68  $\mu M$ ), што указује на значајно већи афинитет везивања витамина Бе2 за *iNOS* протеин. Као што је приказано (табела 14), оба витамина су показала потенцијал за формирање интеракција са кључним аминокиселинским остацима који учествују у везивању ЛПС-а, укључујући Gln257, Tyr341, Trp366, Tyr367 и Glu371, као и са већим бројем аминокиселинских остатака изван места везивања. Наиме, витамин Бе1 има потенција да формира интеракције путем конвенционалних водоничних веза (Glu371 и Asn364), угљеник-водоничних веза (Tyr367), Pi-сумпора (Phe363), хидрофобних Pi-Pi (Trp188 и Phe363), алкил (Cys194, Ile238 и Leu203) и Pi-алкил интеракција (Phe363, Tyr483, и Leu203) (слика 40). За витамин Бе2 је предвиђено успостављање интеракција кроз конвенционалне водоничне везе и електростатичке Pi-катјонске интеракције (Trp366), хидрофобне Pi-сигма (Cys194 и Trp188), Pi-Pi (Trp188 и Phe363), алкил (Ile238 и Leu203) и Pi-алкил

интеракције (Trp188, Phe363, Tyr483, Ala191 и Cys194) (слика 37). Осим тога, витамин Беб и Бе12 су такође показали релативно добре афинитете везивања (-5,21 kcal/mol и -5,78 kcal/mol) (табела 14).



**Слика 37. Најбоље позиције добијене у анализи молекуларног докинга и предвиђене интеракције/везе са аминокиселинским остацима места везивања витамина Бе1 и витамина Бе2 за *iNOS* протеин.**

## **5 ДИСКУСИЈА**



МС је хронична аутоимунска болест ЦНС-а чије главне карактеристике укључују инфламацију, демјелинизацију, и оштећење аксона. Последњих деценија широм света примећен је пораст броја људи који оболевају од МС-а. Прогресивни губитак функције нерава и мијелинског омотача може довести до развоја инвалидитета и стога представљати озбиљан изазов у обављању свакодневних активности. Услед комплексног тока болести и варирања клиничких манифестација између пацијената, не постоји јединствена терапија за МС-у. Доступни третмани ефикасно контролишу прогресију болести, међутим оваква имunosупресивна терапија подразумева дугорочну примену што може довести до супримирања функција имунског система и повећати подложност инфекцијама и другим обољењима [72, 74]. Управо због тога, развијају се нови приступи у лечењу МС-е који ће обезбедити дугорочну неуропротективну корист, без негативних последица на функцију имунског система. Један од приступа подразумева примену имуномодулатора који се обично примењују у комбинацији са другим стандардним имunosупресивним лековима и тако доприносе ефикаснијој контроли функције имунског одговора, доводе до поновног успостављања имунолошке хомеостазе и на тај начин спречавају прогресију болести [75]. Литературни подаци истичу витамин Де као један од највише истражених витамина за терапију МС-е. Хипотеза да адекватна исхрана витамином Де може допринети превенцији МС-е била је првобитно предложена да објасни географску дистрибуцију ове болести (с обзиром на највећу учесталост у северном делу хемисфере), али тек недавно је датљније истражена веза између витамина Де и ризика од развоја МС-е. Бројне студије потврђују значајну улогу активног облика витамина Де у имунском систему, што га чини моћним имуномодулатором који регулише функцију проинфламаторних и регулаторних Т-ћелија [150-152]. Неколико истраживања је показало да су код пацијената са МС-ом нивои серумског 1,25-дихидрокси и 25-хидрокси витамина Де били значајно нижи у поређењу с контролним особама, што додатно истиче значај витамина Де у патофизиологији аутоимунских болести као што је МС [150, 153]. Такође, витамини групе Бе имају многобројне имуномодулаторне функције и играју важну улогу у регулацији имунског одговора [76]. Витамини групе Бе су кључни коензими који учествују у регулацији многих метаболичких путева, укључујући метаболизам угљених хидрата, протеина и липида. Витамини групе Бе су веома важни за правилан развој и функционисање нервног система, чија дефицијенција је повезана са различитим неуролошким обољењима, међу којима је и МС [154]. Поред тога,

поремећаји метаболизма витамина групе Бе су повезани и са дизбиозом микробиоте црева која је присутна код пацијената оболелих од различитих неуроинфламаторних болести, укључујући и МС-у [155]. Један од најдетаљније истражених витамина групе Бе у контексту патогенезе МС-е је витамин Бе12. Низак ниво витамина Бе12 потврђен је у серуму код пацијената са МС-ом, као и код пацијената са Паркинсоновом болешћу [156-158]. Између осталог, показано је да дефицијенција витамина Бе12 утиче и на функцију глијалних ћелија, као и на формирање мијелина у ЦНС-у [159]. Додатно, утврђено је да дефицијенција витамина Бе12 може довести до појачане продукције цитокина *IFN- $\gamma$* , што може допринети погоршању стања код пацијената са МС-ом [160, 161]. Познато је да неки пацијенти са МС-ом пате од мегалобластичне анемије или макроцитозе, стања која могу бити узрокована дефицијенцијом витамина Бе12 [158, 162, 163]. Такође, на животињском моделу МС-е, ЕАЕ-у, показано је да је комбинована примена витамина Бе12 и *IFN- $\beta$*  довела до побољшања клиничке слике и смањења процеса демиелинизације [164]. Иако у мањем броју, постоје студије које указују и на значајну улогу у нервном систему и других витамина групе Бе. На пример, показано је да су ћелије глије главни извор *NAD* коензима за неуроне током стреса, а витамин Бе3 је један од прекурсора за синтезу овог коензима. У условима дефицијенције *NAD*, неурони могу постати изузетно осетљиви на дегенерацију која је карактеристична за МС-у [165]. Овај третман у ЕАЕ-у довео је до повећаног нивоа *NAD* молекула и значајно је ублажио прогресију болести [101]. Такође, неколико студија указало је и на важну улогу тиамин у нервном систему [166, 167]. Наиме, установљено је да дефицијенција тиамин код мишева са ЕАЕ-ом узрокује повећану експресију *CCL2* хемокина у кичменој мождини, као и пролиферацију Т-ћелија у лимфним чворовима, што је довело до погоршања симптома болести [85]. Поред тога, клиничке студије су показале да су пацијенти са МС-ом који су примали терапију тиамином имали значајно смањен осећај умора [168-170]. Блиска веза између витамина групе Бе и регулације цитокина описана је у стањима као што је депресија, где је примећено да суплементација витаминима Бе има потенцијал да модулише про-инфламаторни одговор и ублажи симптоме депресије [171]. Такође, истакнути су и анти-инфламаторни и анти-ноцицептивни ефекти витамина Бе. Наиме, установљено је да сам витамин Бе2, као и комбинација витамина Бе1, Бе6 и Бе12, испољавају анти-ноцицептивне и анти-инфламаторне ефекте у различитим експерименталним моделима [172, 173]. Иако је значај витамина Бе за адекватно функционисање нервних система

добро познат, постоји ограничен број података о третманима који укључују више од три витамина групе Бе у комбинацији. Због тога, основни фокус ове дисертације био је истраживање ефекта истовремене примене неколико Бе витамина. Сходно томе, предмет ове докторске дисертације био је да се испита утицај третмана комплексом витамина Бе (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) на прогресију ЕАЕ-а и процесе неуроинфламације применом *in vivo*, *in vitro* и *in silico* истраживања.

Добијени резултати показали су да третман витаминима Бе комплекса утиче на ток болести и клиничке манифестације ЕАЕ-а код пацова. Третман витаминима Бе довео је до смањења клиничких знакова током пика болести, а ЕАЕ животиње третиране витаминима Бе комплекса развиле су блажи облик болести и брже се опоравиле, у поређењу са нетретираним ЕАЕ животињама. Макроскопски видљива разлика у величини између левог и десног поплитеалног лимфног чвора је детектована након индукције ЕАЕ-а, у свим испитиваним групама. Узимајући у обзир да је леви задњи екстремитет био место индукције ЕАЕ-а, увећани поплитеални лимфни чворови, регионални дренарајући лимфни чворови тог екстремитета, су вероватно последица интензивног процеса активације Т-ћелија специфичних за антигене присутне у емулзији примењеног хомогената. Третман ЕАЕ животиња витаминима Бе комплекса је довео до смањења броја лимфоидних фоликула у региону кортекса поплитеалних дренарајућих лимфних чворова, а у њима су примећени и мањи епителиоидни грануломи. Ови налази указују на потенцијалну анти-инфламаторну улогу примењеног комплекса витамина Бе, односно његов значај у спречавању/контроли прекомерног инфламаторног одговора, имајући у виду уочен нижи степен активације лимфоцита у испитиваним лимфним чворовима који представљају почетно место презентације антигена и индукције инфламаторног одговора.

Одређивање густине једара може пружити увид у степен инфилтрације имунских ћелија, односно инфламаторни статус испитиваног ткива. У раној фази болести, третман комплексом витамина Бе је смањио густину једара у феморалном нерву и мишићу квадрицепса, иако је на крају болести примећено значајно повећање у густини једара у оба испитивана ткива. Могуће објашњење за значајно повећање густине једара у феморалном нерву, може бити нарушена пропустљивост крвно-нервне баријере која је карактеристична у процесима прогресивних инфламаторних стања, као што је ЕАЕ. Одржавање адекватне пропустљивости/интегритета крвно-нервне баријере

регулисано је протеинима чврстих веза, укључујући фамилију клаудина, оклудина и трицелулина [174]. Процес индукције болести може изазвати промене у архитектури ових протеина и самим тим утицати на пропустљивост крвно-нервне баријере [175]. Наиме, показано је да је код пацова са ЕАЕ-ом смањена експресија ових протеина (укључујући клаудин-3 и клаудин-5) индукована про-инфламаторним цитокинима *TNF- $\alpha$*  и *IL-17*. У раној фази третмана, промене у функцији феморалног нерва (клинички манифестоване као пареза/парализа задњих екстремитета) праћене су смањењем густине једара нерва, која је била у корелацији са смањењем мишићне густине једара. Насупрот томе, показано је да је третман комплексом витамина Бе значајно утицао на повећање густине једара у феморалном нерву на крају болести. Ова запажања могу бити повезана са недавно објављеним резултатима који показују да је у моделу повреде периферног нерва, третман витаминима Бе комплекса узроковао пораст у броју макрофага/Шванових ћелија, које су кључне у процесима регенерације нерва [126, 127]. Поред Шванових ћелија, једна студија је истакла и значај глијалних ћелија олфакторног нерва, за које је показано да су ефикасније од Шванових ћелија у уклањању мијелинског дебриса, као и подстицању регенерације нерава. На основу ових налаза, ко-трансплантација оба типа ћелија је предложена као потенцијална терапија за регенерацију аксона, унутар ЦНС-а и периферног нервног система (ПНС) [176]. Литературни подаци показали су да су витамини Бе, Бе1, Бе6 и Бе12, утицали на побољшање процеса регенерације нерава, промовишући повећање броја Шванових ћелија, које представљају једну од најважнијих глијалних ћелија ПНС-а неопходних за формирање мијелина и опоравак аксона [177]. Могуће објашњење за пораст густине једара у захваћеном феморалном нерву након индукције ЕАЕ-а, могло би бити у складу са процесом инфилтрације макрофага различите поларизације који олакшавају регенерацију нерава, уклањањем остатака мијелина и промоцијом пролиферације и миграције ћелија [178]. Литературни подаци указују да витамин Бе12 један учествује у процесима формирања мијелина. Поред тога, у једној пилот студији, показано је да високе дозе комплекса витамина Бе (Бе1, Бе6 и Бе12) побољшавају функције оптичког нерва код пацијената са МС-ом [179]. Код пацијената са МС-ом може доћи и до развоја периферне неуропатије, а недостатак одређених хранљивих супстанци, као што је витамин Бе12, може бити један од фактора који доприносе овом стању [180]. Иако се неуропатски бол често приписује абнормалностима у ЦНС-у код пацијената са МС-ом, забележени су случајеви код којих је уочена повишена осетљивост на топлотни

стимулус, што указује на промене у функцији сензорних нерава које могу бити повезане са болом и другим симптомима МС-е. Ово показује да је ПНС такође укључен у прогресију болести, и истовремено указује на то да физиолошка основа осетљивости на бол код пацијената са МС-ом представља сложен процес. Ова комплексност је резултат промена како у ЦНС-у, тако и у ПНС-у [181]. Узимајући у обзир да је МС болест која захвата оба система, и ЦНС и ПНС, неопходно је разматрати оба аспекта у циљу разумевања прогресије болести и приступа у лечењу пацијената са МС-ом. Због свог неуропротективног дејства, витамини Бе комплекса представљају потенцијалну суплементарну терапију за побољшање процеса ремиелинизације захваћених периферних нерава и њихове регенерације [182]. Поред смањења густине једара у феморалном нерву на почетку болести, установљено је да је третман витаминима Бе комплекса допринео и значајном смањењу густине једара у мишићу квадрицепса, у поређењу са нетретираним ЕАЕ животињама. Као што је описано, денервисане мишиће карактерише компензаторни миогени одговор који подразумева формирање нових мишићних влакана посредством сателитских ћелија [183]. Појава мање густине једара у мишићу квадрицепса након третмана комплексом витамина Бе може указивати на мањи број денервисаних мишићних влакана, и сходно томе мањем компензаторном одговору. Ови резултати су у корелацији са студијом где је испитан утицај терапије витаминима Бе комплекса на моделу повреде периферног нерва код пацова. Наиме, у овом истраживању показано је да је терапија комплексом витамина Бе утицала на побољшање процеса регенерације повређеног феморалног нерва, као и на смањење густине једара у мишићу квадрицепсу [125]. Поред тога, смањење густине једара у мишићу квадрицепса на почетку болести након примене комплекса витамина Бе, а које је праћено и мањом густином ћелија у самом нерву, може указати на мањи степен инфламације. Позитиван ефекат на процес регенерације нерава може бити разлог за смањење густине једара у мишићу квадрицепса због краћег периода денервације мишића и истовремено, смањеног компензаторног миогеног одговора [125]. Промене у густини једара периферног нерва и њиме инервисаном мишићу квадрицепса у различитим временским тачкама болести, указују на потенцијалну улогу витамина Бе у процесима инфилтрације и миграције имунских ћелија на место инфламације, као и улогу витамина Бе у процесима регенерације нерва. Како бисмо са сигурношћу могли да утврдимо утицај терапије комплексом витамина Бе на детектоване промене у периферним нервима и мишићима, неопходна су даља

истраживања која између осталог подразумевају идентификацију специфичних ћелијских популација.

Хистопатолошка обележја МС-е и животињског модела ЕАЕ-а обухватају појаву лезија, места повећане перивенуларне лимфо-моноцитне инфилтрације, као и поља демиелинизације у различитим деловима ЦНС-а, што је потврђено и у овој дисертацији. Хистоморфолошка анализа пресека кичмене мождине и предњег мозга указала је на присуство ових промена у обе испитиване групе ЕАЕ животиња (Е и ЕТ). Ипак, треба нагласити да ове промене нису квантификоване, те да је интерпретација резултата заснована на квалитативним описима. У групи ЕАЕ животиња које су примале терапију комплексом витамина Бе, у кичменој мождини уочен је нижи ниво инфилтрације имунских ћелија, који је био праћен и нижим степеном демиелинизације у овим регионима, у односу на групу нетретираних ЕАЕ животиња. Као што је и очекивано, видљива разлика детектована је у пику болести када су присутна места инфилтрата ћелија и поља демиелинизације у различитим регионима ЦНС-а, што је било праћено и клиничком сликом, односно погоршањем симптома ЕАЕ-а код пацова. Мањи степен инфилтрације имунских ћелија који је уочен код ЕАЕ животиња које су примале терапију комплексом витамина Бе, може бити последица очувања КМБ-е. Миграција леукоцита у ЦНС олакшана је услед нарушеног интегритета КМБ-е који је последица хроничног процеса неуроинфламације као што је описано у поглављу (Увод 1.1) [7, 9, 11]. Иако тачни механизми који узрокују нарушавање КМБ-е нису сасвим разјашњени, показано је да про-инфламаторни цитокини директно утичу на повећану пропустљивост КМБ-е, што доводи до олакшане миграције имунских ћелија и за последицу има развој хроничне инфламације у ЦНС-у [184]. Услед чињенице да постоји стална комуникација између ћелија ЦНС-а, КМБ-е и имунског система, контрола ових процеса може бити кључна у одржавању интегритета КМБ-е и самим тим у спречавању даљег ширења инфламације у ЦНС-у. Наиме, у претходним студијама је показано да витамини Бе комплекса имају потенцијал да утичу на одржавање интегритета КМБ-е и на тај начин спрече пролазак имунских ћелија у ЦНС. Витамини групе Бе пролазе КМБ-у процесом активног транспорта који укључује специфичне протеинске транспортере и носаче [185]. У једној студији, показано је да је примена комбинације витамина Бе6, Бе9 и Бе12 довела до побољшања функције КМБ-е и смањења нивоа хомоцистеина у серуму, који код пацијената са когнитивом дисфункцијом испољава неуротоскичне ефекте [186, 187]. Такође, утврђено је да

дефицијенција витамина Бе9 и Бе12 може бити повезана са повишеном концентрацијом хомоцистеина у серуму, за који је показано да је повишен у серуму пацијената са МС-ом и да може довести до развоја инфламације у ЦНС-у [86, 116, 118]. Поред тога, у нетретираној групи ЕАЕ животиња, на пресецима предњег мозга уочена је инфилтрација периваскуларних моноцита у зони хороидног плексуса у трећој вентрикули, у односу на групу ЕАЕ животиња која је примала терапију комплексом витамина Бе. Познато је да имунске ћелије могу доспети до различитих региона ЦНС-а (мозак, кичмена мождина и ЦСТ) или проласком преко хороидног плексуса и лептоменингеалним крвним судовима у ЦСТ, или путем паренхимских капилара и пост-капиларних венула у периваскуларни простор [9, 188, 189]. Квалитативна хистоморфолошка анализа пресека кичмене мождине и предњег мозга указала је на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у одржавању интегритета КМБ-е и контроли процеса инфилтрације имунских ћелија. Међутим, како би се детаљно утврдио механизам деловања комплекса витамина Бе на процесе очувања КМБ-е, као и ефекат на појединачне типове ћелије имунског система неопходна су даља истраживања која би омогућила идентификовање специфичног типа ћелија које су укључене у ове процесе.

Процеси нарушавања КМБ-е могу бити посредовани и дизбиозом микробиоте црева. Многобројне студије указале су на присуство дизбиозе микробиоте црева код пацијената са МС-ом, као и у моделу ЕАЕ-а [59, 190]. Упркос великом броју студија, порекло аутоимунског одговора усмереног према ЦНС-у још увек није у потпуности разјашњено. Наиме, постоје две хипотезе о начину покретања аутоимунског одговора према антигенима у ЦНС-у: (i) Промене се иницијално дешавају у ЦНС-у индукујући инфламаторну каскаду, инфилтрацију имунских ћелија у ЦНС и хроничну инфламацију; (ii) Аутоимунски одговори се покрећу на периферији, а затим долази до инфилтрације имунских ћелија у ЦНС [191, 192]. Досадашња истраживања указују на то да се вероватно оба процеса одвијају током различитих фаза прогресије болести. Недавна истраживања указују на могућу улогу коменсалних микроорганизама црева као модулятора аутоимунског одговора у ЦНС-у. Наиме, показано је да промене у саставу микробиоте црева повећавају подложност за развој аутоимунске болести [193]. Чињеница да микробиота црева продукује витамине Бе комплекса и да ови витамини могу утицати на састав и функцију микробиоте црева, чини их важним факторима у одржавању метаболизма одређених врста коменсалних бактерија и сузбијању



колонизације другим патогеним врстама бактерија [87, 194]. У овој дисертацији, испитан је ефекат третмана витаминима Бе комплекса на састав микробиоте црева у три временске тачке ЕАЕ-а, почетак, пик и крај болести. Показано је да индукција ЕАЕ-а изазива промене у саставу микробиоте црева, посебно током почетка и пика болести. Анализа  $\beta$  диверзитета показала је да је састав микробиоте црева на крају болести, када су се све животиње опоравиле без обзира на присуство третмана, био најсличнији саставу микробиоте црева контролних животиња, што указује на значајну улогу микробиоте црева у процесу опоравка. Поред тога, одређивањем мере бета диверзитета, показано је да су се разлике у саставу микробиоте у односу на контролну групу животиња смањивале двоструко већом брзином у ЕАЕ животињама третираним комплексом витамина Бе, у поређењу са нетретираним ЕАЕ животињама. Ови резултати указују на то да повољан ефекат третмана витаминима Бе комплекса на клиничку слику ЕАЕ-а може бити делимично посредован микробиотом црева. Показано је да је на крају болести код третираних животиња, однос F:V био најсличнији односу F:V код интактних, контролних животиња, што указује на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у регверзији дизбиозе микробиоте изазване ЕАЕ-ом. Најзначајнија промена на нивоу фамилије била је смањење заступљености *Prevotellaceae* у ЕАЕ нетретираним и ЕАЕ животињама третираним комплексом витамина Бе, у поређењу са интактним контролним животињама. Штавише, анализа корелације између клиничког знака болести и заступљености бактеријских родова показала је значајну негативну корелацију између заступљености *Prevotellaceae* UCG-001 и клиничких знакова, што указује да је слабљење симптома ЕАЕ-а било праћено повећањем заступљености представника ове групе бактерија. Бактерије рода *Prevotella* представљају анаеробне грам-негативне бактерије које припадају раздели Bacteroidetes и имају улогу у разградњи полисахарида. Бројне студије су истакле да пацијенти са МС-ом имају смањену заступљеност представника рода *Prevotella*, у поређењу са здравим особама, што указује на потенцијалну повезаност између патогенезе МС-е и смањене заступљености овог рода бактерија, као и на потенцијалну улогу врста рода *Prevotella* у промоцији анти-инфламаторног одговора [190]. Такође, показано је да бактерије рода *Prevotella* стимулишу продукцију *IL-10* у танком цреву, као и да суплементација врстом *Prevotella histicola* може да супримира ЕАЕ [195]. Ови литературни подаци указују на важну везу између заступљености рода *Prevotella* и прогресије болести, као и на потенцијалну улогу ових бактерија у промовисању анти-

инфламаторног одговора код пацијената са МС-ом. У пику болести, заступљеност бактерија из рода *Prevotella* је била знатно виша код ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса у односу на нетретиране ЕАЕ животиње, што указује на повољан ефекат витамина Бе на успостављање хомеостазе микробиоте црева. Добијени резултати су у складу са закључцима недавних клиничких испитивања [155], која имплицирају да се терапијске интервенције које модификују микробиоту црева и фаворизују развој „добрих“ микроорганизама са анти-инфламаторним деловањем могу разматрати као агенси за спречавање/одлагање почетка клиничких релапса болести код пацијената са МС-ом. Иако ови налази указују на значај фамилије *Prevoteallaceae* у патогенези МС-е, неопходне су даље студије како би се утврдило да ли род *Prevotella* може бити потенцијална терапијска стратегија за лечење МС-а, јер су показана и контрадикторна запажања. Повећана заступљеност неких *Prevotella* врста повезана је са инфламацијом мукозе црева, посредованом *Th17* помоћничким ћелијама. Неке *Prevotella* врсте стимулишу епителне ћелије да производе IL-8, IL-6 и CCL20, који могу да промовишу *Th17* имунски одговор у мукози [196]. Ови налази указују на то да неке *Prevotella* врсте могу учествовати у промоцији хроничне инфламације и допринети развоју различитих инфламаторних болести. Такође, приметан пораст заступљености представника фамилије *Erysipelotrichaceae* је детектован на почетку ЕАЕ-а. Литературни подаци указују на учешће ове фамилије бактерија у индукцији *Th17* ћелијског одговора [197], што може утицати на погоршање клиничке слике ЕАЕ-а. Ова претпоставка је у складу са чињеницом да промене у заступљености фамилије *Erysipelotrichaceae* представљају један од маркера гастроинтестиналних болести повезаних са инфламацијом [198]. Такође, предвиђањем метаболичког капацитета микробиоте црева, на почетку болести утврђена је повећана производња метаболита који утичу на метаболички пут „Диференцијација *Th17* ћелија” у нетретираној групи животиња, која је била смањена у групи животиња третираних витаминима Бе. Поред тога, повећање заступљености фамилије *Lachnospiraceae* примећено је искључиво на почетку болести код ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса. Недавне студије су показале корелацију између заступљености представника фамилија *Lachnospiraceae* и промоције анти-инфламаторног одговора посредованог производњом IL-10 и TGF- $\beta$  од стране имунских ћелија, праћену диференцијацијом наивних Т лимфоцита у Т регулаторне, што може бити повезано са детектованим побољшањем клиничких знакова ЕАЕ-а код животиња третираних витаминима Бе

комплекса [199]. Анализа релативне заступљености сегментисаних филаментозних бактерија показала је да не постоје значајне разлике између испитиваних група животиња, међутим, примећен је тренд смањења у заступљености ових бактерија код ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса, што указује на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у регулацији заступљености сегментисаних филаментозних бактерија. Литературни подаци указују на значај сегментисаних филаментозних бактерија у промовисању про-инфламаторног имунског одговора. У студијама на мишевима показано је да ове бакетрије доприносе процесима презентације антигена од стране дендритских ћелија, што доводи до значајног повећања броја про-инфламаторних интраепителних лимфоцита, као што су  $\gamma\delta$  Т-ћелије и  $CD8+$  Т-ћелије [60]. Још важније, утврђено је да сегментисане филаментозне бактерије промовишу диференцијацију *Th17* ћелија и продукцију *IL-17* и *IFN- $\gamma$*  у цревима, који могу узроковати прогресију ЕАЕ-а. Наиме, моноколонијација *germ free* мишева сегментисаним филаментозним бактеријама значајно је повећала клиничке знаке ЕАЕ-а, у поређењу са контролним мишевима, што указује на важну улогу ових бактерија у регулацији имунске хомеостазе [60, 200]. Микробиота црева продукује многе лиганде, који имају имуномодулаторни ефекат на имунске процесе у ЦНС-у. Различити производи и метаболити микробиоте црева имају важну улогу у регулацији имунског одговора и потенцијално могу допринети покретању аутоимуноског одговора према антигенима присутним у ЦНС-у. Литературни подаци наводе и постојање промена у метаболичким путевима микробиоте црева у различитим неуродегенеративним обољењима, укључујући и МС-у [201, 202]. Цревна микробиота, продукцијом одређених метаболита као што су кратколанчане масне киселине, деривати триптофана, као и жучне киселине утиче и на удаљена ткива, као што је ЦНС. Као што је описано (Увод 1.6), имуномодулаторна својства витамина могу имати значајан утицај на састав и функционалност микробиоте црева [203]. На основу *MicFunPred* анализе предвиђања метаболичког капацитета микробиоте црева испитиваних пацова, највеће разлике уочене су за метаболизам аминокиселина, угљених хидрата, липида, као и енергетски метаболизам у обе испитиване групе ЕАЕ животиња без обзира на присуство или одсуство третмана. Промене у овим метаболичким путевима се наводе и код пацијената са МС-ом, као и у животињском моделу ЕАЕ-а, укључујући *KEGG* метаболичке путеве као што су фиксација угљеника, метаболизам метана, метаболизам жучних киселина, метаболизам триптофана, АВС

транспортери, и други [204, 205]. Иако резултати *LefSe* анализе нису показали да постоје значајне разлике у предвиђеним метаболичким путевима између нетретираних и ЕАЕ животиња третираних витаминима Бе комплекса, *Wilcoxon signed-rank* тест указао је на постојање значајних разлика између испитиваних група на почетку и на крају болести. У овим временским тачкама тока болести, највећа разлика између нетретираних и третираних група ЕАЕ животиња примећена је за метаболизам АВС транспортера, који је био смањен након терапије витаминима Бе комплекса. Поред тога, након терапије витаминима Бе комплекса, уочен је тренд смањења метаболизма метана. Овај налаз указује на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе третамана у регулацији овог метаболичког пута јер је познато да је релативна заступљеност *Methanobrevibacter smithii* и продукције метана повећана код пацијената са МС-ом [206]. Значајне разлике на почетку и крају болести између нетретираних и третираних група ЕАЕ животиња уочене су и за метаболичке путеве биосинтезе примарних и секундарних жучних киселина. Литературни подаци указују на регулаторну улогу жучних киселина у неуроинфламаторним процесима. Промене у нивоима жучне киселине у циркулацији могу указивати на везу између прогресије МС-е и метаболизма жучних киселина [207]. У једној студији, показано је да је концентрација циркулишућих секундарних жучних киселина била нижа код пацијената са РРМС-ом у поређењу са здравим особама [208, 209]. Поред тога, у мишјем моделу ЕАЕ-а, циркулишући нивои секундарних жучних киселина су били значајно смањени у поређењу са контролом [209, 210]. У другој студији, установљено је повећање нивоа метаболита жучних киселина (25-хидроксихолестерола) у ЦСТ-и пацијената са РРМС-ом, док је ниво у плазми био смањен [211]. Такође, показано је да су рецептори који су укључени у сигнализацију метаболизма жучних киселина, (укључујући *FXR* и *GPBAR1*) експримирани на глијалним и имунским ћелијама изолованим из лезија беле масе [212]. Третман ћелија микроглије применом секундарне жучне киселине (тауроурсодеоксихолна киселине) у *in vitro* условима довео је до инхибиције поларизације ових ћелија у неуротоксичне и про-инфламаторне фенотипове, што указује на анти-инфламаторно дејство ове жучне киселине на ћелије астроцита и микроглије [213]. Секундарне жучне киселине се формирају путем ензимских модификација примарних жучних киселина од стране конституеаната микробиоте црева. Услед тога, састав микробиоте црева има значајан утицај на ниво жучних киселина које, за узврат, могу регулисати састав микробиоте у цревима путем

директних и индиректних механизма [207]. Добијени резултати указали су на улогу витамина Бе у модулацији метаболизма жучних киселина. На почетку болести уочено је повећање заступљености ових метаболичких путева у нетретираним ЕАЕ животињама, док је након третмана витаминима Бе уочено њихово смањење. Иако литературни подаци наводе да током почетка болести долази до смањења нивоа одређених жучних киселина [207, 208], овакви налази могу бити резултат разлике у: експерименталним условима, соју животиња, начину узорковања као и типу узорка. Узимајући у обзир недовољан број литертаурних података о утицају комплекса витамина Бе на метаболизам жучних киселина као и важност микробиоте у производњи секундарних жучних киселина, неопходно је додатно истражити везу између МС-е, жучних киселина и микробиоте црева. Такође, детектоване су и промене у метаболичком путу триптофана након терапије витаминима Бе комплекса. Триптофан и његови деривати идентификовани су као модулатори процеса инфламације ЦНС-а и повезани су са ризиком настанка и прогресије МС-е [214]. Неопходно је узети у обзир и чињеницу да су неки од витамина Бе (као што су Бе<sub>2</sub>, Бе<sub>6</sub> и Бе<sub>9</sub>) укључени такође у метаболизам триптофана што их чини важним факторима у регулацији овог метаболичког пута [87]. Улога одређених деривата триптофана у МС-и посебно је истакнута с обзиром на њихову способност да делују као лиганди за арил угљоводонични рецептор који је експримиран и на површини многих имунских ћелија, као што су Б-ћелије, Т-ћелије, дендритске ћелије и макрофаги [215]. Један од најчешће описаних продуката катаболизма триптофана је и кинуренин, за који је показано да промовише прогресију МС-е [216]. Поред тога, показано је да су прекомерни нивои про-инфламаторних цитокина у ЦНС-у повезани са смањеном синтезом серотонина, једним од деривата триптофана. У једној студији, утврђено је да је третман серотонином ослабио *in vitro* пролиферацију Т-ћелија и производњу *Th1* и *Th17* цитокина у ћелијским културама изолованим из пацијената са МС [217]. Такође, смањено је ослобађање *IFN-γ* и *IL-17* цитокина од стране *CD8+* Т-ћелија, а повећао производњу *IL-10* од стране *CD4+* Т-ћелија и промовисао експанзију *Регулаторне Т-ћелије* ћелија [217]. Метаболизам триптофана од стране микробиоте црева може бити повезан са развојем МС код деце, као и са тежином и активношћу саме болести [218]. У мишјем моделу ЕАЕ-а, показано је да метаболизам триптофана путем одређених коменсалних микроорганизама црева, укључујући *L. reuteri*, узоркује знатне промене у имунском одговору и може да појача аутоимунски одговор [219]. Ефекти метаболита

микробиоте црева зависе од многобројних фактора и представљају врло сложену интеракцију између микробиоте црева, доступних нутријената и компоненти имунског система. У неким случајевима, одређени метаболити могу промовисати имунолошку толеранцију и регулисати инфламацију, док у другим ситуацијама могу допринети инфламаторним одговорима. Иако предикциона анализа има ограничења, може да пружи посредан увид у метаболичке промене које се дешавају током прогресије болести, и укаже на улогу одређених метаболита у регулацији хомеостазе имунског одговора и прогресије болести. Тачност резултата предвиђања метагеномског профила зависи од доступности и квалитета информација у референтним базама података, а анализа предвиђања метагеномског профила може се сусрести са различитим изазовима. Ови изазови укључују ефикасно обухватање, односно узимање у обзир сложености микробних заједница, варијација у микробним функцијама, као и предвиђање функција повезаних са ретким или мање истраженим микробним врстама.

