

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET



Natalija R. Jonić

**EFEKAT MODULACIJE
ARIL-UGLJOVODONIČNOG RECEPTORA NA
IMUNSKI ODGOVOR U LIMFOIDNIM
TKIVIMA POVEZANIM SA
GASTROINTESTINALNIM TRAKTOM U
MIŠJEM MODELU
DIJABETESA TIP 1**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY



Natalija R. Jonić

**THE EFFECTS OF MODULATING THE
ARYL HYDROCARBON RECEPTOR ON THE
IMMUNE RESPONSE IN GUT-ASSOCIATED
LYMPHOID TISSUE IN A MOUSE MODEL OF
DIABETES TYPE 1**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026.

MENTORI:

dr Ivan Koprivica, viši naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dragica Mićanović, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Sergej Tomić, naučni savetnik

Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

dr Marija Rakić, naučni saradnik

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta 451-03-66/2024-03/200007 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i uz pomoć Fondacije Lilić-Abinun za unapređenje kliničke imunologije u Srbiji.

Zahvaljujem se

dr Ivanu Koprivici, za strpljenje, sva ohrabivanja i prijateljstvo, što me je vraćao na put nevezano koliko puta i koliko daleko bih odlutala, i što me je uvek obasipao empatijom. Mislim da nikad ne bih ovoliko sazrela kao naučnik i osoba da nije bilo njegovog uticaja i podrške.

dr Biljani Božić Nedeljković, za podršku koju mi je pružila tokom svih ovih godina, za svaku sugestiju i svaki razgovor tokom studija i van njih, i što mi je dala zdrave temelje koji su mi pomogli da dalje gradim svoju ličnost u jednom pozitivnom svetlu.

dr Dragici Mićanović, za svu podršku koju mi je pružila od početka doktorskih studija, za svaki prijateljski razgovor, za sve savete i smernice koje mi je davala tokom eksperimentalnog rada i pisanja doktorske disertacije.

dr Sergeju Tomiću, za svaku sugestiju i korekciju i što je doprineo usavršavanju mojeg razumevanja imunologije.

dr Mariji Rakić na vremenu i sugestijama koje su doprinele unapređenju kvaliteta doktorske disertacije.

dr Ivani Stojanović, što je prepoznala moj entuzijazam za imunologiju i pružila priliku da postignem i više od onoga što sam mislila da mogu, što me je podržavala na svakom koraku mog puta i podizala kad god bih se saplela. Hvala joj što mi je pokazala da je nebo granica i da nikad ne odustajem. Ako bih morala da navedem jednu osobu koja mi je uzor kakav naučnik i osoba želim da postanem, to bi bila ona.

dr Đorđu Miljkoviću, što mi je otvorio vrata instituta i omogućio da postanem deo Odeljenja za imunologiju, što je savetima i razgovorom doprineo mom boljem razumevanju naučnog principa i što me je naučio da uvek treba biti dosledan u životu, kakva god da je okolnost.

dr Nataši Radulović, za svaki savet, srdačan razgovor i topao zagrljaj, i za svu podršku koju mi je pružila tokom pisanja ove doktorske disertacije.

dr Mirjani Dimitrijević, za svaki zanimljiv razgovor, što mi je statistički značajno pomogla pri analizi rezultata i što mi je savetima olakšala pisanje doktorske disertacije.

Tamari, Bokiju i Nedi, za svaku razbibrigu i razgovor, što su me podučili pravilnom radu u laboratoriji koji mi je omogućio da dobijem kvalitetne rezultate dostojne doktorata, što su mi pružili pažnju, podršku i osećaj prihvaćenosti u našem kolektivu od prvog dana.

Milji, Suzi, Goranu, Milici, Ivanu, Maši i Zorani, za stvaranje opuštene i razdragane atmosfere u kancelariji i laboratoriji, za sve šaljive trenutke i razgovore kojim su ulepšavali svakodnevicu.

Svim koleginicama (i kolegama) iz grupe za onkoimunologiju (naročito mojim Portopaćenicima ♥), na svim zabavnim trenucima, ohrabrenjima i međusobnom podržavanju, kako na institutu, tako i na putu! :)

Svim saradnicima sa Odeljenja za ekologiju, na ukazanoj kolegijalnosti i prijatnoj atmosferi u labu 66 i labu 58. Miki, tebi posebno hvala na svakom razgovoru, kafi, udruživanju snaga i zagrljaju koji smo razmenile tokom ovih godina ♥.

Goranu Đmuri, za svaku šalu, ohrabrenje, vreme i strpljenje koje mi je pružio od samog početka. Hvala na podržavanju i integrisanju jednog humanog i empatičnog pristupa u radu sa životinjama. Ne bih nikad postala šefčina, da mi uzor nije bila ljudina kao što je Đmura.

Tati i mami, što su uvek verovali u mene, što su me pridizali svaki put kad bih poklekla i što su uvek bili tu za mene i podržavali me na svaki mogući način sve ove godine.

Mojoj sekani Irini, što me je uvek štitila od drugih i od mene same, što je sa mnom delila svaki stres i radost, i što bi me uvek oraspoložila kada bismo pričale na našem osmišljenom sestričkom jeziku, koji samo nas dve razumemo.

Mom Duletu što mi je kontinuirano pružao razumevanje i ljubav kakvoj sam mogla samo da se nadam, i što me je stalno podsećao koliko vredim. Zahvaljujući tebi, izrada doktorske disertacije je postala podnošljivija, a moj život lakši i lepši.

Mojim prijateljima, naročito Džoniju, Neni i Nikiti, za sve godine prijateljstva i podrške, razonode i osmeha. Drago mi je da ste uvek bili tu da saslušate moje muke i pružite mi rame za plakanje, i da me posavetujete, ili ubedite da ništa nije nerešivo. Hvala vam što ste ostali uz mene.

Efekat modulacije aril-ugljovodoničnog receptora na imunski odgovor u limfoidnim tkivima povezanim sa gastrointestinalnim traktom u mišjem modelu dijabetesa tipa 1

Sažetak

Dijabetes tipa 1 (DT1) je hronična autoimunska bolest koju odlikuje uništavanje β ćelija pankreasa i snižen nivo insulina. Da bi se usporilo napredovanje DT1, uloženi su napori da se stimulišu regulatorne imunske ćelije i ublaži inflamacijski odgovor, ali i dalje ne postoji lek za DT1. Osim genetike, sredinski faktori su ključni u razvoju DT1, a njihov doprinos se često manifestuje u crevima. Aril-ugljovodonični receptor (AHR) je transkripcioni faktor koji se aktivira ligandom i koji ima visoku ekspresiju u mukoznim tkivima, čime je postao potencijalna meta za razvijanje novih terapijskih pristupa za modulaciju imunskog odgovora. U tom smislu, ova doktorska teza bila je posvećena proceni efekata novog jedinjenja koje sadrži indol – AGT-5, dizajniranog da modulira AHR aktivnost, time utičući na imunski sistem creva i progresiju DT1. Nakon potvrđivanja da AGT-5 stimuliše AHR aktivnost u imunskim ćelijama miša i reguliše regulatorne T ćelije (Treg ćelije) i njihove antiinflamacijske markere *in vitro*, AGT-5 je oralno davan C57BL/6 miševima kojima je DT1 indukovao višestrukim malim dozama streptozotocina. Tretman je efikasno očuvao proizvodnju insulina, smanjio uništavanje β ćelija i zaustavio progresiju DT1. AGT-5 je ostvario ove efekte putem stimulacije tolerogenih dendritskih ćelija (tolDC) i Treg ćelija duž ose crevo-pankreasni limfni čvorovi-pankreas. Tretman sa AGT-5 je uticao i na urođeni imunski sistem creva – povećao je zastupljenost IL-22- i IL-2-produkujućih urođenih limfoidnih ćelija tipa 3 (ILC3), čime se podržava stanje crevne barijere i tolerogeno okruženje u crevima. AGT-5 je dodatno testiran *in vitro* na ljudskim ćelijama poreklom iz tonzila, gde je na sličan način uvećavao prisustvo supresivnih dendritskih ćelija, Treg ćelija i ILC3. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je AGT-5 moćan AHR modulator, čijom primenom se postižu antiinflamacijski efekti u crevima i pankreasu. Njegova sposobnost da modulira i mišji i ljudski AHR čini ga kandidatom za dalje prekliničke studije u različitim autoimunskim i inflamacijskim bolestima.

Ključne reči: dijabetes tipa 1, aril-ugljovodonični receptor, streptozotocin, regulatorne T ćelije, tolerogene dendritske ćelije, urođene limfoidne ćelije, creva, lamina proprija, pankreas

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

The effects of modulating the aryl hydrocarbon receptor on the immune response in gut-associated lymphoid tissue in a mouse model of diabetes type 1

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic condition characterized by autoimmune destruction of pancreatic β cells and lowered insulin levels. In order to slow down the progression of T1D, efforts have been made to stimulate regulatory immune cells and dampen the inflammatory response, but T1D is still without a cure. Apart from genetics, environmental factors are crucial in the development of T1D, and their contribution was often found to occur in the gut. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor highly expressed in mucosal tissues. AHR was shown to have immunoregulatory effects, thus becoming a potential therapeutic target for modulating immune responses. In that sense, this doctoral thesis was devoted to evaluating the effects of a novel indole-containing compound – AGT-5, designed to modulate AHR activity, on the gut immune system and progression of T1D. After confirming that AGT-5 stimulates AHR activity in mouse immune cells and upregulates regulatory T cells (Treg cells) and their anti-inflammatory markers *in vitro*, AGT-5 was orally administered to C57BL/6 mice with T1D induced by multiple low doses of streptozotocin. The treatment effectively preserved insulin production, lowered β cell destruction and halted T1D progression. AGT-5 achieved this by promoting tolerogenic dendritic cells (tolDC) and Treg activity along the gut-pancreatic lymph node-pancreas axis. AGT-5 treatment also affected the innate branch of the gut immune system – it upregulated the proportions of IL-22⁺ and IL-2⁺ innate lymphoid cells type 3 (ILC3), thus promoting the wellbeing of the gut barrier and a tolerogenic environment. AGT-5 was additionally tested on human tonsil cells *in vitro*, where it similarly potentiated the presence of suppressive dendritic cells, Treg cells and ILC3. The results of this doctoral thesis demonstrate AGT-5 to be a potent AHR modulator, able to enact anti-inflammatory effects both in the gut and in the pancreas. It's ability to modulate both murine and human AHR makes it a promising candidate for further preclinical studies in various autoimmune and inflammatory diseases.

Key words: type 1 diabetes, aryl hydrocarbon receptor, streptozotocin, regulatory T cells, tolerogenic dendritic cells, innate lymphoid cells, gut, lamina propria, pancreas

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunobiology

Lista skraćenica:

1MT – 1-metil triptofana

AHR – aril-ugljovodonični receptor (engl. Aryl Hydrocarbon Receptor)

AMP – adenzin monofosfat

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

ATP – adenzin trifosfat

BMI – indeks telesne mase (engl. Body Mass Index)

BP – benzo(a)piren

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

Caco2 – ćelijska linija humanih epitelnih ćelija raka debelog creva

CFSE – karboksifluorescein sukcinimidil estar

CTLA-4 – citotoksični T-limfocitni antigen 4 (engl. Cytotoxic T-limphocyte antigen)

CYP – citohrom P450

DĆ – dendritske ćelije

DMSO – dimetil sulfoksid

DT1 – dijabetes tipa 1

ELISA – engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FACS – engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting

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

FICZ – 6-formilindol[2-b]karbazol

FoxP3 – engl. Forkhead box P3

GAD –dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. Glutamic Acid Decarboxylase)

GALT – limfoidna tkiva povezana sa gastrointestinalnim traktom (engl. Gut-associated Lymphoid Tissue)

GLUT-2 – transporter glukoze 2 (engl. Glucose Transporter 2)

GM-CSF – faktor stimulacije rasta granulocita i monocita (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HBSS – engl. Hanks's Balanced Salt Solution

HLA – humani leukocitni antigeni (engl. Human Leukocyte Antigens)

I3S – indoksil-3 sulfat

IDO1 – indolamin 2,3-dioksigenaza

IFN – interferon

ITE – 2-(1'H-indol-3'-karbonil)-tiazol-4-metil estar karboksilne kiseline

IL – interleukin

ILC – urođene limfoidne ćelije (engl. Innate Lymphoid Cells)

ILT3 – engl. Immunoglobulin-like transcript 3

LPS – engl. Lipopolysaccharide

MAPK – engl. Mitogen-activated Protein Kinase

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

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

NF- κ B – nuklearni faktor κ B

NK – urođenoubilačke ćelije (engl. Natural Killer Cells)

NOD – engl. Non-obese diabetic

OGTT – oralni test opterećenja glukozom (engl. Oral Glucose Tolerance Test)

PBS – engl. Phosphate Buffered Saline

PD-1 – inhibitorni receptor programirane ćelijske smrti 1 (engl. Programmed cell death protein 1)

PD-L1 – inhibitorni ligand programirane ćelijske smrti 1 (engl. Programmed death-ligand 1)

ROR γ T – engl. RAR-related Orphan Receptor γ T

ROS – reaktivne vrste kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species)

RPMI – engl. Roswell Park Memorial Institute

RT – sobna temperatura (engl. Room temperature)

RT-qPCR – kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction)

SCFA – zasićene kiseline kratkih lanaca (engl. Short-chain fatty acids)

STAT – engl. Signal Transducer and Activator of Transcription

STZ – streptozotocin

T-bet – engl. T-box transcription factor TBX21

TCDD – tetrahlorodibenzo-p-dioksin

TGF- β – transformišući faktor rasta β (engl. Transforming growth factor β)

THP-1 – humana ćelijska linija izvedena iz perifernih mononuklearnih ćelija krvi

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

tolDĀ – tolerogene dendritske ćelije

Treg ćelije – regulatorne T ćelije

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Dijabetes tipa 1.....	2
1.2 Etiologija.....	3
1.3 Genetički faktori u dijabetesu tipa 1	4
1.4 Sredinski faktori u dijabetesu tipa 1.....	5
1.5 Eksperimentalni životinjski modeli dijabetesa tipa 1	5
1.6 Imunopatogeneza dijabetesa tipa 1	7
1.7 Uloga ćelija urođenog imuniteta u patogenezi dijabetesa tipa 1.....	7
1.8 Uloga ćelija adaptivnog imuniteta u patogenezi dijabetesa tipa 1	8
1.9 Terapijski pristupi u dijabetesu tipa 1	10
1.10 Značaj imunskog sistema creva u patogenezi dijabetesa tipa 1	11
1.11 Aril-ugljovodonični receptor.....	12
2. Ciljevi.....	16
3. Materijal i metode	19
3.1 Rastvori i reagensi.....	20
3.2 Eksperimentalne životinje i humani uzorci.....	21
3.2.1 Tretman miševa AHR modulatorom AGT-5	21
3.2.2 Indukcija dijabetesa tipa 1.....	22
3.3 Brojanje ćelija metodom bojenja tripan plavim.....	22
3.4 Izolacija ćelija iz koštane srži miša.....	22
3.5 Diferencijacija dendritskih ćelija <i>in vitro</i>	23
3.6 Izolacija ćelija peritonealne šupljine.....	23
3.7 Izolacija mononuklearnih infiltrata pankreasa.....	23
3.8 Izolacija ćelija mezenteričnih i pankreasnih limfnih čvorova	24
3.9 Izolacija ćelija lamine proprije tankog creva	24
3.10 Izolacija ćelija humanih tonzila	25
3.11 Izolacija CD4 ⁺ T limfocita.....	25
3.11.1 Selekcija CD4 ⁺ T limfocita magnetnom separacijom	25
3.11.2 Sortiranje CD4 ⁺ T limfocita protočnom citofluorimetrijom	25
3.12 Određivanje vijabilnosti ćelija MTT metodom.....	26
3.13 Analiza protočnom citofluorimetrijom	26
3.13.1 Detekcija površinskih ćelijskih markera	26