Добијени резултати указали су на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у модулацији функције микробиоте црева посредством неких од кључних метаболичких путева који су укључени у регулацију имунског одговора и који могу бити повезани са развојем и прогресијом МС-е, међутим неопходни су додатни експериментални подаци како би се са сигурношћу утврдило на који начин третман витаминима Бе комплекса утиче на модулацију метаболичких путева микробиоте црева.

Витамини групе Бе су такође агенси за регулацију инфламаторних процеса, што је потврђено и у *in vitro* анализи ове дисертације када су коришћене активирани хелије микроглије. Хелије микроглије представљају хелије урођеног имунског система које имају двојну улогу и испољавају и неуропротективне и неуротоксичне ефекте [220]. Прекомерна активација хелија микроглије доприноси патогенези различитих неуродегенеративних обољења, укључујући и МС-у [221]. Наиме, показано је да су оксидативна оштећења неурона узрокована дејством про-инфламаторних медијатора (РОК и NO) продукованих од стране активираних хелија микроглије [222]. Чињеница да хелије микроглије испољавају и неуропротективна својства и да су фундаменталне у регулацији функције и правилног развоја неурона, додатно истиче њихов значај у одржавању хомеостазе ЦНС-а [223, 224]. Резултати *in vitro* истраживања показали су да је третман витаминима Бе комплекса значајно смањио ниво про-инфламаторних медијатора продукованих од стране ЛПС-ом активираних хелија микроглије, укључујући РОК, NO, *TNF-α* и *IL-6*. Ови резултати су у корелацији са литературним

подацима, где је показано да је бенфотиамин (синтетички облик витамина Бе1) значајно смањио продукцију про-инфламаторних медијатора од стране ЛПС-ом активираних ћелија микроглије [82]. Такође, третман витаминима Бе комплекса је смањио продукцију про-инфламаторних медијатора од стране активираних ћелија микроглије који испољавају неуротоксични ефекат према ћелијама неурона и позитивно утицао на повећање метаболичке активности неурона, што указује на његову потенцијалну улогу у модулацији активације ћелија микроглије и одржавању функције неурона. Поред тога, како би се испитало да ли су анти-инфламаторни ефекти комплекса витамина Бе у корелацији са експресијом специфичних маркера ћелија микроглије, упоређена је експресија различитих протеина код нетретираних ЛПС-стимулисаних BV2 ћелија и ЛПС-стимулисаних BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса. Иако је концептуални оквир класификације фенотипа микроглије на M1 и M2 тип превише поједностављен, јер функција микроглије је сложена, зависна од контекста и укључује експресију бројних маркера [225], карактеризација фенотипа микроглије може допринети бољем разумевању активационог статуса микроглије и њеног утицаја на регулацију инфламаторног одговора. Добијени резултати указали су на потенцијалну улогу комплекса витамина Бе у регулацији експресије *IL-4* и *CD163*, који су описани као молекули који испољавају анти-инфламаторне карактеристике [226, 227]. Ови молекули учествују у смањењу инфламације регулисањем M1/M2 поларизације ка M2 фенотипу, што може бити у корелацији са анти-инфламаторним дејством комплекса витамина Бе потврђеним смањењем продукције про-инфламаторних медијатора (NO, POK, *TNF* и *IL-6*) од стране активираних ћелија микроглије [43, 228]. Такође, ефекат комплекса витамина Бе огледао се и у смањењу експресије *ILT-3* и *Лубс*. *ILT-3*, познат још и као *Lilrb4*, се сматра маркером процеса активације ћелија микроглије, јер је показано да је ниво експресије овог маркера повишен након стимулације ћелија микроглије ЛПС-ом. Међутим, његова функција још увек није сасвим разјашњена због различитих нивоа експресије детектованих у *in vivo* и *in vitro* условима [229]. Поред тога, *ILT-3* може да има улогу у промовисању диференцијације регулаторних Т-ћелија и супресији про-инфламаторног имунског одговора [230]. *Лубс*<sup>+</sup> моноцити су такође кључна популација инфламаторних ћелија које се регрутују у ЦНС током процеса инфламације [231, 232]. У овом истраживању показано је да је стимулација BV2 ћелија ЛПС-ом довела до смањења експресије *CD11c* молекула, док је након третмана витаминима Бе комплекса примећено повећање



експресије овог молекула. Иако није у потпуности разјашњено, неколико студија указало је на важну улогу *CD11c*+ ћелија микроглије у неуроинфламаторним процесима у ЦНС-у [233, 234]. Показано је да је смањење броја *CD11c*+ ћелија микроглије асоцирано са прогресијом ЕАЕ-а, што указује на потенцијалну неуропротективну функцију ових ћелија, коју је неопходно даље истражити [233]. Међутим, показано је и да је експресија овог молекула повећана на мирујућој микроглији и у фази репарације ткива, а ниска у фази инфламације [235]. Поред тога, третман витаминима Бе комплекса довео је до повећане експресије протеина *NRF-2*, за који је показано да има кључну улогу у анти-оксидативном одговору и одржавању редокс хомеостазе [236]. Недавне студије показале су важну улогу *NRF-2* у смањењу оксидативног стреса и неуроинфламације у ЕАЕ-у и МС-и, као и у другим неуродегенеративним болестима које карактерише хронична инфламација [148]. На мишјем моделу Паркинсонове болести показано је да су *NRF-2 knockout* мишеви развили озбиљнија оштећења неурона, настала услед прекомерног оксидативног стреса, указујући на постојање неуропротективног ефекта *NRF-2* молекула [237]. Стога, појачана активност анти-оксидативног *NRF2*-посредованог одговора, може објаснити ниже нивое про-инфламаторних медијатора, посебно РОК, уочене након третмана витаминима Бе комплекса. Резултати *in vitro* анализе указују на потенцијалну улогу третмана витаминима Бе комплекса у модулацији фенотипа ЛПС-стимулисаних *BV2* ћелија, што је праћено и смањеном производњом про-инфламаторних медијатора.

Како би се испитали потенцијални анти-инфламаторни механизми испитиваног комплекса витамина Бе према кључним протеинима ЛПС-индукованог инфламаторног пута (*LBP*, *CD14* и *TLR4/MD2*), урађена је анализа молекулског докинга. Активација сигналног пута *TLR4* започиње активацијом *LBP* солубилног протеина који директно везује ЛПС и транспортује га до *CD14* корецептора, који даље преноси ЛПС до *TLR4/MD2* комплекса који је експримиран на површини ћелија микроглије [238]. Након *TLR4/MD2* активације, долази до индукције *MyD88*-зависних и *MyD88*-независних путева, који доводе до продукције про-инфламаторних цитокина као што су *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  и *NO* [239]. Поред тога, потенцијал комплекса витамина Бе да инхибира активност *iNOS* протеина је такође испитан. Услед чињенице да *iNOS* представља један од главних ензима за продукцију *NO* молекула, супримирање његове функције може допринети смањењу инфламаторних процеса [239]. Добро је познато да је прекомерна активација сигналног пута *TLR4* уско повезана са прогресијом неколико

неуродегенеративних болести, укључујући Паркинсонову болест, Алцхајмерову болест, амиотрофичну латералну склерозу, као и МС-у [240]. Показано је да је *TLR4* један од важних молекула који учествује у патогенези МС-е. Активација рецептора *TLR4* у контексту МС-е је сложен процес који укључује различите факторе. Првенствено, активација рецептора *TLR4* је повезана са препознавањем молекулских образаца оштећења – *DAMPs* (енгл. *Damage-associated molecular patterns*), односно лиганата који се ослобађају у ЦНС-у током процеса демиелинизације и оштећења неурона [241, 242]. Интеракција *TLR4* са лигандима као што су компоненте мијелинског дебриса могу допринети процесима хроничне инфламације и демиелинизације [241]. Оно што је интересантно је да је показано да је активација рецептора *TLR4* детектована и на олигодендритима и неуронима, што додатно може допринети погоршању инфламаторног процеса у ЦНС-у [241, 243]. Стога, инхибиција протеина који посредују у сигналном путу *TLR4*, може послужити као потенцијална терапијска стратегија за смањење/контролу процеса неуроинфламације. У овој дисертацији, након свеобухватне анализе молекулског докинга сваке компоненте комплекса витамина Бе према протеинима сигналног пута *TLR4*, уочено је да витамини Бе1, Бе2 и Бе12 испољавају највећи потенцијал везивања за испитиване протеине, у односу на друге Бе витамине испитиваног комплекса. Конкретно, витамин Бе12 је показао потенцијал везивања за *CD14* рецептор, што га чини потенцијалним кандидатом за инхибицију транспорта ЛПС-а и превенцију следствене активације *TLR4*. Иако није примећен значајан капацитет везивања овог витамина за кључне аминокиселинске остатке С-терминалног домена протеина *CD14*, витамин Бе12 је испољио најбољи потенцијал везивања за N-терминални регион *CD14* протеина, остварен кроз многобројне интеракције са кључним остацима који служе као место везивања за ЛПС. Изузетно комплексна структура витамина Бе12, која се састоји од коринског прстена са централним атомом кобалта (Co), омогућава формирање великог броја интеракција које су укључене у стабилизацију витамина Бе12 унутар места везивања. Неколико студија је истакло да разматрање инхибиције протеина *CD14*, као и осталих протеина *TLR4* пута, може пружити нову терапијску перспективу за контролу процеса неуроинфламације [239, 244]. Поред тога, витамин Бе12 је испољио и добар потенцијал везивања за протеински комплекс *TLR4/MD2*. Ове интеракције су највећим делом укључивале конвенционалне водоничне везе, као и бројне хидрофобне интеракције са активним местом овог протеина, што га чини добрим агенсом за

спречавање активације инфламаторне каскаде. Даље, витамини Бе1 и Бе2 показали су добар потенцијал везивања за све испитиване протеине, а највећи за протеин *iNOS*. Путем активног транспорта, кроз специфичне траспортере који се налазе у ћелијској мембрани, ови витамини пролазе ћелијску мембрану и улазе у цитоплазму [245]. Оба витамина, Бе1 и Бе2, показали су високи потенцијал везивања за кључне аминокиселинске остатке активног места *iNOS* протеина. Витамини Бе1 и Бе2 садрже бицикличне и трицикличне хетероцикле у својој структури, који вероватно омогућавају формирање великог броја интеракција са активним местом протеина. Чињеница је да су повишени нивои молекула NO асоцирани са прогресијом различитих неуродегенеративних стања, стога инхибиција активације протеина *iNOS* такође представља један од могућих терапеутских приступа [246]. Поред тога, витамини Бе1 и Бе5 показали су добар афинитет везивања за протеин *LBP* (и за N- и C- терминални домен), што их чини потенцијалним агенсима за супримирање иницијалног корака у сигналном путу *TLR4*, односно у везивању ЛПС-а и спречавању даље активације инфламаторне каскаде. Иако је за остале витамине, укључујући Бе3, Бе5 и Бе6 уочен генерално нижи афинитет везивања за протеине сигналног пута *TLR4*, неопходно је напоменути да се њихов потенцијал за супримирање активације инфламаторног пута не може у потпуности занемарити. Наиме, интеракције лиганд-протеин представљају динамичан процес који подразумева компетитивно везивање између компоненти испитиваног комплекса витамина Бе и ЛПС-а за протеине сигналног пута *TLR4*. Иако подаци добијени на основу молекулског докинга не могу предвидети да ли испитивано једињење показује агонистичку или антагонистичку активност, потенцијални анти-инфламаторни ефекат комплекса витамина Бе је такође потврђен *in vitro* испитивањима у овој студији. Као што се и очекивало, структурно различити витамини су показали различите афинитете везивања за различите протеине *TLR4* пута, што може указивати на потенцијални синергистички ефекат одабраних једињења који је неопходно даље истражити. Узимајући у обзир да је инфламација у основи различитих неуродегенеративних обољења, идентификација нових једињења који би били добри кандидати за регулацију инфламаторних путева је од велике важности. Иако је улога витамина групе Бе за правилан развој и функционисање нервног система већ добро позната, резултати добијени у овој студији истичу значај ових витамина у контроли неуроинфламаторних процеса.



## **6 ЗАКЉУЧАК**

Реализацијом постављених циљева и експерименталних задатака истраживања у овој студији дошло се до резултата на основу којих се могу извести следећи закључци:

1. *In vivo* студија на животињском моделу МС-е (ЕАЕ) код *Dark Agouti* пацова показала је да је терапија комплексом витамина Бе (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12) утицала на:
  - а) смањење клиничких знакова прогресије болести и бржи опоровак након болести, али без статистичке значајности;
  - б) статистички значајне промене у густини једара захваћеног феморалног нерва и њиме инервисаног мишића квадрицепса у различитим временским тачкама болести, указујући на потенцијалну улогу витамина Бе у процесима неурегенерације периферних нерава инфилтрације и миграције имунских ћелија на место инфламације као и улогу витамина Бе у процесима регенерације нерва;
  - в) процесе у поплитеалним дренирајућим лимфним чворовима, где је квалитативном анализом примећено да је третман витаминима Бе комплекса узроковао смањење броја лимфоидних фоликула у региону кортекса, а примећени су и мањи епителиоидни грануломи. Ови налази указују на потенцијални значај витамина Бе у контроли инфламаторног одговора;
  - г) хистолошке промене у кичменој мождини и великом мозгу где је квалитативно утврђен нижи ниво инфилтрације ћелија, који је у кичменој мождини био праћен и нижим степеном демиелинизације, што може указати на потенцијални анти-инфламаторни ефекат комплекса витамина Бе;
  - д) састав и предвиђену функцију микробиоте црева у различитим временским тачкама током болести, што указује на потенцијалну улогу витамина Бе у регулисању дизбиозе микробиоте присутне у ЕАЕ-у. Најистакнутије промене детектоване су у заступљености представника фамилије *Prevotellaceae*. До краја болести, реконституција еубиотског састава ЕАЕ животиња се брже одвила у групи животиња третираних витаминима Бе групе. Поред тога, предикциона анализа метаболичког капацитета микробиоте црева указала је на могућу улогу витамина Бе у модулацији неких од кључних метаболичких путева који су укључени у регулацију имунског одговора.

2. *In vitro* испитивање анти-инфламаторног потенцијала комплекса витамина Бе показало је да третман ЛПС-ом активираних микроглије витаминима Бе утиче на:
  - а) смањење продукције РОК, NO и про-инфламаторних цитокина *TNF- $\alpha$*  и *IL-6* од стране ЛПС-ом активираних мишићних *BV-2* микроглије;
  - б) промене у експресији специфичних маркера ћелија микроглије ка неуропротективном M2 фенотипу;
  - в) смањење неуротоксичног ефекта медијатора продукованих од стране активираних ћелија микроглије према *SH-SY5Y* неуронским ћелијама, што витамине Бе комплекса чини једним од потенцијалних неуропротективних агенаса.
  
3. *In silico* студија потенцијалног механизма деловања одабраних витамина Бе комплекса на протеине од интереса у оквиру инфламаторног пута *TLR4* индикованог ЛПС-ом, указала је на потенцијал витамина Бе да:
  - а) се вежу за кључне протеине у оквиру инфламаторног пута *TLR4* (*LBP*, *CD14* и *TLR4/MD2*). Конкретно, уочено је да витамини Бе1, Бе2 и Бе12 испољавају највећи капацитет везивања за испитиване протеине;
  - б) се вежу за *iNOS* протеин као један од најважнијих маркера активације ћелија микроглије. Витамини Бе1 и Бе2 су показали најбољи капацитет везивања за активно место овог протеина.

На основу резултата изведених из *in vivo*, *in vitro* и *in silico* испитивања, може се закључити да витамини Бе комплекса имају потенцијал да се примењују као помоћна терапија за смањење процеса неуроинфламације. Узимајући у обзир сложене интеракције између компоненти имунског система, микронутријената, ЦНС-а и микробиоте црева, адекватан терапијски приступ представља један од главних изазова у лечењу неуродегенеративних болести, међу којима је и МС. Стога, приказано истраживање указује на потенцијалну улогу и механизам деловања комплекса витамина Бе у регулацији инфламаторних процеса, отварајући врата новим терапијским приступима у различитим неуродегенеративним стањима у чијој основи су неуроинфламаторни процеси.



## **7 ЛИТЕРАТУРА**

1. Grigoriadis, N. and V. Van Pesch, *A basic overview of multiple sclerosis immunopathology*. European journal of neurology, 2015. **22**: p. 3-13.
2. Dendrou, C.A., L. Fugger, and M.A. Friese, *Immunopathology of multiple sclerosis*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(9): p. 545-558.
3. Goldenberg, M.M., *Multiple sclerosis review*. Pharmacy and therapeutics, 2012. **37**(3): p. 175.
4. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Multiple sclerosis—a review*. European journal of neurology, 2019. **26**(1): p. 27-40.
5. Miljković, D. and I. Spasojević, *Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **19**(18): p. 2286-2334.
6. Aggarwal, S., L. Yurlova, and M. Simons, *Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly*. Trends in cell biology, 2011. **21**(10): p. 585-593.
7. Bennett, J., et al., *Blood–brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE*. Journal of neuroimmunology, 2010. **229**(1-2): p. 180-191.
8. Lassmann, H., W. Brück, and C.F. Lucchinetti, *The immunopathology of multiple sclerosis: an overview*. Brain pathology, 2007. **17**(2): p. 210-218.
9. Larochelle, C., J.I. Alvarez, and A. Prat, *How do immune cells overcome the blood–brain barrier in multiple sclerosis?* FEBS letters, 2011. **585**(23): p. 3770-3780.
10. Daneman, R. and A. Prat, *The blood–brain barrier*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. **7**(1): p. a020412.
11. Cramer, S.P., et al., *Abnormal blood–brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI*. NeuroImage: Clinical, 2014. **4**: p. 182-189.
12. Correale, J., M. Marrodan, and M.C. Ysraelit, *Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in progressive multiple sclerosis*. Biomedicines, 2019. **7**(1): p. 14.
13. Jarjour, A.A., et al., *The formation of paranodal spirals at the ends of CNS myelin sheaths requires the planar polarity protein Vangl2*. Glia, 2020. **68**(9): p. 1840-1858.
14. Dargahi, N., et al., *Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update*. Brain sciences, 2017. **7**(7): p. 78.
15. Kaskow, B.J. and C. Baecher-Allan, *Effector T cells in multiple sclerosis*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2018. **8**(4): p. a029025.

16. Andreadou, M., et al., *IL-12 sensing in neurons induces neuroprotective CNS tissue adaptation and attenuates neuroinflammation in mice*. *Nature Neuroscience*, 2023. **26**(10): p. 1701-1712.
17. Volpe, E., L. Battistini, and G. Borsellino, *Advances in T helper 17 cell biology: pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis*. *Mediators of inflammation*, 2015. **2015**.
18. Iwasaki, Y., et al., *Interleukin-27 in T cell immunity*. *International journal of molecular sciences*, 2015. **16**(2): p. 2851-2863.
19. Apetoh, L., et al., *The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27*. *Nature immunology*, 2010. **11**(9): p. 854-861.
20. Deng, Y., et al., *Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials*. *Human immunology*, 2017. **78**(2): p. 120-128.
21. Rolla, S., et al., *Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- $\beta$* . *Journal of Leukocyte Biology*, 2014. **96**(6): p. 1155-1164.
22. Salehi, Z., et al., *Differential frequency of CD8+ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns*. *PloS one*, 2016. **11**(7): p. e0159565.
23. Van Kaer, L., L. Wu, and V.V. Parekh, *Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Immunology*, 2015. **146**(1): p. 1-10.
24. Jahng, A., et al., *Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide*. *The Journal of experimental medicine*, 2004. **199**(7): p. 947-957.
25. Araki, M., et al., *Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission*. *International immunology*, 2003. **15**(2): p. 279-288.
26. McGinley, A.M., et al., *Th17 cells,  $\gamma\delta$  T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis*. *Journal of autoimmunity*, 2018. **87**: p. 97-108.
27. Shimonkevitz, R., et al., *Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993. **90**(3): p. 923-927.
28. Wucherpfennig, K.W., et al., *Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(10): p. 4588-4592.

29. Dhaiban, S., et al., *Role of peripheral immune cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Sci*, 2021. **3**(1): p. 12.
30. Treiner, E. and R.S. Liblau, *Mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis: the jury is still out*. *Frontiers in immunology*, 2015. **6**: p. 503.
31. Willing, A., et al., *Production of IL-17 by MAIT cells is increased in multiple sclerosis and is associated with IL-7 receptor expression*. *The Journal of Immunology*, 2018. **200**(3): p. 974-982.
32. Bianchini, E., et al., *Invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis*. *Immunology letters*, 2017. **183**: p. 1-7.
33. Miyazaki, Y., et al., *Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis*. *International immunology*, 2011. **23**(9): p. 529-535.
34. Kohm, A.P., et al., *Cutting edge: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(9): p. 4712-4716.
35. Beyersdorf, N., et al., *Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *The Journal of experimental medicine*, 2005. **202**(3): p. 445-455.
36. Krumbholz, M., et al., *B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy*. *Nature Reviews Neurology*, 2012. **8**(11): p. 613-623.
37. Wanleenuwat, P. and P. Iwanowski, *Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis*. *Multiple sclerosis and related disorders*, 2019. **36**: p. 101416.
38. Kuenz, B., et al., *Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis*. *PloS one*, 2008. **3**(7): p. e2559.
39. Pikor, N.B., et al., *Meningeal tertiary lymphoid tissues and multiple sclerosis: a gathering place for diverse types of immune cells during CNS autoimmunity*. *Frontiers in immunology*, 2016. **6**: p. 657.
40. Häusser-Kinzel, S. and M.S. Weber, *The role of B cells and antibodies in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and related disorders*. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 201.
41. Tambuyzer, B.R., P. Ponsaerts, and E.J. Nouwen, *Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology*. *Journal of Leucocyte Biology*, 2009. **85**(3): p. 352-370.

42. Jurga, A., M. Paleczna, and K. Kuter, *Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. Front Cell Neurosci 14: 198.* 2020.
43. Tang, Y. and W. Le, *Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. Molecular neurobiology, 2016. 53: p. 1181-1194.*
44. da Fonseca, A.C.C., et al., *The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. Frontiers in cellular neuroscience, 2014. 8: p. 362.*
45. Chen, W.W., X. Zhang, and W.J. Huang, *Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. Molecular medicine reports, 2016. 13(4): p. 3391-3396.*
46. Mammana, S., et al., *The role of macrophages in neuroinflammatory and neurodegenerative pathways of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets. International journal of molecular sciences, 2018. 19(3): p. 831.*
47. Palumbo, S. and S. Pellegrini, *Experimental in vivo models of multiple sclerosis: State of the art. Exon Publications, 2017: p. 173-183.*
48. Nuyts, A.H., et al., *Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies? Multiple Sclerosis Journal, 2013. 19(8): p. 995-1002.*
49. Yu, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. The Journal of immunology, 2013. 190(7): p. 3783-3797.*
50. Moliné-Velázquez, V., et al., *Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. Brain Pathology, 2011. 21(6): p. 678-691.*
51. Bekić, M. and S. Tomić, *Myeloid-derived suppressor cells in the therapy of autoimmune diseases. European Journal of Immunology, 2023. 53(12): p. 2250345.*
52. Kim, D., M.Y. Zeng, and G. Núñez, *The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. Experimental & molecular medicine, 2017. 49(5): p. e339-e339.*
53. Yoo, J.Y., et al., *Gut microbiota and immune system interactions. Microorganisms, 2020. 8(10): p. 1587.*
54. Boziki, M.K., et al., *Microbiome in multiple sclerosis: where are we, what we know and do not know. Brain Sciences, 2020. 10(4): p. 234.*

55. Thaiss, C.A., et al., *The interplay between the innate immune system and the microbiota*. Current opinion in immunology, 2014. **26**: p. 41-48.
56. McLean, M.H., et al., *Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases?* Gut, 2015. **64**(2): p. 332-341.
57. Cryan, J.F. and T.G. Dinan, *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. Nature reviews neuroscience, 2012. **13**(10): p. 701-712.
58. Braniste, V., et al., *The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice*. Science translational medicine, 2014. **6**(263): p. 263ra158-263ra158.
59. Johanson, D.M., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 15183.
60. van den Hoogen, W.J., J.D. Laman, and B.A. 't Hart, *Modulation of multiple sclerosis and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis by food and gut microbiota*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**: p. 1081.
61. Lee, Y.K., et al., *Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(supplement\_1): p. 4615-4622.
62. Duc, D., et al., *Disrupting myelin-specific Th17 cell gut homing confers protection in an adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell reports, 2019. **29**(2): p. 378-390. e4.
63. Mielcarz, D.W. and L.H. Kasper, *The gut microbiome in multiple sclerosis*. Current treatment options in neurology, 2015. **17**: p. 1-10.
64. Radojević, D., et al., *Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Gut Microbes, 2022. **14**(1): p. 2127455.
65. Berer, K., et al., *Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 538-541.
66. Ntranos, A., et al., *Bacterial neurotoxic metabolites in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and plasma*. Brain, 2022. **145**(2): p. 569-583.

67. Tsunoda, I., *Lymphatic system and gut microbiota affect immunopathology of neuroinflammatory diseases, including multiple sclerosis, neuromyelitis optica and Alzheimer's disease*. 2017, Wiley Online Library. p. 177-179.
68. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. British journal of pharmacology, 2011. **164**(4): p. 1079-1106.
69. Bert, A., B. Gran, and R. Weissert, *EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis*. Trends in molecular medicine, 2011. **17**(3): p. 119-125.
70. Lee, G., et al., *Identification of altered metabolic pathways during disease progression in EAE mice via metabolomics and lipidomics*. Neuroscience, 2019. **416**: p. 74-87.
71. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(1): p. 1-11.
72. Loma, I. and R. Heyman, *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment*. Current neuropharmacology, 2011. **9**(3): p. 409-416.
73. Sriwastava, S., et al., *Disease-modifying therapies and progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis*. Journal of neuroimmunology, 2021. **360**: p. 577721.
74. Hauser, S.L. and B.A. Cree, *Treatment of multiple sclerosis: a review*. The American journal of medicine, 2020. **133**(12): p. 1380-1390. e2.
75. Mitra, S., et al., *Exploring the immune-boosting functions of vitamins and minerals as nutritional food bioactive compounds: A comprehensive review*. Molecules, 2022. **27**(2): p. 555.
76. Gombart, A.F., A. Pierre, and S. Maggini, *A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection*. Nutrients, 2020. **12**(1): p. 236.
77. Yoshii, K., et al., *Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity*. Front Nutr. 2019; 6: 48. 2019, Pubmed KoreaMed.
78. Peterson, C.T., et al., *B vitamins and their role in immune regulation and cancer*. Nutrients, 2020. **12**(11): p. 3380.
79. Yoshii, K., et al., *Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity*. Frontiers in nutrition, 2019. **6**: p. 48.



80. Shikina, T., et al., *IgA class switch occurs in the organized nasopharynx-and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(10): p. 6259-6264.
81. Scalabrino, G., *Vitamin-regulated cytokines and growth factors in the CNS and elsewhere*. *Journal of neurochemistry*, 2009. **111**(6): p. 1309-1326.
82. Bozic, I., et al., *Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0118372.
83. Costantini, A., A. Nappo, and M. Pala, *High dose thiamine improves fatigue in multiple sclerosis, BMJ Case Rep. 2013 (2013)*.
84. Jhala, S.S. and A.S. Hazell, *Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism*. *Neurochemistry international*, 2011. **58**(3): p. 248-260.
85. Ji, Z., et al., *Thiamine deficiency promotes T cell infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis: the involvement of CCL2*. *The Journal of Immunology*, 2014. **193**(5): p. 2157-2167.
86. Nemazannikova, N., et al., *Is there a link between vitamin B and multiple sclerosis?* *Medicinal Chemistry*, 2018. **14**(2): p. 170-180.
87. Uebanso, T., et al., *Functional roles of B-vitamins in the gut and gut microbiome*. *Molecular nutrition & food research*, 2020. **64**(18): p. 2000426.
88. Hossain, K.S., S. Amarasena, and S. Mayengbam, *B vitamins and their roles in gut health*. *Microorganisms*, 2022. **10**(6): p. 1168.
89. Corbett, A.J., et al., *T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways*. *Nature*, 2014. **509**(7500): p. 361-365.
90. Almeida, L., et al. *Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation*. in *Seminars in immunology*. 2016. Elsevier.
91. Ghadirian, P., et al., *Nutritional factors in the aetiology of multiple sclerosis: a case-control study in Montreal, Canada*. *International journal of epidemiology*, 1998. **27**(5): p. 845-852.
92. Naghashpour, M., et al., *Riboflavin supplementation to patients with multiple sclerosis does not improve disability status nor is riboflavin supplementation correlated to homocysteine*. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 2014.

93. Bisaga, G., et al., *Possibilities of treatment of multiple sclerosis exacerbations without corticosteroids: a role of metabolic and antioxidant therapy*. Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni SS Korsakova, 2011. **111**(2): p. 44-48.
94. Naghashpour, M., et al., *Update on riboflavin and multiple sclerosis: a systematic review*. Iranian journal of basic medical sciences, 2017. **20**(9): p. 958.
95. Naghashpour, M., et al., *Brain-derived neurotrophic and immunologic factors: beneficial effects of riboflavin on motor disability in murine model of multiple sclerosis*. Iranian journal of basic medical sciences, 2016. **19**(4): p. 439.
96. Singh, N., et al., *Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 128-139.
97. Zhou, E., et al., *Niacin attenuates the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced mouse alveolar macrophages by HCA2 dependent mechanisms*. International Immunopharmacology, 2014. **23**(1): p. 121-126.
98. Wuerch, E., G.R. Uργοiti, and V.W. Yong, *The Promise of Niacin in Neurology*. Neurotherapeutics, 2023: p. 1-18.
99. Rawji, K.S., et al., *Niacin-mediated rejuvenation of macrophage/microglia enhances remyelination of the aging central nervous system*. Acta Neuropathologica, 2020. **139**: p. 893-909.
100. Klenner, F.R., *Response of peripheral and central nerve pathology to mega-doses of the vitamin B-complex and other metabolites*. Townsend Letter for Doctors and Patients, 2005(269): p. 99-106.
101. Kaneko, S., et al., *Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models*. Journal of Neuroscience, 2006. **26**(38): p. 9794-9804.
102. He, W., et al., *Vitamin B5 reduces bacterial growth via regulating innate immunity and adaptive immunity in mice infected with Mycobacterium tuberculosis*. Front Immunol. 2018. 9: 365. 2018.
103. Zhang, P., et al., *Vitamin B6 prevents IL-1 $\beta$  protein production by inhibiting NLRP3 inflammasome activation*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(47): p. 24517-24527.
104. Qian, B., et al., *Effects of vitamin B6 deficiency on the composition and functional potential of T cell populations*. Journal of immunology research, 2017. **2017**.

105. Mitchell, D.A. and E.K. Schandl, *Carbon monoxide, vitamin B6, and multiple sclerosis: a theory of interrelationship*. The American journal of clinical nutrition, 1973. **26**(8): p. 890-896.
106. Liu, T., et al., *NF- $\kappa$ B signaling in inflammation*. Signal transduction and targeted therapy, 2017. **2**(1): p. 1-9.
107. Tourbah, A., et al., *MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. Multiple Sclerosis Journal, 2016. **22**(13): p. 1719-1731.
108. Kunisawa, J. and H. Kiyono, *Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 189.
109. Kinoshita, M., et al., *Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon*. The Journal of Immunology, 2012. **189**(6): p. 2869-2878.
110. Bromley, L., et al., *Impact of nutritional intake on function in people with mild-to-moderate multiple sclerosis*. International journal of MS care, 2019. **21**(1): p. 1-9.
111. Kanevskaia, S., et al., *Folic acid in the combined treatment of patients with disseminated sclerosis and chronic gastritis*. Vrachebnoe delo, 1990(4): p. 96-97.
112. Likosky, W.H., et al., *Intense immunosuppression in chronic progressive multiple sclerosis: the Kaiser study*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1991. **54**(12): p. 1055-1060.
113. Tamura, J., et al., *Immunomodulation by vitamin B12: augmentation of CD8+ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B12-deficient patients by methyl-B12 treatment*. Clinical & Experimental Immunology, 1999. **116**(1): p. 28-32.
114. Todorova, T.T., N. Ermenlieva, and G. Tsankova, *Vitamin B12: Could it be a promising immunotherapy*. Immunotherapy-Myths, Reality, Ideas, Future, 2017: p. 85-100.
115. Partearroyo, T., et al., *Vitamin B12 and folic acid imbalance modifies NK cytotoxicity, lymphocytes B and lymphoproliferation in aged rats*. Nutrients, 2013. **5**(12): p. 4836-4848.
116. Kocer, B., et al., *Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels and their association with clinical and electrophysiological parameters in multiple sclerosis*. Journal of Clinical Neuroscience, 2009. **16**(3): p. 399-403.
117. Nijst, T., et al., *Vitamin B12 and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological patients with special reference to multiple sclerosis and*

- dementia*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1990. **53**(11): p. 951-954.
118. Moghaddasi, M., et al., *Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with multiple sclerosis: a case control study*. Clinical neurology and neurosurgery, 2013. **115**(9): p. 1802-1805.
  119. Kira, J.-i., S. Tobimatsu, and I. Goto, *Vitamin B12 metabolism and massive-dose methyl vitamin B12 therapy in Japanese patients with multiple sclerosis*. Internal medicine, 1994. **33**(2): p. 82-86.
  120. Martignoni, E., et al., *Homocysteine and Parkinson's disease: a dangerous liaison?* Journal of the neurological sciences, 2007. **257**(1-2): p. 31-37.
  121. Roth, W. and M. Mohamadzadeh, *Vitamin B12 and gut-brain homeostasis in the pathophysiology of ischemic stroke*. EBioMedicine, 2021. **73**.
  122. Herrmann, W. and R. Obeid, *Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases*. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2011. **49**(3): p. 435-441.
  123. Jende, J.M., et al., *Peripheral nerve involvement in multiple sclerosis: demonstration by magnetic resonance neurography*. Annals of Neurology, 2017. **82**(5): p. 676-685.
  124. Teixeira, N.B., et al., *Alterations of peripheral nerve excitability in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model for multiple sclerosis*. Journal of Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 1-14.
  125. Nedeljković, P., et al., *Vitamin B complex treatment improves motor nerve regeneration and recovery of muscle function in a rodent model of peripheral nerve injury*. Archives of Biological Sciences, 2017. **69**(2): p. 361-368.
  126. Ehmedah, A., et al., *Effect of vitamin B complex treatment on macrophages to schwann cells association during neuroinflammation after peripheral nerve injury*. Molecules, 2020. **25**(22): p. 5426.
  127. Ehmedah, A., et al., *Vitamin B complex treatment attenuates local inflammation after peripheral nerve injury*. Molecules, 2019. **24**(24): p. 4615.
  128. Feldman, A.T. and D. Wolfe, *Tissue processing and hematoxylin and eosin staining*. Histopathology: methods and protocols, 2014: p. 31-43.
  129. Jovel, J., et al., *Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics*. Frontiers in microbiology, 2016. **7**: p. 459.
  130. Team, R.D.C., *R: A language and environment for statistical computing*. (No Title), 2010.

131. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome biology, 2004. **5**(10): p. 1-16.
132. Liu, C., et al., *microeco: an R package for data mining in microbial community ecology*. FEMS microbiology ecology, 2021. **97**(2): p. fiae255.
133. Callahan, B.J., et al., *DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. Nature methods, 2016. **13**(7): p. 581-583.
134. Quast, C., et al., *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. Nucleic acids research, 2012. **41**(D1): p. D590-D596.
135. Lemos, L.N., et al., *Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era*. Journal of microbiological methods, 2011. **86**(1): p. 42-51.
136. Mongad, D.S., et al., *MicFunPred: A conserved approach to predict functional profiles from 16S rRNA gene sequence data*. Genomics, 2021. **113**(6): p. 3635-3643.
137. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
138. Auclair, C. and E. Voisin, *Nitroblue tetrazolium reduction*. Handbook of methods for oxygen radical research, 1985. **123**.
139. Pišlar, A., et al., *Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation*. Neuropharmacology, 2017. **114**: p. 88-100.
140. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clinical chemistry, 2005. **51**(12): p. 2415-2418.
141. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Critical reviews in biotechnology, 2017. **37**(2): p. 163-176.
142. Meng, X.-Y., et al., *Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*. Current computer-aided drug design, 2011. **7**(2): p. 146-157.
143. Biovia, D.S., *Discovery Studio Visualizer v21. 1.0. 20298*. San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
144. Webb, B. and A. Sali, *Comparative protein structure modeling using MODELLER*. Current protocols in bioinformatics, 2016. **54**(1): p. 5.6. 1-5.6. 37.
145. Huey, R. and G.M. Morris, *Using AutoDock 4 with AutoDocktools: a tutorial*. The Scripps Research Institute, USA, 2008. **8**: p. 54-56.

146. Lunić, T., et al., *Antioxidant and neuroprotective activities of selected 2-pyridones: In vitro and in silico study*. Journal of Molecular Structure, 2022. **1256**: p. 132546.
147. Rószler, T., *Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms*. Mediators of inflammation, 2015. **2015**.
148. Johnson, D.A. and J.A. Johnson, *Nrf2—a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **88**: p. 253-267.
149. Ryu, J.-K., et al., *Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer*. Immunity, 2017. **46**(1): p. 38-50.
150. Correale, J., M.C. Ysraelit, and M.I. Gaitán, *Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis*. Brain, 2009. **132**(5): p. 1146-1160.
151. Ooi, J.H., J. Chen, and M.T. Cantorna, *Vitamin D regulation of immune function in the gut: why do T cells have vitamin D receptors?* Molecular aspects of medicine, 2012. **33**(1): p. 77-82.
152. Chambers, E.S. and C.M. Hawrylowicz, *The impact of vitamin D on regulatory T cells*. Current allergy and asthma reports, 2011. **11**: p. 29-36.
153. Ascherio, A., K.L. Munger, and K.C. Simon, *Vitamin D and multiple sclerosis*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(6): p. 599-612.
154. Mikkelsen, K., et al., *Cognitive decline: a vitamin B perspective*. Maturitas, 2016. **93**: p. 108-113.
155. Schepici, G., et al., *The gut microbiota in multiple sclerosis: an overview of clinical trials*. Cell Transplantation, 2019. **28**(12): p. 1507-1527.
156. Shen, L., *Associations between B vitamins and Parkinson's disease*. Nutrients, 2015. **7**(9): p. 7197-7208.
157. Reynolds, E., J. Linnell, and J. Faludy, *Multiple sclerosis associated with vitamin B12 deficiency*. Archives of neurology, 1991. **48**(8): p. 808-811.
158. Khosravi-Largani, M., et al., *A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis*. Eneurologicalsci, 2018. **10**: p. 37-44.
159. Scalabrino, G., *The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency*. Progress in neurobiology, 2009. **88**(3): p. 203-220.

160. Schroecksnadel, K., et al., *Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation*. Current pharmaceutical biotechnology, 2004. **5**(1): p. 107-118.
161. Miller, A., et al., *Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis*. Journal of the neurological sciences, 2005. **233**(1-2): p. 93-97.
162. Reynolds, E., et al., *Vitamin B12 metabolism in multiple sclerosis*. Archives of neurology, 1992. **49**(6): p. 649-652.
163. Crellin, R., T. Bottiglieri, and E. Reynolds, *Multiple sclerosis and macrocytosis*. Acta neurologica scandinavica, 1990. **81**(5): p. 388-391.
164. Mastronardi, F.G., et al., *Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN- $\beta$  plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance*. The journal of Immunology, 2004. **172**(10): p. 6418-6426.
165. Suh, S.W., A.M. Hamby, and R.A. Swanson, *Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1280-1286.
166. Barchi, R.L. and P.E. Braun, *Thiamine in neural membranes. A developmental approach*. Brain research, 1971. **35**(2): p. 622-624.
167. Bâ, A., *Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2008. **28**: p. 923-931.
168. Costantini, A., et al., *High dose thiamine improves fatigue in multiple sclerosis*. Case Reports, 2013. **2013**: p. bcr2013009144.
169. Kennedy, D.O., *B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review*. Nutrients, 2016. **8**(2): p. 68.
170. Calderón-Ospina, C.A. and M.O. Nava-Mesa, *B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin*. CNS neuroscience & therapeutics, 2020. **26**(1): p. 5-13.
171. Mikkelsen, K., et al., *The effects of vitamin B on the immune/cytokine network and their involvement in depression*. Maturitas, 2017. **96**: p. 58-71.
172. Bertollo, C.M., et al., *Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models*. European journal of pharmacology, 2006. **547**(1-3): p. 184-191.
173. Menezes, R.R., et al., *Thiamine and riboflavin inhibit production of cytokines and increase the anti-inflammatory activity of a corticosteroid in a chronic model of inflammation induced by complete Freund's adjuvant*. Pharmacological reports, 2017. **69**(5): p. 1036-1043.



174. Reinhold, A. and H. Rittner, *Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2017. **469**(1): p. 123-134.
175. Luissint, A.-C., et al., *Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation*. Fluids and Barriers of the CNS, 2012. **9**: p. 1-12.
176. Nazareth, L., et al., *Phagocytosis by peripheral glia: Importance for nervous system functions and implications in injury and disease*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021. **9**: p. 660259.
177. Baltrusch, S., *The role of neurotropic B vitamins in nerve regeneration*. BioMed research international, 2021. **2021**: p. 1-9.
178. Liu, P., et al., *Role of macrophages in peripheral nerve injury and repair*. Neural regeneration research, 2019. **14**(8): p. 1335.
179. Mallone, F., et al., *High-dose vitamin B supplementation for persistent visual deficit in multiple sclerosis: A pilot study*. Drug Discoveries & Therapeutics, 2020. **14**(3): p. 122-128.
180. Almsaddi, M., T.E. Bertorini, and W.K. Seltzer, *Demyelinating neuropathy in a patient with multiple sclerosis and genotypical HMSN-1*. Neuromuscular Disorders, 1998. **8**(2): p. 87-89.
181. Khan, A., et al., *Peripheral neuropathy in patients with multiple sclerosis*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0193270.
182. El Soury, M., et al., *The role of dietary nutrients in peripheral nerve regeneration*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(14): p. 7417.
183. Borisov, A.B., E.I. Dedkov, and B.M. Carlson, *Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle*. The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2001. **264**(2): p. 203-218.
184. Erickson, M.A., K. Dohi, and W.A. Banks, *Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier*. Neuroimmunomodulation, 2012. **19**(2): p. 121-130.
185. Campos-Bedolla, P., et al., *Role of the blood–brain barrier in the nutrition of the central nervous system*. Archives of medical research, 2014. **45**(8): p. 610-638.

186. Besler, H.T. and S. Çomog˘lu, *Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis*. Nutritional neuroscience, 2003. **6**(3): p. 189-196.
187. Lehmann, M., et al., *Vitamin B12-B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment*. Dementia and geriatric cognitive disorders, 2003. **16**(3): p. 145-150.
188. Ransohoff, R.M., P. Kivisäkk, and G. Kidd, *Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(7): p. 569-581.
189. Holman, D.W., R.S. Klein, and R.M. Ransohoff, *The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011. **1812**(2): p. 220-230.
190. Jangi, S., et al., *Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis*. Nature communications, 2016. **7**(1): p. 12015.
191. Stys, P.K., *Multiple sclerosis: autoimmune disease or autoimmune reaction?* Canadian journal of neurological sciences, 2010. **37**(S2): p. S16-S23.
192. Goverman, J., *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(6): p. 393-407.
193. Wu, H.-J. and E. Wu, *The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity*. Gut microbes, 2012. **3**(1): p. 4-14.
194. Ramakrishna, B.S., *Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2013. **28**: p. 9-17.
195. Shahi, S.K., et al., *Prevotella histicola, a human gut commensal, is as potent as COPAXONE® in an animal model of multiple sclerosis*. Frontiers in immunology, 2019: p. 462.
196. Larsen, J.M., *The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease*. Immunology, 2017. **151**(4): p. 363-374.
197. Maghzi, A.-H. and H.L. Weiner, *A one-two punch in the gut may trigger multiple sclerosis*. Immunity, 2020. **53**(4): p. 707-709.
198. Kaakoush, N.O., *Insights into the role of Erysipelotrichaceae in the human host*. 2015, Frontiers Media SA. p. 84.

199. Saresella, M., et al., *Immunological and clinical effect of diet modulation of the gut microbiome in multiple sclerosis patients: a pilot study*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**: p. 1391.
200. Berer, K. and G. Krishnamoorthy, *Microbial view of central nervous system autoimmunity*. *FEBS letters*, 2014. **588**(22): p. 4207-4213.
201. Freedman, S.N., S.K. Shahi, and A.K. Mangalam, *The “gut feeling”: breaking down the role of gut microbiome in multiple sclerosis*. *Neurotherapeutics*, 2018. **15**: p. 109-125.
202. Takewaki, D., et al., *Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020. **117**(36): p. 22402-22412.
203. Pham, V.T., et al., *Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans*. *Nutrition Research*, 2021. **95**: p. 35-53.
204. Tankou, S.K., et al., *A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis*. *Annals of neurology*, 2018. **83**(6): p. 1147-1161.
205. Sand, I.K., et al., *Disease-modifying therapies alter gut microbial composition in MS*. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 2019. **6**(1).
206. Thirion, F., et al., *The gut microbiota in multiple sclerosis varies with disease activity*. *Genome medicine*, 2023. **15**(1): p. 1-17.
207. Hurley, M.J., et al., *Bile acids and neurological disease*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022: p. 108311.
208. Bhargava, P., et al., *Bile acid metabolism is altered in multiple sclerosis and supplementation ameliorates neuroinflammation*. *The Journal of clinical investigation*, 2020. **130**(7): p. 3467-3482.
209. Fettig, N.M. and L.C. Osborne, *Direct and indirect effects of microbiota-derived metabolites on neuroinflammation in multiple sclerosis*. *Microbes and Infection*, 2021. **23**(6-7): p. 104814.
210. Mangalam, A., et al., *Profile of circulatory metabolites in a relapsing-remitting animal model of multiple sclerosis using global metabolomics*. *Journal of clinical & cellular immunology*, 2013. **4**.
211. Crick, P.J., et al., *Reduced plasma levels of 25-hydroxycholesterol and increased cerebrospinal fluid levels of bile acid precursors in multiple sclerosis patients*. *Molecular neurobiology*, 2017. **54**: p. 8009-8020.

212. Zahoor, I., et al., *An emerging potential of metabolomics in multiple sclerosis: A comprehensive overview*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2021. **78**: p. 3181-3203.
213. Yanguas-Casás, N., et al., *TUDCA: An agonist of the bile acid receptor GPBAR1/TGR5 with anti-inflammatory effects in microglial cells*. Journal of cellular physiology, 2017. **232**(8): p. 2231-2245.
214. Sauma, S. and P. Casaccia, *Gut-brain communication in demyelinating disorders*. Current opinion in neurobiology, 2020. **62**: p. 92-101.
215. Ghiboub, M., et al., *Nutritional therapy to modulate tryptophan metabolism and aryl hydrocarbon-receptor signaling activation in human diseases*. Nutrients, 2020. **12**(9): p. 2846.
216. Ormstad, H., et al., *Chronic fatigue and depression due to multiple sclerosis: Immune-inflammatory pathways, tryptophan catabolites and the gut-brain axis as possible shared pathways*. Multiple sclerosis and related disorders, 2020. **46**: p. 102533.
217. Sacramento, P.M., et al., *Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4+ T-cell subsets in multiple sclerosis patients*. European journal of immunology, 2018. **48**(8): p. 1376-1388.
218. Nourbakhsh, B., et al., *Altered tryptophan metabolism is associated with pediatric multiple sclerosis risk and course*. Annals of clinical and translational neurology, 2018. **5**(10): p. 1211-1221.
219. Montgomery, T.L., et al., *Lactobacillus reuteri tryptophan metabolism promotes host susceptibility to CNS autoimmunity*. Microbiome, 2022. **10**(1): p. 198.
220. Ekdahl, C., Z. Kokaia, and O. Lindvall, *Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia*. Neuroscience, 2009. **158**(3): p. 1021-1029.
221. Guo, S., H. Wang, and Y. Yin, *Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases*. Frontiers in aging neuroscience, 2022. **14**: p. 815347.
222. Yin, J., et al., *The role of microglia and macrophages in CNS homeostasis, autoimmunity, and cancer*. Journal of immunology research, 2017. **2017**.
223. De Schepper, S., G. Crowley, and S. Hong, *Understanding microglial diversity and implications for neuronal function in health and disease*. Developmental Neurobiology, 2021. **81**(5): p. 507-523.

224. Pósfai, B., et al., *New insights into microglia–neuron interactions: a neuron’s perspective*. *Neuroscience*, 2019. **405**: p. 103-117.
225. Ransohoff, R.M., *A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?* *Nature neuroscience*, 2016. **19**(8): p. 987-991.
226. He, Y., et al., *IL-4 switches microglia/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neurological damage by modulating the JAK1/STAT6 pathway following ICH*. *Neuroscience*, 2020. **437**: p. 161-171.
227. Weaver, L.K., et al., *Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors*. *Journal of Leucocyte Biology*, 2007. **81**(3): p. 663-671.
228. Komohara, Y., et al., *Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas*. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2008. **216**(1): p. 15-24.
229. Kretzschmar, F., et al., *Characterization of the Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (Lilrb4) Expression in Microglia*. *Biology*, 2021. **10**(12): p. 1300.
230. Suciú-Foca, N., et al., *Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells*. *International immunopharmacology*, 2005. **5**(1): p. 7-11.
231. Greter, M., I. Lelios, and A.L. Croxford, *Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation*. *Frontiers in immunology*, 2015. **6**: p. 249.
232. Greter, M. and M. Merad, *Regulation of microglia development and homeostasis*. *Glia*, 2013. **61**(1): p. 121-127.
233. Fischer, H.-G. and G. Reichmann, *Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation*. *The Journal of Immunology*, 2001. **166**(4): p. 2717-2726.
234. Mayrhofer, F., et al., *Reduction in CD11c+ microglia correlates with clinical progression in chronic experimental autoimmune demyelination*. *Neurobiology of Disease*, 2021. **161**: p. 105556.
235. Olah, M., et al., *Microglia phenotype diversity*. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 2011. **10**(1): p. 108-118.
236. Innamorato, N.G., et al., *The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation*. *The Journal of Immunology*, 2008. **181**(1): p. 680-689.

237. Rojo, A.I., et al., *Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease*. *Glia*, 2010. **58**(5): p. 588-598.
238. Lu, Y.-C., W.-C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 2008. **42**(2): p. 145-151.
239. Rahimifard, M., et al., *Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation*. *Ageing research reviews*, 2017. **36**: p. 11-19.
240. Trotta, T., et al., *Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain*. *Journal of neuroimmunology*, 2014. **268**(1-2): p. 1-12.
241. Manjili, F.A., A. Yousefi-Ahmadipour, and M.K. Arababadi, *The roles played by TLR4 in the pathogenesis of multiple sclerosis; a systematic review article*. *Immunology letters*, 2020. **220**: p. 63-70.
242. Miranda-Hernandez, S. and A.G. Baxter, *Role of toll-like receptors in multiple sclerosis*. *American journal of clinical and experimental immunology*, 2013. **2**(1): p. 75.
243. Lehnardt, S., et al., *The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS*. *Journal of Neuroscience*, 2002. **22**(7): p. 2478-2486.
244. Leitner, G.R., et al., *Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2019. **23**(10): p. 865-882.
245. Hrubša, M., et al., *Biological properties of vitamins of the B-complex, part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5*. *Nutrients*, 2022. **14**(3): p. 484.
246. Hannibal, L., *Nitric oxide homeostasis in neurodegenerative diseases*. *Current Alzheimer Research*, 2016. **13**(2): p. 135-149.

## Прилог 1

Списак скраћеница

Arg-1 – (енгл. Arginase 1)

Bcl2 – (енгл. B-cell lymphoma 2)

CCL – (енгл. CC chemokine superfamily)

CFA – (енгл. Complete Freund's Adjuvant)

CD – (енгл. Cluster of Differentiation)

COX-2 – Циклооксигеназа-2 (енгл. Cyclooxygenase-2)

CTLA-4 – (енгл. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4)

CXCR1 – (енгл. C-X-C Motif Chemokine Receptor 1)

CXCL – (енгл. The chemokine (C-X-C motif) ligand)

CoA – (енгл. Coenzyme A)

DAMPs – (енгл. Damage-associated molecular patterns)

FSC – (енгл. Forward Scattering)

GM-CSF – (енгл. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)

Hsp70 – Протеин тоplotног шока 70 (енгл. Heat shock protein 70)

ICAM – (енгл. Intercellular adhesion molecules)

IFN – (енгл. Interferon)

IL – Интерлеукин (енгл. Interleukin)

ILT-3 – (енгл. Immunoglobulin-like transcript 3)

Ig – (енгл. Immunoglobulin)

KEGG – (енгл. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Ki – (енгл. The inhibitor constant)

LBP – ЛПС-везујући протеин (енгл. LPS-binding protein)

LefSe – (енгл. Linear discriminant analysis (LDA) effect size)

Ly6C – (енгл. lymphocyte antigen 6 complex, locus C1)

MAIT – (енгл. mucosal-associated Invariant T cells)

MCP-1 – (енгл. Monocyte chemoattractant protein-1)

MDSC – (енгл. Myeloid-derived suppressor cells)

MHC – (енгл. The major histocompatibility complex)

MFI – (енгл. Mean Fluorescence Intensity)

NAD – (енгл. Nicotinamide adenine dinucleotide)

NF- $\kappa$ B – (енгл. Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)

NFIB – Нуклеарни фактор-1Б (енгл. Nuclear factor-1 B)

NKT – (енгл. Natural killer T cells)

NLRP3 – (енгл. Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3)

NRF2 – (енгл. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

NRF2 – (енгл. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

PCR – Ланчана реакција полимеразе (енгл. Polymerase Chain Reaction)

RMSD – (енгл. Root Mean Square Deviation)

SSC – (енгл. Side Scattering)

TCA – (енгл. Tricarboxylic acid cycle)

TGF- $\beta$  – (енгл. Transforming growth factor beta)

TLR4/ MD2 - Рецептор сличан Toll-у 4/мијелоидни фактор диференцијације 2 комплекс (енгл. Toll like receptor/ Myeloid factor of differentiation)

TNF- $\alpha$  – Туморски некротички фактор (енгл. Tumor Necrosis Factor)

Tc – (енгл. T cytotoxic cells)

Th – (енгл. T helper cells)

Регулаторне Т-ћелије – (енгл. T regulatory cells)

iNKT – инваријантни тип NKT

iNOS – Индуцибилна азот оксидаза (енгл. Inducible nitric oxide synthase)

qPCR – Квантитативна ланчана реакција полимеразе (енгл. quantitative Polymerase-Chain Reaction)



vNKT – варијантни тип NKT

## Прилог 2

### Списак слика

<b>Слика 1.</b> Имунопатогенеза у мултиплој склерози.....	6
<b>Слика 2.</b> Бидирекциона оса мозак - гастроинтестинални тракт.....	15
<b>Слика 3.</b> Имуномодулаторна функција витамина групе Бе.....	21
<b>Слика 4.</b> Илустрација експерименталног дизајна и временских тачака жртвовања животиња.....	37
<b>Слика 5.</b> Схематски приказ припреме ткивних пресека кичмене мождине и великог мозга.....	39
<b>Слика 6.</b> Клиничка слика и прогресија експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.....	56
<b>Слика 7.</b> Хистолошка анализа пресека поплитеалних лимфних чворова.....	58
<b>Слика 8.</b> Макроскопски изглед пресека поплитеалних лимфних чворова животиња којима је индукован експериментални аутоимунски енцефаломијелитис.....	59
<b>Слика 9.</b> Хистолошке промене у структури поплитеалних лимфних чворова.....	60
<b>Слика 10.</b> Густина једара периферног нерва и мишића квадрицепса контролних животиња.....	61
<b>Слика 11.</b> Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара у феморалном нерву током прогресије ЕАЕ.....	62
<b>Слика 12.</b> Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара мишића квадрицепса током прогресије ЕАЕ.....	64
<b>Слика 13.</b> Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине контролних животиња.....	66
<b>Слика 14.</b> Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине на увеличању 5X.....	67

<b>Слика 15.</b> Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине на увеличању 10X.....	68
<b>Слика 16.</b> Хистолошки преглед ткивних пресека лумбалног дела кичмене мождине на увеличању 20X.....	69
<b>Слика 17.</b> Хистолошки преглед мијелинских структура у лумбалном делу кичмене мождине контролних животиња.....	70
<b>Слика 18.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 5X.....	71
<b>Слика 19.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 10X.....	72
<b>Слика 20.</b> Хистолошки преглед ткивних пресека великог мозга контролних животиња.....	74
<b>Слика 21.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у великом мозгу код ЕАЕ животиња на увеличању 5X.....	75
<b>Слика 22.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у великом мозгу код ЕАЕ животиња на увеличању 10X.....	76
<b>Слика 23.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе инфилтрације ћелија у великом мозгу у пику болести код ЕАЕ животиња.....	78
<b>Слика 24.</b> Хистолошки преглед мијелинских структура у великом мозгу контролних животиња.....	79
<b>Слика 25.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 5X.....	81
<b>Слика 26.</b> Утицај третмана витаминима Бе комплекса на процесе демиелинизације код ЕАЕ животиња на увеличању 10X.....	82
<b>Слика 27.</b> Анализа микробиоте црева на нивоу раздела.....	84
<b>Слика 28.</b> Анализа микробиоте црева на нивоу фамилије.....	86

<b>Слика 29.</b> PCoA (енгл. <i>Principal Component Analysis</i> ) дијаграм и кластеровање бактеријских заједница на основу <i>Weighted UniFrac</i> матрице удаљености.....	88
<b>Слика 30.</b> Филогенетско стабло микробиоте црева на нивоу рода.....	89
<b>Слика 31.</b> Анализа микробиоте црева на нивоу рода.....	90
<b>Слика 32.</b> Ефекат третмана витаминима Бе комплекса на фенотиске карактеристике ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....	98
<b>Слика 33.</b> Ефекти комплекса витамина Бе на експресију одабраних маркера код ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....	100
<b>Слика 34.</b> Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и остварене интеракције/везе са аминокиселинским остацима места везивања (А) витамина Бе5 са N-терминалом <i>LBP</i> протеина; (Б) витамина Бе1 са C-терминалом <i>LBP</i> протеина.....	105
<b>Слика 35.</b> Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и остварене интеракције/везе витамина Бе12 са аминокиселинским остацима места везивања N-терминала <i>CD14</i> протеина.....	106
<b>Слика 36.</b> Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и остварене интеракције/везе витамина Бе12 са аминокиселинским остацима места везивања <i>TLR4/MD2</i> комплекса.....	109
<b>Слика 37.</b> Најбоље позиције добијене у анализи молекулског докинга и остварене интеракције/везе са аминокиселинским остацима места везивања <i>iNOS</i> протеина и витамина Бе1 и витамина Бе2.....	112
<b>Слика 38.</b> Комплекс витамина Бе као супресор неуринфламације. Сумирани резултати истраживања изведених у <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> и <i>in silico</i> условима.....	131

### Прилог 3

#### Списак графика

<b>График 1.</b> Промене у телесној маси током прогресије експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.....	57
<b>График 2.</b> Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара у феморалном нерву током прогресије ЕАЕ.....	63
<b>График 3.</b> Ефекти третмана витаминима Бе комплекса на густину једара мишића квадрицепса током ЕАЕ.....	65
<b>График 4.</b> Релативна заступљеност сегментисаних филаментозних бактерија.....	92
<b>График 5.</b> Предикција метаболичког капацитета микробиоте црева на почетку развоја болести.....	94
<b>График 6.</b> Предикција метаболичког капацитета микробиоте црева у пику болести.....	95
<b>График 7.</b> Предикција метаболичког капацитета микробиоте црева на крају болести.....	96
<b>График 8.</b> Ефекат супернатаната ЛПС-стимулисаних BV2 ћелија третираних витаминима Бе комплекса на метаболичку активност SH-SY5Y ћелија.....	101

## Прилог 4

### Списак табела

<b>Табела 1.</b> Називи и састав коришћених пуфера, раствора и медијума.....	34
<b>Табела 2.</b> Списак назива и произвођача коришћених комерцијално доступних комплета.....	35
<b>Табела 3.</b> Концентрације комплекса витамина Бе коришћених за <i>in vitro</i> анализу.....	46
<b>Табела 4.</b> Карактеристике коришћених антитела за фенотипску анализу применом проточне цитометрије.....	50
<b>Табела 5.</b> Карактеристике коришћених изотипских контрола за фенотипску анализу применом проточне цитометрије.....	51
<b>Табела 6.</b> Бета диверзитет прерачунат и изражен као <i>weighted UniFrac</i> индекс удаљености између узорака.....	87
<b>Табела 7.</b> Релативна заступљеност родова унутар фамилије <i>Prevotellaceae</i> у различитим узорцима. Слова а-к означавају парове узорака који су детектовани као диференцијално заступљени на основу <i>metastat</i> методе имплементираној у <i>Microeco</i> пакету.....	91
<b>Табела 8.</b> Ефекти комплекса витамина Бе на функције активираних BV2 ћелија мишије микроглије.....	97
<b>Табела 9.</b> Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака N-терминалног региона <i>LBP</i> протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....	103
<b>Табела 10.</b> Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака C-терминалног региона <i>LBP</i> протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....	104
<b>Табела 11.</b> Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака N-терминалног региона места везивања <i>CD14</i> протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....	107

**Табела 12.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака С-терминалног региона места везивања *CD14* протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....108

**Табела 13.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака места везивања *TLR4/MD2* комплекса и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....110

**Табела 14.** Вредности енергије везивања, константе инхибиције и интеракције између аминокиселинских остатака места везивања *iNOS* протеина и витамина из комплекса (Бе1, Бе2, Бе3, Бе5, Бе6 и Бе12).....111

## Биографија

Марија Р. Ракић је рођена 24.3.1994. у Београду. Након завршене IX гимназије, уписује основне академске студије 2013. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемија. Основне студије завршава 2017. године, са просечном оценом 8,47.

Мастер академске студије уписује 2018. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Молекуларна биологија и физиологија – модул Имунобиологија. Студије завршава 2019. године одбраном мастер рада под називом „Карактеризација екстракта маховине *Hedwigia ciliata* (Hedw.) P. Beauv. са територије Вршачких планина и истраживање њихових имуномодулаторних ефеката *in vitro*“, под менторством др Биљане Божић Недељковић и др Бојана Божића са просечном оценом 10.

Године 2019. уписује докторске академске студије, студијски програм Биологија, модул Имунобиологија на Биолошком факултету. Од 2020. године је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Од јануара 2022. године запослена је као истраживач-приправник на Биолошком факултету Универзитета у Београду на Катедри за општу физиологију и биофизику, а од новембра 2022. године као истраживач-сарадник. Од 2020. године учествује у извођењу практичне наставе у области Имунологије на Биолошком факултету. Била је учесник пројекта „Развој високог образовања“ – Виртуелна експериментална имунологија и имуноинформатика школске 2020/2021.

Аутор је 9 научних радова у часописима међународног значаја, 11 саопштења на међународним, а 5 на националним скуповима.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Марија Ракић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3022/2019 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Утицај комплекса витамина Бе на неуроинфламацију и развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“**

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Марија Ракић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3022/2019 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада „Утицај комплекса витамина Бе на неуроинфламацију и развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“

Ментор \_\_\_\_\_ проф. др Биљана Божић Недељковић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Марија Ракић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

„Утицај комплекса витамина Бе на неуроинфламацију и развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

## Article

# Vitamin B Complex and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis –Attenuation of the Clinical Signs and Gut Microbiota Dysbiosis

Marija Mandić <sup>1</sup>, Katarina Mitić <sup>1</sup>, Predrag Nedeljković <sup>2</sup>, Mina Perić <sup>1,3</sup> , Bojan Božić <sup>1</sup> , Tanja Lunić <sup>1</sup>, Ana Bačić <sup>4</sup>, Mirjana Rajilić-Stojanović <sup>4</sup> , Sanja Peković <sup>5</sup> and Biljana Božić Nedeljković <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physiology and Biochemistry “Ivan Đaja”, Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; marija.mandic@bio.bg.ac.rs (M.M.); katarina.mitic@bio.bg.ac.rs (K.M.); minap@bio.bg.ac.rs (M.P.); bbozic@bio.bg.ac.rs (B.B.); tanja.lunic@bio.bg.ac.rs (T.L.)

<sup>2</sup> Department for Plastic and Reconstructive Surgery, Institute for Orthopedic Surgery “Banjica”, 11000 Belgrade, Serbia; nedeljkovicpredrag@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratory for Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; abacic@tmf.bg.ac.rs (A.B.); mrajilic@tmf.bg.ac.rs (M.R.-S.)

<sup>5</sup> Department of Neurobiology, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, 11060 Belgrade, Serbia; sanjapekovic@gmail.com

\* Correspondence: biljana@bio.bg.ac.rs; Tel.: +381-11-303-2356



**Citation:** Mandić, M.; Mitić, K.; Nedeljković, P.; Perić, M.; Božić, B.; Lunić, T.; Bačić, A.; Rajilić-Stojanović, M.; Peković, S.; Božić Nedeljković, B. Vitamin B Complex and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis –Attenuation of the Clinical Signs and Gut Microbiota Dysbiosis. *Nutrients* **2022**, *14*, 1273. <https://doi.org/10.3390/nu14061273>

Academic Editor: Edward Quadros

Received: 10 February 2022

Accepted: 7 March 2022

Published: 17 March 2022

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The present study aimed to investigate the neuroprotective effects of the vitamin B complex (B1, B2, B3, B5, B6, and B12—VBC), by studying the changes in the femoral nerve, quadriceps muscle, popliteal lymph nodes and gut microbiota in the rat model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). VBC treatment attenuated clinical signs of EAE during the disease, and reduced the duration of EAE thereby contributing to a faster recovery. In VBC-treated EAE rats, a significant decrease in nerve and muscle nuclear density was revealed during the onset period of the disease, while a marked increase was detected at the end of the disease, compared with untreated EAE rats. In the lymph nodes of VBC-treated EAE rats, a fewer number of lymphoid follicles in the cortical area and smaller epithelioid granulomas were detected. The changes in microbiota composition were examined using 16S rRNA gene sequencing and bioinformatics analysis, which revealed the potential of VBC treatment in establishing and/or maintaining gut microbiota homeostasis. Finally, the present study demonstrated that VBC treatment ameliorated the cellular changes in the affected peripheral nerve, muscles innervated by this nerve, and the gut microbiota dysbiosis which occurred during the EAE.

**Keywords:** vitamin B complex; experimental autoimmune encephalomyelitis; nerve/muscle nuclear density; popliteal lymph nodes; gut microbiota; neuroprotection

## 1. Introduction

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) represents one of the most frequently used experimental models of multiple sclerosis (MS) [1,2] that mimics many aspects of MS symptoms and pathology [3]. In humans, MS is a neuroinflammatory, demyelinating and T lymphocytes mediated disease of the central nervous system (CNS) [4]. The principal pathological hallmarks of MS include neuroinflammation, demyelination (myelin sheath loss and damage), axonal deterioration, and gliosis (glial cells reaction to CNS impairment) [1,5]. The experimental model of MS can be established either via active immunization with an adjuvant consisting of myelin-derived proteins or peptides, such as myelin basic protein, proteolipid protein, and myelin oligodendrocyte glycoprotein [6,7]

or the passive transfer of activated myelin-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [8]. MS is mediated by Th1, as well as Th17 CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [9], and is manifested as neuronal deficiency followed by relapsing/remitting phase. As observed in MS, EAE is characterized by demyelination and infiltration of different immune cells in CNS [1].

The unfavorable changes in gut microbiota composition, known as “dysbiosis”, directly modulate the immune response and therefore presumably represent the fundamental factor for the development of various inflammatory diseases [10]. The gut microbiota is essential for proper maturation of immune cells and maintenance of immune homeostasis, regulating both pro- and anti-inflammatory responses [11]. Additionally, the gut microbiota influences distant tissues, including the CNS [12]. It has been demonstrated that gut microbiota communicates with the CNS along the bidirectional gut-brain axis, having an impact on the permeability of the blood-brain barrier (BBB), hence affecting neural regulation pathways and CNS homeostasis [13]. Numerous studies have shown that gut microbiota dysbiosis plays a significant role in different diseases including MS [14], as well as in EAE [15]. Namely, it was shown that microbiota metabolites are key players in the regulation of immune response, via several pathways mediated by different microbial metabolites including short chain fatty acids, tryptophan metabolites, polysaccharide A, etc., [16]. For instance, it was demonstrated that short chain fatty acids, including propionate and butyrate, produced by certain bacteria, can induce the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into T regulatory lymphocytes, and therefore directly influence the T-helper/T-regulatory ratio which is a crucial element in immune-mediated diseases, such as MS [16,17]. More specific for MS pathology, a recent study identified p-cresol sulphate, indoxyl sulphate and N-phenylacetylglutamine (bacterial metabolites of tryptophan and phenylalanine) as neurotoxic mediators of gut–brain communication in MS [18]. Interestingly, it was shown that germ-free or gnotobiotic mice, did not develop EAE, indicating that the microbiota is required for disease induction [19].

Vitamins of the B group are water-soluble vitamins with many beneficial effects on the nervous system, which deficiency has been linked to different neurodegenerative diseases [20]. As demyelination and axonal deterioration are common for both vitamin B deficiency and many neurological diseases, including MS, it is believed that vitamin B treatment could aid in axonal recovery and improvement of neuronal function [21–24]. In our previously published paper [25], we have shown that VBC (a complex of vitamins B1, B2, B3, B5, B6, and B12) treatment enhanced the motor nerve regeneration and the recovery of muscle function in a rat model of peripheral nerve injury. Briefly, VBC therapy improved axonal regeneration, as well as functional recovery, by reducing both Schwann cell decline and deterioration of myelin sheath [26]. Moreover, we have demonstrated that treatment with VBC complex accelerated this recovery via attenuation of neuroinflammation [27]. In addition, it was shown that the vitamins B produced by gut microbiota are important for host health but also for bacterial colonization as well as in regulating the immune response [28]. Vitamins B are used by gut microbiota as cofactors of numerous metabolic pathways, playing an important role in regulating the gut microbiota homeostasis [28]. On the other hand, gut dysbiosis could lead to a decrease in vitamin B levels, causing disruption of the immune homeostasis and further gut dysbiosis development allowing for colonization by pathogenic strains. Therefore, the modification of gut microbiota using VBC may provide an adjuvant therapeutic approach for controlling MS progression by promoting anti-inflammatory response and consequential reduction of CNS inflammation.

As a part of our investigation of the VBC effect on neuroinflammation/neuroreparation [27], the objective of this study was to investigate whether VBC could ameliorate clinical signs that occur during EAE. The effects of VBC treatment on affected peripheral nerve and innervated muscle, processes in draining lymph node, and gut microbiota in the EAE rat model were evaluated at different time points of the disease course (onset, peak, and end).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Male Dark Agouti (DA) rats aged between 2 and 2.5 months (weighing between 220–250 g) were obtained from the breeding colony at Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. The animals were maintained at the animal facility of the Faculty of Biology (University of Belgrade, Belgrade, Serbia), in standard macrolone cages (3 rats/cage) under conventional conditions: constant temperature and humidity, 12 h light/dark cycle, with free access to food pellets and tap water. Paralyzed animals were fed and given water manually. Ethics Review Committee for Animal Experimentation of Military Medical Academy and Ministry of Agriculture and Environmental Protection Republic of Serbia, Veterinary Directorate No. 323-07-6180/2019-05 and No. 323-07-06858/2021-05, approved all the experiments conducted on animals. The experiments were performed in compliance with the EEC Directive (2010/63/EU) on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

### 2.2. Chemicals

Vitamin B complex (Beviplex<sup>®</sup> ampoule containing B<sub>1</sub> (40 mg), B<sub>2</sub> (4 mg), B<sub>3</sub> (100 mg), B<sub>5</sub> (10 mg), B<sub>6</sub> (8 mg), and B<sub>12</sub> (4 µg)) was obtained from Galenika a.d. Belgrade, Serbia. Complete Freund's adjuvant, containing 1 mg/mL *Mycobacterium tuberculosis* (CFA) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.3. Induction and Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)

Animals (n = 47) were randomly categorized into four different experimental groups: control intact group (C, n = 6); group subcutaneously injected only with Complete Freund's adjuvant (CFA, n = 6); untreated EAE group (E, n = 17); VBC-treated EAE group (ET, n = 18). The animals from E and ET experimental groups were sub-divided and studied at three-time points: onset (o), peak (p), and the end (e) of EAE (Eo, Ep, Ee and ET<sub>o</sub>, ET<sub>p</sub>, ET<sub>e</sub>, respectively). EAE was induced by subcutaneous injection (into the left hind footpad) of 150 µL of an emulsion containing rat spinal cord homogenate (50% w/v in saline) in Complete Freund's adjuvant. Immunization was performed under ether anesthesia. Subcutaneous injection of Complete Freund's adjuvant of equal volume was administrated in age-matched rats in the CFA group. In the ET experimental group, animals were treated with VBC which was dissolved in saline and administered intraperitoneally once per-day (*i.p.* 1.85 mL/kg body weight/day) starting from the onset of immunization (day 0) until the end of the experiment (day 30), while EAE-untreated rats (E group) received the equal volume of saline. The experimental design is given in Figure 1.

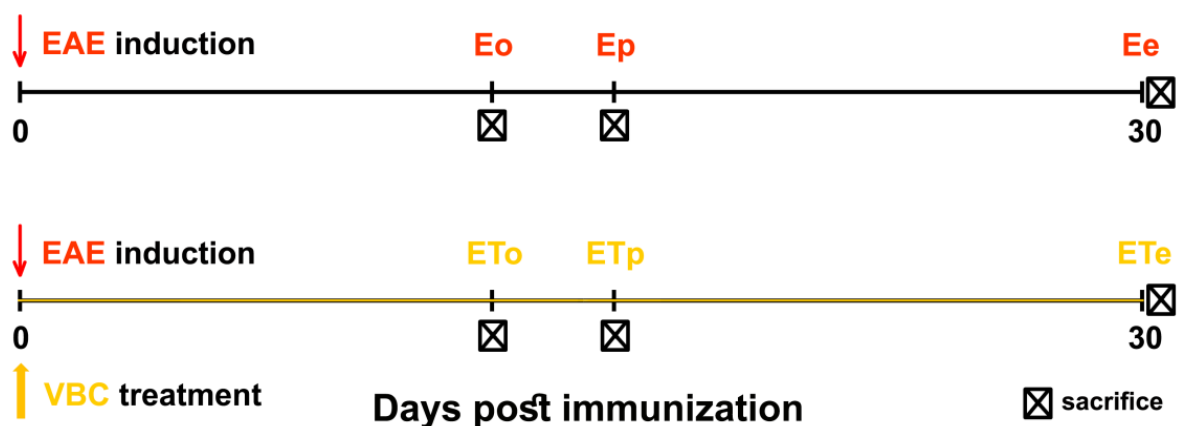


Figure 1. Illustration of the experimental design and time points of animal sacrifice. Untreated EAE rats (E), VBC-treated EAE rats (ET), onset (o), peak (p), and end (e) time points.

#### 2.4. Clinical Assessment of EAE

The rats were daily examined, weighed and scored for neurological signs of EAE during 30 days after immunization, by two independent observers according to standard 0–5 EAE grading scale: 0, no clinical signs; 0.5, partial loss/reduced tail tone assessed by the inability to curl the distal end of the tail; 1, flaccid tail; 1.5, slightly/moderately clumsy gait, impaired righting ability, or combination; 2, hindlimb weakness; 2.5, partial hindlimb paralysis; 3, complete hindlimb paralysis; 3.5, complete hindlimb paralysis and forelimb weakness; 4, quadriplegia; and 5, moribund state or death. The monitoring and scoring procedure was used for all animals. The mean clinical scores for animals in each experimental sub-group were calculated at the end of the evaluation period (day 30).

#### 2.5. The Determination of Nerve/Muscle Nuclear Density and Histological Examination of Popliteal Lymph Nodes

After the animals were sacrificed by decapitation, they were positioned for dissection of femoral nerves and quadriceps muscles of both back legs. Moreover, popliteal lymph nodes, located in the lymph drainage route, were collected. The quadriceps muscles, femoral nerves, and popliteal lymph nodes were washed in saline solution and prepared for histological H&E technique (Laboratory Oculus, Belgrade, Serbia). A series of muscles, nerves, and lymph nodes sections were prepared for histological assessment. Afterwards, nerve and muscle samples were inspected under a 40× magnification, while lymph nodes samples were observed under 5×, 10×, and 40× magnification of the brightfield microscope (Leica, LAS V4.11 software was used for imaging). ImageJ software was utilized for nuclei counting and determination of nuclear density (nuclei per mm<sup>2</sup>).

#### 2.6. Tissue Collection and DNA Extraction for 16S rRNA GENE Sequencing

For each time point of the disease course (**o**, **p**, and **e**), fecal samples of each animal were collected in all (sub-)groups (**C**, **CFA**, **Eo**, **Ep**, **Ee**, **ETo**, **ETp**, and **ETe**). The genomic DNA was isolated using the Sigma-Aldrich GenElute™ Stool DNA Isolation Kit according to the manufacturer instructions. Briefly, lysates were prepared by adding lysis buffer to the app. 80 mg of each sample. Following the centrifugation steps, supernatant (700 µL) was collected and equal volume of 70% ethanol was added and DNA was eluted. Purified DNA was stored at −20 °C for a longer period time. Quality control of isolated DNA was evaluated by 1% agarose gel electrophoresis. Sample for each (sub-)group was prepared for 16S rRNA gene sequencing (pooled DNA of each animal in equal portion).

#### 2.7. 16S rRNA Protocol

Gut microbiota was assessed by 16S rRNA gene amplicon sequencing, performed using the Illumina NovaSeq 6000 platform. PCR amplification of (sub-)group genomic DNAs was performed using barcoded primers targeting the hypervariable V4-V5 region of the 16S rRNA gene: 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') and 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'). A total of 672,480 sequencing reads were generated from eight samples, with an average of 84,060 ± 14,184 reads per sample. The raw data were processed using the programming language R version 4.1.2 [29] and using the Bioconductor software version 3.14 [30]. Raw sequencing reads were filtered and trimmed to a length of 200 base pairs, following the quality control assessment. The DADA2 pipeline was used for the denoising step and to generate the amplicon sequence variants (ASVs) [31]. After running the DADA2 inference algorithm, the sequences were checked for the presence of chimeras and chimeric sequences were removed. A total of 476,009 reads parsed the upstream analysis with the range of 42,311–77,952 reads per sample (average number of reads 61,554 ± 10,924). Generated ASVs were aligned against the SILVA 138 reference database for the phylogenetic identification [32]. Further, microbiota analysis was performed using the Microeco package (v.0.6.5) and the relative abundances of ASVs were used in the construction of the data tables from phylum to genus level [33]. The singletons and the



taxa with the relative abundance lower than 0.1% were removed from the analysis and the differences in microbial composition among the experimental groups were examined.

Microbial community diversity within and between samples was assessed by measuring alpha and beta diversity indices. Shannon diversity index was calculated as a measure of alpha diversity, whereas beta diversity was evaluated by performing weighted UniFrac distances. Log transformed weighted UniFrac distances between samples were used to perform a principal coordinate analysis (PCoA) plot. Correlation between the relative abundance of 50 most abundant microbial genera and the clinical score was assessed by calculating Pearson correlation coefficient. Differentially abundant phylogenetic groups were detected by performing the differentially abundance test based metastat method implemented in the Microeco package.

### 2.8. Statistical Analysis

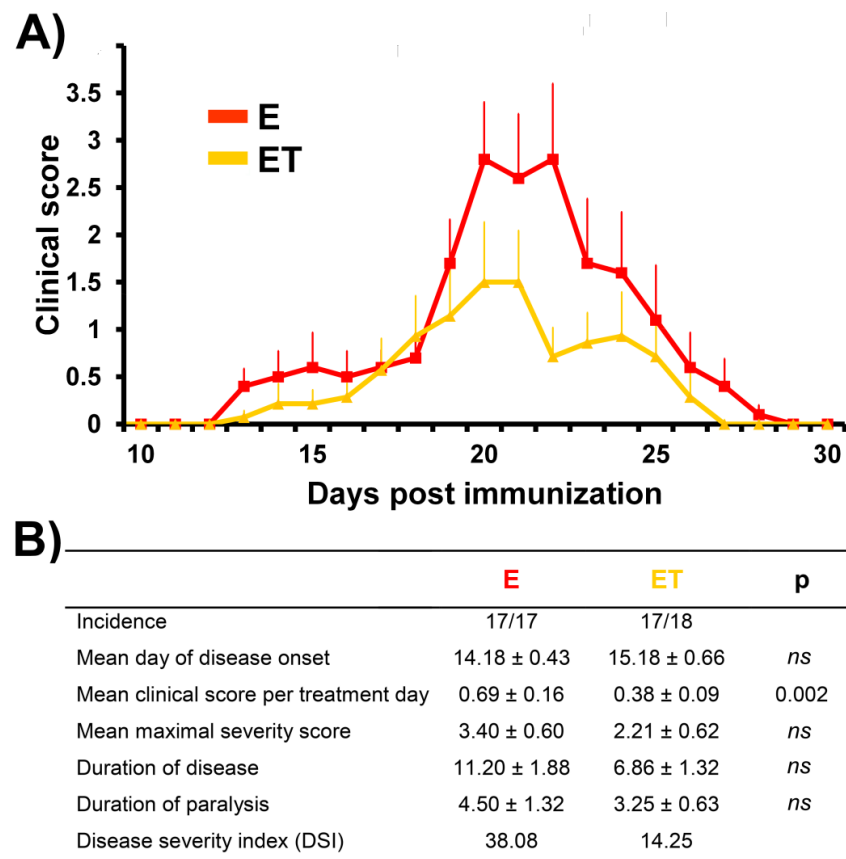
Descriptive statistics were presented as mean values with standard error (SE). Student t-test and one-way ANOVA, followed by Fisher's PLSD test were used to calculate differences between mean values. A  $p < 0.05$  was considered as significant. Statistical analysis was performed using the SPSS software for Windows, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## 3. Results

### 3.1. VBC Treatment Attenuates Severity and Duration of EAE

Conventional immunization protocol with rat spinal cord emulsified in CFA usually induces EAE in DA rats, highly susceptible strain to development of EAE. In the present study, all immunized rats in the E group (17/17) developed the acute monophasic disease, while in the ET group 17/18 developed clinical signs of the EAE. The animals from C and CFA groups did not develop EAE (0/6 per group). In the E group the first signs of EAE appeared at  $14 \pm 0.43$  days post-immunization (dpi), while rats from the ET group have shown the first clinical signs of EAE slightly, and not significantly later at  $15 \pm 0.66$  dpi (Figure 2).

The symptoms peaked at  $18 \pm 0.95$  dpi in the E group, while in the ET group peak of disease was detected at  $19 \pm 0.98$  dpi. Clinical signs of EAE decreased afterwards during the period of recovery, and all rats in the E group completely recovered until  $26 \pm 0.76$  dpi while in the ET group animals completely recovered until  $23 \pm 0.89$  dpi (end of disease). Parameters of the disease were evaluated throughout the disease (Figure 2B), including incidence (a number of rats that developed any clinical sign); mean day of disease onset (the mean day on which afflicted animals developed the first clinical sign); mean clinical score per treatment day (mean disease symptoms for all rats within a given group per day); mean maximal severity score (the mean of maximal clinical score that each rat developed throughout the disease); duration of disease (the mean number of days the rat had any symptoms); duration of paralysis (the mean number of days the rat had paralysis throughout the experiment); disease severity index ( $DSI = (\text{maximal severity of the disease}) \times (\text{duration of the disease}) \times (\text{incidence})$ ). Rats treated with VBC (ET) developed a milder form of the disease ( $DSI = 14.25$ ) in comparison to rats of the E group ( $DSI = 38.08$ ). Additionally, VBC treatment has led to a shorter duration of disease ( $6.86 \pm 1.32$  vs.  $11.20 \pm 1.88$  days, respectively, ET vs. E), although this difference was at the border of significance ( $p = 0.079$ , Figure 2B). Similarly, the mean maximal severity score in the ET group was lower when compared to the E group ( $2.21 \pm 0.62$  vs.  $3.40 \pm 0.60$ , respectively, ET vs. E), while the mean clinical score per treatment day was significantly ( $p < 0.002$ ) smaller in the treatment group ( $0.38 \pm 0.09$  vs.  $0.69 \pm 0.16$ , respectively, ET vs. E) (Figure 2B). It should be emphasized that although it was not statistically significant VBC treatment decreased body weight loss during the peak of disease which is in line with lower clinical scores observed (Figure S1).



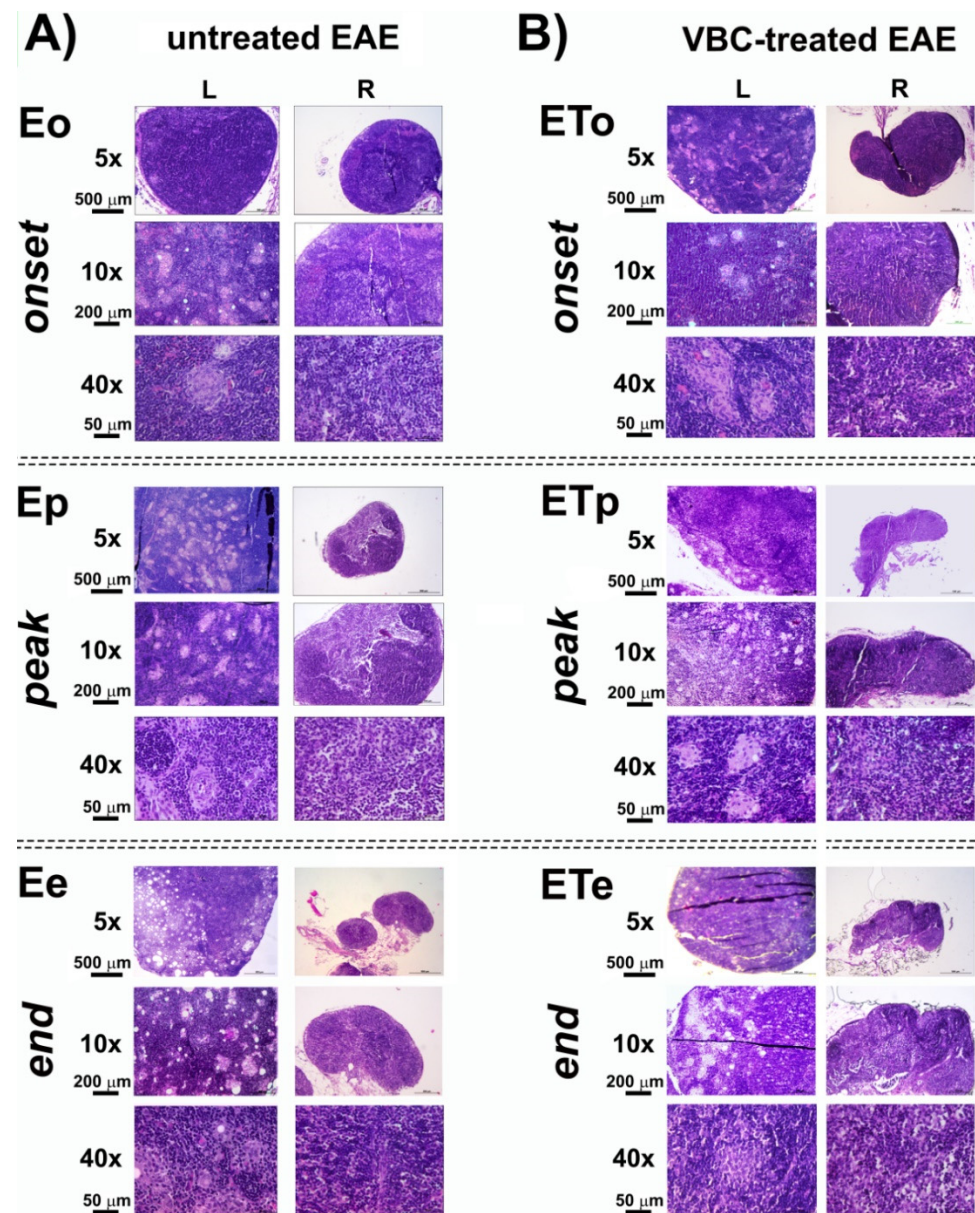
**Figure 2. Clinical scores of untreated EAE rats (E) vs. VBC-treated EAE rats (ET) during the disease course.** (A) The mean clinical scores of rats were monitored daily and the animals were sacrificed as described in Materials and Methods. Animals in E group were immunized and 150  $\mu$ L saline was applied daily as *i.p.* injection from the onset of immunization (0 dpi) until the end of experiment (30 dpi). Animals in ET group were immunized and treated with cocktail of B vitamins (B1, B2, B3, B5, B6, B12) at a dosage 1.85 mL/kg body weight/every day, *i.p.*, from the onset of immunization (0 dpi) to 30 following days (end of experiment). (B) The effect of VBC treatment on parameters of the disease. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE), *ns*—nonsignificant.

### 3.2. Histological Examination of Popliteal Lymph Nodes as Drain Lymph Nodes after Induction of EAE

Histological examinations of the popliteal lymph node (LN), as a drain lymph node, section of both control groups (C and CFA) are shown in Figure S2. The cortex contained several primary lymphoid follicles, mainly poorly developed without visible germinal centers, which underwent intensive staining (Figure S2). The histology of LN isolated from untreated EAE rats (E) is shown in Figure 3. The LN in the rats from this group, isolated at the time point marked as the disease onset (Eo), showed a decrease in the cortex thickness with medullary hyperplasia (Figure 3A), secondary lymphoid follicles with prominent germinal center and small epithelioid granulomas (Figure 3A).

The histological examination of popliteal LN sections from untreated EAE animals at the peak of disease (Ep), showed the masses of macrophages distributed throughout the whole section, which extend to the medulla. Large epithelioid granulomas were observed on high magnification 40 $\times$ , containing epithelioid cells forming granuloma, surrounded by a collar of lymphocytes, accompanied by cortical atrophy (Figure 3A). Similar observations were detected on sections from animals at the end of the disease (Ee), but with a fewer number of secondary lymphoid follicles with a germinal center and small epithelioid granulomas (Figure 3A). Histological examinations of sections obtained from EAE animals treated with VBC showed a fewer number of lymphoid follicles in the cortical area during the ET<sub>o</sub>, while smaller epithelioid granulomas during ET<sub>p</sub> and ET<sub>e</sub> time points

were detected (Figure 3B). Additionally, a significant difference was detected between the size/extent of left LNs in comparison with right LNs after EAE induction (Figure S3).

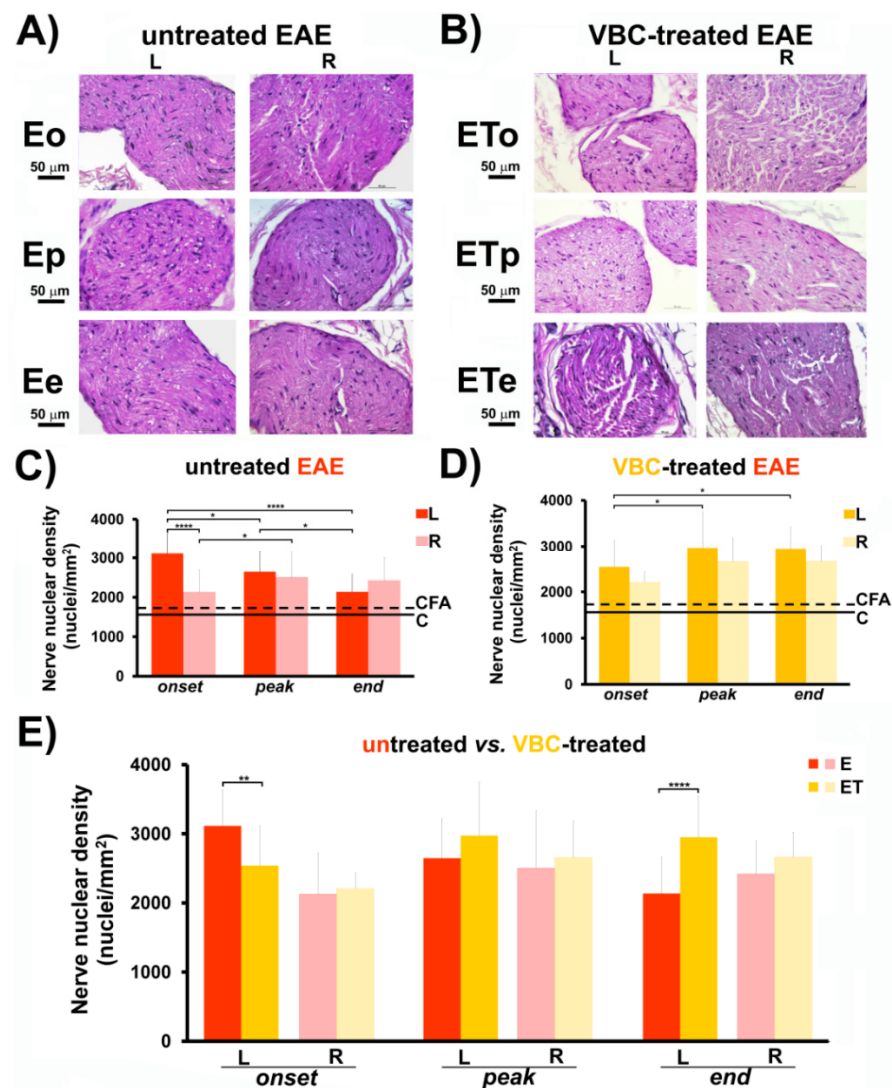


**Figure 3.** Histological changes in popliteal lymph nodes structure of untreated EAE rats (A) and VBC-treated EAE rats (B). Micrographs of transverse sections of H&E stained lymph nodes (left—L and right—R) in three different time points: onset (o), peak (p), and end (e) of the disease. Magnification 5× (scale bar 500 μm), 10× (scale bar 200 μm), and 40× (scale bar 50 μm).

### 3.3. Nerve Nuclear Density

The nuclear densities analysis of isolated femoral nerves at three different time points showed that in the untreated group of EAE rats this feature has changed significantly more evidently than in the treated group (Figure 4C–E). Animals with EAE from both treated and untreated groups (E and ET) showed a significant increase in nerve nuclear density in comparison to the control groups (C and CFA,  $p < 0.01$ ). Regarding the EAE untreated group, at the onset time point (Eo), the left femoral nerve displayed a notable rise in nuclei number/mm<sup>2</sup> ( $3112 \pm 523$ ) when compared to the right femoral nerve ( $2127 \pm 576$ ,  $p < 0.001$ , Figure 4C). During the disease peak and at the disease end, there was no significant difference between left and right femoral nerve in either E or ET groups

(Figure 4C,D). In addition, for different time points (**Eo** vs. **Ep/Ee**), prominent alterations in nuclei number/mm<sup>2</sup> were noted for both groups (**E** and **ET**) (Figure 4C,D). Moreover, in Figure 4E, it can be observed that nuclei/mm<sup>2</sup> of left femoral nerve of the **ET** group (at time point **ETo**) showed a decrease in number ( $2540 \pm 594$ ) compared to the left femoral nerve of the **E** group at onset ( $3112 \pm 523$ ,  $p < 0.01$ ). In contrast, at the end of the disease (**ETe**), an increase in nuclei number of the left femoral nerve was observed in the **ET** ( $2950 \pm 480$ ) compared to the **E** group ( $2136 \pm 451$ ,  $p < 0.001$ , Figure 4E). Micrographs of H&E stained femoral nerve transverse sections, showing marked changes of nuclear density, are separately presented (Figure 4A,B). Histological examinations of nerve nuclear density of both control groups (**C** and **CFA**) are shown in Figure S4.



**Figure 4.** The effects of VBC treatment on nerve nuclear density during EAE. (A) Histological changes of nerve nuclear density in untreated EAE rats (**E**). Scale bar 50  $\mu$ m (Magnification 40 $\times$ ). (B) Histological changes of nerve nuclear density in VBC-treated EAE rats (**ET**). Scale bar 50  $\mu$ m (Magnification 40 $\times$ ). (C) Changes in nerve nuclear density in untreated EAE rats (**E**). (D) Changes in nerve nuclear density in VBC-treated EAE rats (**ET**). (E) Changes in nerve nuclear density compared in both groups (**E** and **ET**). The nuclear density is monitored in three different time points: onset (**o**), peak (**p**), and end (**e**) of the disease. Control intact rats (**C**), rats *s.c.* injected only with Complete Freund’s adjuvant (**CFA**). Left (**L**) and right (**R**) nerve. Results are presented as the mean  $\pm$  standard error (SE). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .



### 3.4. Muscle Nuclear Density

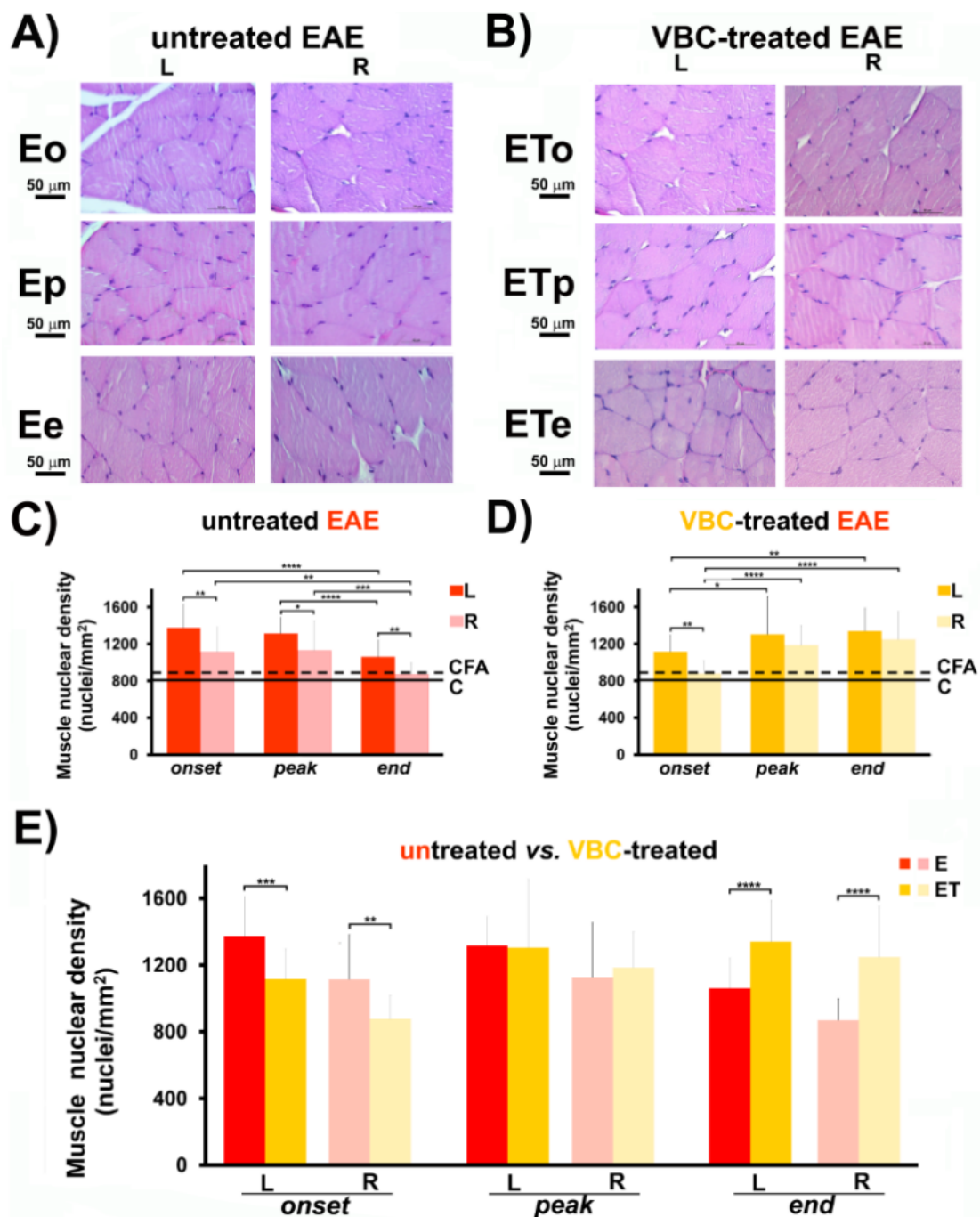
The nuclear densities of isolated quadriceps muscles at different time points for both groups (E and ET) showed a significant increase ( $p < 0.0001$ ) in muscle nuclear density in comparison with control groups (C and CFA). For all time points in the E group and onset time point in the ET group, a significant increase in nuclear density in the left muscle compared to the right muscle was detected (Figure 5C,D). There was no significant increase in muscle nuclear density between left and right muscle for ETp and ETe groups (Figure 5D). Interestingly, muscle nuclear density alterations (Figure 5E) followed the same trend of change as nerve nuclear density (Figure 5E). Namely, at the disease onset, a decrease of nuclei number/mm<sup>2</sup> ( $1116 \pm 180$ ) was observed in the left muscle of ET group, compared to the left muscle of the E group ( $1375 \pm 255$ ), while, at the disease end, a notable increase in nuclei number/mm<sup>2</sup> ( $1341 \pm 250$ ) was detected in the left muscle of the ET group, compared to the left muscle of E group ( $1061 \pm 181$ ), (Figure 5E). In parallel, the same data trend was detected for the nuclei number/mm<sup>2</sup> for the right muscles of both aforementioned animal groups (Figure 5E). Micrographs of H&E stained quadriceps muscle transverse sections, showing prominent changes of nuclear density, are separately presented (Figure 5A,B). Histological examinations of muscle nuclear density of both control groups (C and CFA) are shown in Figure S4.

### 3.5. Gut Microbiota Analysis

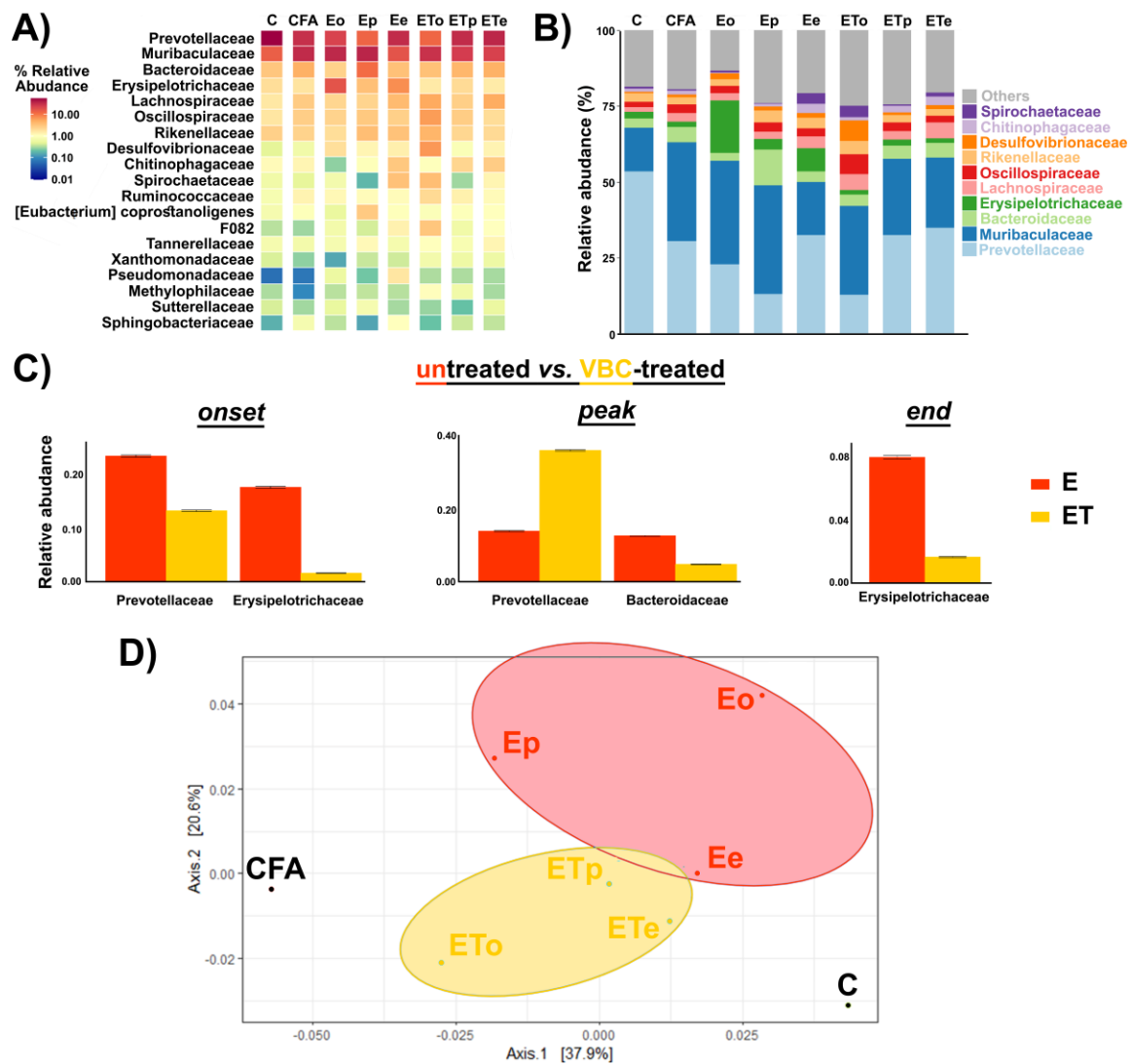
To characterize the influence of VBC therapy on gut microbiota composition during EAE, genomic DNA was extracted from fecal samples of rats from each experimental (sub-)group. Using this material, the bacterial microbiota composition of each (sub-)group was assessed by 16S rRNA gene sequencing. There was no significant difference in alpha diversity between the samples. However, frequently analyzed marker of microbiota–Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F:B) was found to be increased in untreated EAE animals during the disease (onset, peak, and end; 0.42, 0.33, and 0.33, respectively), compared to intact control animals (F:B ratio of 0.13). In VBC-treated EAE animals, F:B ratio also increased compared to the intact control animals (onset, peak, and end; 0.38, 0.30, and 0.22, respectively), although with lower F:B ratio values observed for the untreated EAE animals. These data indicated that VBC treatment may have a role in regulating the microbiota dysbiosis induced by EAE, due to the prominent decrease in F:B ratio at the end of the disease.

The abundance-based heatmap analysis at the family level (Figure 6A), as well as the bar chart showing the taxonomic abundance at the family level, revealed clear differences between bacterial composition in VBC-treated (ET) and untreated (E) EAE animal groups. At the family level, the top 10 bacteria were identified and included Prevotellaceae, Muribaculaceae, Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, Lachnospiraceae, Oscillospiraceae, Rikenellaceae, Desulfovibrionaceae, Chitinophagaceae, and Spirochaetaceae (Figure 6B). According to the data presented in Figure 6B, the most prominent changes were the decline in Prevotellaceae and the increase in the Muribaculaceae family in all groups when compared to the intact control animals (C). At the peak of the disease in the untreated animal group (E), a significant rise of the Bacteroidaceae family was observed while in the treatment group (ET) it remained consistent during all time points of the disease (Figure 6B). Additionally, a significant elevation of the Erysipelotrichaceae family was noted in the E group at the onset and the end of the disease (Figure 6A,B).

According to the metastat analysis (Figure 6C), a significant decrease of the relative abundance of Prevotellaceae and Erysipelotrichaceae was detected during the onset in the VBC-treated (ET), compared to untreated (E) animal group, while during the peak of the disease, in the VBC-treated animal group, a significant increase in Prevotellaceae remained accompanied with a significant decrease in Bacteroidaceae family abundance. Finally, at the end of the disease, significant differences between E and ET groups were detected only for the Erysipelotrichaceae family.



**Figure 5.** The effects of VBC treatment on muscle nuclear density during EAE. (A) Histological changes of muscle nuclear density in untreated EAE rats (E). Scale bar 50  $\mu$ m (Magnification 40 $\times$ ). (B) Histological changes of muscle nuclear density in VBC-treated EAE rats (ET). Scale bar 50  $\mu$ m (Magnification 40 $\times$ ). (C) Changes in muscle nuclear density in untreated EAE rats (E). (D) Changes in muscle nuclear density in VBC-treated EAE rats (ET). (E) Changes in muscle nuclear density compared in both groups (E and ET). The nuclear density is monitored in three different time points: onset (o), peak (p), and end (e) of the disease. Control intact rats (C), rats s.c. injected only with Complete Freund’s adjuvant (CFA). Left (L) and right (R) muscle. Results are presented as the mean  $\pm$  standard error (SE). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

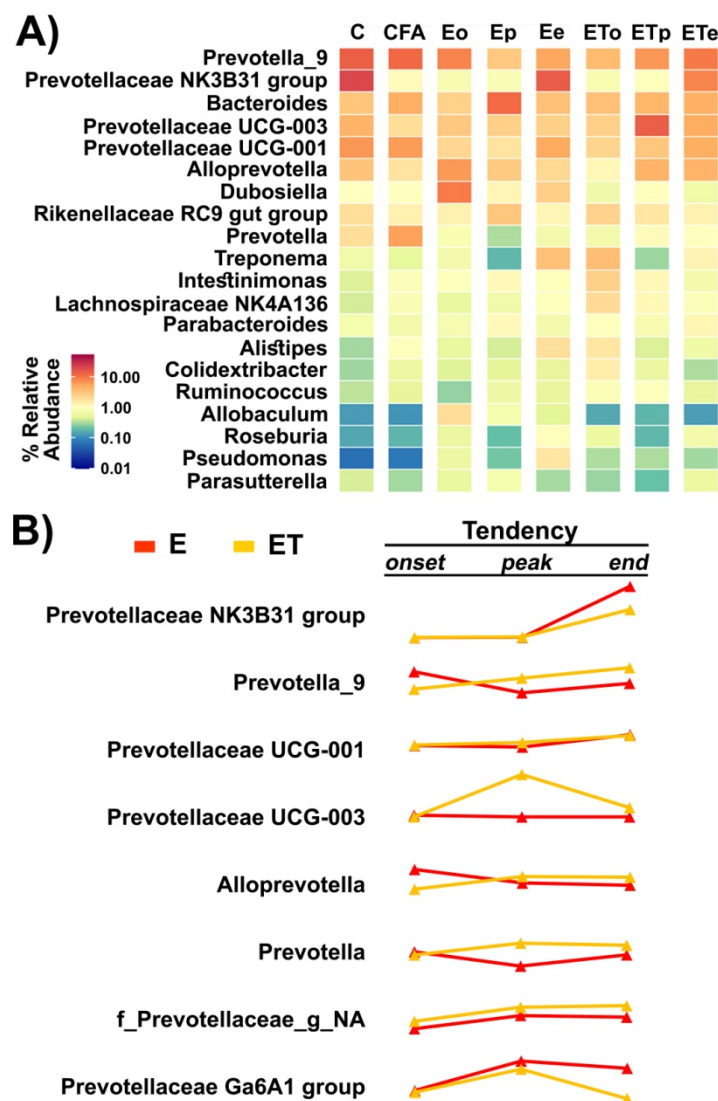


**Figure 6. Gut microbiota analysis—**(A) The abundance-based heatmap of 20 most abundant bacterial families level. (B) Relative abundances (%) of top 10 identified bacterial families. (C) Differentially abundant families between untreated and VBC-treated animals based on metastat method. (D) Principal component analysis (PCA) and clustering of the gut bacterial communities based on log transformed weighted Unifrac distance. Untreated EAE rats (E), VBC-treated EAE rats (ET) in three different time points: onset (o), peak (p), and end (e) of the disease, control intact rats (C), and rats *s.c.* injected only with Complete Freund’s adjuvant (CFA). Percentage values in parentheses represent a percentage of variance explained by each component.

Principal component analysis showed clear segregation of gut microbiota from VBC-treated and untreated EAE animals, which was further separated from the microbiota of the controls (Figure 6D). Interestingly, the microbiota of EAE animals at the end of the treatment, when all animals recovered, was the most similar to the microbiota of the control group, suggestive of the significant role of gut microbiota in the recovery process.

The weighted Unifrac distance calculated between the control and all other samples (Supplementary, Table S1) indicated that the microbiota of VBC-treated EAE animals at the end (ETe) of the trial was the most similar to the microbiota of the control group (C). In addition, during the disease, the calculated distance was decreasing at two-fold higher rate for the VBC-treated group when compared to the untreated group (dissimilarity decrease of 8.3 vs. 4.5 between time points for ET and E group, respectively).

Several *Prevotella* genera were identified as highly abundant in different samples, while differential abundance was detected for a number of pairs of comparisons (Figure 7A). Differentially abundant Prevotellaceae included *Prevotellaceae* NK3B31 group, *Prevotella\_9*, *Prevotellaceae* UCG-001, and *Prevotellaceae* UCG-003 and there was a notable change in the abundance of these groups throughout the disease course. A significant negative correlation between the abundance of *Prevotellaceae* UCG-001 and clinical score (Pearson correlation coefficient  $-0.719$ ,  $p$  value 0.044) showed that alleviation of EAE symptoms was either followed or induced by the increase in the abundance of this bacterial group. Finally, it was noted that the abundance ratio of *Prevotella* at the end point when animals did not show symptoms of EAE, in both E and ET groups, were similar to those observed for the control group (C). The trend of change of relative abundance of genera within the Prevotellaceae family (Figure 7B) was presented according to the relative abundance values shown in Table S2.



**Figure 7.** Gut microbiota analysis at the Genus level—(A) The abundance-based heatmap of the top 20 bacterial genera (B) The trend of change of relative abundance of genera within the Prevotellaceae family for VBC-treated and untreated EAE animals during the course of the disease.

#### 4. Discussion

B vitamins are essential for diverse metabolic pathways and cellular reactions [22,34]. They are required for the metabolism of carbohydrates, proteins, and lipids, and also play key roles in the regulation of many enzymatic reactions, in the form of coenzymes.



Most importantly, vitamins of B group are fundamental in providing the energy for the proper development of the nervous system. Their deficiency has been associated with cognitive dysfunction and neurological diseases such as Parkinson's, Alzheimer's disease, and MS [22,34]. Importantly, B vitamins are produced by gut microbiota and their altered metabolism has been linked to gut dysbiosis which occurs in neurodegenerative diseases [35].

The results of the present study revealed that VBC treatment affected the course of the disease at specific time points, following the EAE induction. VBC caused a reduction in the number of lymphoid follicles in the cortical area, while smaller epithelioid granulomas were observed in the treated EAE rats. At the early phase of the disease, VBC decreased the nerve and muscle nuclear densities, although the significant elevation of nuclear densities of both investigated tissues was noticed at the end of the disease. In addition, it should be emphasized that VBC treatment attenuated clinical signs during the peak and end phase of EAE indicating that rats treated with VBC developed a milder form of the disease accompanied by faster recovery during the period of post-immunization. Finally, VBC treatment in EAE had an impact on the gut microbiota composition.

Interestingly, we detected a significant difference between the size/extent of the left popliteal LNs in comparison with the right popliteal LNs after EAE induction in all animal groups, together with increased nuclear density in femoral nerve and quadriceps muscle isolated from the left legs. Considering that the left leg was challenged for EAE induction, large drain popliteal LNs from this leg could be a consequence of a progressive process of antigen presentation that occurred in these regional draining nodes. Importantly, the applied immunization triggers changes in blood-nerve barrier (BNB) permeability. The maintenance of BNB permeability is regulated by key tight junction proteins, including the family of claudins, occludin, and tricellulin [36]. It has been demonstrated that in rats with EAE, the diminished expression of BNB proteins (i.e., claudin-3 and claudin-5) in the endothelium is mediated by proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-17. Disrupted BNB permeability could be a possible explanation for a significant increase of nuclear density/cell recruitment in the femoral nerve and quadriceps muscle, under progressive inflammatory conditions, such as EAE. In other experimental models, the infiltration of mononuclear cells into the sciatic nerve was observed after experimental autoimmune neuritis immunization [37]. In the early phase of VBC treatment of EAE, the changes in nerve function (paresis/paralysis) were followed by a decrease in nerve nuclear density and were observed together with the reduction in muscle nuclear density. On the contrary, our findings displayed that VBC treatment contributed to the increased nerve nuclear density at the end of the disease. These observations could be correlated with our recently published results showing that VBC caused a time-dependent rise of cell number (i.e., macrophages/Schwann cells) and their mutual interactions that are most likely associated with the regeneration of the injured nerve [26,27]. In addition to Schwann cells, one study outlined the significance of the olfactory nerve glia, which is more efficient in removing myelin debris and promoting neuronal regeneration than Schwann cells. Thus, co-transplantation of both cell types has been proposed as a potential therapy for axonal regeneration of the injured nervous system, including CNS and peripheral nervous system (PNS) [38]. The literature data described that VBC, as additional therapy, improved nerve regeneration, by promoting an increase in the number of Schwann cells, which represent one of the most important glial cells of the PNS required for myelin formation and axonal recovery [23,39]. In the present study, the possible explanation for the rise in nuclear density in the affected femoral nerve after EAE induction could be in line with the infiltration process mediated by macrophages of different polarization which facilitate nerve regeneration, by clearing myelin debris and promoting the cell proliferation and migration [40]. One of the most frequently described vitamins of the B group, vitamin B12, was specified as one of the major vitamins responsible for myelin formation. What is more interesting, decreased levels of vitamin B12 have been detected in neuroinflammatory and neurodegenerative conditions, including MS [41,42]. Moreover, in one pilot study [43], it was demonstrated

that high doses of B vitamins supplementation (B1, B6, and B12) improved the optical nerve functions in MS patients. Due to their neuroprotective activities, the vitamins of the B complex could represent a potential supplementation therapy for improving the remyelination of affected nerves and their regeneration [24].

In our study, it was detected that VBC treatment contributed to a significant increase in muscle nuclear density at the end of the disease. As previously described [44], denervated muscles show a compensatory myogenic response by forming new muscle fibers from satellite cells in the process that is opposite to muscle atrophy and cell death. The potential mechanism of VBC effects shown in our study could be associated with a compensatory myogenic response and a larger number of satellite cells at the end of EAE. However, a reduced number of counted cells was confirmed in muscles at the day 15 post-immunization, which is in accordance with our previously published results showing the potential of VBC treatment in reducing the muscle nuclear density during neuroinflammation induced by peripheral nerve injury [25].

Various studies have shown the presence of gut microbiota dysbiosis in MS patients [14], as well as in the EAE model [15]. In the present study, we examined the microbiota composition at the onset, the peak, and the end of EAE in both untreated and VBC-treated animals. It was demonstrated that EAE induced gut microbiota shift, especially during the onset and peak of the disease. Interestingly, at the end of the study, when all animals have recovered the microbiota distance from the control was the smallest, indicating a role of microbiota in the recovery process. In addition, the distance between the control and the samples from VBC-treated animals was decreasing more rapidly than for untreated animals. This led us to the conclusion that the beneficial effect of VBC treatment was at least partially mediated by gut microbiota. The most relevant marker of gut microbiota dysbiosis in different pathological conditions [45] is the alteration in F:B ratio. In this study, it was revealed that VBC may have a potential role in regulating the microbiota dysbiosis induced by EAE during all investigated time points. Most importantly, at the end of the disease in VBC-treated animals, F:B ratio was the most similar to the F:B ratio in the intact control animals. Furthermore, it is well established that gut microbiota is a producer of vitamins of B complex [46], and that these vitamins may impact gut microbiota composition and function by, among other means, supporting metabolism of certain bacteria and suppressing colonization of others [47].

The most significant change at the family rank in this study was the decrease in Prevotellaceae abundance in both E and ET groups when compared to the intact control animals. Moreover, analysis of correlation between the disease score and the abundance of top 50 bacterial genera showed a significant negative correlation between *Prevotellaceae* UCG-001 abundance and clinical score, indicating that attenuation of EAE symptoms was either accompanied or induced by the increase in the abundance of this bacteria. *Prevotella* species are anaerobic Gram-negative bacteria belonging to the Bacteroidetes phylum, having a role in polysaccharide breakdown. Numbers of studies pointed out that MS patients had a depleted abundance of *Prevotella* in comparison with healthy subjects, suggesting a potential association between MS and reduced amount of *Prevotella*, as well as the potential role of *Prevotella* in the promotion of anti-inflammatory response [14]. In addition, it was indicated that *Prevotella* stimulates the IL-10 production in the small intestine and that *Prevotella histicola* can suppress EAE [48]. Taken together, it can be suggested that *Prevotella* abundance is in close relationship with disease severity and may play a part in promoting anti-inflammatory response in MS patients. At the peak of the EAE course, *Prevotella* abundance was notably higher in VBC-treated animals when compared to non-treated animals, indicating that the beneficial effect of B vitamins was evident also through reinforcing the gut microbiota homeostasis. Although our data and data of others recognize Prevotellaceae family relevant for MS pathology, further studies are needed to elucidate if the *Prevotella* genus can be considered as the potential therapeutic target for MS treatment. Our results are in accordance with conclusions of some recent clinical trials [49], which imply that therapeutic interventions which modify the gut microbiota aiming to

favor the development of “good” microorganisms with anti-inflammatory action, such as *Prevotella*, might be considered for reduction of the onset of clinical relapses of disease in MS patients.

Furthermore, a notable rise of *Allobaculum* spp. from Erysipelotrichaceae family, and Erysipelotrichaceae family was detected at the onset of EAE. This bacterial family has been shown to participate in the induction of Th17 cell response [50], which could elevate the EAE severity. Both *Allobaculum* and Erysipelotrichaceae are markers of dysbiosis induced by high fat diets and obesity [51], as well as in inflammation-related gastrointestinal diseases [52]. Moreover, an increase in the abundance of Lachnospiraceae was noted exclusively at the onset of disease in the VBC-treated animals. Recent studies have demonstrated a correlation between Lachnospiraceae and promotion of anti-inflammatory response mediated by IL-10 and TGF- $\beta$  production by immune cells, accompanied with Treg cell differentiation, which may be linked to detected amelioration of EAE clinical signs in VBC-treated animals [53].

## 5. Conclusions

This study demonstrated that VBC treatment reduced severity and duration of EAE, attenuated changes in draining (popliteal) lymph nodes, and induced changes in gut microbiota composition. Analysis of EAE affected nerves and muscles showed that VBC treatment significantly decreased their nuclear densities at the disease onset, while nuclear densities of both examined tissues were increased at the end of the disease. Additionally, in popliteal lymph nodes of VBC-treated EAE rats, fewer lymphoid follicles and smaller epithelioid granulomas were observed. Regarding gut microbiota analysis, members of Prevotellaceae family varied most prominently, indicating the potential role of this bacterial family in shaping the course of EAE. Based on our results and previously detected association with neurodegenerative diseases, members of the Prevotellaceae appear as a potential therapeutic target for adjuvant VBC treatment of MS. However, further studies are needed to investigate the complex mechanisms of immune modulation by intestinal microbiota, as well as to determine their interplay with therapeutic agents such as vitamins in the pathogenesis of MS and EAE disease processes.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14061273/s1>, Figure S1: Histological examinations of the popliteal lymph node sections of C and CFA control groups; Figure S2: Difference between the size/extent of left (L) popliteal lymph node in comparison with right (R) after EAE induction; Figure S3: Histological examinations of nerve and muscle nuclear density of C and CFA control groups; Table S1: Beta diversity calculated as weighted Unifrac distance between the samples; Table S2: Relative abundance of genera within Prevotellaceae family in different samples. Letters a–k indicate pairs of samples that were detected as differentially abundant according to the differentially abundant test based on metastat method as implemented in microeco package.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.B.N.; methodology, M.M., P.N., M.R.-S., S.P. and B.B.N.; software, M.M., B.B., A.B. and M.R.-S.; validation, M.M., K.M., S.P. and B.B.N.; formal analysis, M.M., K.M., S.P. and B.B.N.; investigation, M.M., K.M., P.N., M.P., T.L., M.R.-S., S.P. and B.B.N.; resources, B.B.N.; data curation, M.M., M.R.-S., S.P. and B.B.N.; writing—original draft preparation, M.M., K.M. and B.B.N.; writing—review and editing, M.M., K.M., B.B., T.L., A.B., M.R.-S., S.P. and B.B.N.; visualization, M.M., K.M., B.B., T.L., A.B., S.P. and B.B.N.; supervision, M.R.-S., S.P. and B.B.N.; project administration B.B.N.; funding acquisition, B.B.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Contract number: 451-03-9/2021-14/200178).

**Institutional Review Board Statement:** Ethics Review Committee for Animal Experimentation of Military Medical Academy and Ministry of Agriculture and Environmental Protection Republic of Serbia, Veterinary Directorate No. 323-07-6180/2019-05 and No. 323-07-06858/2021-05, approved all the experiments conducted on animals. The experiments were performed in compliance with the EEC Directive (2010/63/EU) on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to: Aleksandra Korać and Marija Aleksić for their valuable help during microscope usage; Miloš Zarić, pathologist, for critical reading of description of histological analysis of lymph nodes; Jovan Pešović for help during the DNA extraction process and quality control; Tina Dragović for help during histological analysis of samples of untreated EAE rats. Graphical abstract was made using resources from [www.flaticon.com](http://www.flaticon.com), designed by: Freepik; Pixel perfect; Nadiinko; Eucalyp; Creative Stall Premium; Smashicons.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

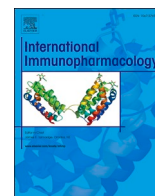
## References

1. Palumbo, S.; Pellegrini, S. Experimental in vivo models of multiple sclerosis: State of the art. *Exon Publ.* **2017**, *2017*, 173–183.
2. Bert, A.; Gran, B.; Weissert, R. EAE: Imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 119–125.
3. Bjelobaba, I.; Begovic-Kupresanin, V.; Pekovic, S.; Lavrnja, I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **2018**, *96*, 1021–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Constantinescu, C.S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1079–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bjelobaba, I.; Savic, D.; Lavrnja, I. Multiple sclerosis and neuroinflammation: The overview of current and prospective therapies. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 693–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gold, R.; Hartung, H.-P.; Toyka, K.V. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol. Med. Today* **2000**, *6*, 88–91. [[CrossRef](#)]
7. Gold, R.; Linington, C.; Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **2006**, *129*, 1953–1971. [[CrossRef](#)]
8. Robinson, A.P.; Harp, C.T.; Noronha, A.; Miller, S.D. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: Utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb. Clin. Neurol.* **2014**, *122*, 173–189.
9. Lee, M.J.; Jang, M.; Choi, J.; Lee, G.; Min, H.J.; Chung, W.-S.; Kim, J.-I.; Jee, Y.; Chae, Y.; Kim, S.-H. Bee venom acupuncture alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by upregulating regulatory T cells and suppressing Th1 and Th17 responses. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 1419–1445. [[CrossRef](#)]
10. McLean, M.H.; Dieguez, D.; Miller, L.M.; Young, H.A. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut* **2015**, *64*, 332–341. [[CrossRef](#)]
11. Belkaid, Y.; Hand, T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **2014**, *157*, 121–141. [[CrossRef](#)]
12. Cryan, J.F.; Dinan, T.G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 701–712. [[CrossRef](#)]
13. Braniste, V.; Al-Asmakh, M.; Kowal, C.; Anuar, F.; Abbaspour, A.; Tóth, M.; Korecka, A.; Bakocevic, N.; Ng, L.G.; Kundu, P. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, ra158–ra263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jangi, S.; Gandhi, R.; Cox, L.M.; Li, N.; Von Glehn, F.; Yan, R.; Patel, B.; Mazzola, M.A.; Liu, S.; Glanz, B.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12015. [[CrossRef](#)]
15. Johanson, D.M.; Goertz, J.E.; Marin, I.A.; Costello, J.; Overall, C.C.; Gaultier, A. Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. van den Hoogen, W.J.; Laman, J.D.; Hart, B.A. Modulation of multiple sclerosis and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis by food and gut microbiota. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lee, Y.K.; Menezes, J.S.; Umesaki, Y.; Mazmanian, S.K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4615–4622. [[CrossRef](#)]
18. Ntranos, A.; Park, H.-J.; Wentling, M.; Tolstikov, V.; Amatruda, M.; Inbar, B.; Kim-Schulze, S.; Frazier, C.; Button, J.; Kiebish, M.A. Bacterial neurotoxic metabolites in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and plasma. *Brain* **2021**, awab320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Berer, K.; Mues, M.; Koutrolos, M.; Rasbi, Z.A.; Boziki, M.; Johnner, C.; Wekerle, H.; Krishnamoorthy, G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **2011**, *479*, 538–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