3.13.2 Detekcija unutarćelijskih citokina i unutarjedarnih proteina	29
3.14 Test proliferacije	30
3.15 Izolovanje RNK	30
3.16 Reakcija reverzne transkripcije	31
3.17 Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu	31
3.18 Western blot	32
3.18.1 Izolovanje proteina iz periotnealnih makrofaga	32
3.18.2 Izolovanje proteina iz CD4 ⁺ T limfocita	32
3.18.3 Utvrđivanje koncentracije proteina pomoću Lowry metode	33
3.18.4 Elektroforeza i transfer proteina na membranu	33
3.18.5 Detekcija proteina	33
3.19 Primena metode ELISA	34
3.19.1 Merenje produkcije citokina metodom ELISA	34
3.19.2 Merenje prisustva insulina metodom ELISA	34
3.20 Histološka analiza	35
3.20.1 Priprema histoloških preparata u parafinu	35
3.20.2 Bojenje tkivnih isečaka hematoksilinom	35
3.20.3 Imunohistohemija	36
3.21 Analiza statističkih podataka	36
4. Rezultati	37
4.1 Ispitivanje efekata AGT-5 na vijabilnost, proliferaciju i diferencijaciju imunskih ćelija <i>in vitro</i>	38
4.1.1 Utvrđivanje sposobnosti AGT-5 da moduliše aktivnost AHR na mišjim makrofagima <i>in vitro</i>	38
4.1.2 Uticaj AGT-5 na vijabilnost makrofaga modulacijom aktivnosti AHR <i>in vitro</i>	39
4.1.3 Uticaj AGT-5 na diferencijaciju makrofaga modulacijom aktivnosti AHR <i>in vitro</i>	40
4.1.4 Uticaj AGT-5 na diferencijaciju T limfocita modulacijom AHR aktivnosti <i>in vitro</i>	41
4.1.5 Uticaj AGT-5 na proliferaciju i funkciju Treg ćelija modulacijom AHR aktivnosti <i>in vitro</i> ...	43
4.2 Uticaj AGT-5 tretmana na T limfocite u mezenteričnim limfnim čvorovima zdravih miševa <i>in vivo</i>	46
4.3 Ispitivanje uticaja <i>in vivo</i> tretmana AGT-5 na razvoj dijabetesa tipa 1	48
4.3.1 Uticaj AGT-5 na klinički tok dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa	48
4.3.2 Uticaj AGT-5 na morfologiju pankreasnih ostrvaca i funkciju β ćelija <i>in vivo</i>	49
4.4 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor dijabetičnih C57BL/6 miševa <i>in vivo</i>	52
4.4.1 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor u pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima <i>in vivo</i> ...	52

4.4.2 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor u lamini propriji tankog creva <i>in vivo</i>	58
4.4.2.1 Uticaj AGT-5 na antigen-prezentujuće ćelije u lamini propriji tankog creva <i>in vivo</i>	58
4.4.2.2 Uticaj tretmana AGT-5 na urođene limfoidne ćelije u lamini propriji tankog creva <i>in vivo</i>	61
4.4.2.3 Uticaj AGT-5 na ćelije adaptivne imunosti u lamini propriji tankog creva <i>in vivo</i>	63
4.4.3 Uticaj AGT-5 na funkciju tolerogenih dendritskih ćelija i Treg ćelija	65
4.5 Uticaj AGT-5 na humane imunске ćelije modulacijom AHR aktivnosti <i>in vitro</i>	70
4.5.1 Uticaj AGT-5 na humane DC i ILC3 <i>in vitro</i>	70
4.5.2 Uticaj AGT-5 na humane Treg ćelije <i>in vitro</i>	71
5. Diskusija	74
6. Zaključci	85
7. Literatura	88

1. Uvod

1.1 Dijabetes tipa 1

Dijabetes tipa 1 (DT1) je hronično autoimunska oboljenje kod kojeg dolazi do uništavanja insulin-produkujućih β ćelija pankreasa od strane autoreaktivnih imunskih ćelija, što posledično dovodi do deficijencije insulina (DiMeglio i sar., 2019). β ćelije su lokalizovane u strukturama poznatim kao Langerhansova ostrvca, i zajedno sa α ćelijama koje oslobađaju glukagon i δ ćelijama koje oslobađaju somatostatin vrše endokrinu funkciju pankreasa (Shahid i Singh, 2022). Autoimunski odgovor na antigene β ćelija pankreasa koji kulminira u njihovom uništavanju, se najpre manifestuje okruživanjem ostrvaca imunskim ćelijama (peri-insultis), a potom i pojavom infiltrata u okviru ostrvaca koja sadrže efektorske imunske ćelije (Pugliese, 2016).

Iako se prevashodno smatra da DT1 nastupa u juvenilnom periodu života, postoje i podaci o nezanemarljivom broju pacijenata kod kojih je DT1 nastupio u kasnijoj, adultoj fazi života (Atkinson i sar., 2014). Klinički tok ove bolesti je podeljen u tri faze (Slika 1), a kategorizacija se vrši na osnovu stepena oštećenja Langerhansovih ostrvaca odnosno β ćelija, kliničke slike, i na osnovu detektabilnosti različitih dijagnostičkih parametara u krvi pacijenata, kao što su prisustvo specifičnih autoantitela, koncentracija glukoze i koncentracija insulina (Speight i Pouwer, 2024).

Prva faza bolesti je asimptomatska – pacijenti su normoglikemični, ali im se u krvi mogu detektovati autoantitela specifična za dva ili više autoantigena β ćelija. Autoantitela koja se najčešće detektuju su antitela specifična za 65kDa subjedinicu dekarboksilaze glutaminske kiseline (engl. Glutamic Acid Decarboxylase, GAD65), insulin (IAA), izoformu 8 transportera za cink (ZnT8), antigen iz citoplazme ćelija ostrvaca (engl. Islet Cell Antibodies, ICA) i pankreasnu tirozin fosfatazu 2 (engl. Islet Antigen-2, IA-2). U tom periodu je tek započet imunski odgovor usmeren protiv β ćelija (Krischer i sar., 2021).

Druga faza DT1 je definisana pojavom disglukemije, odnosno hiperglikemičnih pikova koji se javljaju pri oralnom testu opterećenja glukozom (engl. Oral Glucose Tolerance Test, OGTT), a kvantifikuju se kao vrednosti koncentracije glukoze u krvi u opsegu 7,7 – 11,05 mmol/l (140-199 mg/dl) dva sata nakon unosa 75 g glukoze. Ova faza patogeneze DT1, pored humoralnog, uključuje i aktiviranje ćelijskog imunskog odgovora usmerenog protiv β ćelija pankreasa (Speight i Pouwer, 2024).

Treća faza DT1 je okarakterisana kao klinički stadijum bolesti – pacijenti tokom OGTT ispoljavaju hiperglikemiju koja se definiše kao koncentracija glukoze u krvi veća od 11,1 mmol/l (200 mg/dl). Uz hiperglikemiju se javljaju i propratni simptomi kao što su polidipsija, poliurija, polifagija, gubitak na težini, umor i opšta slabost, a ukoliko se stanje zapusti, nastupa dijabetična ketoacidoza (Speight i Pouwer, 2024). Tada u nedostatku insulina, usled nemogućnosti ćelija da koriste glukozu dolazi do oksidacije masnih kiselina i nastanka ketona. Vremenom krv postaje prezasićena ketonskim telima, dovodeći do zakišeljavanja krvi, što posledično dovodi do nastanka hipovolemije odnosno značajnog smanjenja vanćelijske tečnosti u telu. Ukoliko ovaj proces potraje dovoljno dugo, može dovesti do hipovolemičnog šoka i kome (Dalfrà i Burlina, 2023).

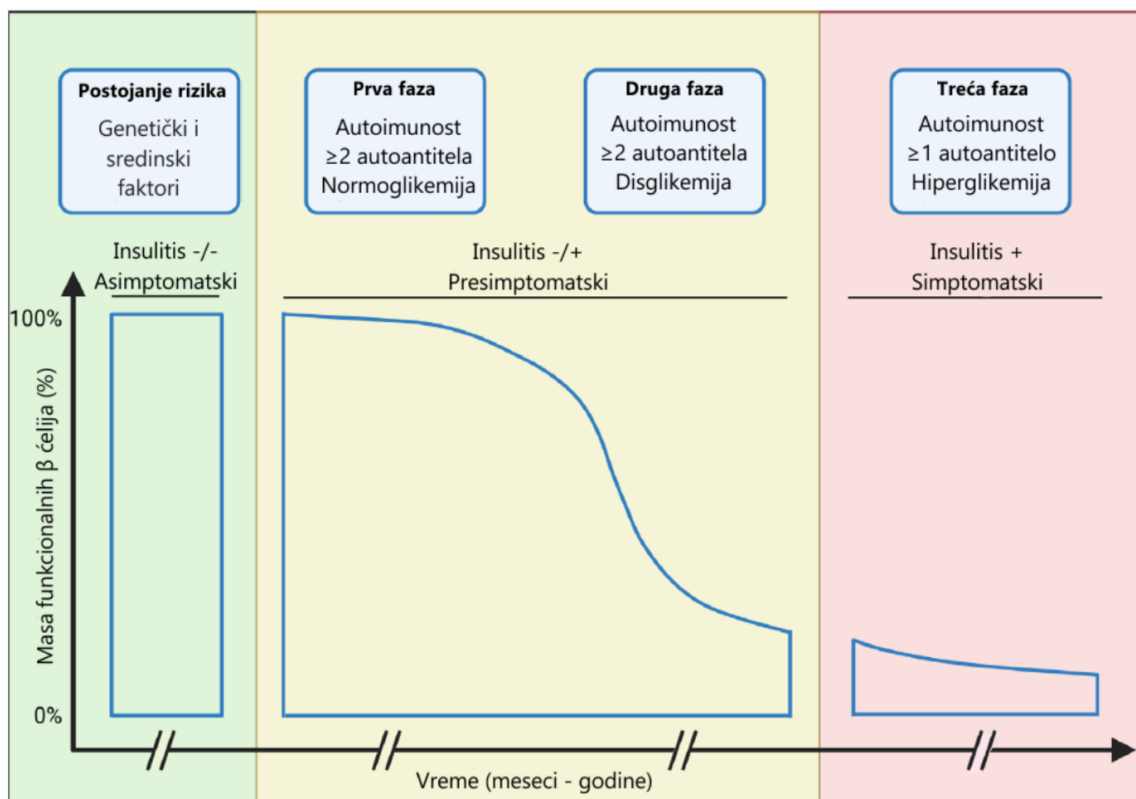
Trenutno se procenjuje da 9,5 miliona ljudi na svetu boluje od DT1, pri čemu 1,9 miliona obolelih ima manje od 20 godina, 6,5 miliona ima između 20 i 59 godina, dok osobe od 60 godina i starije čine 1,1 milion obolelih. U odnosu na podatke iz 2021. godine, kada je procenjeno da na svetu postoji 8,4

miliona ljudi koji boluju od DT1, samo četiri godine kasnije je zabeležen porast obolelih od čak 13% (Ogle i sar., 2025).

1.2 Etiologija

Trenutni konzensus je da se DT1 razvija kod osoba koje imaju genetičku predispoziciju nakon izlaganja nekom od sredinskih okidača koji mogu pokrenuti autoimunski odgovor. Iako i dalje nije poznat tačan mehanizam kojim dolazi do gubitka tolerancije i začetka autoimunskog odgovora usmerenog protiv antigena β ćelija pankreasa, genetička predispozicija predstavlja glavni uslov za nastanak DT1 (Mauvais i van Endert, 2025). Sa druge strane, genetički faktori ne mogu objasniti godišnji rast prevalencije obolelih za 0,34%, pa su brojna istraživanja usmerena ka izučavanju uticaja sredinskih faktora na imunopatogenezu DT1 (Ogrotis i sar., 2023).

Najčešće pominjane hipoteze o nastanku DT1 su hipoteza ubrzanja i higijenska hipoteza. Hipoteza ubrzanja se zasniva na pretpostavci da povećanje telesne mase može bitno uticati na nastanak DT1. Visok indeks telesne mase (engl. Body Mass Index, BMI) (Kibirige i sar., 2003) i hiperholesterolemija pokreću proinflamacijski T ćelijski odgovor (Zhou i sar., 1998), a dovode i do oksidativnog stresa i posledične apoptoze β ćelija pankreasa (Cnop i sar., 2002), čime bi se sticala



Slika 1. Shematski prikaz faza DT1. Preuzeto i prilagođeno iz Mauvais i Endert, 2025.

predispozicija za oboljevanje od DT1. Ipak, 91,6% dece kojoj se dijagnostifikuje DT1 su telesne težine u granicama normale (Wasył-Nawrot i sar., 2020). Sa druge strane, studija sprovedena u Finskoj je pokazala da se rizik za razvijanje DT1 udvostručava ukoliko su deca starija od tri godine gojazna (Hyppönen i sar., 2000).

Prema higijenskoj hipotezi pojava autoimunosti je utoliko manja koliko su infekcije uzrokovane različitim patogenima prisutnije u populaciji (Bach, 2018). Ovakva prepostavka se poklapa sa rasprostranjenošću i incidencom DT1 u svetu, ali se i dalje postavlja pitanje da li je incidenca DT1 niska u zemljama u razvoju zbog povećane izloženosti mikrobima ili usled većeg mortaliteta kao posledice brojnih infektivnih bolesti (Ogrotis i sar., 2023).

1.3 Genetički faktori u dijabetesu tipa 1

DT1 je klasifikovan kao poligeniska bolest – identifikovano je preko 60 različitih gena koji su povezani sa razvojem DT1 (Mauvais i van Endert, 2025). Statistički posmatrano, ukoliko je jedan od jednogajčanih blizanaca oboleo od DT1, rizik da drugi blizanac oboli iznosi 30-70%, dok je rizik da braća i sestre obole 6-7%. Ukoliko jedan od roditelja boluje od DT1, šansa da će deca imati DT1 iznosi 1-9% (Pociot i Lernmark, 2016).

Geni sa najvećim uticajem na naslednost ovog oboljenja su geni za glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) druge klase, koji se kod ljudi naziva kompleks humanih leukocitnih antigena (engl. Human Leukocyte Antigens, HLA) druge klase. Najveći rizik za razvoj DT1 je asociran sa prisustvom HLA DR4-DQ8 i HLA DR3-DQ2 haplotipova, pri čemu su zabeleženi kod 90% obolele dece (Speight i Pouwer, 2024). Polimorfizam HLA II gena čini 50% genetičkog rizika od razvijanja DT1 (Redondo i sar., 2018), jer HLA molekuli II klase imaju ključnu ulogu u prikazivanju antigena T ćelijama i indukciji tolerancije tokom sazrevanja T limfocita u timusu (Stadinski i sar., 2023).

Riziku mogu doprineti i mnogi geni van HLA lokusa – drugi gen po doprinosu riziku je gen za insulin, koji poseduje region sa varijabilnim brojem ponovaka. U zavisnosti od tipa polimorfizma u ovom regionu gena za insulin, ekspresija proinsulina odnosno transkripcija gena za (pro)insulin može varirati – u tom smislu, ukoliko su molekuli insulina prisutni u timusu u dovoljnoj meri, dolazi do negativne selekcije autoreaktivnih T limfocita koji su specifični za insulin i uspostavlja se tolerancija na isti (Pugliese i sar., 1997). Kod pacijenata sa DT1 mogu biti zabeležene abnormalnosti u post-transkripcionoj regulaciji gena za citotoksični T-limfocitni antigen 4 (engl. Cytotoxic T-lymphocyte antigen, CTLA-4), kao i prisustvo varijante gena za α subjedinicu receptora za interleukin (IL) 2 (IL2R α) čija posledica je ekspresija IL-2 receptora sa smanjenom osetljivošću za IL-2. Ova dva gena su ključna za opstanak i funkciju regulatornih CD4⁺ T ćelija (Treg ćelija) (Redondo i sar., 2018).

Ipak, uprkos jasnom značaju genetičkih faktora, 90% novodijagnostikovanih pacijenata nema srodnike obolele od DT1 u svojoj porodičnoj istoriji (Redondo i sar., 2018).

1.4 Sredinski faktori u dijabetesu tipa 1

Usled nemogućnosti da se porast incidence i prevalencije DT1 objasni isključivo pomoću genetičkih faktora i procesa nasleđivanja, uloženi su napor da se ustanovi koji faktori dodatno povećavaju verovatnoću nastanka DT1. Brojne studije su pokazale da nastanku DT1 doprinose različiti sredinski faktori (Ogrotis i sar., 2023), od kojih se kao jedne od glavnih pokretača autoimunskog odgovora navode virusne infekcije. TEDDY (engl. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) studijom je ustanovljeno da infekcija enterovirusima dovodi do pojave autoimunskog odgovora usmerenog protiv antigena Langerhansovih ostrvaca, pri čemu je infekcija koksaki virusom najviše asocirana sa povećanjem rizika nastanka DT1 (Lernmark i sar., 2025).

Postoje dokazi koji ukazuju da narušavanje mikrobiote creva može uticati kako na nastanak, tako i na progresiju DT1. Pet bakterijskih vrsta je dovedeno u vezu sa razvojem DT1, pri čemu je ujedno zabeležena povećana zastupljenost bakterijskih vrsta koje pripadaju soju Bacteroidetes. Ovakve promene najčešće uzrokuju povećanje propustljivosti creva i smanjenje produkcije metabolita kao što su zasićene kiseline kratkih lanaca (engl. Short-chain fatty acids, SCFA) koje imaju protektivnu i antiinflamacijsku ulogu u crevima (Kostic i sar., 2015; Vatanen i sar., 2018).

Sve veća pažnja je usmerena na izučavanje zagađenja kao faktora koji može uticati na nastanak autoimunskih bolesti. Jedan primer predstavlja zagađenje vazduha, vodeći spoljašnji faktor sredine koji doprinosi povećanju incidence i pogoršanju kliničke slike niza autoimunskih bolesti (Zhao i sar., 2019). Izglaganje PM₁₀ i PM_{2,5} česticama predstavlja prognostički faktor za razvoj DT1 kod dece mlađe od pet godina (Tsai i sar., 2019). Ove čestice iniciraju i održavaju inflamaciju, stimulišući produkciju i oslobađanje IL-1 β , koji doprinosi uništavanju β ćelija pankreasa (Bengalli i sar., 2013). Ozon takođe povećava rizik od oboljevanja od DT1 izazivajući inflamaciju, apoptozu ćelija i oksidativni stres. Organski zagađivači kao što su živa, aluminijum, a naročito ksenobiotici kao što su dugotrajne organske zagađujuće supstance i policiklični aromatični ugljovodonici, na sličan način povećavaju rizik za razvijanje DT1 (Ogrotis i sar., 2023).

1.5 Eksperimentalni životinjski modeli dijabetesa tipa 1

Pri izučavanju DT1 najčešće je korišćen miš (*Mus musculus*) kao model organizam, iz razloga što je genetička podudarnost sa ljudskim genomom visoka (Waterston i sar., 2002), a ujedno postoji i visok stepen sličnosti između ljudske i mišje fiziologije. Miševi kao model organizmi su najpodobniji za izučavanje bioloških i imunoloških fenomena čiji su mehanizmi, odnosno njihova genetička osnova, ostali konzervirani tokom evolucije. U tom smislu, geni koji se nalaze u osnovi nekih autoimunskih oboljenja čoveka su evoluirali na drugačiji način od, na primer, mišjih. Stoga saznanja dobijena na životinjskim modelima se ne mogu potpuno translirati na ljude (Perlman, 2016). Ipak, uz napredovnije genetičkog bioinženjeringa i razvojem različitih sojeva transgenih miševa (Fox i sar., 2007), sve uspešnije se premošćuje genetički jaz koji onemogućava translaciju istraživanja između životinjskih modela i ljudi (Peng i sar., 2023).

Za razumevanje i izučavanje humanih oboljenja, najrelevantniji podaci proizilaze iz istraživanja urađenim na humanim uzorcima (organi, tkiva, ćelije) (Kaddis i sar., 2009). Nažalost, ovakav pristup poseduje bezbroj ograničenja – etičkih i praktičnih: varijabilnost između donora pankreasa (godine, pol, stepen oštećenja pankreasa), nedovoljna dostupnost doniranih pankreasa, razlike u pripremi i izolaciji pankreasa i sam kvalitet dobijenih pankreasnih ostrvaca (Lyon i sar., 2016). Korišćenjem životinjskih modela većina pomenutih ograničenja se prevazilazi, stoga se i dalje najveći broj istraživanja vrši korišćenjem istih.

Postoji više životinjskih modela DT1, što omogućava multidisciplinarni pristup izučavanja ove autoimunske bolesti, kao i mogućnost odabira životinjskog modela u zavisnosti od potrebe istraživanja (Peng i sar., 2023).

Humanizovani modeli nastaju genetičkim inženjeringom odnosno inkorporiranjem humanih ćelija ili tkiva u imunodeficientnim sojevima eksperimentalnih životinja, najčešće miševa. Transgeni miševi ovog tipa su najpodobniji za prekliničko testiranje bezbednosti i efikasnosti različitih terapijskih metoda i terapeutika, ali naravno i u samom istraživanju nastanka i progresije DT1 (Bosma i sar., 1983; Ito i sar., 2002).

Spontani životinjski modeli su zasnovani na postojanju genetičkih varijanti odnosno mutacija usled kojih se kod životinja manifestuje fenotip sličan onom koji je zastupljen kod čoveka u stanju ciljnog oboljenja (King, 2012). Najviše korišćen spontani modela DT1 je mišji NOD (engl. Non-obese diabetic) model, koji se koristi u istraživanjima fokusiranim na izučavanje progresije DT1, kao i na uticaj koji mogu imati genski polimorfizmi (Chatenoud i sar., 2022; Driver i sar., 2012). Iako je opšteprihvaćeno da je NOD model najpribližniji humanom DT1 usled spontanog načina nastanka bolesti kao posledice genetičke pozadine i autoimunske reaktivnosti na antigene pankreasa, nedostatak ovog modela je postojanje polne razlike u incidenci nastanka DT1, kao i neophodnost postojanja sterilnih uslova u kojima se životinje gaje (Koprivica i sar., 2025). Pored NOD miševa, spontani modeli uključuju i pacovski BB model, korišćen za izučavanje genetičkih faktora koji doprinose nastanku DT1 (Wallis i sar., 2009) i u istraživanju razlika u mikrobioti koja bi imala uticaj u patogenezi DT1 (Roesch i sar., 2009), kao i pacovski IDDM model, podoban za izučavanje dijagnostičkih parametara i markera (Peng i sar., 2023), faza infiltracije imunskih ćelija (Arndt i sar., 2018) i komorbiditeta koji prate DT1 (Kottaisamy i sar., 2021).

Indukovani modeli DT1 se mogu izazvati kod eksperimentalnih životinja na više načina. Modeli indukovani virusnim infekcijama se koriste u istraživanjima koje izučavaju uzročno-posledičnu vezu između virusnih infekcija i nastanka DT1 (De Beeck i Eizirik, 2016), najčešće primenom Encefalomiokarditisnog virusa (Sano i sar., 2011) i koksaki B virusa (Rewers i Ludvigsson, 2016).

Hemijski indukovani modeli se zasnivaju na primeni aloksana ili streptozotocina (STZ), koji vezivanjem za transporter glukoze 2 (engl. Glucose Transporter 2, GLUT2) dospevaju u unutrašnjost β ćelija pankreasa, gde ostvaruju svoje toksične efekte i uništavaju ih kroz oštećivanje DNK i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) (Lenzen, 2008). STZ se češće koristi kao indukujući agens zbog manje generalne toksičnosti i veće specifičnosti za β ćelije koja se ogleda u većem afinitetu vezivanja za GLUT2 (Furman, 2021). Postoje dva pristupa u indukciji DT1 primenom STZ – primena jedne visoke doze, ili primena višestrukih malih doza. Prilikom prvog načina indukcije dolazi do značajnog oštećenja β ćelija i posledično male ili potpuno odsutne produkcije insulina, dok

drugi pristup indukcije dovodi do postepenog oštećenja β ćelija i fluktuirajuće produkcije insulina (Athmuri i Shiekh, 2023). Indukcija bolesti višestrukim malim dozama STZ ostvaruje povoljniju formu hemijski indukovanih modela bolesti: stopa preživljavanja životinja je veća, i bolje je simuliran nastanak humanog oblika DT1 – postoji hronična inflamacija pankreasnih ostrvaca, dolazi do postepenog uništavanja β ćelija, što posledično dovodi do nastanka insulinske deficijencije i hiperglikemije (Weide i Lacy, 1991). Ipak, ovakav način indukcije DT1 poseduje i određena ograničenja: 1) inicijalno oštećenje β ćelija je uzrokovano direktnom toksičnošću STZ, a ne aktivnošću autoreaktivnih imunskih ćelija (Furman, 2021), i 2) STZ može uticati i na imunske ćelije koje ekspimiraju GLUT2 ($CD4^+$ i $CD8^+$ T limfociti, kao i B limfociti) (Queiroz i sar., 2021), menjajući imunski odgovor usmeren protiv autoantigena pankreasnih ostrvaca (Fu i sar., 2023).

Ekspresija GLUT2 je ujedno i ograničavajući faktor izbora eksperimentalnih životinja, pa se hemijska indukcija DT1 intraperitonealnim STZ injekcijama vrši na C57BL/6 miševima, CD-1 miševima i Sprague Dawley pacovima, usled dovoljne ekspresije pomenutog transportera (Damasceno i sar., 2014). Hemijski indukovani modeli su od velikog značaja pri istraživanju mehanizama koji se nalaze u osnovi autoimunskog odgovora, kao i procene efikasnosti lekova (Koprivica i sar., 2025; Lee i sar., 2021). Naročiti značaj su pokazali i kao eksperimentalni modeli pri izučavanju fundamentalnih mehanizama koji se nalaze u osnovi terapijskog potencijala indukcije regulatornih ćelija (Zhou i sar., 2021) i pri istraživanju efekata izmenjene mikrobiote creva na kliničku sliku DT1 (Zheng i sar., 2021).

1.6 Imunopatogeneza dijabetesa tipa 1

Iako nije identifikovan tačan mehanizam kojim dolazi do nastanka DT1, saznanja koja se tiču biologije β ćelija su pokazala da je moguće da i ove ćelije same doprinose patogenezi DT1. β ćelije su svakodnevno izložene velikom stresu usled visokih i fluktuirajućih potreba za insulinom (Atkinson i Mirmira, 2023). U takvim uslovima, sa ili bez virusne infekcije koja se često smatra kao okidač DT1, može doći do nakupljanja ROS koji izazivaju značajna oštećenja i/ili smrt β ćelija usled njihove osetljivosti na oksidativni stres (Holendová i sar., 2024). U oštećenim β ćelijama dolazi do neefikasne obrade proinsulina i nepravilne eliminacije nefunkcionalnih sekretornih vezikula putem krinofagije, što sve za posledicu može imati stvaranje autoantigena (Jeffery i sar., 2019; Rodriguez-Calvo i sar., 2021; Vomund i sar., 2015; Vomund i sar., 2021). Te autoantigene prvo preuzimaju, obrađuju i prikazuju ćelije urođenog imuniteta.

1.7 Uloga ćelija urođenog imuniteta u patogenezi dijabetesa tipa 1

Ćelije urođenog imuniteta kao što su makrofagi, dendritske ćelije (D \acute{C}), urođene limfoidne ćelije (engl. Innate Lymphoid Cells, ILC) i neutrofili su ključni deo početnog autoimunskog odgovora na autoantigene, kao i u indukciji DT1 (Herold i sar., 2024).

Prilikom inicijacije autoimunosti u DT1, konvencionalne DĆ preuzimaju i obrađuju antigene β ćelija, koji mogu nastati modifikacijom insulina ili drugih proteina poreklom iz β ćelija, odnosno koji se oslobađaju nakon smrti β ćelija, nakon čega ispoljavaju ove autoantigene u sklopu sa MHC II molekulima. Ove DĆ odlaze u drenirajuće limfne čvorove gde pomenute antigene prikazuju autoreaktivnim T limfocitima koji specifično prepoznaju antigene β ćelija (Ferris i sar., 2023; Turley i sar., 2003). Pored prikazivanja antigena, aktivirane DĆ ispoljavaju kostimulacione molekule i citokine (IL-6, IL-12, IL-23, TNF i IL-1 β) koji polarizuju diferencijaciju T ćelija u efektorske T limfocite (Jin i sar., 2025).

Sa druge strane, DĆ mogu biti i tolerogene (tolDĆ), i imaju ulogu u uspostavljanju i održavanju imunološke homeostaze i tolerancije. tolDĆ ekspimiraju različite imunoregulatorne molekule kao što su antiinflamacijski citokini IL-10 i transformišući faktor rasta (engl. Transforming growth factor, TGF) β , ligand za receptor programirane ćelijske smrti 1 (engl. Programmed death ligand 1, PD-L1) (Jia i sar., 2018), a odlikuju se i ekspresijom indolamin 2,3-dioksigenaze (IDO1) koja je jedan od enzima čija aktivnost je ključna za održavanje imunološke tolerancije (Mellor i sar., 2002). tolDĆ uspostavljaju imunološku toleranciju na nekoliko načina: direktnim uništavanjem autoreaktivnih T limfocita, konverzijom efektorskih T limfocita u Treg ćelije, ili izazivanjem anergije T limfocita (Giannoukakis, 2023). Studija na NOD životinjskom modelu DT1 je pokazala da postoji značajno manji broj tolDĆ u pankreasu predijabetičnih NOD miševa u odnosu na zdrave C57BL/6 miševe. tolDĆ su u pankreasu predijabetičnih NOD miševa imale smanjeni kapacitet produkcije IL-10, kao i smanjenu ekspresiju CCR5, hemokina koji je ključan za migraciju na mesta inflamacije. Smanjeni imunoregulatorni kapaciteti tolDĆ bi mogli da objasne kako u DT1 dolazi do nefunkcionalnog uspostavljanja tolerance na sopstvene antigene, usled čega autoreaktivni T limfociti izbegavaju anergiju (Welzen-Coppens i sar., 2012).