20. Altun, I.; Kurutaş, E.B. Vitamin B complex and vitamin B12 levels after peripheral nerve injury. *Neural Regen. Res.* **2016**, *11*, 842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Nemazannikova, N.; Mikkelsen, K.; Stojanovska, L.; Blatch, G.L.; Apostolopoulos, V. Is there a link between vitamin B and multiple sclerosis? *Med. Chem.* **2018**, *14*, 170–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nedeljković, P.; Dacić, S.; Kovačević, M.; Peković, S.; Vučević, D.; Božić-Nedeljković, B. Vitamin B complex as a potential therapeutical modality in combating peripheral nerve injury. *Acta Med. Median.* **2018**, *57*, 85–91. [[CrossRef](#)]
23. Baltrusch, S. The Role of neurotropic B vitamins in nerve regeneration. *BioMed Res. Int.* **2021**, *2021*, 9968228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El Soury, M.; Fornasari, B.E.; Carta, G.; Zen, F.; Haastert-Talini, K.; Ronchi, G. The role of dietary nutrients in peripheral nerve regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nedeljković, P.; Zmijanac, D.; Drašković-Pavlović, B.; Vasiljevska, M.; Vučević, D.; Božić, B.; Bumbaširević, M. Vitamin B complex treatment improves motor nerve regeneration and recovery of muscle function in a rodent model of peripheral nerve injury. *Arch. Biol. Sci.* **2017**, *69*, 361–368. [[CrossRef](#)]
26. Ehmedah, A.; Nedeljkovic, P.; Dacic, S.; Repac, J.; Draskovic-Pavlovic, B.; Vučević, D.; Pekovic, S.; Nedeljkovic, B.B. Effect of vitamin B complex treatment on macrophages to schwann cells association during neuroinflammation after peripheral nerve injury. *Molecules* **2020**, *25*, 5426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ehmedah, A.; Nedeljkovic, P.; Dacic, S.; Repac, J.; Draskovic Pavlovic, B.; Vucevic, D.; Pekovic, S.; Bozic Nedeljkovic, B. Vitamin B complex treatment attenuates local inflammation after peripheral nerve injury. *Molecules* **2019**, *24*, 4615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. LeBlanc, J.G.; Milani, C.; De Giori, G.S.; Sesma, F.; Van Sinderen, D.; Ventura, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 160–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Internet]; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021.
30. Gentleman, R.C.; Carey, V.J.; Bates, D.M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R80. [[CrossRef](#)]
31. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
32. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Liu, C.; Cui, Y.; Li, X.; Yao, M. microeco: An R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2021**, *97*, fiae255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mikkelsen, K.; Stojanovska, L.; Tangalakis, K.; Bosevski, M.; Apostolopoulos, V. Cognitive decline: A vitamin B perspective. *Maturitas* **2016**, *93*, 108–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Leblhuber, F.; Ehrlich, D.; Steiner, K.; Geisler, S.; Fuchs, D.; Lanser, L.; Kurz, K. The immunopathogenesis of Alzheimer’s disease is related to the composition of gut microbiota. *Nutrients* **2021**, *13*, 361. [[CrossRef](#)]
36. Reinhold, A.; Rittner, H. Barrier function in the peripheral and central nervous system—A review. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2017**, *469*, 123–134. [[CrossRef](#)]
37. Castro, F.R.; Farias, A.S.; Proença, P.L.; de La Hoz, C.; Langone, F.; Oliveira, E.C.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Santos, L.M. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicol.* **2007**, *49*, 299–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nazareth, L.; St John, J.; Murtaza, M.; Ekberg, J. Phagocytosis by peripheral glia: Importance for nervous system functions and implications in injury and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 660259. [[CrossRef](#)]
39. Lee, S.K.; Wolfe, S.W. Peripheral nerve injury and repair. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2000**, *8*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Liu, P.; Peng, J.; Han, G.-H.; Ding, X.; Wei, S.; Gao, G.; Huang, K.; Chang, F.; Wang, Y. Role of macrophages in peripheral nerve injury and repair. *Neural Regen. Res.* **2019**, *14*, 1335. [[PubMed](#)]
41. Miller, A.; Korem, M.; Almog, R.; Galboiz, Y. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **2005**, *233*, 93–97. [[CrossRef](#)]
42. Dardiotis, E.; Arseniou, S.; Sokratous, M.; Tsouris, Z.; Siokas, V.; Mentis, A.-F.A.; Michalopoulou, A.; Andravizou, A.; Dastamani, M.; Paterakis, K. Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple sclerosis: A meta-analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2017**, *17*, 190–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mallone, F.; Lucchino, L.; Franzone, F.; Marengo, M.; Carlesimo, S.C.; Moramarco, A. High-dose vitamin B supplementation for persistent visual deficit in multiple sclerosis: A pilot study. *Drug Discov. Ther.* **2020**, *14*, 122–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Borisov, A.B.; Dedkov, E.I.; Carlson, B.M. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat. Rec. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **2001**, *264*, 203–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Stojanov, S.; Berlec, A.; Štrukelj, B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ramakrishna, B.S. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Uebanso, T.; Shimohata, T.; Mawatari, K.; Takahashi, A. Functional Roles of B-Vitamins in the Gut and Gut Microbiome. *Mol. Nutr. Food Res.* **2020**, *64*, 2000426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Shahi, S.K.; Freedman, S.N.; Murra, A.C.; Zarei, K.; Sompallae, R.; Gibson-Corley, K.N.; Karandikar, N.J.; Murray, J.A.; Mangalam, A.K. *Prevotella histicola*, a human gut commensal, is as potent as COPAXONE<sup>®</sup> in an animal model of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **2019**, *462*. [[CrossRef](#)]
49. Schepici, G.; Silvestro, S.; Bramanti, P.; Mazzon, E. The gut microbiota in multiple sclerosis: An overview of clinical trials. *Cell Transplant.* **2019**, *28*, 1507–1527. [[CrossRef](#)]
50. Maghzi, A.-H.; Weiner, H.L. A One-Two Punch in the Gut May Trigger Multiple Sclerosis. *Immunity* **2020**, *53*, 707–709. [[CrossRef](#)]
51. Zheng, Z.; Lyu, W.; Ren, Y.; Li, X.; Zhao, S.; Yang, H.; Xiao, Y. Allobaculum Involves in the Modulation of Intestinal ANGPTL4 Expression in Mice Treated by High-Fat Diet. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 242. [[CrossRef](#)]
52. Kaakoush, N.O. Insights into the role of Erysipelotrichaceae in the human host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5*, 84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Saresella, M.; Mendozzi, L.; Rossi, V.; Mazzali, F.; Piancone, F.; LaRosa, F.; Marventano, I.; Caputo, D.; Felis, G.E.; Clerici, M. Immunological and clinical effect of diet modulation of the gut microbiome in multiple sclerosis patients: A pilot study. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Vitamin B complex suppresses neuroinflammation in activated microglia: *in vitro* and *in silico* approach combined with dynamical modeling

Marija Rakić<sup>a</sup>, Tanja Lunić<sup>a</sup>, Marina Bekić<sup>b</sup>, Sergej Tomić<sup>b</sup>, Katarina Mitić<sup>a</sup>, Stefan Graovac<sup>c</sup>, Bojan Božić<sup>a,\*</sup>, Biljana Božić Nedeljković<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Belgrade, Faculty of Biology, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>b</sup> University of Belgrade, Institute for the Application of Nuclear Energy, INEP, 11080 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> University of Belgrade, Faculty of Physics, 11000 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Microglia  
Neuroinflammation  
Vitamin B complex  
Neuroprotection  
Molecular docking  
Dynamical model

### ABSTRACT

Activated microglia is critically involved in the regulation of neuroinflammation/neurodegradation. Hereby, the anti-inflammatory effects of the vitamin B complex (VBC – B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>) on the function and phenotype of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglial cells were examined *in vitro*. Additionally, VBC-treated microglia supernatants were evaluated on SH-SY5Y cells to investigate the effects on neurons' viability. Further, anti-inflammatory mechanisms of VBC were examined by molecular docking studies to determine the binding affinity of each VBC component to Toll-like receptor 4 (TLR4) signalling pathway proteins and inducible nitric oxide synthase. In addition, the dynamical model which simulates VBC inhibition of TLR4 signalling pathway proteins activated by LPS has been constructed and excellent agreement with experimental data has been observed ( $adjR^2 = 0.9715$  and  $0.9909$  for TNF- $\alpha$  and IL-6, respectively). The obtained data demonstrated that VBC treatment reduced the inflammatory mediators secreted by LPS-stimulated microglia, diminished their neurotoxic effects against neurons, and induced changes in phenotype profile toward M2 microglia type. Finally, the constructed dynamical model provides deeper insight into the involvement of each VBC component on the VBC inhibitory potential toward the TLR4 signalling pathway and enables optimization of novel VBC formulations as well as inhibitory potential of new putative inhibitors.

### 1. Introduction

An increasing amount of data has shown that neuroinflammatory processes play a key role in the development of central nervous system (CNS) pathology [1,2]. These processes are initially induced by an altered and/or inadequate immune response, mediated by different peripheral immune cells, as well as CNS-resident cells [3]. Microglia, tissue-resident macrophage population of the CNS, is considered to be one of the major immune effector cells specialized for the regulation of CNS homeostasis and inflammatory response. Besides the fact that microglia represent the first line of defense in the CNS, participating in pathogen elimination, they are also involved in the removal of cellular debris and dying cells [3]. Therefore, microglia maintain CNS development and homeostasis through close interaction with other glia cells, including neuronal cells, astrocytes and oligodendrocytes [3]. In response to different stimuli, microglia cells produce proinflammatory

cytokines such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon (IFN)  $\gamma$ , interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6, as well as proinflammatory molecules including reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) produced by nitric inducible synthase (iNOS) [3]. The uncontrolled microglial activation and inflammatory response in CNS leads to the oxidative damage and disruption of the blood–brain barrier (BBB), which, in turn, facilitates the infiltration of other peripheral immune cells including monocytes, Th1 and Th17 lymphocytes, B lymphocytes, and dendritic cells (DC) into the site of inflammation [4]. Deregulation of these processes may cause chronic inflammation in the CNS, which is a feature of many neurological diseases, including multiple sclerosis (MS) [3]. MS is one of the most common autoimmune CNS diseases, characterized by demyelination, progressive axonal damage, and subsequent neurodegeneration. It is a complex process that encompasses a cross-talk between numerous immune cells and releasement of proinflammatory mediators, followed by neuronal function loss and consequent neurodegeneration [5].

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [marija.mandic@bio.bg.ac.rs](mailto:marija.mandic@bio.bg.ac.rs) (M. Rakić), [tanja.lunic@bio.bg.ac.rs](mailto:tanja.lunic@bio.bg.ac.rs) (T. Lunić), [marina.bekic@inep.co.rs](mailto:marina.bekic@inep.co.rs) (M. Bekić), [sergej.tomic@inep.co.rs](mailto:sergej.tomic@inep.co.rs) (S. Tomić), [katarina.mitic@bio.bg.ac.rs](mailto:katarina.mitic@bio.bg.ac.rs) (K. Mitić), [gstefan94@gmail.com](mailto:gstefan94@gmail.com) (S. Graovac), [bbozic@bio.bg.ac.rs](mailto:bbozic@bio.bg.ac.rs) (B. Božić), [biljana@bio.bg.ac.rs](mailto:biljana@bio.bg.ac.rs) (B. Božić Nedeljković).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110525>

Received 16 March 2023; Received in revised form 22 May 2023; Accepted 14 June 2023

1567-5769/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Using the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), different studies have described that microglial activation (antigen presentation and production of proinflammatory molecules) led to the worsening of EAE symptoms [2,6]. On the other hand, due to the dual role of microglia in CNS and their neuroprotective effects, it also has been indicated that microglia participate in processes of T regulatory cell proliferation, remyelination, and neurogenesis, resulting in attenuation of EAE disease development [7]. These findings suggest that modulation of microglial activation may alter the course of disease leading to faster neuroregeneration and recovery. Hence, further investigation of detailed mechanisms underlying neuroinflammation processes can lead to a better understanding of microglial functions in neurodegenerative diseases such as MS, as well as to aid in the discovery of new therapeutics that could attenuate disease progression.

In our previous paper, it has been revealed that the *in vivo* vitamin B complex (VBC – B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>) treatment of EAE, ameliorated the cellular changes in the affected peripheral nerve, muscle innervated by this nerve, and the gut microbiota dysbiosis, which occurred during the EAE progression [8]. Therefore, VBC treatment can serve as a possible therapeutic strategy for the regulation and reduction of inflammatory response in neurodegenerative diseases. B vitamins act as coenzymes in multiple metabolic reactions and are necessary for the metabolism of macronutrients, such as proteins, carbohydrates, and lipids. They are water-soluble vitamins and are well-known as essential micronutrients for proper neurological functioning [9]. Decreased level of B vitamins has been linked to neuronal dysfunction and neurological diseases development, including MS [10,11].

In the present study, the effects of VBC treatment on functions and phenotype of activated microglia (model system – lipopolysaccharide (LPS) stimulated BV2 microglia cells) as one of the main inflammatory cells that mediate neurodegeneration in MS were evaluated. Furthermore, using the microglial culture supernatant transfer model on SH-SY5Y neuronal cells, the neuroprotective activity of VBC was examined. Additionally, to determine the inhibitory potential of VBC, molecular docking studies of examined B vitamins were performed on proteins of interest within the LPS-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway mediated by LPS-binding protein (LBP), cluster of differentiation 14 (CD14), Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 2 complex (TLR4/MD2), as well as iNOS, crucial marker of microglial activation. Finally, the dynamical model, which successfully describes the competitive binding of examined B vitamins vs. LPS to TLR4 signalling pathway proteins, has been constructed.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Vitamin B complex - Beplex® ampoule (Galenika a.d. Belgrade, Serbia) which is commercially available contains: B<sub>1</sub> (thiamine hydrochloride, 40 mg), B<sub>2</sub> (riboflavin sodium phosphate, 4 mg), B<sub>3</sub> (nicotinamide, 100 mg), B<sub>5</sub> (calcium pantothenate, 10 mg), B<sub>6</sub> (pyridoxine hydrochloride, 8 mg), and B<sub>12</sub> (cyanocobalamin, 4 µg). Complete cell culture medium (RPMI medium, acquired from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) used for cell-related experiments, consisted of RPMI 1640 supplemented with 10% inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), glucose, and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin), all acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4 (LPS) used for cell stimulation, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) used for the metabolic activity determination, and nitroblue tetrazolium chloride (NBT) used for determination of ROS production, were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MTT and NBT were dissolved in sterile PBS in concentration of 5 mg/mL.

### 2.2. *In vitro* assays

#### 2.2.1. Cell cultivation

To investigate the effects of VBC on cell metabolic activities and their functions *in vitro*, two cell lines – BV2 (murine microglia cells) and SH-SY5Y (human neuroblastoma) were cultured. Cells were purchased from American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cell lines were maintained in a cell culture medium at 37 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After reaching the confluence, cells were passaged for further assays with 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich) dissolved in PBS containing 0.02% Na<sub>2</sub>EDTA according to standard laboratory protocols.

#### 2.2.2. Cell line treatment

In this study, BV2 cells were used as a well-characterized and extensively employed model system for microglia. BV2 microglia cells were seeded ( $1 \times 10^4$  cells per well) to a 96-well microtiter plate and stimulated with LPS in the final concentration of 10 µg/mL. The influence of different LPS concentration (from 0.1 to 10 µg/ml) on BV2 cell activation status was measured by determining the level of nitric oxide production. Since the optimal LPS concentration for activation of BV2 cells was 10 µg/ml, we decided to use this concentration for further experiments. VBC, in three different concentrations (Table 1), was dissolved in a complete culture medium, added to the cells (50 µL of each concentration) and further incubated for 48 h. Non-stimulated cells cultured only in complete medium were used as a control.

#### 2.2.3. MTT assay

The effects of VBC on cell metabolic activity were determined by MTT assay as previously described [12]. Briefly, 100 µL of cells were added to each well ( $1 \times 10^4$  cells per well). For BV2 cells, 50 µL of LPS solution (final concentration 10 µg/mL) and 50 µL of the VBC were added to each well. Control column contained 50 µL of LPS and 50 µL of RPMI with 10% FBS. Following the 48 h incubation, 100 µL of the medium was removed from each well and 10 µL of sterile MTT solution was added. After 3 h of incubation (at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>), 100 µL of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS, Sigma-Aldrich) with 0.01 N hydrochloric acid (Zorka Pharma, Šabac, Serbia) was added and after the dissolution of the precipitated formazans, the absorbance was measured at 540 nm (Microplate Reader LKB 5060–006, LKB Instruments, Vienna, Austria). The results are presented as metabolic activity, from three independent experiments performed in quadruplicate relative to the non-stimulated cells, given a value of 100%.

#### 2.2.4. NBT assay

The effect of VBC on the generation of ROS was examined using the NBT assay [13]. The experiment set-up was identical to the one used for the MTT assay. Following the 48 h incubation, 100 µL of the medium was removed from each well and 10 µL of NBT was added to the microplate which was incubated for 3 h, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, 100 µL of 10% SDS with 0.01 N hydrochloric acid was added and after the dissolution of the precipitated formazans, the absorbance of the solution was measured at 540 nm (Microplate Reader LKB 5060–006). The results are expressed as the mean values of the ROS index, calculated according to the absorbance of

**Table 1**  
Concentrations of B vitamins present in the VBC used for *in vitro* assays.

B vitamins	C1 (µM)	C2 (µM)	C3 (µM)
B <sub>1</sub>	50	100	250
B <sub>2</sub>	3.52	7.04	17.62
B <sub>3</sub>	344	688	1720
B <sub>5</sub>	8.84	17.68	44.22
B <sub>6</sub>	16.36	32.72	81.80
B <sub>12</sub>	$1.24 \times 10^{-3}$	$2.48 \times 10^{-3}$	$6.22 \times 10^{-3}$



the samples made in quadruplicate, relative to the non-stimulated cells, given a value of 1.

### 2.2.5. Determination of NO production

To assess the effect of VBC on NO production, Griess assay was performed, as previously described [14]. Following the stimulation of BV2 cells with 10 µg/mL LPS for 48 h, 50 µL of supernatants were mixed with 50 µL of Griess reagent. After 10 min incubation, the absorbance of the solution was measured at 520 nm (Microplate Reader LKB 5060-006). Each VBC treatment was performed in quadruplicate and the results are presented as nitrite concentration (µmol/L) equivalent to NO production, in comparison with non-stimulated cells.

### 2.2.6. Determination of cytokine concentration in cell supernatants

Pooled supernatants of LPS-stimulated and VBC-treated BV2 cells from three independent experiments were used for IL-6 and TNF-α quantification by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer suggestions (R&D Systems). The results are expressed in pg/mL for one of the three independent experiments.

### 2.2.7. The microglial culture supernatant transfer model

The effects of VBC on neuron metabolic activity were determined by the microglial culture supernatant transfer model as previously described [15]. Briefly, the supernatants of stimulated BV2 cells, treated with 10 µg/mL LPS and VBC in different concentrations (100 µL), were transferred to a 96-well microplate seeded with SH-SY5Y neurons (1 × 10<sup>4</sup> cells per well). After 24 h incubation, the metabolic activity of the neurons was determined by MTT assay, as described above.

### 2.2.8. Flow cytometry analysis

The phenotypic analysis of VBC-treated BV2 cells was performed on BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences). Following the trypsinization procedure, single cell suspensions were prepared. Further, the cells were washed once in PBS, and incubated in presence of 2% mouse normal serum for 15 min at 4 °C prior to antibody staining procedure. For surface staining, cells were incubated with following antibodies diluted in recommended concentrations in PBS containing 0.01% NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich): IgG1 negative control (MOPC-21)-Phycoerythrin (PE), IgG1 negative control (MOPC-21)-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), IgG1 negative control (MOPC-21)-Allophycocyanin (APC), IgG1 negative control (MOPC-21)-APC-Cyanine7 (Cy7), CX3CR1 (SA011F11)-PE-Cy7, Arginase I (14D2C43)-PE-Cy7, Ly-6C (HK1.4)-Alexa Fluor 647, CD85k (ILT3) (H1.1)-Alexa Fluor 647, CD11b (M1/70)-PE-Cy7, CD11c (N418)-APC-Cy7 (all from BioLegend, San Diego, California, USA); CD86 (GL1)-PE-Cy5, (eBioscience, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); IgG1 negative control (MA5-18167)-Alexa Fluor 488, IgG1 negative control (MG112)-PE-Cy7, CD86 (GL1)-APC (all from Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific); CD163 (Polyclonal)-PE (Bioss, Woburn, Massachusetts, USA). For detection of intracellular markers, cells were further processed with the flow cytometry fixation and permeabilization kit I, following the manufacturer instructions (R&D Systems) with antibodies diluted in recommended concentrations: IL-4 (11B11)-Alexa Fluor 488 (both from BioLegend); NRF2 (D1Z9C)-Alexa Fluor 488 (Cell Signalling Technology, Danvers, Massachusetts, USA). For each analysis, more than 10,000 cells were gated according to their specific side-scatter (SSC)/forward-scatter (FSC) properties, after doublets exclusion according to forward scatter (FSC)-A/FSC-H properties. Signal overlap between the channels was compensated before each experiment using single labeled cells; non-specific fluorescence was determined by using the appropriate isotype controls and fluorochrome minus one (FMO) control.

### 2.3. Molecular docking

Molecular docking study was performed in order to determine the binding affinity of the B complex vitamins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>)

toward amino acid residues of LPS-binding protein (LBP, Protein Data Bank (PDB): 4M4D), cluster of differentiation 14 (CD14, PDB: 1WWL), Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 2 complex (TLR4/MD2, PDB: 3VQ2), and iNOS.

Three-dimensional (3D) crystal structures of proteins used in this study were retrieved in pdb format from the RCSB Protein Databank [16]. Proteins were prepared for molecular docking by removing all ligands, water molecules, and cofactors in the BIOVIA Discovery Studio 2021 [17], while missing amino acid residues (in the case of CD14) were added using Modeller 10.1 [18]. The adjustment of histidine protonation states, as well as the addition of polar hydrogens and Kollman charges to proteins were performed using the AutoDockTools (ADT) graphical interface [19].

All studied vitamin structures, except vitamin B<sub>12</sub>, were obtained from the PubChem Compound database in sdf formats [20]. The structure of vitamin B<sub>12</sub> was taken from the RCSB Protein Databank (PDB: 5YSC). Geometries of ligands were additionally optimized and energy minimized using the UFF (Universal Force Field) implemented in the Avogadro program (version 1.2.0), to ensure that the lowest-energy structure is used for the docking study [21]. The atomic partial charges (Gasteiger) were assigned to the vitamins by using the ADT graphical interface.

Docking simulations have been conducted in AutoDock 4.2.6 program equipped with ADT graphical interface. Grid box for each protein was generated to include the LPS-interacting amino acid residues (both N- and C-terminal region for LBP and CD14; A, B, and C chain for TLR4/MD2) or the active site of an enzyme (for iNOS). The center of the grid box was set at the following coordinates: N-terminal (X = -13.959, Y = -47.977, Z = 101.043) and C-terminal (X = 41.7, Y = -9.01, Z = 15.376) for LBP; N-terminal (X = 21.823, Y = 47.806, Z = -5.189) and C-terminal (X = 14.392, Y = 11.095, Z = 11.885) for CD14; X = -28.830, Y = -15.412, Z = 22.638 for TLR4/MD2; and X = -55.258, Y = 135.368, Z = 43.323 for iNOS. For LBP, TLR4/MD2, and iNOS a box of size 60 Å × 60 Å × 60 Å was used, while for CD14 the dimension of the box was 70 Å × 70 Å × 70 Å, in the x, y, and z directions, with distance of 0.375 Å between the points. Due to the complex structure of vitamin B<sub>12</sub> and the position of active site cavity in the center of iNOS protein, as well as the position of the key residues of the C-terminal domain of LBP and CD14 proteins, the grid box dimensions for these proteins were set to 90 Å × 90 Å × 90 Å, in the x, y, and z directions. Docking of each ligand to protein was performed with 200 iterations, while all other parameters were set to default. To generate the ligand orientation within the active site, Lamarckian genetic algorithm was applied. The conformer with the lowest binding energy in the highest numbered population size of cluster (where it was applicable) was considered to be the best pose. All results were analyzed and visualized using BIOVIA Discovery Studio 2021 and ADT programs.

To verify the validity of the docking study, re-docking of the ligands present in the crystal structures of LBP, TLR4/MD2, and iNOS (1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine for LBP, 2-deoxy-3-O-[(3R)-3-hydroxytetradecanoyl]-2-[[[(3R)-3-hydroxytetradecanoyl]amino]-4-O-phosphono-beta-D-glucopyranose for TLR4/MD2, and N-omega-propyl-L-arginine for iNOS) were performed, following the same docking protocol as described earlier. The root mean square deviations (RMSD) between the docked and crystal conformations were then computed.

### 2.4. Dynamic model description

Mechanism of LPS binding to TLR4 signalling pathway proteins (LBP, CD14, TLR4/MD2) and its corresponding inhibition by VBC can be presented as a series of interdependent interactions (Fig. 1), and can be written in form of chemical binding reactions:



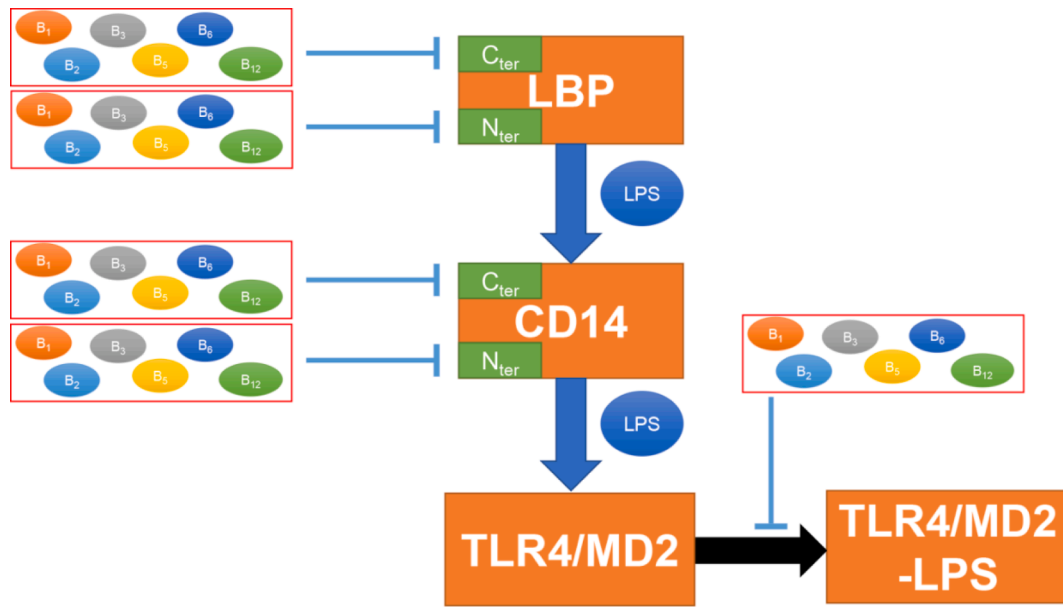


Fig. 1. Diagram of LPS transportation by TLR4 signalling pathway proteins and proposed mode of its inhibition by complex of vitamins  $B_i$ .

$$[LBP - LPS] + [CD14] \xrightarrow{k_2} [LBP] + [CD14 - LPS] \quad (1.2)$$

$$[CD14 - LPS] + [TLR4/MD2] \xrightarrow{k_3} [CD14] + [TLR4/MD2 - LPS] \quad (1.3)$$

$$[LBP]_{N_{ter}} + [B_i] \xrightarrow{k_{4_i}, k_{-4_i}} [LBP - B_i]_{N_{ter}} \quad (1.4)$$

$$[LBP]_{C_{ter}} + [B_i] \xrightarrow{k_{5_i}, k_{-5_i}} [LBP - B_i]_{C_{ter}} \quad (1.5)$$

$$[CD14]_{N_{ter}} + [B_i] \xrightarrow{k_{6_i}, k_{-6_i}} [CD14 - B_i]_{N_{ter}} \quad (1.6)$$

$$[CD14]_{C_{ter}} + [B_i] \xrightarrow{k_{7_i}, k_{-7_i}} [CD14 - B_i]_{C_{ter}} \quad (1.7)$$

$$[TLR4/MD2] + [B_i] \xrightarrow{k_{8_i}, k_{-8_i}} [TLR4/MD2 - B_i] \quad (1.8)$$

$$[LBP - LPS]_{N_{ter}} + [B_i] \xrightarrow{k_{9_i}, k_{-9_i}} [LBP - LPS - B_i]_{N_{ter}} \quad (1.9)$$

where  $[•]$  denotes concentration of given protein, vitamin, or formed complex. Vitamin B mixture is composed of vitamins  $B_1, B_2, B_3, B_5, B_6$  and  $B_{12}$  (Table 1). In equations from (1.1) to (1.9), the abbreviated notation  $B_i$  is used where  $i = 1, 2, 3, 5, 6, 12$ . Thus, equations (1.4) – (1.9) stand for six separate equations for each vitamin B from mixture. Notations “ $N_{ter}$ ” and “ $C_{ter}$ ” denotes whether  $B_i$  vitamin is binding on  $N$  terminal or  $C$  terminal on protein.

It is important to note that proteins LBP and CD14 act like a carrier to transport LPS and that they are not forming inseparable complexes with LPS or  $B_i$  vitamins. Therefore, one can calculate current concentration of these proteins as:

$$[LBP](t) = [LBP]_{tot} - [LBP - LPS](t) - [LBP - B_i]_{N_{ter}}(t) - [LBP - B_i]_{C_{ter}}(t) - [LBP - LPS - B_i]_{N_{ter}}(t) \quad (1.10)$$

$$[CD14](t) = [CD14]_{tot} - [CD14 - LPS](t) - [CD14 - B_i]_{N_{ter}}(t) - [CD14 - B_i]_{C_{ter}}(t) \quad (1.11)$$

where  $[•]_{tot}$  denotes total amount of that protein and it is conserved. These two equations replace ordinary differential equations for protein concentration of LBP and CD14.

Concentrations of LPS and  $B_i$  vitamins are much higher than evaluated protein concentrations. Therefore, the binding of LPS or vitamin  $B_i$  to proteins does not change their concentration significantly and one can consider their concentrations to be constant at all time.

Based on equations (1.2) – (1.9), one can write ordinary differential equations for concentrations:

$$\frac{d[LBP - LPS]}{dt} = k_1[LBP][LPS] - k_{-1}[LBP - LPS] - k_2[LBP - LPS][CD14] + \sum_i k_{-9_i}[LBP - LPS - B_i]_{N_{ter}} - \sum_i k_{9_i}[LBP - LPS][B_i] \quad (1.12)$$

$$\frac{d[CD14 - LPS]}{dt} = k_2[LBP - LPS][CD14] - k_3[CD14 - LPS][TLR4/MD2] \quad (1.13)$$

$$\frac{d[TLR4/MD2]}{dt} = -k_3[CD14 - LPS][TLR4/MD2] + \sum_i k_{-8_i}[TLR4/MD2 - B_i] - \sum_i k_{8_i}[TLR4/MD2][B_i] \quad (1.14)$$

$$\frac{d[TLR4/MD2 - LPS]}{dt} = k_3[CD14 - LPS][TLR4/MD2] \quad (1.15)$$

$$\frac{d[LBP - LPS - B_i]_{N_{ter}}}{dt} = k_{4_i}[LBP][B_i] - k_{-4_i}[LBP - B_i]_{N_{ter}} \quad (1.16)$$

$$\frac{d[LBP - LPS - B_i]_{C_{ter}}}{dt} = k_{5_i}[LBP][B_i] - k_{-5_i}[LBP - B_i]_{C_{ter}} \quad (1.17)$$

$$\frac{d[CD14 - LPS - B_i]_{N_{ter}}}{dt} = k_{6_i}[CD14][B_i] - k_{-6_i}[CD14 - B_i]_{N_{ter}} \quad (1.18)$$

$$\frac{d[CD14 - LPS - B_i]_{C_{ter}}}{dt} = k_{7_i}[CD14][B_i] - k_{-7_i}[CD14 - B_i]_{C_{ter}} \quad (1.19)$$

$$\frac{d[TLR4/MD2 - B_i]}{dt} = k_{8_i}[TLR4/MD2][B_i] - k_{-8_i}[TLR4/MD2 - B_i] \quad (1.20)$$

$$\frac{d[LBP - LPS - B_i]_{N_{ext}}}{dt} = k_{9_i}[LBP - LPS][B_i] - k_{-9_i}[LBP - LPS - B_i]_{N_{ext}} \quad (1.21)$$

where equations (1.16) – (1.21) represent six equations, one for each vitamin  $B_i$ ,  $i = 1, 2, 3, 5, 6, 12$ . Set of equations (1.10) – (1.21) describe the model of LPS transmission from LBP to TLR4/MD2. However, constants of proportionality of reaction rates are unknown. To avoid the overfitting and make the model minimal, appropriate assumptions were introduced. The first assumption was that reactions described with equations (1.1), (1.2) and (1.3) are happening with comparable rates (same order of magnitude). The second assumption is that binding rates of vitamins  $B_i$ , which are expressed through Gibbs binding energies [22], have comparable constants and are depending solely on their Gibbs binding energies. This is reasonable to assume because when one derives the expression for the constants using the canonical ensemble [22], one sees that the constants depend on the environment in which the particles are. Thus, constants of proportionality of binding rates of vitamins  $B_i$  can be brought into relative connection through the difference in Gibbs binding energies (calculated as described in section 2.3). By these assumptions, model is reduced to minimal model with only 5 free parameters. Constants of association for equations (1.1) – (1.3):  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  and  $K_{a3}$ , are obtained from the following references [23–28]. It should be noted that, since all constants of association are found in corresponding experimental ranges ((1.28)-(1.30)), during the model optimization, randomized combination of  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  and  $K_{a3}$  through their entire ranges, with appropriate steps, have been performed. This randomization of  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  and  $K_{a3}$  values has been performed with the aim to get insight into the robustness of the proposed model. Each experimental range of  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  and  $K_{a3}$  has been divided on 5000 intervals and every possible interdependence between constants of association has been investigated during optimization. Finally, values of 5 free parameters are obtained by fitting the model on experimental data. Constants in model are given by following expressions:

$$k_3 = 5800 \quad (1.22)$$

$$k_{4_1} = 15 \quad (1.23)$$

$$b = 10 \quad (1.24)$$

$$k_{-4_1} = \frac{k_{4_1}}{b} \quad (1.25)$$

$$k_{8_1} = 300 \quad (1.26)$$

$$a = 1000 \quad (1.27)$$

$$K_{a1} = 1.4 \bullet 10^8 - 2.88 \bullet 10^8 \quad (1.28)$$

$$K_{a2} = 1 \bullet 10^6 - 5 \bullet 10^8 \quad (1.29)$$

$$K_{a3} = 7.1 \bullet 10^4 - 3.3 \bullet 10^8 \quad (1.30)$$

$$k_2 = k_3 \frac{[TLR4/MD2]K_{a2}}{[LBP]} \quad (1.31)$$

$$k_1 = k_3 \frac{K_{a1}K_{a2}[CD14][TLR4/MD2]}{[LBP]} \quad (1.32)$$

$$k_{-1} = \frac{k_1}{b} \quad (1.33)$$

$$k_{4_j} = k_{4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{4_j}} \frac{[B_j]}{[B_1]} \quad (1.34)$$

$$k_{-4_j} = k_{-4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{4_j}} \frac{[B_j]}{[B_1]} \quad (1.35)$$

$$k_{5_1} = k_{4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{5_1}} \quad (1.36)$$

$$k_{-5_1} = k_{-4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{5_1}} \quad (1.37)$$

$$k_{6_1} = k_{4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{6_1}} \quad (1.38)$$

$$k_{-6_1} = k_{-4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{6_1}} \quad (1.39)$$

$$k_{7_1} = k_{4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{7_1}} \quad (1.40)$$

$$k_{-7_1} = k_{-4_1} e^{\Delta G_{4_1} - \Delta G_{7_1}} \quad (1.41)$$

$$k_{8_j} = k_{8_1} e^{\Delta G_{8_1} - \Delta G_{8_j}} \frac{[B_j]}{[B_1]} \quad (1.42)$$

$$k_{-8_1} = \frac{k_{8_1}}{a} \quad (1.43)$$

$$k_{9_1} = k_{5_1} \quad (1.44)$$

$$k_{-9_1} = k_{-5_1} \quad (1.45)$$

where  $j = 1, 2, 3, 5, 6, 12$  and  $\Delta G$ s are corresponding Gibbs binding energies, given in Supplementary file (Tables S1-S5). The output of the model is the concentration of complex when LPS is bound to TLR4/MD2, noted as [TLR4/MD2-LPS]. The model did not go into details of further transformation of TLR4/MD2-LPS complex to TNF- $\alpha$  and IL-6. Finally, it is considered that the concentration of [TLR4/MD2-LPS] correlates with the concentration of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6. For calculations, the experimental data is recalculated to  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ .

### 2.5. Statistical analysis

Descriptive statistics were presented as mean values with standard error (SE) or standard deviation (SD). Student  $t$ -test and one-way ANOVA, followed by Fisher's PLSD test were used to calculate differences between mean values. A value of  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance. Statistical analysis was performed using the SPSS software for Windows, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

**Table 2**

The effects of VBC on functions of LPS-stimulated BV2 cells.

	Control	LPS	VBC		
			C1	C2	C3
MTT (%)	100.00 ± 3.75	78.37 ± 1.15 <sup>#</sup>	98.94 ± 1.76 <sup>****</sup>	101.94 ± 3.85 <sup>**</sup>	101.10 ± 4.33 <sup>**</sup>
NBT (index)	1.00 ± 0.05	1.48 ± 0.05 <sup>#</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>****</sup>	0.90 ± 0.04 <sup>****</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>****</sup>
NO (μM)	0.64 ± 0.55	29.00 ± 0.68 <sup>#</sup>	16.77 ± 0.33 <sup>****</sup>	15.44 ± 0.50 <sup>****</sup>	8.53 ± 0.81 <sup>****</sup>
IL-6 (pg/mL)	1.9 ± 0.095	255.6 ± 6.1 <sup>####</sup>	143.8 ± 6.19 <sup>****</sup>	95.6 ± 5.1 <sup>****</sup>	40.6 ± 3.4 <sup>****</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	159.4 ± 7.97	1539.4 ± 17.1 <sup>####</sup>	1506.4 ± 26.0 <sup>**</sup>	1312.4 ± 19.5 <sup>****</sup>	1009.4 ± 16.8 <sup>****</sup>

Data are presented as mean ± standard error (SE), from a representative experiment of three independent experiments performed in quadruplicate for MTT, NBT and NO assays. For IL-6 and TNF- $\alpha$  data are presented as concentration (pg/mL) in pooled supernatants from a representative experiment of two independent experiments performed in quadruplicate. C1, C2, and C3 of VBC are presented in Table 1. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. non-stimulated cells, <sup>####</sup> $p < 0.0001$  vs. non-stimulated cells; <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. LPS <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs. LPS <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0.0001$  vs. LPS.

### 3. Results

#### 3.1. In vitro study of VBC anti-neuroinflammatory and neuroprotective properties

##### 3.1.1. The effects of VBC treatment on functions of activated BV2 cells

To determine if the VBC treatment can modulate the metabolic activity of LPS-stimulated BV2 cells, MTT assay was performed. As presented in Table 2, the metabolic activity was reduced due to LPS stimulation, in comparison to non-stimulated cells. However, all three tested concentrations of VBC have shown a significant increase in the metabolic activity of LPS-stimulated BV2 cells.

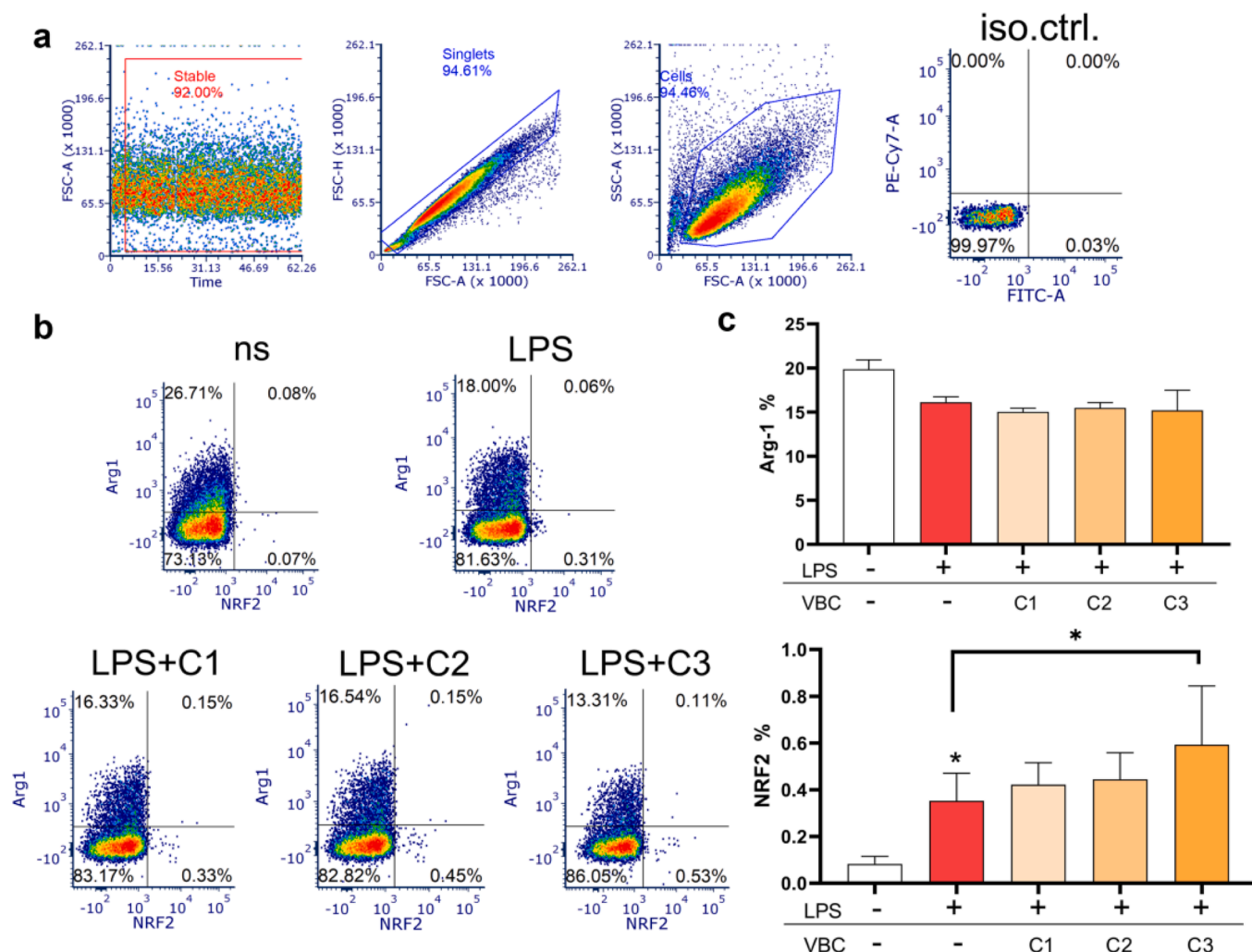
Furthermore, stimulation with LPS triggered the production of inflammatory molecules, including ROS, NO, and proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) (Table 2) in relation to non-stimulated cells. The results have shown that VBC treatment significantly diminished the generation of all evaluated molecules by LPS-stimulated BV2 cells.

##### 3.1.2. The effects of VBC treatment on phenotype of activated BV2 cells

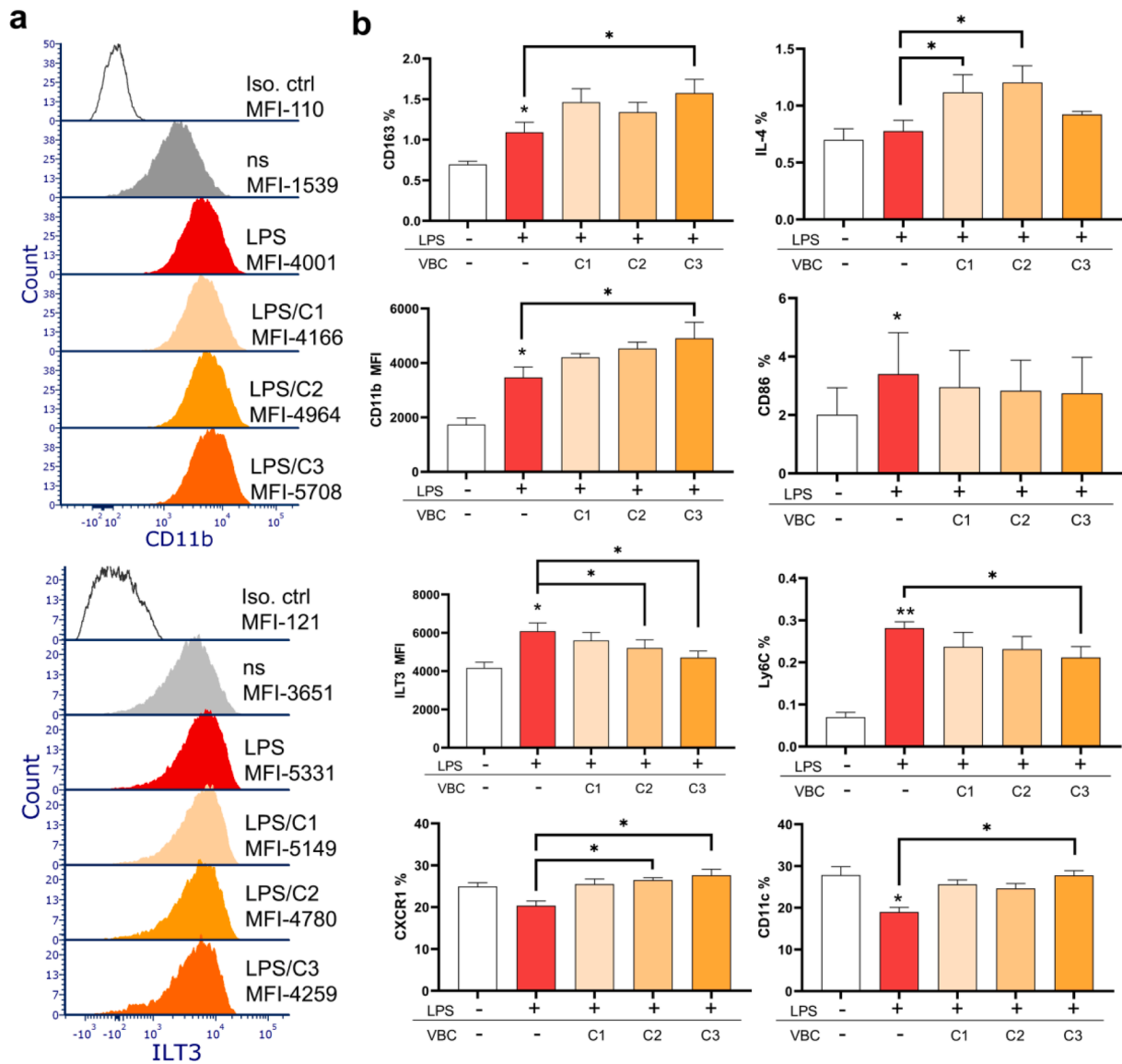
To examine whether the anti-inflammatory effects of vitamin B complex are related to the expression of specific phenotype markers, the expression of surface and intracellular molecules in non-stimulated, LPS-

stimulated BV2 cells and VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells have been compared by flow cytometry (Fig. 2). Arg1 is a key marker of M2 microglia cell involved in anti-inflammatory response [29], whereas NRF-2 was recently demonstrated as critically involved in the regulation of oxidative stress in neuroinflammation [30]. It can be noted that LPS, expectedly, down-regulated Arg1 expression by BV2 cells, and upregulated NRF-2 (Fig. 2b, c). Thereby, VBC did not modulate further expression of Arg1, but it has significantly increased the expression of NRF2.

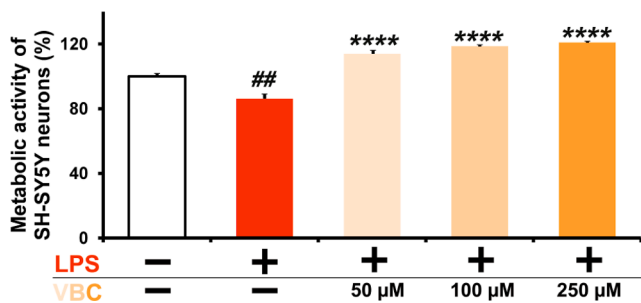
Furthermore, the expression of IL-4 and CD163 was significantly increased in VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells, when compared with untreated LPS-stimulated BV2 cells (Fig. 3b). LPS upregulated CD11b and CD86 expression by BV2 cells, as compared to non-stimulated BV2 cells. The additional VBC treatment further increased expression of CD11b by LPS-BV2 cells, whereas CD86 expression displayed a reduction tendency (Fig. 3a, b). CXCR1 and CD11c expression were upregulated by VBC treatment on LPS-stimulated BV2 cells, compared to untreated LPS-stimulated BV2 cells. The obtained data also displayed notable rise in the expression of ILT-3 and Ly6C of LPS-stimulated BV2 cells in comparison with control (non-stimulated BV2 cells), while the expression of these molecules was markedly downregulated by VBC treatment on LPS-stimulated BV2 cells (Fig. 3a, b). The obtained data



**Fig. 2.** The characterization of VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells. (a) Gating strategy - Cells were gated according to their specific side-scatter (SSC)/forward-scatter (FSC) properties, after doublets exclusion according to forward scatter (FSC)-A/FSC-H properties. (b) The dot plots of the expression of Arg1 and NRF2 on non-stimulated and VBC-treated cells in three different concentrations. (c) The effects of VBC on the production of Arg1 and NRF2 on non-stimulated and VBC-treated LPS-stimulated cells, in three different concentrations. All cultures and measurements were done in quadruplicates from independent experiments, calculating the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The representative results are shown. \*p < 0.05 compared with corresponding controls.



**Fig. 3.** The effects of VBC on the expression of selected markers of LPS-stimulated BV2 cells. (a) The effects of VBC on the production of CD11b and ILT3 on non-stimulated and VBC-treated LPS-stimulated cells, in three different concentrations, represented as mean fluorescence intensity (MFI). (b) The effects of VBC on the production of CD163, IL-4, CD11b, CD86, ILT3, Ly6C, CXCR1, and CD11c on non-stimulated and VBC-treated LPS-stimulated cells, in three different concentrations, represented as MFI or percentage (%). All cultures and measurements were done in quadruplicates from independent experiments, calculating the mean ± standard deviation (SD). The representative results are shown. \*p < 0.05 compared with corresponding controls.



**Fig. 4.** The effect of supernatants of VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells on SH-SY5Y viability. The effect of supernatants of VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells on metabolic activity of SH-SY5Y cells after 24 h. The results are expressed as the mean ± standard error (SE), from a representative experiment of three independent experiments performed in quadruplicate. ##p < 0.01 LPS-stimulated BV2 cells vs. non-stimulated cells. \*\*\*\*p < 0.0001 VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells vs. LPS-stimulated BV2 cells.

suggest a potential role of VBC in modulation of phenotype profile of LPS-stimulated BV2 cells.

**3.1.3. The effect of supernatants of VBC-treated BV2 cells on neurons**

The effect of supernatants of VBC-treated BV2 microglial cells on viability of SH-SY5Y neuronal cells is demonstrated in Fig. 4. Following the transfer, the percentage of SH-SY5Y metabolic activity has shown a major increase compared to neurons treated with supernatants of LPS-stimulated microglia (Fig. 4).

The metabolic activity of SH-SY5Y neurons treated with culture supernatants from non-stimulated BV2 cells did not differ significantly from the control cells treated only with the complete medium, whereas the treatment with culture supernatants from LPS-stimulated BV2 cells resulted in a significantly reduced neuronal viability 24 h after supernatant transfer. However, treatment with culture supernatants of VBC-treated LPS-stimulated BV2 cells eliminated the neurotoxic effects and increased the metabolic activity of neurons (Fig. 4). These results suggest that VBC inhibited the production of soluble molecules by LPS-



stimulated microglia cells that induce neuronal death. In this way, the VBC inhibits neurodegeneration induced by neuroinflammation. Altogether, these results make VBC a potential neuroprotective agent.

### 3.2. Molecular docking

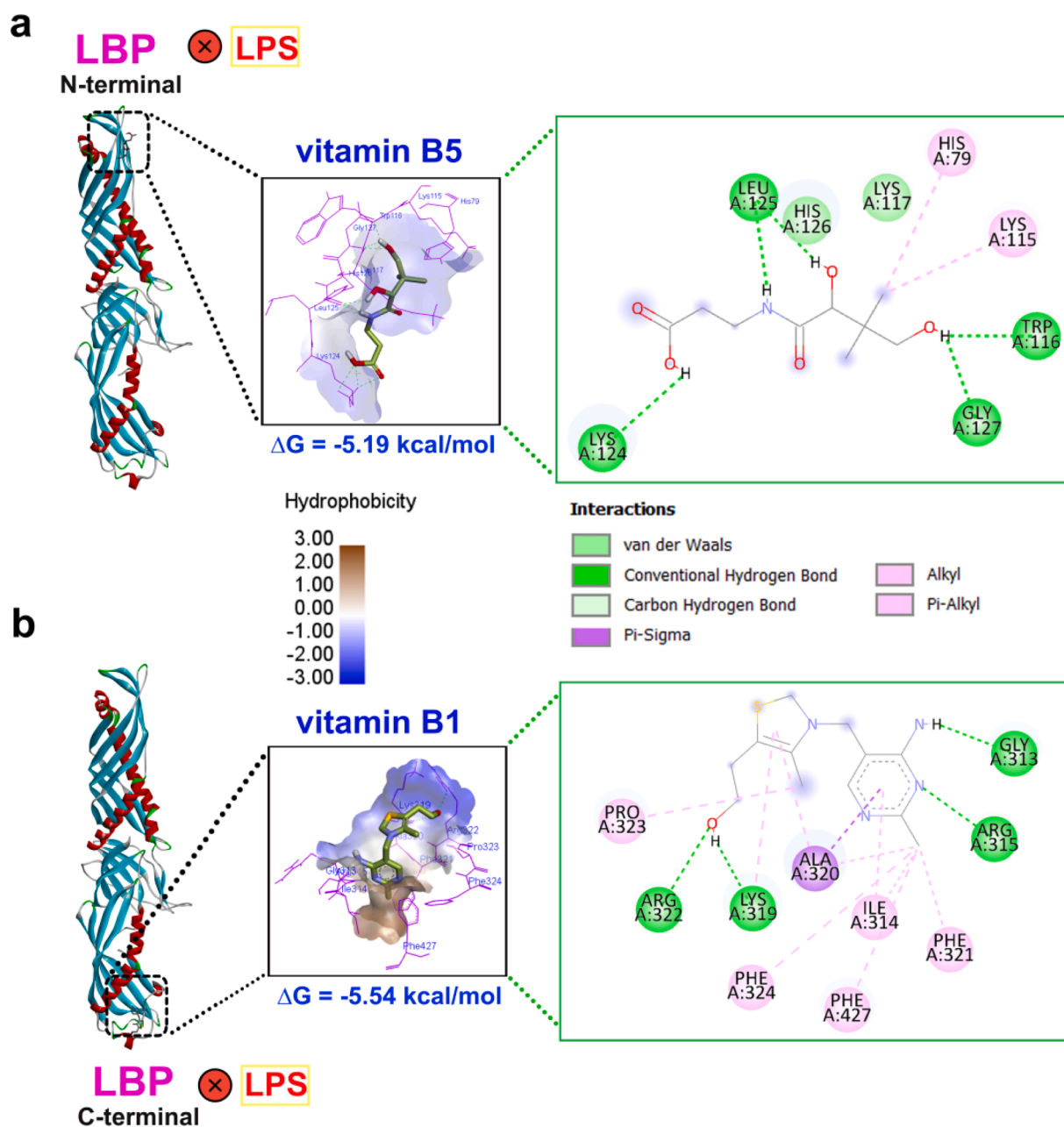
Molecular docking study was performed to reveal the binding affinity of the vitamins of B complex (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>) toward key proteins of LPS-induced inflammatory pathway (LBP, CD14, and TLR4/MD2), as well as iNOS. Binding energy values, inhibition constants, and interactions between amino acid residues of all vitamins from the complex and binding sites on proteins of interest are presented in Table S1 and S2 (for LBP), Table S3 and S4 (for CD14), Table S5 (for TLR4/MD2), and Table S6 (for iNOS). According to the docking calculations, investigated vitamins from the VBC revealed promising binding potential toward proteins of TLR4 signalling pathway.

#### 3.2.1. Validation of the docking protocol

The validations of the docking procedures were performed by docking co-crystallized ligands to their native receptors and calculating RMSD values between the crystallographic and docked conformations. The RMSD values were found to be 1.56 Å for LBP, 2.35 Å for TLR4/MD2, and 1.26 Å for iNOS, indicating high efficiency as well as validity of the docking protocol used in the study. Regarding CD14 protein, validation of the docking protocol could not be performed due to the lack of crystal structure with co-crystallized ligand.

#### 3.2.2. Vitamin B complex docking to TLR4/MD2 signalling pathway proteins

In terms of molecular docking analysis for LBP protein, vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>5</sub> have exhibited the best inhibition potential for N-terminal domain, when compared to the rest of the vitamins from the complex (Table S1). Regarding N-terminal domain, the estimated free binding



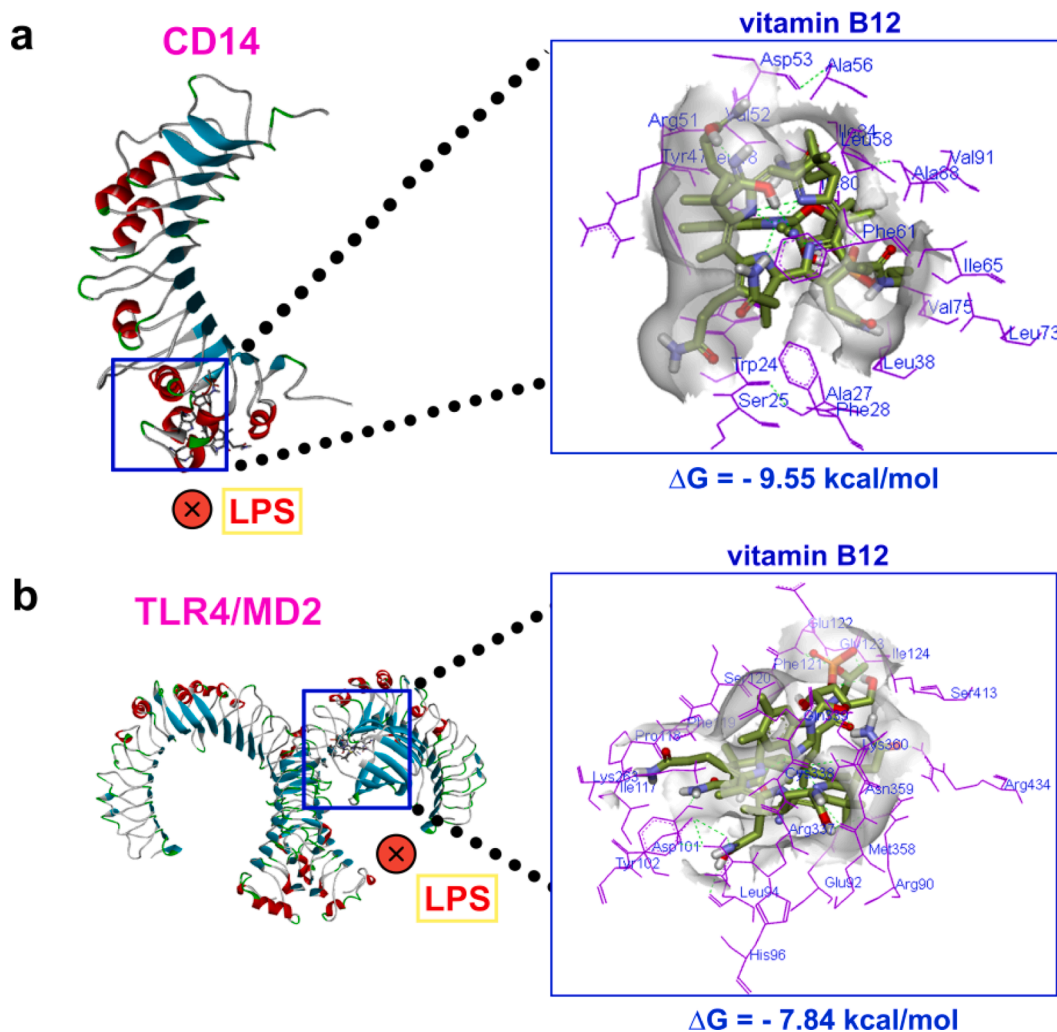
**Fig. 5.** Interactions of selected B vitamins with C- and N-terminal of LBP. (a) The best docking poses, interacting residues, and 2D intermolecular interactions of vitamin B<sub>5</sub> with N-terminal domain of LBP. (b) The best docking poses, interacting residues, and intermolecular interactions of vitamin B<sub>1</sub> with C-terminal domain of LBP.

energies for B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>5</sub> were similar, with corresponding values of  $-5.11$  kcal/mol,  $-5.17$  kcal/mol, and  $-5.19$  kcal/mol, respectively, and inhibition constants of  $178.23$   $\mu$ M,  $162.31$   $\mu$ M, and  $157.93$   $\mu$ M, respectively. Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>5</sub> have shown interactions with key residues involved in LPS binding site (Arg119, Lys120, and Lys124) [31], as well as hydrogen bonds and hydrophobic interactions with other amino acid residues in comparison with other vitamins (Table S1). As shown (Table S1), vitamin B<sub>1</sub> demonstrated interactions with Ser63, Tyr76, and Leu125 residues (conventional hydrogen bonds), with Arg119 and Lys124 residues through hydrophobic interactions (alkyl and Pi-alkyl), and Pi-Cation interaction with Lys117 residue. The B<sub>2</sub> vitamin formed conventional hydrogen bonds with Arg73, Arg119, and Lys120 residue, carbon hydrogen bonds with Gly72, Arg119, and Lys120 residues, hydrophobic interactions (alkyl and Pi-alkyl) with Arg73, and Pi-Cation and Pi-Anion interactions with Asp65 and Arg73. The vitamin B<sub>5</sub> demonstrated the highest binding affinity through conventional hydrogen bonds with Trp116, Lys124, Leu125, and Gly127, as well as hydrophobic interactions (alkyl and Pi-alkyl) with His79 and Lys115 (Fig. 5a).

In addition, the docking analysis was performed on the C-terminal domain of LBP, which has been shown to be involved in LPS transfer as well [32]. Regarding C-terminal domain, vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>6</sub> have shown the best binding affinity, with corresponding values of  $-5.54$  kcal/mol,  $-4.78$  kcal/mol, and  $-4.65$  kcal/mol, respectively, and inhibition constants  $86.28$   $\mu$ M,  $314.07$   $\mu$ M, and  $388.13$   $\mu$ M, respectively,

similar to those observed for N-terminal domain. Both B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> vitamins demonstrated interactions with key residues for LPS transfer (Lys319 and Arg322) through conventional hydrogen bonds (Table S2). The vitamin B<sub>1</sub> demonstrated the best docking capacity through hydrophobic interactions (alkyl and Pi-alkyl) with Pro323, Phe321, Phe324, Phe427, and Ile314, as well as through Pi-Sigma interaction with Ala320 and conventional hydrogen bonds with Gly313 and Arg315 (Fig. 5b). As shown (Table S2), vitamin B<sub>2</sub> also demonstrated alkyl, Pi-alkyl, and Pi-Sigma interactions with Arg315, Ala320, Pro323, Leu423, Phe324, Phe427 residues, as well as conventional hydrogen bonds with Arg315 and Ala320 residues. Regarding vitamin B<sub>6</sub>, no interactions were observed with the key residues, however number of interactions (alkyl, Pi-alkyl, and Pi-Sigma) were detected with other amino acid residues, including Phe321, Phe427, Phe324, Ile314, Ala320, Arg315, and Gly313.

For the CD14 protein, vitamin B<sub>12</sub> has shown the best docking capacity for N-terminal domain, with corresponding binding energy of  $-9.55$  kcal/mol. The primary interactions between the vitamin B<sub>12</sub> and binding site of CD14 protein (N-terminal region, residues 20–171) [33] involved conventional and carbon hydrogen bonds with Arg51, Thr54, Ala56, and Ile84 residues, while Phe28, Phe61, Ala27, Ala88, Leu58, Leu45, Leu48, and Trp24 residues were included in hydrophobic (alkyl, Pi-alkyl, Pi-sigma) interactions (Fig. 6a). In addition, vitamin B<sub>1</sub> also demonstrated relatively high binding affinity regarding other vitamins from complex (Table S3), with estimated binding energy of  $-5.88$  kcal/



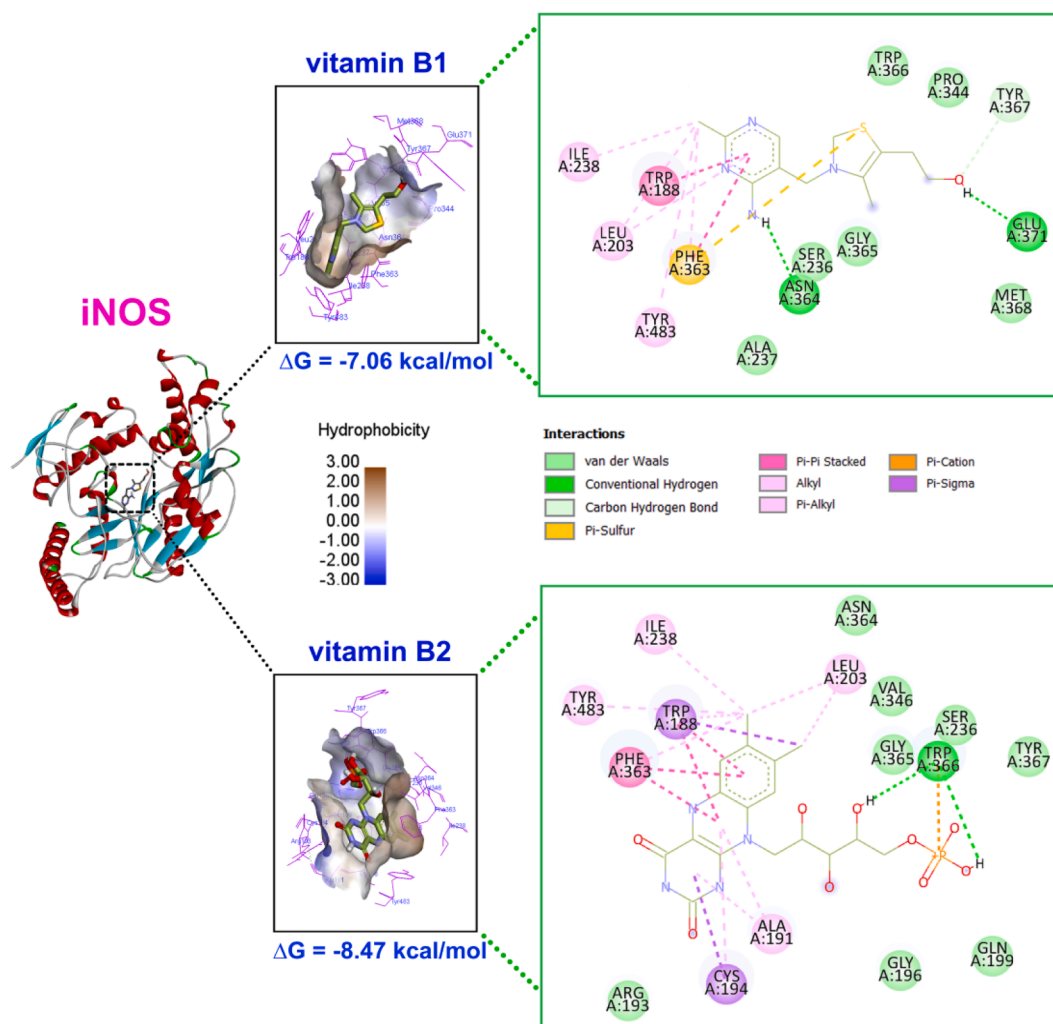
**Fig. 6.** Interactions of B<sub>12</sub> vitamin with CD14 and TLR4/MD2. (a) The best docking poses, interacting residues, and intermolecular interactions of vitamin B<sub>12</sub> with CD14. (b) The best docking poses, interacting residues, and intermolecular interactions of vitamin B<sub>12</sub> with TLR4/MD2.

mol. As presented (Table S3), CD14 binding site residues Ser69, Leu70, Ala33, Ala27, and Cys30 formed hydrogen bonds (conventional and carbon hydrogen), while Phe28, Val36, Leu68, Ile64, Ile65, and Phe61 residues were involved in hydrophobic (alkyl, Pi-Pi T-shaped, and Pi-alkyl) interactions with vitamin B<sub>1</sub>. Besides lower free binding energy obtained for B<sub>12</sub>, inhibition constant, K<sub>i</sub> (Table S3), was also significantly lower (0.01 μM), than one estimated for B<sub>1</sub> vitamin (48.67 μM), which indicate a far better inhibition capacity of B<sub>12</sub> vitamin. Among other B vitamins from the complex, vitamin B<sub>6</sub> has also shown relatively good binding affinity (-4.49 kcal/mol), although with higher inhibition constant of 507.83 μM (Table S3).