Makrofagi vrše dvojak ulogu u patogenezi DT1 – najpre u samoj inicijaciji bolesti kao antigen-prezentujuće ćelije (APĆ), a zatim i u uništavanju β ćelija produkcijom proinflamacijskih citokina IL-1 β , IL-6, faktora nekroze tumora (engl. Tumour Necrosis Factor, TNF), i ROS (Alleva i sar., 2000; Carrero i sar., 2017; Citro i sar., 2021; Sun i sar., 2020).

U ILC spada nekoliko tipova ćelija: urođenoubilačke ćelije (engl. Natural Killer Cells, NK), ILC1, ILC2 i ILC3. Dok su NK ćelije pandan CD8⁺ T limfocitima, poslednje tri populacije ćelija predstavljaju pandan podtipova pomoćničkih CD4⁺ T limfocita (Th1, Th2 i Th17) (Ryu i sar., 2023). O ulozi ILC u patogenezi DT1 trenutno nema dovoljno podataka. Smatra se da kod osoba sa genetičkom predispozicijom NK ćelije najviše doprinose nastanku DT1 uništavanjem β ćelija, tako čineći autoantigene dostupnim za APĆ i autoreaktivne T limfocite. Pretpostavlja se da je za aktivaciju NK ćelija potreban okidač kao što je prisustvo virusne infekcije u ćelijama pankreasa. Oslobađanjem vezikula sa granzimom B i perforinom, kao i produkcijom interferon (IFN)- γ , NK ćelije ispoljavaju citotoksične efekte i dovode do smrti β ćelija (Gardner i Fraker, 2021).

1.8 Uloga ćelija adaptivnog imuniteta u patogenezi dijabetesa tipa 1

Iako ne postoje jasni dokazi za direktno učešće B limfocita humoralnog adaptivnog odgovora u progresiji DT1 i samom procesu uništavanja β ćelija pankreasa, autoantitela specifična za antigene kao

što su GAD65 i insulin su prisutna i nekoliko godina pre pojave kliničkih simptoma (Krischer i sar., 2019). Kako u trenutku pojave kliničkih simptoma DT1 kod ljudi već postoji značajni stepen destrukcije β ćelija, postoji mogućnost da vršeci funkciju APC B limfociti doprinose aktivaciji i ekspanziji autoreaktivnih $CD4^+$ T ćelija (Di Lorenzo i sar., 2007; Hu i sar., 2007; Krischer i sar., 2015; Wong i sar., 2004).

Pomoćnički $CD4^+$ i citotoksični $CD8^+$ T limfociti su efektorske ćelije adaptivnog imunskog odgovora usmerenog protiv β ćelija pankreasa. U drenirajućim limfnim čvorovima autoreaktivni $CD8^+$ T limfociti bivaju aktivirani pri prepoznavanju autoantigena prikazanih pomoću MHC I molekula na konvencionalnim DĆ i makrofagima, dok se $CD4^+$ T limfociti aktiviraju prepoznavanjem autoantigena prikazanim na MHC II molekulima na DĆ, makrofagima i B ćelijama (Unanue, 2014).

Nakon prepoznavanja autoantigena na β ćelijama, aktivirani $CD8^+$ T limfociti uništavaju ove ćelije oslobađanjem citotoksičnih granula sa granzimom B i perforinom, dok $CD8^+$ i $CD4^+$ T limfociti mogu doprineti uništavanju β ćelija produkcijom IFN- γ (Eizirik i sar., 2009). IFN- γ sledstveno aktivira makrofage, indukujući njihovu produkciju TNF, IL-1 β i ROS, ujedno stimulišući njihovu sposobnost fagocitoze (Lehuen i sar., 2010). Produkcija IFN- γ takođe direktno stimuliše β ćelije da eksprimiraju FAS receptor smrti na svojoj površini. Interakcijom FAS receptora i FAS liganda eksprimiranog na $CD8^+$ i $CD4^+$ limfocitima indukuje se apoptotska ćelijska smrt β ćelija (Eizirik i sar., 2009).

U stanju homeostaze citotoksični $CD8^+$ T limfociti su kratkoživeće ćelije. Sa druge strane, u NOD životinjskom modelu DT1 u pankreasnim limfnim čvorovima je utvrđeno da $CD8^+$ T limfociti poseduju visok stepen samoobnavljanja, nalik onom koje imaju matične ćelije (Abdelsamed i sar., 2020), kao i sposobnost da se diferenciraju u kratkoživeći oblik koji učestvuje u destrukciji β ćelija (Gearty i sar., 2022).

Iako je ranije smatrano da u imunopatogenezi DT1 prevashodno učestvuje Th1 podtip $CD4^+$ T limfocita produkcijom IFN- γ , pokazano je da u disregulaciji imunskog odgovora i uništavanju β ćelija udeo ima i Th17 podtip $CD4^+$ T limfocita (Arif i sar., 2011; Ferraro i sar., 2011) produkcijom IL-17A i IL-17F (Martin-Orozco i sar., 2009; Tong i sar., 2015). Pored proinflamacijskih podtipova $CD4^+$ T limfocita, Treg ćelije poseduju antiinflamacijska svojstva i imaju funkciju regulisanja imunskog odgovora. Treg ćelije ostvaruju svoju supresivnu ulogu produkcijom citokina IL-10 i TGF- β kao i ekspresijom CTLA-4 inhibitornog receptora, onemogućavajući aktivaciju imunskih ćelija, pa i indukujući anergiju istih (Asseman i sar., 1999; Read i sar., 2006). Kod individua koje boluju od DT1 zabeleženi su smanjeni broj i aktivnost Treg ćelija, usled njihove smanjene stabilnosti (Brusko i sar., 2008; Okubo i sar., 2016; Schneider i sar., 2008). Kod osoba koje imaju DT1, kao i kod dijabetičnih NOD miševa, pronađena su antitela specifična za IL-2, citokin koji je od ključne važnosti za opstanak i pravilno funkcionisanje Treg ćelija (Pérol i sar., 2016). Bez dovoljno IL-2, Treg ćelije prelaze u stanje anergije i ne mogu vršiti supresiju efektorskih ćelija (Thornton i sar., 2004a; Thornton i sar., 2004b). Tokom DT1, u Langerhansovim ostrvicima pankreasa je povećano prisustvo IFN- γ , usled čega Treg ćelije snižavaju ekspresiju receptora za IL-2 (CD25), time ograničavajući ekspresiju transkripcionog faktora Foxp3 (engl. Forkhead box P3) kao i proliferaciju Treg ćelija (St. Rose i sar., 2013). Usled smanjene funkcije Treg ćelije nisu u mogućnosti da adekvatno spreče autoimunski odgovor usmeren protiv autoantigena β ćelija (Long i Buckner, 2011).

1.9 Terapijski pristupi u dijabetesu tipa 1

Iako postoje veliki napori da se razume imunološki reljef DT1 kao autoimunske bolesti i na osnovu prikupljenog znanja odredi najoptimalniji terapijski pristup koji bi inhibirao efektorske funkcije autorektivnih imunskih ćelija, danas jedini adekvatan vid terapije predstavlja sprečavanje hipoinsulinemije redovnim i višestrukim injekcijama egzogenog insulina (Speight i Pouwer, 2024). Osim injekcija insulina, postoji i opcija transplatacije pankreasnih ostrvaca, čime se obnavlja populacija β ćelija, ali je ovakav vid terapije ograničen dostupnošću donora pankreasa ili pankreasnih ostrvaca (Pathak i sar., 2019). Još jedan nepovoljan aspekt transplatacije pankreasnih ostrvaca je taj što još uvek ne postoji adekvatno rešenje za prevazilaženje imunskog odgovora recipijenta na donorsko tkivo (Ekser i Cooper, 2010).

Iako i dalje ne postoji idealna imunomodulacijska terapija koja bi ostvarila specifičan i lokalizovan efekat na imunske ćelije koje su autoreaktivne na antigene β ćelija, na osnovu dosadašnjih istraživanja iz oblasti autoimunskih oboljenja su proizašli terapeutici sa nespecifičnim ali efikasnim antiinflamacijskim dejstvom. Kliničke studije su pokazale da monoklonsko anti-TNF antitelo (Infliximab) inhibira vezivanje endogenog TNF za svoj receptor na površini imunskih ćelija, što posledično inhibira dalju aktivaciju nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) i MAPK (engl. Mitogen-activated Protein Kinase) signalnih puteva, sprečavajući produkciju proinflamacijskih citokina i medijatorskih molekula (Levin i sar., 2024). Korišćenje Teplizumaba, humanizovanog monoklonskog antitela koje se vezuje za ϵ lanac CD3 molekula, odobreno je 2022. godine radi odlaganja nastupanja treće faze DT1 kod osoba starijih od 8 godina. Primenom ovog monoklonskog antitela, koje sprečava $CD4^+$ i $CD8^+$ T limfocite da ostvaruju svoje efektorske funkcije, moguće je odložiti početak DT1 do dve godine, kao i usporiti dalje napredovanje bolesti (Herold i sar., 2023).

Ipak, nijedna od pomenutih terapija ne daje dugoročno rešenje i ne fokusira se na suštinske uzročnike koji dovode do nastanka DT1 – izgubljenu toleranciju na antigene β ćelija pankreasa, kao i postojanje autorektivnih T limfocita koji specifično uništavaju β ćelije. Iz tog razloga je predmet brojnih istraživanja bilo i razvijanje metoda pomoću kojih bi bila povraćena regulacija imunskog odgovora. Pokazalo se da je terapija koja podrazumeva *ex vivo* modulaciju i ekspanziju Treg ćelija efikasna jedino uz istovremenu primenu IL-2 molekula vezanih za antitela specifična za oksidativne markere inflamacije. Ovakav pristup omogućava da modulirane Treg ćelije opstanu dovoljno dugo u organizmu kako bi ostvarile antiinflamacijske efekte (Passerini i sar., 2025). Efekat ovakve regulatorne terapije je poboljšan primenom Rituksimaba, monoklonskog antitela koje se koristi za depleciju B limfocita koji ekspimiraju CD20. Nakon primanja Rituksimaba, deo recipijenata nije zahtevao insulinsku terapiju dve godine, dok su delu recipijenata bile potrebne samo niske doze insulina tokom čak 12 godina. U osnovi ovog poboljšanja efikasnosti terapije se nalazi eliminacija B limfocita koji prikazuju antigene β ćelija (Pescovitz i sar., 2009; Zieliński i sar., 2022).

Terapijski pristup davanja moduliranih APC u lečenju DT1 je prvi put primenjen korišćenjem nezrelih DC, ali bez uspeha (Giannoukakis i sar., 2011). tolDC specifične na proinsulinski peptid koje su dobijene tretiranjem monocita vitaminom D i deksametazonom su takođe primenjene na pacijentima sa DT1. Tretirani pacijenti su imali oslabljenu efektorsku funkciju reaktivnih T limfocita, kao i povećanje broja IL-10-produkujućih ćelija, u trajanju od tri godine (Nikolic i sar., 2022). Dalje unapređenje terapije

sa tolDC bi se moglo zasnivati na pospešivanju indukcije Treg ćelija od strane ove tolerogene populacije APC (Passerini i sar., 2025).

Pored spomenutih terapija prihvaćenih za primenu na pacijentima postoji i niz potencijalnih imunomodulacijskih pristupa u terapiji koji podrazumevaju specifično modulisanje imunskih ćelija adaptivnog imunskog odgovora u gastrointestinalnom traktu (Eveleens Maarse i sar., 2025). Ipak, i pored pozamašnog broja studija o modulisanju ćelija adaptivnog imunskog sistema creva, postoji sve veće interesovanje za terapijski potencijal ćelija koje su deo urođenog imuniteta creva, a koje imaju ulogu u inicijaciji autoimunskog odgovora. Kako su creva kompleksna mikrosredina, gubitak tolerancije umnogome zavisi od interakcija mikrobiote i njihovih metabolita sa pomenutim ćelijama mukoznog imuniteta creva (Zhang i sar., 2023).

1.10 Značaj imunskog sistema creva u patogenezi dijabetesa tipa 1

Kod mnogih osoba koje boluju od DT1 postoji narušena mikrobiota creva (De Goffau i sar., 2013; Giongo i sar., 2011; Vatanen i sar., 2018), a vrlo često to podrazumeva i izmenjenu propustljivost creva (Del Chierico i sar., 2022). Ova dva fenomena su uzročno-poslednično povezana – usled smanjene zastupljenosti komensalnih bakterija koje proizvode SCFA, manjak ovih metabolita (kao što su butirrat, acetat i propionat) utiče na slabljenje čvrstih veza između epitelnih ćelija creva i na taj način uzrokuje povećanu propustljivost (Fasano, 2012; Ulluwishewa i sar., 2011). Povećana propustljivost creva dozvoljava da se bakterije i antigeni hrane translociraju do lamine proprije koja pripada limfoidnim tkivima povezanim sa gastrointestinalnim traktom (engl. Gut-associated Lymphoid Tissue, GALT) (Del Chierico i sar., 2022). Pored lamine proprije, u GALT spadaju i Pejerove ploče i mezenterični limfni čvorovi, međusobno formirajući kompleksnu mrežu limfoidnih struktura kojima cirkulišu DC, T limfociti i B limfociti (Wershil i Furuta, 2008) i koje imaju ulogu u uspostavljanju i održavanju tolerancije prema spomenutim antigenima hrane i mikrobiote creva (Wells i sar., 2010).

Naime, pokazano je da u stanjima narušene mukozne barijere creva dolazi do gubitka oralne tolerancije na pojedine antigene (Vaarala, 2012), što može uticati na nastanak DT1 (Barrett i sar., 2009; Mejía-León i Calderón de la Barca, 2015). Jedan od načina na koji može doći do gubitka tolerancije je putem molekulske mimikrije (Altindis i sar., 2018). Dospućem bakterijske forme GAD u GALT, služeći kao antigen, GAD aktivira T limfocite koji će kasnije dospeti u pankreas i reaktivirati se pri susretu sa GAD poreklom iz β ćelija (Bedi i sar., 2022; Jamshidi i sar., 2019). Pojedine bakterije mogu sintetisati metabolite i/ili peptide koji su slični različitim oblicima insulina ili drugim antigenima β ćelija. Primer su peptidi poreklom iz bakterijskih sojeva *Bacteroides* i *Clostridium* koji poseduju sličnu aminokiselinsku sekvencu kao preproinsulin (Cole i sar., 2016). Dodatno, neki peptidi mikrobiote creva mogu aktivirati autoreaktivne CD8⁺ T limfocite specifične za protein glukoza-6-fosfatazu poreklom iz pankreasnih ostrvaca (Hebbandi Nanjundappa i sar., 2017; Tai i sar., 2016). U NOD životinjskom modelu je ustanovljeno da bakterija *Parabacteroides distasonis* proizvode peptide koji su homologni sa β lancem insulina, čije prepoznavanje od strane imunskog sistema može pokrenuti odgovor usmeren protiv insulina β ćelija (Girdhar i sar., 2022). Na kraju, u prilog hipotezi da se aktivacija autoreaktivnih T limfocita odvija u GALT strukturama creva, u mezenteričnim limfnim čvorovima i Pejerovim pločama

predijabetičnih NOD miševa su pronađeni autoreaktivni T limfociti specifični za insulin u skoro jednakoj meri kao u pankreasnim limfnim čvorovima (Đedović i sar., 2019).

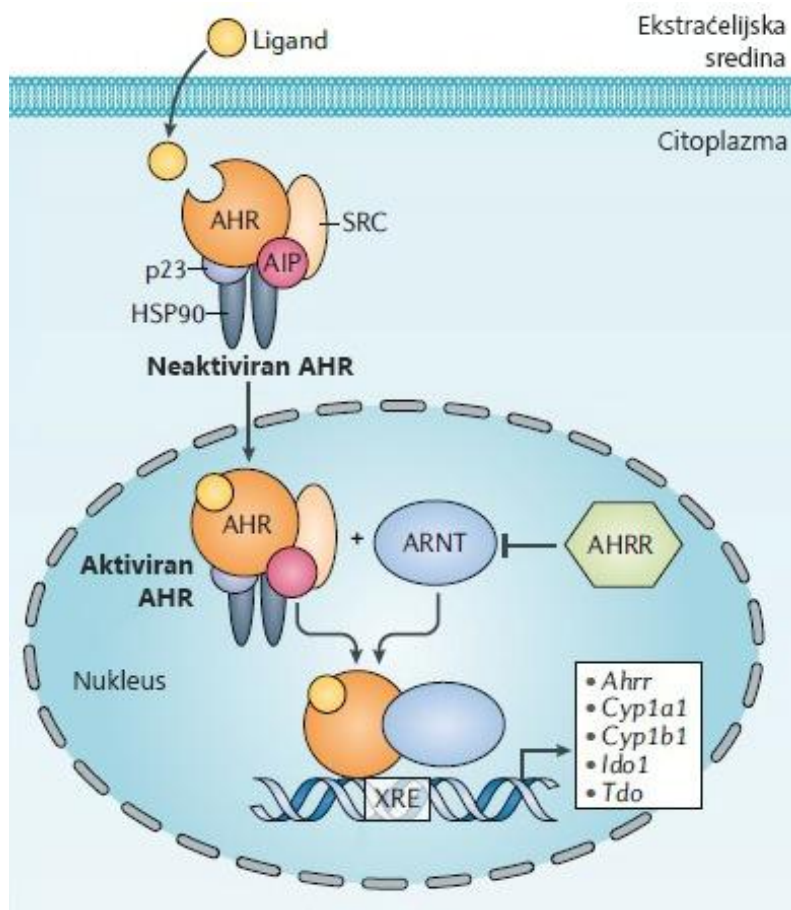
ILC3 imaju bitnu ulogu u sprečavanju njenog narušavanja i povećanja propustljivosti (Miani i sar., 2018). ILC3 oslobađaju citokin IL-22, stimulišući produkciju mucina (Sugimoto i sar., 2008) i antimikrobnih jedinjenja (Bevins i Salzman, 2011), a stimulišu i epitelne ćelije creva da produkuju IL-10 i proliferišu, obnavljajući mukoznu barijeru (Cella i sar., 2009). IL-22 poreklom od ILC3 može doprineti i zaštiti samih β ćelija. IL-22 štiti β ćelije od oksidativnog stresa (Hasnain i sar., 2014) i izaziva ekspresiju β -defenzina 14 u pankreasu koji može indukovati nastanak regulatornih B limfocita, a njihovim posredstvom podstaći nastanak Treg ćelija i antiinflamacijskih makrofaga (Miani i sar., 2018).

Narušavanje mikrobiote creva utiče na imunske ćelije koje doprinose održavanju crevne mukozne barijere. Na primer, brojne studije su pokazale da promene u crevnoj mikrobioti u DT1 mogu uzrokovati disbalans između Treg i IL-17-produkujućih patogenih Th17 ćelija u crevu (Li i sar., 2015). Narušena mikrobiota creva i hronična inflamacija u crevima takođe mogu uticati na zastupljenost ILC3. Stanje mikrobioma creva može direktno uticati na produkciju IL-7 od strane epitelnih ćelija creva. Potvrđeno je da upravo IL-7 poreklom od epitelnih ćelija ima bitnu ulogu u održavanju funkcije ILC3 (Shalpour i sar., 2010; Vonarbourg i sar., 2010). Takođe, u prisustvu proinflamacijskih citokina IL-12 i IL-1 β ILC3 gube ekspresiju ROR γ t (engl. RAR-related Orphan Receptor γ T) i počinju da ekspimiraju T-bet (engl. T-box transcription factor TBX21), poprimajući proinflamacijski ILC1 fenotip (Bernink i sar., 2015; Cella i sar., 2010). ILC3 mogu proizvoditi i IL-2, koji je neophodan za nastanak i održavanje Treg ćelija koje imaju ulogu u uspostavljanju oralne tolerancije u crevima. Kod NOD miševa je zabeležen manji udeo IL-2-produkujućih ILC3, kao i udeo i apsolutni broj Treg ćelija u lamini propriji tankog creva. Sličan fenomen je zabeležen kod C57BL/6 miševa kojima je DT1 indukovano višestrukim malim dozama STZ, sa time da je pored udela IL-2-produkujućih ILC3, snižen i njihov apsolutni broj, dok je u slučaju Treg ćelija bio smanjen samo apsolutni broj u lamini propriji tankog creva (Saksida i sar., 2023). U tom smislu, pored narušene mikrobiote creva, bitnu ulogu u nastanku a potom i pogoršanju DT1 imaju imunske ćelije creva koje su se pokazale kao neophodne za uspostavljanje i održavanje oralne tolerancije.

Pomenute promene u mikrosredini creva, kako na polju mikrobiote creva, tako i u zastupljenosti imunskih ćelija i signalnih molekula, se ostvaruju kao posledica aktivnosti mreže receptora i transkripcionih faktora. Ekstenzivnim istraživanjima je ustanovljeno da je jedan od ključnih regulatora imunskog sistema creva aril-ugljovodonični receptor. On predstavlja sponu između signala koji potiču iz spoljašnje sredine i ćelija domaćina, pri čemu najveću ekspresiju ovog transkripcionog faktora imaju ćelije koje najčešće dolaze u kontakt sa molekulima iz spoljašnje sredine – u plućima i gastrointestinalnom traktu (Rothhammer i Quintana, 2019).

1.11 Aril-ugljovodonični receptor

Aril-ugljovodonični receptor (engl. Aryl hydrocarbon receptor, AHR) je ligand-zavisni transkripcioni faktor koji pripada porodici proteina sa osnovnim heliks-petlja-heliks domenom (bHLH-PAS). U mirujućem stanju se nalazi u citoplazmi i formira kompleks sa AhR-interagujućim proteinom (AIP), tirozin kinazom c-Src, šaperonskim proteinom toplotnog šoka 90 (Hsp90) i proteinom p23. Nakon



Slika 2. Shematski prikaz signalne kaskade AHR. Preuzeto i prilagođeno iz Rothhammer i Quintana, 2019.

vezivanja liganda, AHR kompleks se izmešta iz citoplazme u nukleus ćelije. U nukleusu AHR napušta dotadašnji šaperonski kompleks i formira heterodimer vezivanjem nukleusnog translokatora AHR (ARNT) tj. HIF1 β molekul (Slika 2). AHR-ligand-ARNT kompleks interaguje sa DNK prepoznavanjem i vezivanjem za regulatorni region obeležen kao XRE element (engl. Xenobiotic Response Elements) (Rothhammer i Quintana, 2019). Regulacija genske ekspresije se vrši pomoću negativne povratne sprege – represor AhR (AHRR) je u kompeticiji sa ARNT molekulom za isto vezujuće mesto na AHR (Sakurai i sar., 2017).

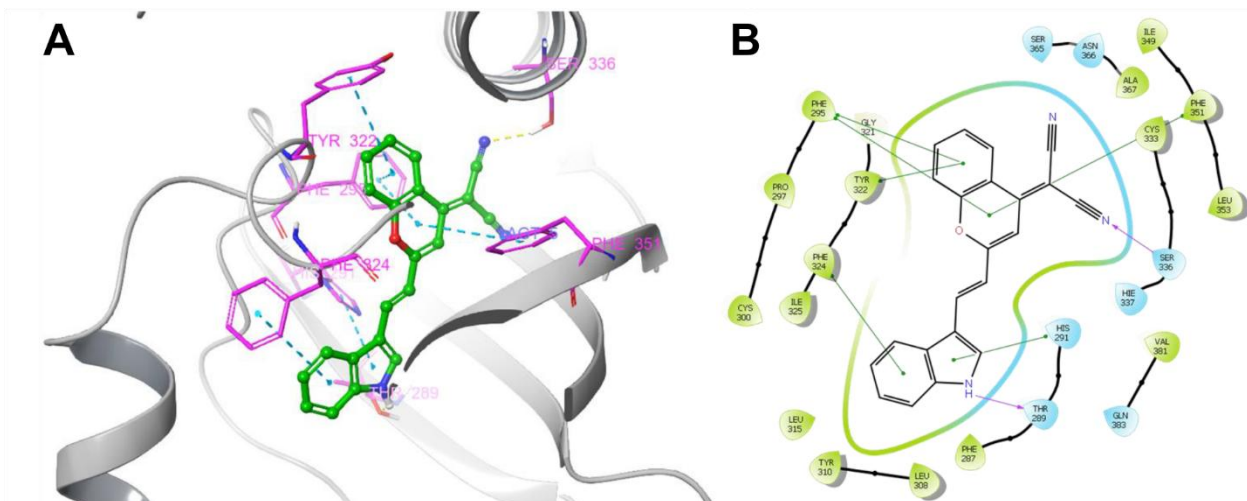
Među genima koji se transkribuju pri vezivanju AHR-ARNT dimera za XRE se nalaze geni za citohrom P450-zavisne monooksigenaze – CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 i NAD(P)H kinonske oksidoreduktaze (Furman i sar., 2009). Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u detoksikaciji i metabolisanju različitih ksenobiotika, hormona i masnih kiselina (Guengerich, 1992). Osim u transkripciji pomenutih enzima, AHR učestvuje u pozitivnoj regulaciji transkripcije gena za citokine IL-22 i IL-10 (Rutz i Ouyang, 2011), dok je njegova uloga u transkripciji gena za citokin IL-17 suprimirujuća (Liu i sar., 2020).

AHR utiče i na aktivaciju drugih transkripcionih faktora kao što je NF- κ B. AHR ovo čini na više načina: indirektno, interagovanjem sa SOCS-2 (engl. Suppressor of cytokine signalling 2) (Kim i sar., 2019) ili sa STAT1 (engl. Signal transducer and activator of transcription 1) (Kimura i sar., 2008), i direktno, interagovanjem sa RELA, RELB i drugim molekulima koji su deo NF- κ B signalnog kompleksa (Salisbury i Sulentic, 2015; Vogel i sar., 2014), što posledično uzrokuje supresiju NF- κ B signalnog puta. Na ovaj način se smanjuje transkripcija gena za proinflamacijske citokine kao što su IL-1B, IL-6, IL-8 i TNF.

Iako su najpotentniji ligandi za AHR često ksenobiotici kao što je tetrahlorodibenzo-p-dioksin (TCDD), većina njegovih liganada nastaje u crevima tokom kinureninskog katabolizma triptofana (Seok i sar., 2018). Naročito značaj imaju i metaboliti mikrobiote creva – indol-3-sirćetna kiselina, indol-3-aldehid, triptamin i 3-metilindol učestvuju u kontrolisanju inflamacije u crevima na AHR-zavisan način (Gutiérrez-Vázquez i Quintana, 2018; Zelante i sar., 2013). Brojne studije su ispitivale uticaj aktivacije AHR na inflamaciju u crevima u modelu ulcerativnog kolitisa. Na primer, nakon primene AHR liganda 6-formilindol[2-b]karbazola (FICZ), zabeleženo je značajno smanjenje produkcije IFN- γ , IL-17 i TNF u debelom crevu, što se manifestovalo kroz bolju kliničku sliku životinja (Monteleone i sar., 2011). U tom smislu, osim što je ekspresiran na epitelnim ćelijama creva (Stockinger i sar., 2024), pokazano je da je AHR ekspresiran i na imunskim ćelijama. Najvišu ekspresiju AHR imaju Th17 podtip CD4⁺ T limfocita, Treg ćelije i ILC3, ali se ekspresija ovog receptora može detektovati i kod makrofaga, DC i ostalih ILC u lamini proprije creva (Yue i sar., 2020). Više studija je pokazalo da aktivacija AHR signalnog puta predstavlja jedan od ključnih načina na koji se vrši regulacija imunskog sistema creva i održava njegova homeostaza (Marafini i sar., 2024).

Dosadašnja istraživanja koja se baziraju na modulaciji AHR su pokazala da u zavisnosti od tipa tkiva ili ćelija, efekti se mogu razlikovati (Opitz i sar., 2023) – u slučaju lamine proprije i mukoznih tkiva, aktivacija AHR prevashodno ostvaruje antiinflamacijsko dejstvo, stimulisanjem diferencijacije Treg ćelija i tolDC (Mezrich i sar., 2010; Nguyen i sar., 2010). Iako postoje brojna istraživanja koja su ispitivala značaj AHR u nastanku i razviću različitih autoimunskih oboljenja, njegova uloga u patogenezi DT1 je nedovoljno istražena, a postojeća saznanja potiču od nekolicine studija sprovedenih na NOD miševima (Yue i sar., 2020). Ehrlich i saradnici su pokazali da AHR ne sprečava pojavu insulitisa kod NOD miševa isključivo uticajem na Treg ćelije, već i direktnom supresijom patogenih Th17 ćelija, kao i proinflamacijskih CD4⁺Nrp1⁺Foxp3⁻ROR γ t⁺ ćelija (Ehrlich i sar., 2016), što ostavlja prostor za dalje izučavanje mehanizama kojim AHR može ostvariti protektivne efekte.

U cilju istraživanja efekata koji se ostvaruju modulacijom AHR tokom autoimunskog odgovora u DT1, prof. dr Andreas G. Tzacos je sa saradnicima dizajnirao i sintetisao novi AHR ligand – AGT-5 (Jonić i sar., 2024). Jedinjenje je incijalno nosilo naziv C43, ali je odlukom prof. dr Tzakosa publikovano pod trenutnim imenom. Dizajn AGT-5 je osmišljen po ugledu na indirubin i njegov region koji biva prepoznat od strane PAS-B vezujućeg domena AHR (Gruszczuk i sar., 2022). Potencijalna interakcija između AGT-5 i PAS-B domena AHR je testirana primenom računarskog proračuna afiniteta molekula za vezujuće mesto na receptoru (Slika 2). U odnosu na indirubin koji je imao energetski koeficijent –12,081 kcal/mol, AGT-5 je ostvario koeficijent –13,219 kcal/mol, što ukazuje da AGT-5 poseduje veći afinitet vezivanja za PAS-B domen AHR u odnosu na indirubin. Testiranje biodostupnosti i farmakokinetike AGT-5 je pokazalo da se ovaj molekul dobro apsorbuje u gastrointestinalnom traktu, kao i da poseduje poželjne farmakološke i farmakokinetičke osobine (Jonić i sar., 2024).