Furthermore, docking analysis was performed on C-terminal domain of CD14 protein, as it is also described as LPS binding site [32]. Overall, the docking results were similar for those observed for N-terminal region, except for vitamin B<sub>12</sub>, which exhibited the lowest binding affinity for C-terminal domain of CD14 protein. The best docking capacity for C-terminal domain was shown for vitamin B<sub>6</sub>, with corresponding binding energy of -6.52 kcal/mol. The main interactions between the vitamin B<sub>6</sub> and CD14 protein involved Ala243, Lys270, Pro269, Ala244, Arg241, and Ser217 amino acid residues, however no interactions with key residues of the C-terminal (Asp 234 and Asp280 [32]) were detected (Table S4.). In addition, vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> demonstrated relatively similar binding affinity with estimated binding energies of -5.00 kcal/mol, -4.49 kcal/mol, and -5.18 kcal/mol, respectively (Table S4). As presented (Table S4), only vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>5</sub> exhibited interactions

with one of the key residues (Asp280) for the LPS transfer, however the observed binding affinity was higher for the vitamin B<sub>2</sub>. Although vitamins did not show a suitable number of interactions with the key residues, a plenty of interactions (conventional hydrogen bonds, carbon hydrogen bonds, and Pi-alkyl interactions) were detected with other amino acid residues of the binding site (Table S4), suggesting a potential role of VBC in hindering the LPS transfer.

The data observed for the TLR4/MD2 protein once again have shown that vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>12</sub> displayed the best docking scores through hydrogen (conventional hydrogen and carbon hydrogen) bonds, hydrophobic (alkyl, Pi-alkyl, Pi-sigma, and Pi-Pi-stacked), Pi-Sulfur, as well as van der Waals interactions. The lowest free binding energy was revealed for vitamin B<sub>12</sub> (-7.84 kcal/mol), followed by -6.19 kcal/mol for B<sub>1</sub>, and -5.91 kcal/mol for B<sub>2</sub> vitamin (Table S5). The vitamin B<sub>12</sub> formed the highest number of conventional hydrogen bonds with the main residues of the active site of TLR4/MD2 (A:Lys263, C:Glu122, B:Arg434, and C:Ile124), as well as with the residues out of the binding site, including Gly123, Pro118, and Leu94, and Met358 (Fig. 6b). Further, vitamin B<sub>1</sub> showed interactions within the active site (C: Tyr131, B:Phe438, B:Arg434, and C:Ile124), and also out of the LPS binding site (Arg90, Glu437, and Leu87). Finally, vitamin B<sub>2</sub> also was involved in interactions with the residues of the binding site (A:Lys263, C:Ser120, C:Phe119, C:Val61, C:Leu94, and C:Ile117), as well as with the residues outside the LPS binding site including Tyr102, Pro118, and Phe104 (Table S5). The acquired docking scores suggest that vitamin B<sub>12</sub>



**Fig. 7.** Interactions of selected B vitamins with iNOS. (A) The best docking poses, interacting residues, and 2D intermolecular interactions of vitamin B<sub>1</sub> with iNOS. (B) The best docking poses, interacting residues, and 2D intermolecular interactions of vitamin B<sub>2</sub> with iNOS.



exhibited the best potential in inhibiting the TLR4/MD2 protein, with the inhibition constant notably lower (1.79  $\mu\text{M}$ ), in relation to those obtained for vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (28.78  $\mu\text{M}$  and 46.24  $\mu\text{M}$ , respectively) (Table S5).

The molecular docking study for the iNOS protein indicated vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> as the most potent agents in binding the active site of an enzyme, with binding energies of  $-7.06$  kcal/mol and  $-8.47$  kcal/mol, respectively (Fig. 7). Although both vitamins exhibited similar values for free binding energy, Ki for vitamin B<sub>2</sub> was significantly lower (0.61  $\mu\text{M}$ ) than one for the vitamin B<sub>1</sub> (6.68  $\mu\text{M}$ ), suggesting a much higher affinity rate for the vitamin B<sub>2</sub>. As presented (Table S6), both vitamins showed interactions with the main residues of the iNOS active site including Gln257, Tyr341, Trp366, Tyr367, and Glu371, as well as with the residues out of the binding site. Namely, vitamin B<sub>1</sub> mainly formed interactions through conventional hydrogen bonds (Glu371 and Asn364), carbon hydrogen bonds (Tyr367), Pi-Sulfur (Phe363), hydrophobic Pi-Pi-stacked (Trp188 and Phe363), alkyl (Cys194, Ile238, and Leu203), Pi-alkyl (Phe363, Tyr483, and Leu203) (Fig. 7). In addition, vitamin B<sub>2</sub> displayed interactions through conventional hydrogen bonds, electrostatic Pi-Cation (Trp366), hydrophobic Pi-Sigma (Cys194 and Trp188), Pi-Pi-stacked (Trp188 and Phe363), alkyl (Ile238 and Leu203) and Pi-alkyl interactions (Trp188, Phe363, Tyr483, Ala191, and Cys194) (Fig. 7). Furthermore, vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> have also demonstrated good binding affinities of  $-5.21$  kcal/mol and  $-5.78$  kcal/mol, respectively (Table S6).

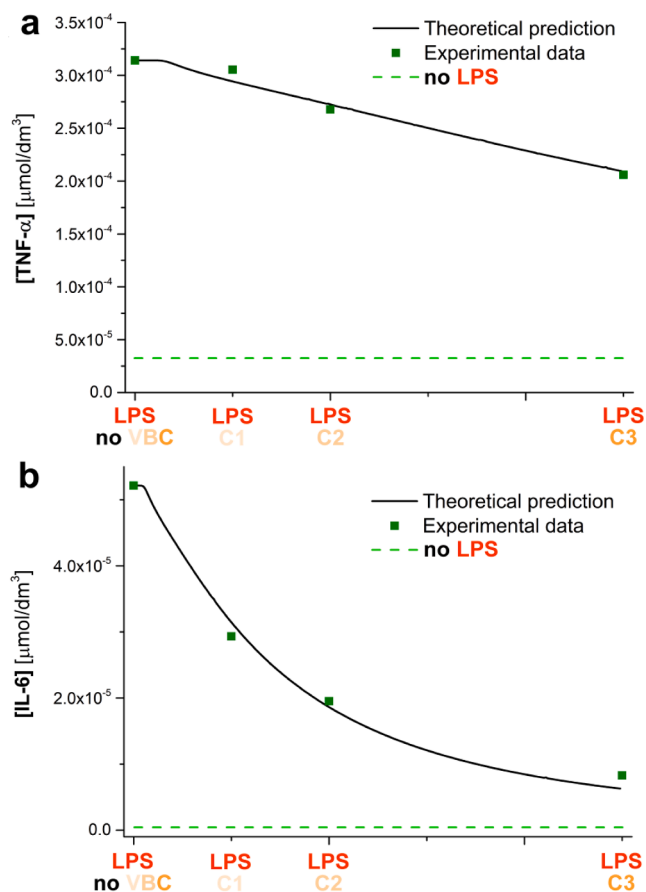
### 3.3. Dynamical modeling

Finally, the dynamical model of LPS binding to TLR4 signalling pathway proteins and corresponding inhibitions by VBC have been constructed (Section 2.4, Fig. 1). The excellent agreement of calculated data with experimental measurements for both proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  (Fig. 8a) and IL-6 (Fig. 8b) have been observed, when appropriate initial conditions are applied. Calculated  $\text{adj}R^2 = 0.9715$  and  $0.9909$  as well as Pearson coefficient =  $0.9892$  and  $0.9970$  for TNF- $\alpha$  and IL-6, respectively, quantify the excellent agreement of the calculated theoretical model (Section 2.4.) with the corresponding experimental data (Section 3.1.1, Table 2). Importantly, the model is robust to the changes of association constants (1.28) – (1.30) in their given ranges. Also, the model confirmed initial assumptions and showed that reversible reactions for bindings of vitamins B<sub>i</sub> to proteins, i.e. decompositions of protein-vitamin complex, are slower than processes of bindings.

## 4. Discussion

The microglia represent cells of the innate immune system which exhibit both neurotoxic and neuroprotective functions [34]. It is noted that uncontrolled microglial activation contributes to the pathophysiology of several neurodegenerative diseases, including MS [35]. Namely, it has been shown that oxidative damage of neurons is induced by activated microglia, which release inflammatory molecules, such as ROS and NO [3]. A number of studies have revealed that microglia-neuron interactions are fundamental for the modulation of neuronal function, as well as for the appropriate neurodevelopment [36,37]. Besides the excessive microglial activation, one of the main hallmarks of different neurological diseases is also the blood–brain barrier (BBB) disruption, accompanied by enhanced vascular permeability [38]. Although the exact mechanisms leading to BBB disruption are not fully understood, it was demonstrated that proinflammatory cytokines directly modulate BBB, which further contributes to the passage of inflammatory molecules and prolonged inflammation [38]. As there is a dynamic cross-talk between the CNS, the BBB and the immune system, control of these processes may be crucial in maintaining the BBB integrity and therefore preventing further spread of inflammation [39]. It was revealed that treatment with vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, and/or B<sub>9</sub> combination in patients with cognitive impairment, resulted in improved BBB function and reduced serum homocysteine (a neurotoxic metabolite) levels [40]. In addition, one study on the EAE model displayed that treatment with a combination of IFN- $\beta$  and vitamin B<sub>12</sub>, improved clinical signs and reduced demyelination [41]. Several studies indicated the beneficial role of B vitamins as anti-inflammatory agents and their potential use in preventing different inflammation-induced pathological conditions. A close relationship between B vitamins and cytokine regulation was described in conditions such as depression, where it was noted that supplementation of B vitamins has the potential to modulate proinflammatory response, resulting in decreased symptoms of depression [42]. In addition, anti-inflammatory and antinociceptive effects of B vitamins have also been outlined. Namely, vitamin B<sub>2</sub>, as well as the combination of vitamins, including B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>, have exhibited antinociceptive/anti-inflammatory effects in different experimental models [43,44]. Although the importance of B vitamins for adequate functioning of the nervous system is well established, there is not much data on treatments that include more than three B vitamins in combination. Therefore, the aim of this study was directed toward elucidating the potential benefits of simultaneous application of several B vitamins and their synergism rather than focusing exclusively on the individual effect or combination of up to three vitamins.

In the presented study, VBC treatment significantly reduced the levels of the ROS, NO, TNF- $\alpha$ , and IL-6 produced by LPS-stimulated BV2 cells. These results are in line with published data [45], where it was demonstrated that benfotiamine (a synthetic vitamin B<sub>1</sub>, thiamine) significantly decreased the production of proinflammatory mediators



**Fig. 8.** Experimental data and theoretical prediction of TNF- $\alpha$  (a) and IL-6 (b) concentration depending on the VBC concentrations (C1, C2, and C3) used for treatment of LPS-stimulated BV2 cells. Experimental data for TNF- $\alpha$  and IL-6 are presented as concentration ( $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ) of pooled supernatants from a representative experiment of two independent experiments performed in quadruplicate.

such as NO, TNF- $\alpha$ , and IL-6 by LPS-stimulated BV2 microglia. In addition, VBC treatment reduced the neurotoxic effects of activated microglia and increased the metabolic activity of neurons, which imply a possible role of VBC in modulating microglial activation, thereby maintaining neuronal functioning. Further, the expression of specific markers was evaluated to examine whether the above mentioned anti-inflammatory effects of VBC are associated with changes in microglia phenotype profile. Recently, there has been a debate whether M1/M2 microglia distinction conceptual framework is too simplified, as microglia function is reflected as a complex, context-dependent dynamic expression of numerous markers [46]. However, microglia phenotype characterization can provide an additional explanation regarding the microglia activation state, as well as its impact on the regulation of inflammatory response. The obtained data demonstrated a potential role of VBC in upregulating the expression of IL-4 and CD163, which are described to exert anti-inflammatory properties [47,48]. These molecules are involved in the resolution of inflammation by regulating M1/M2 polarization toward M2 phenotype that may be in correlation with the anti-inflammatory effects of VBC expressed by a decrease in NO, ROS, TNF- $\alpha$ , and IL-6 levels in LPS-stimulated microglia. Additionally, anti-inflammatory effects of VBC treatment were also confirmed by downregulated expression of ILT-3 and Ly6c as proinflammatory molecules. ILT-3, also known as LILRB4, has shown to be an excellent marker of microglia activation processes, but it remained unclear what is the function of this molecule taking into account its different expression *in vivo* and in primary cell cultures [49]. Ly6c<sup>+</sup> monocytes were also demonstrated as a critical subset of inflammatory cells recruited to the CNS during inflammation [50,51]. Furthermore, the LPS stimulation of BV2 cells demonstrated a decrease in the expression of CD11c, while an increase was observed following the VBC treatment. Although not fully understood, several studies suggest that CD11c<sup>+</sup> microglia play an important role in neuroinflammatory processes in CNS [52,53]. It was observed that reduction in CD11c<sup>+</sup> microglia was associated with EAE progression in mice, suggesting a potential neuroprotective function of these cells, which needs to be further investigated [52]. Moreover, the expression of NRF2 protein has shown to be upregulated following the VBC treatment of LPS-stimulated BV2 cells. NRF2 is known to have a crucial role in the antioxidant response, thereby maintaining the redox homeostasis [54]. Recent studies indicated an important role of NRF-2 in resolution of oxidative stress and neuroinflammation in EAE and MS, as well as other neurodegenerative diseases characterized by chronic inflammation [30]. Thereby, NRF2 displays neuroprotective effects in a mouse model of Parkinson's disease [55], since NRF2 KO mice develop more severe neuronal damage upon oxidative stress. Therefore, upregulation of the NRF-2-mediated antioxidant response by VBC treatment may explain the observed lower production of proinflammatory mediators, especially ROS, upon VBC treatment. Overall, the results of *in vitro* analysis indicate a role of VBC treatment in modulating the phenotype of LPS-stimulated BV2 cells that is accompanied by reduced production of proinflammatory mediators.

To elucidate the potential of VBC to modulate/inhibit inflammatory TLR4 signalling pathway, molecular docking was performed. Activation of LPS/TLR4 signalling pathway is mediated by several proteins, including LBP, a soluble protein which directly binds LPS and transfers it to the CD14 co-receptor that further traffics LPS to the TLR4/MD2 receptor complex, expressed on the surface of microglial cells [56]. After TLR4/MD2 activation, the MyD88-dependent and the MyD88-independent pathways are induced, leading to the production of proinflammatory cytokines including IL-6, TNF- $\alpha$ , and NO [57]. In addition, the ability of VBC to directly inhibit iNOS was also examined. As iNOS represents the major enzyme for the production of proinflammatory NO molecule, its suppression may lead to a reduction/attenuation of inflammation processes [57]. It is well known that excessive TLR4 pathway activation is closely associated with the progression of several neurodegenerative disorders including Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis

(ALS), as well as MS [58]. Hence, targeting proteins that mediate TLR4 signalling pathway can serve as a possible therapeutic strategy for reducing neuroinflammation. In the present study, after the comprehensive docking investigation of each VBC component toward TLR4 signalling pathway proteins, it was observed that vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>12</sub> expressed the highest docking capacity for investigated proteins, in relation to the other investigated B vitamins from the VBC. Specifically, vitamin B<sub>12</sub> has shown a remarkable binding affinity for CD14 receptor, which makes it a potential candidate for inhibition of LPS transport and prevention of subsequent TLR4 activation. Although no significant docking capacities of vitamins were observed for key residues of C-terminal domain of CD14 protein, the molecular docking simulations showed that vitamin B<sub>12</sub> accommodates in N-terminal region of CD14 through number of interactions with key residues that serve as the binding site for LPS (Fig. 6). The highly complex structure of vitamin B<sub>12</sub>, consisting of a corrin ring and cobalt as a central metal ion, enables the formation of plenty of interactions which are involved in stabilization of this vitamin inside the pocket. Several studies indicated that targeting CD14 protein, as well as other proteins within the TLR4 signalling cascade may provide a new therapeutic perspective for reducing neuroinflammation processes [57,59]. Moreover, vitamin B<sub>12</sub> also exhibited a good binding affinity for TLR4/MD2 protein. These interactions mainly included consistent conventional hydrogen bonds, as well as numerous hydrophobic interactions within the active site of protein (Fig. 6b) making it a good agent for preventing inflammatory cascade pathways. It has to be noted that generally the lower binding affinity of the B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, and B<sub>6</sub> toward TLR4 signalling proteins cannot be fully neglected since the ligand-protein interaction is a dynamic process. These competitive binding between VBC components and LPS with TLR4 signalling proteins have been investigated in the final part of this investigation – dynamical modeling.

Furthermore, vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> demonstrated a good capacity of binding to all investigated proteins, although the best docking scores were observed for iNOS protein (Fig. 7). Both vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> demonstrated a high rate of binding to the key residues of the iNOS active site, through interactions with Glu371, Tyr367, and Trp366. Both vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> contain bicyclic and tricyclic heterocycles in their structures, which probably allow more interactions with protein active site. As increased level of NO is associated with the progression of neurodegenerative diseases, targeting iNOS protein also represents a promising therapeutic approach [60]. In addition, good binding affinities toward LBP were observed for vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>5</sub> (for both N- and C-terminal domain), although these energies were generally lower when compared with data of other investigated proteins.

Although molecular docking data cannot predict whether the compound exhibit agonistic or antagonistic activity, a possible anti-inflammatory effect of VBC was confirmed in this study by *in vitro* assays. As expected, structurally diverse vitamins demonstrated diverse binding affinities for different TLR4 pathway proteins which may suggest a potential synergistic effect of selected compounds which needs to be deeply investigated. Thus, the final aim of this investigation was the construction of dynamical model which could describe the inhibitory potential of VBC toward TLR4 signalling pathway proteins activated by LPS. Since the model has been successfully constructed and calculated data exhibited an excellent agreement with experimental data (Fig. 8), a deeper insight into the involvement of each VBC component on the VBC inhibitory potential can be provided. Moreover, it can be suggested that proposed model can be additionally used for optimization of novel VBC formulations as well as investigation of inhibitory potential of new putative inhibitors.

As inflammation is the main underlying process characteristic for different neurodegenerative diseases, identification of novel compounds that are good candidates for downregulation of inflammatory pathways and subsequent production of proinflammatory mediators is of great importance. In accordance with all presented results in this study, we can conclude that VBC expresses prominent neuroprotective properties

and its therapeutic potential is promising. Most importantly, the obtained data emphasize the significance of mutual effects of B vitamins and their possible implementation as an adjuvant therapy for diverse neuroinflammatory conditions in humans, which requires further clinical investigation.

## 5. Conclusion

VBC treatment has shown significant potential in increasing metabolic activity of microglia, as well as in reducing the ROS, NO, and proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) production by LPS-stimulated microglia. In addition, VBC treatment reduced the neurotoxic effects of activated microglia and increased the metabolic activity of neurons. As demonstrated by molecular docking, different B vitamins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, and B<sub>12</sub>) have the potential to inhibit proteins within the LPS-induced BV2 inflammatory pathways, mediated by LBP, CD14, TLR4/MD2, as well as iNOS as a significant marker of microglial activation. Moreover, the dynamical model which simulates the inhibitory effects of VBC to TLR4 signalling pathway proteins activated by LPS has been constructed and excellent agreement with experimental data has been observed. Altogether, obtained data provide deeper insight into the involvement of the inhibitory potential of each VBC component toward TLR4 signalling pathway, and enable optimization of novel VBC combinations/formulations as well as the inhibitory potential of new putative inhibitors. Based on the results of *in vitro* and *in silico* analyses, it can be concluded that B vitamins can exhibit a prominent synergistic effect and have the potential to be used as an additional therapy in reducing neuroinflammation and subsequent neurodegeneration.

## Funding

This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Contract number: 451–03-68/2022–14/200178 and 451–03-68/2022–14/200019).

Availability of data and material.

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its [supplementary materials](#). Additional data is available on request.

## CRediT authorship contribution statement

**Marija Rakić:** Investigation, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Tanja Lunić:** Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing, Visualization. **Marina Bekić:** Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing, Visualization. **Sergej Tomić:** Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition. **Katarina Mitić:** Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing, Visualization. **Stefan Graovac:** Investigation, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Bojan Božić:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision. **Biljana Božić Nedeljković:** Conceptualization, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

Graphical abstract was made using resources from [www.flaticon.com](http://www.flaticon.com), designed by: Freepik; Nadiinko; Eucalyp; Pixel Perfect; Creative Stall Premium; Bharat Icons; Creatype; Exomoon design studio; Jesus Chavarria; IconsNova.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110525>.

## References

- [1] M. Lyman, D.G. Lloyd, X. Ji, M.P. Vizcaychipi, D. Ma, Neuroinflammation: the role and consequences, *Neurosci. Res.* 79 (2014) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>.
- [2] M. Schwartz, A. Deczkowska, Neurological disease as a failure of brain-immune crosstalk: the multiple faces of neuroinflammation, *Trends Immunol.* 37 (10) (2016) 668–679, <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.001>.
- [3] J. Yin, K.L. Valin, M.L. Dixon, J.W. Leavenworth, The role of microglia and macrophages in CNS homeostasis, autoimmunity, and cancer, *J. Immunol. Res.* (2017), <https://doi.org/10.1155/2017/5150678>.
- [4] K. Rezaei-Zadeh, D. Gate, T. Town, CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4 (2009) 462–475, <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9166-2>.
- [5] C.S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, B. Gran, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), *Br. J. Pharmacol.* 164 (4) (2011) 1079–1106, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>.
- [6] M.J. Plastini, H.L. Desu, R. Brambilla, Dynamic responses of microglia in animal models of multiple sclerosis, *Front. Cell. Neurosci.* 14 (2020) 269, <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00269>.
- [7] A.F. Lloyd, V.E. Miron, The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system, *Nat. Rev. Neurol.* 15 (8) (2019) 447–458, <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2>.
- [8] M. Mandić, K. Mitić, P. Nedeljković, M. Perić, B. Božić, T. Lunić, A. Bačić, M. Rajilić-Stojanović, S. Peković, B. Božić Nedeljković, Vitamin B complex and experimental autoimmune Encephalomyelitis-Attenuation of the clinical signs and gut microbiota dysbiosis, *Nutrients* 14 (6) (2022) 1273, <https://doi.org/10.3390/nu14061273>.
- [9] D.O. Kennedy, B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review, *Nutrients* 8 (2) (2016) 68, <https://doi.org/10.3390/nu8020068>.
- [10] C.A. Calderón-Ospina, M.O. Nava-Mesa, B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin, *CNS Neurosci. Ther.* 26 (1) (2020) 5–13, <https://doi.org/10.1111/cns.13207>.
- [11] K. Mikkelsen, L. Stojanovska, K. Tangalakis, M. Bosevski, V. Apostolopoulos, Cognitive decline: a vitamin B perspective, *Maturitas* 93 (2016) 108–113, <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.08.001>.
- [12] T. Mosdam, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [13] E. Pick, J. Charon, D. Mizel, A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages, *J. Reticuloendothel. Soc.* 30 (6) (1981) 581–593.
- [14] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1) (1982) 131–138, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- [15] A. Pišlar, B. Božić, N. Zidar, J. Kos, Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation, *Neuropharmacology* 114 (2017) 88–100, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.019>.
- [16] P.W. Rose, A. Prlić, A. Altunkaya, C. Bi, A.R. Bradley, C.H. Christie, L.D. Costanzo, J.M. Duarte, S. Dutta, Z. Feng, The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information, *Nucleic Acids Res.* (2016) gkw1000, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1000>.
- [17] D.S. Biovia, *Discovery Studio, version 21.1.0*, Dassault Systèmes, San Diego, 2021.
- [18] B. Webb, A. Sali, Comparative protein structure modeling using MODELLER, *Curr. Protoc. Bioinformatics* 54 (1) (2016) 5–6, <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- [19] R. Huey, G.M. Morris, *Using AutoDock 4 with AutoDocktools: a tutorial*, The Scripps Research Institute, USA 54 (2008) 56.
- [20] S. Kim P.A. Thiessen E.E. Bolton J. Chen G. Fu A. Gindulyte L. Han J. He S. He Shoemaker BAJNar, PubChem substance and compound databases *Nucleic Acids Res.* 44 2016 D1202 D13 10.1093/nar/gkv951.
- [21] D. Marcus D.E.C. Hanwell D.C. Lonie T. Vandermeersch E. Zurek G.R. Hutchison Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform *J. Cheminformatics* 4 17 2012 2946 2944 10.1186/1758-2946-4-17.
- [22] K. Sneppen, Protein folding Kim Sneppen & Giovanni Zocchi, *Physics in Molecular Biology*, (2005), p. 95.
- [23] S. Akashi, S.-I. Saitoh, Y. Wakabayashi, T. Kikuchi, N. Takamura, Y. Nagai, Y. Kusumoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Adachi, Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or



- CD14, *J. Exp. Med.* 198 (7) (2003) 1035–1042, <https://doi.org/10.1084/jem.20031076>.
- [24] A. Basauri, C. González-Fernández, M. Fallanza, E. Bringas, R. Fernandez-Lopez, L. Giner, G. Moncalián, F. de la Cruz, I. Ortiz, Biochemical interactions between LPS and LPS-binding molecules, *Crit. Rev. Biotechnol.* 40 (3) (2020) 292–305, <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709797>.
- [25] H.J. Shin, H. Lee, J.D. Park, H.C. Hyun, H.O. Sohn, D.W. Lee, Y.S. Kim, Kinetics of binding of LPS to recombinant CD14, TLR4, and MD-2 proteins, *Mol. Cells (Springer Sci. Business Media BV)* 24 (1) (2007).
- [26] C.J. Thomas, M. Kapoor, S. Sharma, H. Bausinger, U. Zyilan, D. Lipsker, D. Hanau, A. Surolija, Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response, *FEBS letters* 531 (2) (2002) 184–188, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03499-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03499-3).
- [27] P.S. Tobias, K. Soldau, J.A. Gegner, D. Mintz, R.J. Ulevitch, Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14, *J. Biol. Chem.* 270 (18) (1995) 10482–10488, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10482>.
- [28] S. Viriyakosol, J.C. Mathison, P.S. Tobias, T.N. Kirkland, Structure-function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.* 275 (5) (2000) 3144–3149, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3144>.
- [29] T. Röszer, Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms, *Mediat. Inflamm.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/816460>.
- [30] D. Johnson, J. Johnson, 's Accepted manuscript author's accepted manuscript, *Free Radic. Biol. Med.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.147>.
- [31] J.K. Eckert, Y.J. Kim, J.I. Kim, K. Gürtler, D.-Y. Oh, S. Sur, L. Lundvall, L. Hamann, A. van der Ploeg, P. Pickkers, The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity, *Immunity* 39 (4) (2013) 647–660, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.005>.
- [32] J.-K. Ryu, S.J. Kim, S.-H. Rah, J.I. Kang, H.E. Jung, D. Lee, H.K. Lee, J.-O. Lee, B. S. Park, T.-Y. Yoon, Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer, *Immunity* 46 (1) (2017) 38–50, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.007>.
- [33] S.L. Kelley, T. Lukk, S.K. Nair, R.I. Tapping, The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket, *J. Immunol.* 190 (3) (2013) 1304–1311, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202446>.
- [34] C. Ekdahl, Z. Kokaia, O. Lindvall, Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia, *Neurosci.* 158 (3) (2009) 1021–1029, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.052>.
- [35] S. Guo, H. Wang, Y. Yin, Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases, *Front. Aging Neurosci.* 14 (2022) 75, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>.
- [36] S. De Schepper, G. Crowley, S. Hong, Understanding microglial diversity and implications for neuronal function in health and disease, *Dev. Neurobiol.* 81 (5) (2021) 507–523, <https://doi.org/10.1002/dneu.22777>.
- [37] B. Pósai, C. Cserép, B. Orsolits, Á. Dénes, New insights into microglia–neuron interactions: a neuron's perspective, *Neurosci.* 405 (2019) 103–117, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.046>.
- [38] M.A. Erickson, K. Dohi, W.A. Banks, Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier, *Neuroimmunomodulation* 19 (2) (2012) 121–130, <https://doi.org/10.1159/000330247>.
- [39] E. Nutma, D. van Gent, S. Amor, L.A. Peferoen, Astrocyte and oligodendrocyte cross-talk in the central nervous system, *Cells* 9 (3) (2020) 600, <https://doi.org/10.3390/cells9030600>.
- [40] M. Lehmann, B. Regland, K. Blennow, C. Gottfries, Vitamin B12–B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 16 (3) (2003) 145–150, <https://doi.org/10.1159/000071002>.
- [41] F.G. Mastronardi, W. Min, H. Wang, S. Winer, M. Dosch, J.M. Boggs, M. A. Moscarello, Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN- $\beta$  plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance, *J. Immunol.* 172 (10) (2004) 6418–6426, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6418>.
- [42] K. Mikkelsen, L. Stojanovska, M. Prakash, V. Apostolopoulos, The effects of vitamin B on the immune/cytokine network and their involvement in depression, *Maturitas* 96 (2017) 58–71, <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.11.012>.
- [43] C.M. Bertollo, A.C.P. Oliveira, L.T.S. Rocha, K.A. Costa, E.B. Nascimento Jr, M. M. Coelho, Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models, *Eur. J. Pharmacol.* 547 (1–3) (2006) 184–191, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.045>.
- [44] I. Jurna, K.-H. Carlsson, W. Kömen, D. Bonke, Acute effects of vitamin B 6 and fixed combinations of vitamin B 1, B 6, B 12 on nociceptive activity evoked in the rat thalamus: Dose-response relationship and combinations with morphine and paracetamol, *Klein. Wochenschr.* 68 (1990) 129–135, <https://doi.org/10.1007/BF01646861>.
- [45] I. Bozic, D. Savic, D. Laketa, I. Bjelobaba, I. Milenkovic, S. Pekovic, N. Nedeljkovic, I. Lavrnja, Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia, *PLoS One* 10 (2) (2015) e0118372.
- [46] R.M. Ransohoff, A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.* 19 (8) (2016) 987–991, <https://doi.org/10.1038/nn.4338>.
- [47] Y. He, Y. Gao, Q. Zhang, G. Zhou, F. Cao, S. Yao, IL-4 switches microglia/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neurological damage by modulating the JAK1/STAT6 pathway following ICH, *Neurosci.* 437 (2020) 161–171, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.008>.
- [48] L.K. Weaver, P.A. Pioli, K. Wardwell, S.N. Vogel, P.M. Guyre, Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors, *J. Leukoc. Biol.* 81 (3) (2007) 663–671, <https://doi.org/10.1189/jlb.0706428>.
- [49] F. Kretzschmar, R. Piecha, J. Jahn, P.S. Potru, B. Spittau, Characterization of the Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor B4 (Lilrb4) expression in Microglia, *Biology* 10 (12) (2021) 1300, <https://doi.org/10.3390/biology10121300>.
- [50] M. Greter, I. Lelios, A.L. Croxford, Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation, *Front. Immunol.* 6 (2015) 249, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00249>.
- [51] M. Greter, M. Merad, Regulation of microglia development and homeostasis, *Glia* 61 (1) (2013) 121–127, <https://doi.org/10.1002/glia.22408>.
- [52] H.-G. Fischer, G. Reichmann, Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation, *J. Immunol.* 166 (4) (2001) 2717–2726, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2717>.
- [53] F. Mayrhofer, Z. Dariychuk, A. Zhen, D.J. Daugherty, P. Bannerman, A.M. Hanson, D. Pleasure, A. Soulika, W. Deng, O.V. Chechneva, Reduction in CD11c+ microglia correlates with clinical progression in chronic experimental autoimmune demyelination, *Neurobiol. Dis.* 161 (2021), 105556, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105556>.
- [54] N.G. Innamorato, A.I. Rojo, A.n.J. García-Yagüe, M. Yamamoto, M.L. De Ceballos, A. Cuadrado, The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation, *J. Immunol.* 181(1) (2008), p.p. 680–689. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.680>.
- [55] A.I. Rojo, N.G. Innamorato, A.M. Martín-Moreno, M.L. De Ceballos, M. Yamamoto, A. Cuadrado, Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease, *Glia* 58 (5) (2010) 588–598, <https://doi.org/10.1002/glia.20947>.
- [56] Y. Lu, Ye h WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway, *Cytokine*, 42(2) (2008), p.p. 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- [57] M. Rahimifard, F. Maqbool, S. Moeini-Nodeh, K. Niaz, M. Abdollahi, N. Braidy, S. M. Nabavi, S.F. Nabavi, Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation, *Ageing Res. Rev.* 36 (2017) 11–19, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.02.004>.
- [58] T. Trotta, C. Porro, R. Calvello, M.A. Panaro, Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain, *J. Neuroimmunol.* 268 (1–2) (2014) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.01.014>.
- [59] G.R. Leitner, T.J. Wenzel, N. Marshall, E.J. Gates, A. Klegeris, Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders, *Expert Opin. Ther. Targets* 23 (10) (2019) 865–882, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1676416>.
- [60] L. Hannibal, Nitric oxide homeostasis in neurodegenerative diseases, *Curr. Alzheimer Res.* 13 (2) (2016) 135–149.