Slika 3. *In silico* procena orijentacije vezivanja AGT-5 i PAS-B regiona AHR (A). Dijagram ligand-protein interakcija između AGT-5 i PAS-B regiona AHR (B). Preuzeto iz Jonić i sar., 2024.

Efekat modulacije AHR pomoću AGT-5 na imunski sistem u mišjem modelu DT1 nije prethodno testiran. Na osnovu svega navedenog može se pretpostaviti da AGT-5 poseduje potencijal da moduliše imunski odgovor. U skladu sa time, u ovoj doktorskoj disertaciji je testiran uticaj AGT-5 na razvoj DT1 indukovano primenom višestrukih malih doza STZ kod C57BL/6 miševa, sa posebnom pažnjom posvećenom uticaju AGT-5 na imunski odgovor u limfoidnim tkivima povezanim sa gastrointestinalnim traktom.

2. Ciljevi

Imajući u vida da je DT1 hronična inflamacijska bolest na čiji razvoj utiču sredinski faktori, a čiji doprinos se često manifestuje u crevima; da je AHR transkripcioni faktor koji ima visoku ekspresiju u mukoznim tkivima i čijom modulacijom su do sada postignuti antiinflamacijski efekti u različitim životinjskim modelima inflamacijskih bolesti; i da je AGT-5 pokazao sposobnost da interaguje sa mestima vezivanja AHR, kao i da poseduje povoljne farmakokinetičke osobine i dobru biološku dostupnost, postavljena je hipoteza da **oralna primena AGT-5, modulatora aktivnosti AHR, prevashodno u GALT-u može da atenuira proinflamacijski imunski odgovor usmeren protiv autoantigena β ćelija pankreasa kao i razvoj DT1**. Stoga, postavljeni su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati *in vitro* efekat AGT-5 na makrofage izolovane iz peritoneuma zdravih C57BL/6 miševa:

- Potvrđivanjem interakcije AGT-5 sa mišjim AHR kroz merenje ekspresije Cyp11a1
- Određivanjem uticaja na vijabilnost i zastupljenost populacija makrofaga

2. Ispitati *in vitro* efekat AGT-5 na CD4⁺ T limfocite izolovane iz mezenteričnih limfnih čvorova zdravih C57BL/6 miševa:

- Procenom diferencijacije Th1, Th17 i Treg subpopulacija CD4⁺ T limfocita
- Procenom proliferacije Treg ćelija i njihove sposobnosti produkcije citokina IL-10
- Određivanjem ekspresije markera supresivnih sposobnosti Treg ćelija

3. Ispitati *in vivo* efekat AGT-5 na CD4⁺ T limfocite u mezenteričnim limfnim čvorovima zdravih C57BL/6 miševa:

- Određivanjem zastupljenosti Th1, Th17 i Treg subpopulacija T limfocita
- Određivanjem zastupljenosti Treg ćelija koje ekspimiraju CYP1A1

4. Ispitati efekat *in vivo* terapijskog tretmana AGT-5 na razvoj DT1 kod C57BL/6 miševa kojima je DT1 indukovao višestrukom primenom malih doza STZ:

- Praćenjem kliničkog toka DT1
- Određivanjem morfologije Langerhansovih ostrvaca i funkcije β ćelija
- Određivanjem zastupljenosti populacija APC i njihovom funkcionalnom karakterizacijom u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva
- Određivanjem zastupljenosti ILC3 i njihovom funkcionalnom karakterizacijom u lamini propriji tankog creva
- Određivanjem zastupljenosti Th1, Th17 i Treg subpopulacija CD4⁺ T limfocita i CD8⁺ T limfocita u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva

- Merenjem ekspresije Cyp1a1 u CD4⁺ T limfocitima i CD8⁺ T limfocitima u lamini propriji tankog creva
- Procenom funkcije tolDĆ u pankreasu i lamini propriji tankog creva na osnovu ekspresije indolamin 2,3-dioksigenaze (IDO1)
- Procenom funkcije Treg ćelija u pankreasu i lamini propriji tankog creva na osnovu ekspresije markera supresivnih sposobnosti

5. Ispitati *in vitro* efekat AGT-5 na imunske ćelije izolovane iz humanih tonzila:

- Merenjem zastupljenosti ILT3-eksprimirajućih DĆ
- Određivanjem zastupljenosti ILC3
- Određivanjem zastupljenosti i proliferacije Treg ćelija

3. Materijal i metode

3.1 Rastvori i reagensi

Pri istraživanju su korišćeni sledeći rastvori i reagensi:

Serum fetusa govečeta (engl. Fetal Calf Serum, FCS; PAA Laboratories, Pašing, Austrija), kojem su inaktivirane komponente komplementa inkubacijom na 56°C tokom 30 min.

Goveđi albumin iz seruma (engl. Bovine Serum Albumin, BSA; frakcija V, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Faktor stimulacije rasta granulocita i monocita (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF; Peprotech, Roki Hil, Nju Džersi, SAD).

PBS (engl. Phosphate Buffered Saline) rastvor u dejonizovanoj vodi, kojeg čine: 8,1 mM Na₂HPO₄×2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl i 137 mM NaCl (svi iz LachNer, Neratovice, Češka), pH 7,4.

Ćelijski medijum koji se sastoji od: RPMI (engl. Roswell Park Memorial Institute)-1640 (sa 25 mM HEPES i 2 mM L-glutaminom), sa dodatkom 5% FCS, 1% penicilina i streptomicina (svi iz PAA Laboratories) i 0,001% gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija).

Medijum za dendritske ćelije čije su komponente: RPMI sa dodatkom 20% FCS, 25 mM HEPES, 200 mM glutamina, 100 nM natrijum-piruvata, 1% streptomicina i penicilina (svi iz PAA Laboratories).

Medijum za T limfocite koji čine: RPMI sa dodatkom 10% FCS, 25 mM HEPES, 2 mM glutamina, 0,02 mM natrijum-piruvata, 1% streptomicina i penicilina (PAA Laboratories), 0,001% gentamicina (Galenika) i 5 μ M β-merkaptetanola (Fluka, Buh, Nemačka).

Pufer za liziranje za Western blot koji se sastoji od: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 50 mM ditiotreitola (DTT) i 10% glicerola (Sigma-Aldrich).

4× koncentrovani SDS pufer za nalivanje na gel za elektroforezu kojeg čine: 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% SDS, 20% glicerol, 0,2 M β-merkaptetanol i 0,004% bromfenol plavo.

Reagens C koji sadrži: 2% Na₂CO₃ sa dodatkom 0,1 M NaOH, 1% rastvor CuSO₄×5H₂O i 2% rastvor K-Na-tartarata.

Pufer za magnetne kuglice koji se sastoji od: PBS sa 0,5% BSA i 2 mM etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA, Sigma-Aldrich).

Prilikom izolacije ćelija iz lamine proprije tankog creva korišćeni su sledeći rastvori koji se sastoje od:

R1 rastvor: PBS sa dodatkom 2% FCS i 2,5 mM DTT.

R2 rastvor: PBS sa dodatkom 2% FCS i 5 mM EDTA.

R3 rastvor: RPMI sa dodatkom 10% FCS.

R4 rastvor: RPMI sa dodatkom 10% FCS, 0,2 U/ml Kolagenaze D i 0,1 mg/ml DNAze I.

Tripan plavo (BDSL, Velika Britanija); etanol, metanol, izopropanol, ksilol, vodonik-peroksid, hlorovodonična kiselina (HCl) (svi iz Zorka, Šabac, Srbija); natrijum dodecil sulfat (SDS) (Applichem, Darmstadt, Nemačka); Tris-HCl, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (svi iz Serva, Hajdelberg, Nemačka); pufer za lizu eritrocita, puferi za fiksaciju i permabilizaciju ćelija, supstrat za peroksidazu TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) (svi iz eBioscience, San Dijego, Kalifornija, SAD); reagens za izolovanje RNK (TRIzol), akutaza (svi iz Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD); parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska); Majerov hematoksin (Bio-Optica, Milano, Italija); lipopolisaharid (LPS), streptozotocin (STZ), kolagenaza V, kolagenaza D, perkol, ficol (Histopaque-®1077), hloroform, Tween-20, koktel inhibitora proteaza, indoksil-3 sulfat (I3S), dimetil sulfoksid (DMSO), DNAza I, 1-metil triptofan (1MT), Folin-Ciocalteu reagens, (svi iz Sigma-Aldrich), HBSS (engl. *Hanks' Balanced Salt Solution*) (Thermo Scientific, Braunšvajg, Nemačka).

3.2 Eksperimentalne životinje i humani uzorci

U svrhu ovog istraživanja korišćeni su mužjaci miševa soja C57BL/6, starosti između dva i tri meseca. Životinje su rođene i odgojene u životinjskom bloku Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, pri standardnim uslovima i stalnim pristupom vodi i hrani. Eksperimenti su odobreni od strane Etičke komisije (rešenje br. 119-01-4/11/2020-0) i vršeni su u skladu sa direktivom 2010/63/EU koja se tiče dobrobiti životinja korišćenih u naučnim istraživanjima.

U slučaju korišćenja humanih uzoraka, pristankom pacijenata koji je dokumentovan potpisom su dobijene tonzile i svi zahvati i procedure su obavljani u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobreni od strane Etičke komisije Kliničko-bolničkog centra "Zemun" (rešenje br. 14/1, datuma 27/09/2022).

3.2.1 Tretman miševa AHR modulatorom AGT-5

AGT-5 je sintetisan na Hemijskom odeljenju Univerziteta u Janjini, Grčka, pod rukovodstvom prof. Andreasa G. Tzakosa, a čijom ljubaznošću je dobijen u svrhu istraživanja imunomodulacijskih efekata ovog jedinjenja. Protokol po kojem je AGT-5 sintetisan je opisan u zajedničkom radu sa prof. Tzakosom (Jonić i sar., 2024).

AGT-5 je inicijalno rastvaran u DMSO, pa zatim u susamovom ulju (1% v/v), krajnje koncentracije 10 mg/kg telesne mase. Suspenzija AHR modulatora AGT-5 je davana miševima oralnom gavažom, 100 µl po životinji. U želji da se najpre ispita efekat AGT-5 na imunske ćelije, zdrave jedinice soja C57BL/6 su primale AGT-5 u trajanju od pet dana, dok je kontrolna grupa miševa istog soja dobijala uljanu emulziju koja je sadržala jednaku koncentraciju DMSO kao emulzija AGT-5. Svaka od pomenutih grupa je sadržala po pet životinja. Životinjama kojima je indukovana DT1 20 dana je davana suspenzija AGT-5 ili DMSO, počevši od prve doze streptozotocina. Svaka od pomenutih grupa je sadržala po pet životinja.

3.2.2 Indukcija dijabetesa tipa 1

DT1 je kod eksperimentalnih životinja indukovano intraperitonealnim injektiranjem pojedinačnih malih doza streptozotocina (STZ) u trajanju od pet uzastopnih dana.

STZ je, u dozi od 40 mg/kg telesne mase, neposredno pre injektiranja rastvaran u hladnom 0,1 M citratnom puferu (pH 6) u odgovarajućoj zapremini.

Parametri koji su praćeni tokom kliničkog toka DT1 su bili glikemijski indeks krvi i masa životinja. Nivoi glikemije su mereni pomoću glukometra (GlucoSure glucometer, Apex Biotechnology Group, Hsinšu, Tajvan), pri čemu je glikemija očitavana iz kapi krvi repne vene miša. Životinja je smatrana hiperglikemičnom ukoliko je koncentracija glukoze u krvi iznosila ≥ 11 mmol/l. Mase i nivoi glikemije životinja su mereni 1, 8, 12, 15, 18, 20, 22, 25. i 32. dana od prve doze streptozotocina.

3.3 Brojanje ćelija metodom bojenja tripan plavim

Broj ćelija u uzorcima je tokom istraživanja utvrđivan korišćenjem tripan plavog. Pomoću ove boje je moguće razlikovati žive od mrtvih ćelija usled sposobnosti tripan plavog da prodire u unutrašnjost ćelije ukoliko je ćelijska membrana narušena, što jeste slučaj sa mrtvim ćelijama, dok žive ćelije ostaju nebojene. Suspenzije ćelija su pomešane sa 0,1% rastvorom tripan plavog, u odnosu 1:1 ili 1:10 u zavisnosti od očekivanog prinosa ćelija, a potom su nalivene na komoru Bürker-Türk pločice i pod svetlosnim mikroskopom su izbrojane ćelije koje se nalaze isključivo u okviru izgraviranih polja na samoj pločici. Broj živih ćelija po mililitru uzorka je izračunat po formuli:

$$\frac{\text{broj izbrojanih ćelija}}{\text{broj polja}} \times (2,5 \text{ za razbl. } 1:10 \text{ ili } 0,5 \text{ za razbl. } 1:1) \times 10^6$$

3.4 Izolacija ćelija iz koštane srži miša

Nakon žrtvovanja životinja, izvršeno je vađenje femura jednog od donjih ekstremiteta, pri čemu je kost ostajala intaktnih krajeva. Femur je zatim premešten u petri šolju na ledu u kojoj se nalazio RPMI sa dodatkom 10% FCS, nakon čega su makazama odsecani krajevi femura. Potom je igla šprica napunjenog sa RPMI sa dodatkom 10% FCS ubodena u sredinu koštane šupljine kako bi se pod pritiskom sprao sav sadržaj iste u novu petri šolju u kojoj se nalazi RPMI sa dodatkom 10% FCS. Tako dobijena suspenzija je centrifugirana (550 g, 5 min) na sobnoj temperaturi (engl. room temperature, RT). Na dobijeni talog je dodat pufer za lizu eritrocita, a nakon 5 min inkubiranja reakcija je prekinuta dodavanjem RPMI sa dodatkom 10% FCS. Uzorak je propušten kroz mrežicu promera 70 μm (Falcon, Corning) i potom centrifugiran (550 g, 5 min). Ćelije su resuspendovane u medijumu za DĆ a zatim su postavljene u ploču radi *in vitro* diferencijacije u inkubatoru pri temperaturi 37°C i 5% CO₂.

3.5 Diferencijacija dendritskih ćelija *in vitro*

Nakon izolacije ćelija iz koštane srži miša, u ploču sa 24 bunara je postavljeno 1×10^6 ćelija po bunaru u zapremini od 1 ml, u koji je dodat faktor stimulacije rasta granulocita i monocita (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) u koncentraciji 20 ng/ml. Drugog dana od postavljanja ćelijske kulture je izvršena zamena polovine inicijalnog medijuma sa svežom količinom medijuma za dendritske ćelije uz dodat GM-CSF (40 ng/ml). Četvrtog dana su ćelije razdvojene usled prenamnožavanja i polovina istih iz svakog inicijalnog bunara je zasejana u nov bunar. U sve bunare je naknadno dodato 500 μ l svežeg medijuma za dendritske ćelije obogaćenog sa GM-CSF (40 ng/ml). Poslednja izmena medijuma je izvršena šestog dana, da bi sutradan ćelijskoj kulturi bio dodat bakterijski lipopolisaharid (engl. Lipopolysaccharide, LPS) kao stimulus za sazrevanje ćelija u finalnoj koncentraciji od 100 ng/ml. Dodavanje LPS u ćelijsku kulturu je bilo selektivno izostavljeno u zasebnom eksperimentu gde je ispitivan uticaj AGT-5 na ekspresiju Cyp11a1 u DĆ.

Radi testiranja uticaja AGT-5 na fenotipske karakteristike tako diferenciranih dendritskih ćelija, AGT-5 je testiran u dva navrata. Prvom prilikom je AGT-5, inicijalno rastvoren u DMSO, osmog dana dodat u ćelijsku kulturu u koncentraciji 0,75 μ M. Pored navedenog tretmana, u ćelijsku kulturu su u odgovarajuće bunare umesto AGT-5 dodavani I3S kao pozitivna kontrola ili DMSO kao negativna kontrola. Drugom prilikom je AGT-5 osmog dana dodat u ćelijsku kulturu u koncentraciji 0,75 μ M, sa ili bez stimulacije sa LPS. Nakon 24 h ćelije su odlepljivane sa ploče korišćenjem rastvora sa akutazom, inkubacijom 30 min. Reakcija je prekinuta dodavanjem medijuma koji je obogaćen sa FCS, nakon čega je suspenzija centrifugirana (550 g, 5 min, RT) i dobijeni talog je resuspendovan u medijumu za dendritske ćelije. Metodom protočne citofluorimetrije je u svim prikupljenim uzorcima utvrđivan fenotip dendritskih ćelija.

3.6 Izolacija ćelija peritonealne šupljine

Nakon eutanazije životinja korišćenjem CO₂, hladan PBS je injektiran u peritonealnu šupljinu u više navrata a potom sakupljan pipetom. Ukupna zapremina prikupljenog peritonealnog ispirka po životinji je iznosila okvirno 6 ml. Nakon centrifugiranja uzoraka (650 g, 5 min), supernatant je odliven, a talog sa ćelijama resuspendovan u ćelijskom medijumu.

3.7 Izolacija mononuklearnih infiltrata pankreasa

Pankreas je odstranjen nakon eutanazije životinja, prebačen u Petri šolju sa HBSS rastvorom sa 10% FCS, a onda usitnjen makazama na komade veličine otprilike 1 mm. Nakon pažljivog uklanjanja rastvora, tkivo je prebačeno u HBSS sa dodatkom 10% FCS koji sadrži kolagenazu V (2 mg/ml). Radi enzimske razgradnje pomenutog tkiva, uzorci su mućkani u vodenom kupatilu na 37°C, 15 min. Reakcija

je prekinuta dodavanjem PBS sa 3% FCS, nakon čega su uzorci centrifugirani (300 g, 10 min). Dobijeni talog je resuspendovan u RPMI sa dodatkom 5% FCS i suspenzija je pažljivo naslojena na fikol u odnosu 1:1. Nakon centrifugiranja (700 g, 20 min, bez ubrzanja i kočenja), pažljivo je sakupljen prsten mononuklearnih ćelija koji se formirao na granici između fikola i suspenzije. Dobijeni uzorci su isprani centrifugiranjem uzoraka u ćelijskom medijumu najpre na brzini od 650 g, a zatim na brzini od 600 g, po 5 min. Tako dobijen talog je finalno resuspendovan u ćelijskom medijumu.

3.8 Izolacija ćelija mezenteričnih i pankreasnih limfnih čvorova

Nakon žrtvovanja životinja, izvađeni su mezenterični ili pankreasni limfni čvorovi. Očišćeni su od masti, a potom stavljeni u PBS sa 5% FCS, propušteni kroz mrežicu od 70 µm i tako dobijena suspenzija sa ćelijama je centrifugirana (550 g, 5 min). Dobijeni talog je resuspendovan u ćelijskom medijumu.

3.9 Izolacija ćelija lamine proprije tankog creva

Nakon što su životinje eutanazirane, odstranjeno im je celokupno tanko crevo i stavljeno u PBS. Crevo je zatim očišćeno od masti i vezivnog tkiva, kao i sadržaja koji se nalazio u njemu. Nakon uklanjanja Pejerovih ploča, crevo je najpre rasečeno uzdužno, a potom usitnjeno na manje komade (dužine oko 1 cm). Tako pripremljeno tkivo je isprano nekoliko puta u PBS, a zatim preneto u erlenmajer uz sukcesivno menjanje niza rastvora (R1-R4). Najpre je sipan R1 i erlenmajer je stavljen na mešanje u orbitalni šejker (250 rpm, 20 min, 37°C) kako bi se uklonio sav preostali sadržaj creva i mukusa. Korak je zatim ponovljen tri puta sa R2 u orbitalnom šejkeru (250 rpm, 15 min, 37°C), pri čemu se na ovaj način odstranjuju epitelne ćelije. Nakon toga je tkivo isprano u R3 u orbitalnom šejkeru (250 rpm, 10 min, 37°C). Naposletku, tkivo je preneto u R4 i stavljeno u orbitalni šejker (350 rpm, 45 min, 37°C) radi odvijanja enzimske reakcije čijom je aktivnošću došlo do razgradnje tkiva. Nakon toga tkivo je propušteno kroz mrežicu (70 µm) i enzimska reakcija je prekinuta dodatkom R2 u višku. Tako dobijena suspenzija je centrifugirana (600 g, 5 min), a dobijeni talog je ispran još jedanput (600 g, 5 min) i finalno resuspendovan u 40% perkolu i naslojen na 80% perkol. Naslojeni uzorci su centrifugirani bez kočenja i ubrzanja (2000 rpm, 20 min) posle čega je formiran prsten ćelija koji je pokupljen i prebačen u epruvetu sa R3. Suspenzija ćelija je centrifugirana dva puta (600 g, 5 min) i dobijeni talog je resuspendovan u ćelijskom medijumu.

3.10 Izolacija ćelija humanih tonzila

Dobijena tkiva humanih tonzila su najpre propuštena kroz mrežicu (70 μm) u ćelijskom medijumu. Tako obrađeno tkivo je centrifugirano (380 g, 10 min), a na dobijen talog je sipan pufer za lizu eritrocita na 5 min. Reakcija je prekinuta dodavanjem ćelijskog medijuma, nakon čega su uzorci centrifugirani (380 g, 10 min). Dobijene ćelije su finalno resuspendovane u ćelijskom medijumu.

3.11 Izolacija CD4⁺ T limfocita

3.11.1 Selekcija CD4⁺ T limfocita magnetnom separacijom

Suspenzija ćelija dobijena iz mezenteričnih limfnih čvorova je centrifugirana (550 g, 5 min), a zatim je talog resuspendovan u PBS sa 3% FCS. Takva suspenzija ćelija je potom inkubirana sa anti-mišjim CD4 antitelom koje je konjugovano sa biotinom (1:60, eBioscience). Nakon pranja sa PBS, uzorak je inkubiran sa streptavidinom-obloženim magnetnim kuglicama (1:20, BD IMag Streptavidin Particles Plus-DM, BD Biosciences, Bedford, Masačusets, SAD, 30 min, 4°C) u puferu za magnetne kuglice. Po isteku inkubacije željena CD4⁺ ćelijska frakcija je izolovana korišćenjem magnetna za separaciju (BD IMag Cell Separation Magnet, BD Biosciences), pri čemu je ovaj korak ponovljen tri puta. Princip selekcije se zasniva na privlačenju pozitivne ćelijske frakcije (koja je vezana za magnetne kuglice zahvaljujući interakciji između streptavidina i biotina) magnetnim poljem magnetna, tako da ona ostaje uz sam zid endorf tube, dok negativna ćelijska frakcija nakon tri ponavljanja biva odbačena. Naposletku, ćelije su resuspendovane u medijumu za T limfocite, a zatim stimulisane sa potpunim stimulacionim koktelom kojeg su činili anti-CD3 antitelo kojim su prvo obloženi bunari (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, eBioscience) i anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Thermo Scientific) antitelo dodato u ćelijski medijum. T limfociti koje su korišćene u svrhu izolovanja proteina je, pored anti-CD3 i anti-CD28 antitela, u medijumu dodat IL-2 (10 ng/ml, R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD) i TGF- β (2 ng/ml, R&D Systems). Nakon 4 h, ćelije su tretirane AGT-5 (1,5 μM) ili DMSO (0,0025% v/v) i inkubirane 24 h. Ćelije su potom centrifugirane (550 g, 5 min) i finalno resuspendovane u trizolu.

3.11.2 Sortiranje CD4⁺ T limfocita protočnom citofluorimetrijom

Ćelije iz mezenteričnih limfnih čvorova su inkubirane sa anti-CD4-FITC antitelom ili anti-CD4-eF450 i anti-CD25-Alexa FluorTM 488 antitelima koja su rastvorena u PBS sa dodatkom 1% BSA, 30 min, 4°C. Sortiranje naivnih (CD4⁺CD25⁻) odnosno aktiviranih T limfocita (CD4⁺CD25^{high}) je izvršeno pomoću FACS Aria III (BD Biosciences). Dobijene populacije su korišćene u *in vitro* ispitavanju efekata AGT-5.

3.12 Određivanje vijabilnosti ćelija MTT metodom

Peritonealni makrofagi su korišćeni za inicijalno testiranje uticaja AGT-5 na vijabilnost ćelija. Suspenzija ćelija je postavljena u ploču sa 96 bunara (25×10^4 ćelija/bunaru), gde su nakon 2 h na 37°C makrofagi adherirali za dno ploče. Nakon odbacivanja supernatanta, adherirane ćelije su kultivisane sa različitim koncentracijama AGT-5 (0,19 μM , 0,37 μM , 0,75 μM i 1,5 μM) ili DMSO (v/v) rastvorenim u RPMI sa dodatkom 5% FCS, 37°C . Nakon 4 h ili 24 h, medijum je uklonjen i na ćelije je dodat rastvor 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) koncentracije 0,5 mg/ml u PBS. Tokom inkubacije (30 min, 37°C) dolazi do redukcije MTT pomoću mitohondrijskih oksidoreduktaza i stvaranja formazana, ljubičaste boje, nakon čega je rastvor uklonjen i sipan je DMSO. Optička gustina uzoraka kao indikator vijabiliteta je očitana pomoću BioTek Synergy H1 spektrofotometra (BioTek, Svindon, Ujedinjeno Kraljevstvo), na talasnoj dužini od 540 nm, uz merenje na 670 nm koje služi za korekciju vrednosti očitanih na 540 nm.

3.13 Analiza protočnom citofluorimetrijom

Protočna citofluorimetrija je korišćena radi fenotipizacije ćelija od interesa detekcijom površinskih i unutarćelijskih markera, dok je za sortiranje željenih populacija korišćena FACS (engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) tehnologija. Uzorci su očitavani pomoću FACS Aria III (BD Biosciences). Rezultati dobijeni ovom metodom su analizirani korišćenjem FlowJo softvera (Treestar, Ešlend, SAD), tumačenjem dobijenih fluorescentnih signala koji odgovaraju markerima od interesa na pojedinačnim ćelijama koje su prethodno bile izložene specifičnim antitelima konjugovanim sa fluorescentnom bojom. Svaki uzorak je sadržao $0,5-1 \times 10^6$ ćelija, a pored obojenih uzoraka su korišćeni i uzorci inkubirani sa odgovarajućim izotipskim kontrolama radi potvrde specifičnosti vezivanja primarnog antitela. Dodatno, kao negativne kontrole su služili uzorci u kojima su ćelije prolazile kroz isti protokol ali uz izostanak inkubacije sa antitelima. Prilikom analize su isključivane splepljene ili mrtve ćelije. Dobijeni signali su predstavljeni kao procenat ciljnih ćelija koji je uspešno vezao odgovarajuće antitelo.

3.13.1 Detekcija površinskih ćelijskih markera

U svrhu detekcije površinskih molekula, uzorci su inkubirani sa odgovarajućim anti-mišjim (Tabela 1) ili anti-humanim (Tabela 2) antitelima u PBS sa dodatkom 1% BSA (30 min, 4°C).

Tabela 1. Korišćena anti-mišja antitela specifična za površinske ćelijske markere u citofluorimetrijskoj analizi uzoraka.

Antitelo	Fluorofora	Izotipska kontrola	Proizvođač
CD45	PE Cy7	IgG2b κ lanac iz pacova	Invitrogen
Koktel antitela hematopoetske linije	FITC	Pacov	
CD127	APC-eFluor™780	IgG2a κ lanac iz pacova	
CD4	eFluor™506	IgG2a κ lanac iz pacova	
CD4	PE-Cy7	IgG2b κ lanac iz pacova	
CD4	eFluor™450	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
CD4	FITC	IgG2b κ lanac iz pacova	
CD8	APC-eFluor™780	IgG2a κ lanac iz pacova	Invitrogen
CD25	PE	IgG1 λ lanac iz pacova	
CD25	Alexa Fluor™488	IgG1 λ lanac iz pacova	eBioscience
CD25	APC-eFluor™780	IgG1 λ lanac iz pacova	Invitrogen
CYP1A1	/	IgG iz zeca	
CD11b	Alexa Fluor™488	IgG2b κ lanac iz pacova	
CD11b	APC Cy7	IgG2b κ iz pacova	
CD11c	eFluor™506	IgG iz jermenskog hrčka	
CD11c	PE-Cy5.5	IgG iz jermenskog hrčka	
CTLA-4	FITC	IgG1 iz jermenskog hrčka	eBioscience
PD-1	FITC	IgG1 iz jermenskog hrčka	
CD80	FITC	IgG iz jermenskog hrčka	Invitrogen
CD86	PE-Cy5	IgG2a κ lanac iz pacova	
CD40	APC	IgG2b κ lanac iz pacova	

CD40	PE	IgG2a κ lanac iz pacova	eBioscience
F4/80	Alexa Fluor™488	IgG2a κ lanac iz pacova	
MHC II	APC-eFluor™780	IgG2b κ lanac iz pacova	Invitrogen
CD39	PE-eFluor™510	IgG2b κ lanac iz pacova	
CD39	PE-Cy7	IgG2b κ lanac iz pacova	eBioscience
CD73	PerCP-eFluor™710	IgG1 iz pacova	
CD73	PE-Cy7	IgG1 iz pacova	Invitrogen
CD103	PE	IgG iz jermenskog hrčka	
CD103	PE/Dazzle™594	IgG iz jermenskog hrčka	BioLegend, San Dijego, Kalifornija, SAD
CD206	APC	IgG2a κ lanac iz pacova	
Anti-zečje IgG (H+L) sekundarno antitelo	Alexa Fluor™488	Koza	Invitrogen
Anti-zečje IgG (H+L) sekundarno antitelo	Alexa Fluor™488	Magarac	Abcam, Kembridž, Velika Britanija
Anti-mišje sekundarno antitelo	Alexa Fluor™488	Magarac	

Tabela 2. Korišćena anti-humana antitela specifična za površinske ćelijske markere u citofluorimetrijskoj analizi uzoraka.

Antitelo	Fluorofora	Poreklo	Proizvođač
CD80	FITC	IgG1 κ lanac iz miša	Invitrogen
CD86	PE-Cy5	IgG2b κ lanac iz miša	
Koktel anitela hematopoetske linije	eFluor™450	Miš	

CD25	PE	IgG1 κ lanac iz miša	eBioscience
CD4	APC-eFluor™780	IgG1 κ lanac iz miša	
CD117 (c-Kit)	PE-Cy5	IgG2b κ lanac iz pacova	Invitrogen
CD127	APC-eFluor™780	IgG2a κ lanac iz pacova	
CD294 (CRTH2)	APC	IgG2a κ lanac iz pacova	
ILT3	PE	IgG1 κ lanac iz miša	
HLA-DR	APC-Cy7	IgG2a κ lanac iz miša	BioLegend
CD83	Biotin	IgG1 κ lanac iz miša	MACS, Miltenyi Biotec, San Dijego, Kalifornija, SAD

3.13.2 Detekcija unutarćelijskih citokina i unutarjedarnih proteina

U svrhu detekcije unutarćelijskih citokina i unutarjedarnih proteina, ćelije su permeabilizovane preko noći na 4°C korišćenjem seta pufera iz seta za bojenje Foxp3/transkripcionih faktora (eBioscience). Sutradan su uzorci inkubirani sa željenim antitelima (Tabela 3) koja su rastvorena u puferu za permeabilizaciju (30 min, 4°C).

Tabela 3. Korišćena anti-mišja antitela specifična za unutarćelijske citokine i unutarjedarne proteine u citofluorimetrijskoj analizi uzoraka.

Antitelo	Fluorofora	Poreklo	Proizvođač
Foxp3	PE	IgG2a κ lanac iz pacova	Thermo Fischer Scientific
Foxp3	APC	IgG1 κ lanac iz pacova	Invitrogen
Foxp3	PE-Cy5.5	IgG2a κ lanac iz pacova	
RORγt	PE	IgG2a κ lanac iz pacova	
Granzim B	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	

IDO1	FITC	IgG2b κ lanac iz pacova	Thermo Fischer Scientific
IFN-γ	APC	IgG1 κ lanac iz pacova	
IFN-γ	PE	IgG1 κ lanac iz pacova	
IL-17	PerCP-Cy5.5	IgG2a κ lanac iz pacova	
IL-17	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	
IL-2	eFluor™450	IgG2b κ lanac iz pacova	
IL-22	APC	IgG2a κ lanac iz pacova	
IL-10	PE	IgG2b κ lanac iz pacova	
IL-10	FITC	IgG2b κ lanac iz pacova	
Ki-67	FITC	IgG2a κ lanac iz pacova	

3.14 Test proliferacije

Ćelije humanih tonzila su inkubirane sa karboksifluorescein sukcinimidil estrom (CFSE, Thermo Fischer Scientific) u koncentraciji 1 μM (15 min, 37°C). Ćelije su isprane dva puta sa PBS i potom postavljene u ploču od 96 bunara sa U dnom u medijumu za T limfocite, uz prisustvo rastućih koncentracija AGT-5 (0,19, 0,37 i 0,75 μM) ili DMSO. Nakon 48 h, CFSE⁺ ćelije su detektovane pomoću FACS Aria III.

3.15 Izolovanje RNK

Uzorcima liziranim u trizolu je dodato 100 μl hladnog hloroforma i nakon inkubacije (3 min, RT), uzorci su centrifugirani (12000 g, 20 min, 4°C), nakon čega su se izdvojile dve faze - bezbojna faza u kojoj se nalazi RNK i obojena faza u kojoj se nalaze proteini, a između njih je prsten koji je sačinjen od DNK. Pipetom je pažljivo prikupljena bezbojna faza i pomešana sa 400 μl hladnog izopropanola uz naknadno vorteksiranje, a potom su uzorci ostavljeni na -20°C na 15 min, pa centrifugirani (12000 g, 20 min, 4°C). Talog je resuspendovan u 800 μl 70% etanola i ponovo centrifugiran (12000 g, 10 min, 4°C). Pre dalje manipulacije je uklonjen sav etanol iz uzoraka, a talozi su potom rastvoreni u 11 μl vode bez nukleaza (engl. RNase Free Water, Sigma-Aldrich). Koncentracija RNK u uzorcima je utvrđivana postavljanjem 1 μl uzorka u NanoDrop One spektrofotometar (Thermo Scientific) sa zadatim programom za određivanje koncentracije RNK.

3.16 Reakcija reverzne transkripcije

Metodom reakcije reverzne transkripcije je izolovana RNK prevedena u komplementarnu DNK (cDNK). U zavisnosti od dostupne količine dobijene RNK, uzeto je između 1-2 µg RNK od svakog uzorka a potom je dodato vode bez nukleaza do postizanja ukupne zapremine od 11,5 µl po uzorku. U svaki uzorak je potom dodat 1 µl nasumičnih prajmera (Fermentas, Viljus, Litvanija) nakon čega su uzorci ostavljeni 5 min u mašini za reverznu transkripciju (VWR, Vestčester, Pensilvanija, SAD) čija je unutrašnjost dostigla 70°C. Uzorci su onda ohlađeni na ledu i u svaki uzorak je dodato 4 µl petostruko koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju, 0,5 µl inhibitora RNaze, 2 µl 10 mM smeše dezoksiribonukleotid-trifosfata i 1 µl reverzne transkriptaze (sve je iz Fermentas). Uzorci su vraćeni u mašinu za reverznu transkripciju – najpre 10 min na 25°C, a zatim 1 h na 42°C. Reakcija je prekinuta povećanjem temperature na 70°C u trajanju od 10 min, dok je separacija nosintetisanih lanaca cDNK izvršena na 95°C u toku 3 min. Dobijeni uzorci cDNK su se čuvali na 4°C do dalje upotrebe.

3.17 Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Analiza relativne promene u transkripciji gena od interesa izvršena je metodom kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR). Najpre je u bunare ploče za qPCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Vulston, Velika Britanija) dodavana reakciona smeša koju su sačinjavali 1 µl odgovarajućih prajmera (Forward, sekvence 5'-3', i Reverse, sekvence 3'-5') za gen od interesa ili za referentni gen (β-aktin) (Tabela 4), 2 µl sterilne vode i 5 µl SYBR Green/ROX (Metabion, Štajnkirhen, Nemačka). Pre dodavanja 2 µl uzorka željene cDNK po bunaru, uzorci su razblaživani vodom u odnosu 1:5. Svaki uzorak je sipan u duplikatu, nakon čega je ploča pokrivena optičkom adhezivnom folijom (Applied Biosystems) i centrifugirana (1000 g, 1 minut). Nakon postavljanja ploče u termoblok aparata za RT-qPCR (Applied Biosystems, Vulston, Ujedinjeno Kraljevstvo), pokretan je program za amplifikaciju koji se sastoji od sledećih koraka: 10 min na 50°C, 10 min na 95°C, a zatim sledi 40 ciklusa koji su podrazumevali 15 s na 95°C i 1 min na 60°C. Dobijeni rezultati su analizirani pomoću odgovarajućeg programa (7500 System Software, Thermo Fisher Scientific) koji je snabdeven od strane proizvođača aparata za RT-qPCR. Nivoi relativne ekspresije svih gena od interesa su standardizovani u odnosu na ekspresiju gena za β-aktin ili GAPDH iz istih uzoraka, pri čemu su nivoi relativne ekspresije izraženi kao $2^{-(C_{ti}-C_{ta})}$, gde se C_{ti} odnosi na C_t vrednost gena od interesa, dok je C_{ta} dobijena C_t vrednost gena za β-aktin ili GAPDH.

Tabela 4. Korišćeni parovi prajmera za amplifikaciju gena RT-qPCR metodom.

Gen	Vrsta	Sekvenca 5'-3'	Sekvenca 3'-5'
<i>Cyp11a1</i>	Miš	CAGACCTCAGCTGCCCTATC	TAACCTGCCACTGGTTCACA
<i>β-actin</i>	Miš	GACCTGACAGACTACC	GGCATAGAGGTCTTTACGG

<i>AHR</i>	Čovek	CAAATCCTTCCAAGCGGCATA	CGCTGAGCCTAAGAAGCTGAAAG
<i>AHRR</i>	Čovek	GCGCCTCAGTGTCAGTTACC	CTCCTGCACGACTTGGGAAGAA
<i>CYP1A1</i>	Čovek	ACATGCTGACCCTGGGAAAG	GGTGTGGAGCCAATTCGGAT
<i>CYP1B1</i>	Čovek	GGGACCGTCTGCCTTGTATG	GGTGGCATGAGGAATAGTGACA
<i>GAPDH</i>	Čovek	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

3.18 Western blot

Detekcija proteina je izvršena pomoću Western blot metode. Protokol pripreme uzoraka za Western blot je prilagođavan shodno potrebi za izolacijom RNK, stoga su korišćena dva različita pristupa pripreme uzoraka.

3.18.1 Izolovanje proteina iz peritonealnih makrofaga

Izolovani peritonealni makrofagi su postavljeni u ploču od 24 bunara, 2×10^6 ćelija po bunaru u ćelijskom medijumu. Nakon 2 h na 37°C makrofagi su adherirali za dno ploče i medijum u kome su ostale neadherirane ćelije je uklonjen, a onda su makrofagi inkubirani 4 h sa AGT-5 ($1,5 \mu\text{M}$), I3S ($1,5 \mu\text{M}$), ili sa DMSO (0,005% v/v). Po isticanju inkubacije, ćelije su isprane hladnim PBS i dodat je pufer za liziranje ćelija. Lizat ćelija je potom sakupljen i homogenizovan pomoću šprica i igle. Ovakav uzorak se kuvao 5 min, a zatim centrifugirao (20000 g, 20 min, 4°C). Nakon centrifugiranja su sakupljeni supernatanti u kojima se nalaze proteini.

3.18.2 Izolovanje proteina iz CD4^+ T limfocita

Izolacija proteina poreklom iz CD4^+ T limfocita deli početne korake sa protokolom za izolaciju RNK. Nakon centrifugiranja uzoraka u trizolu sa hladnim hloroformom, na prikupljenu obojenu frakciju je dodato 600 ul acetona i usledilo je centrifugiranje (12000 g, 10 min, 4°C). Talog je resuspendovan u rastvoru 95% etanola koji sadrži 0,3 M guanidin hidrohlorida i 2,5% glicerola. Dobijeni talog je razbijen pomoću sonifikatora (ASTM E1979-21, ASTM International, Vest Konšohoken, Pensilvanija, SAD) Tako dobijena suspenzija je najpre inkubirana 10 min, RT, a zatim centrifugirana (8000 g, 5 min, 4°C). Talog je ponovo resuspendovan sa rastvorom 95% etanola koji sadrži 0,3 M guanidin hidrohlorida i 2,5% glicerola i ovi koraci su ponovljeni tri puta. Uzorci su naposljetku isprani u rastvoru 95% etanola koji sadrži 2,5% glicerola centrifugiranjem (8000 g, 5 min, 4°C). U poslednjem koraku je sav etanol uklonjen iz uzorka i talog je resuspendovan u puferu za liziranje ćelija sa dodatim inhibitorima proteaza.

3.18.3 Utvrđivanje koncentracije proteina pomoću Lowry metode

Kako bi se obezbedilo nalivanje uniformne količine proteina na gel, koncentracija proteina u uzorcima je određivana pomoću Lowry metode. Zarad dobijanja standardne krive, pripremljen je niz koncentracija BSA (1000, 850, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100 µg/ml), dok je voda služila kao negativna kontrola. Sve koncentracije BSA su tretirane na isti način kao i uzorci. Uzorci su razblaženi 10 puta. Naredni korak je bilo dodavanje po 300 µl reagensa C, nakon čega su svi uzorci vorteksovani i inkubirani 15 min, RT. Potom je dodato po 60 µl pet puta razblaženog Folin-Ciocalteu reagensa. Uzorci su vorteksovani i inkubirani 30 min, RT, do razvijanja plave boje. Nakon inkubacije svi uzorci su naliveni u ploču od 96 bunara, 100 µl po bunaru, u triplikatu. Optička gustina je izmerena na BioTek Synergy H1 spektrofotometru, na talasnoj dužini od 670 nm. Od dobijenih vrednosti niza opadajućih koncentracija, dobijena je standardna kriva pomoću koje je određivana koncentracija proteina u uzorcima na osnovu njihove optičke gustine.

3.18.4 Elektroforeza i transfer proteina na membranu

Na osnovu dobijenih koncentracija proteina u uzorcima, adekvatna količina istih je pomešana sa četiri puta koncentrovanim SDS puferom za nalivanje na SDS-poliakrilamidni gel, u odnosu 3:1. Tako spremljeni uzorci su kuvani 5 min, ohlađeni i naliveni na 8% SDS-poliakrilamidni gel, nakon čega je puštena elektroforeza. Zatim je izvršen transfer proteina sa gela na polivinil-difluoridnu membranu pomoću polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka) uz puštanje struje jačine 5 mA/cm² gela. Nakon transfera, membrana je inkubirana u PBS sa dodatkom 0,1% Tween-20 (PBSTw) i 5% BSA (1 h, RT) kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela. Potom je membrana inkubirana preko noći sa primarnim antitelom specifičnim za ciljni protein rastvorenim u PBSTw sa 1% BSA, na 4°C. Sutradan je membrana inkubirana sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom iz rena (engl. *Horse Radish Peroxidase*, HRP) koje je specifično za konstantni deo primarnog antitela (1 h, RT). U paru sa primarnim antitelima specifičnim za mišji STAT-3 (1:750, Cell Signalling Technology, Danvers, Masačusets, SAD), fosforilisanu formu STAT-3 (1:1000, Invitrogen), CYP1A1 (1:750, Invitrogen) i β-aktin (1:1000, Abcam) koji su proizvedeni u zecu, korišćeno je sekundarno antitelo specifično za zečji IgG konjugovano sa HRP proizvedeno u kozi (1:5000, Invitrogen). Membrana je ispirana sa PBSTw u ponavljanju od pet puta po 5 min, pre i posle svake inkubacije kako bi se uklonila nevezana antitela.

3.18.5 Detekcija proteina

Dobijanje signala je postignuto inkubacijom membrane sa Immobilon hemiluminiscentnim supstratom za HRP (Millipore, Bilerika, Masačusets, SAD), nakon čega je detekcija signala izvršena pomoću iBright FL1500 Imaging System spektrofotometra (Invitrogen), a dobijene proteinske trake su

analizirane pomoću iBright softverskog programa. Relativna produkcija specifičnih proteina je izražavana u odnosu na produkciju njihove ukupne proteinske forme ili u odnosu na produkciju β -aktina.

3.19 Primena metode ELISA

3.19.1 Merenje produkcije citokina metodom ELISA

Diferencirane dendritske ćelije su inkubirane 24 h sa LPS (10 ng/ml), LPS i AGT-5 (0,75 μ M) ili LPS u kombinaciji sa AGT-5 (0,75 μ M) i 1MT (0,5 mM), nakon čega su sakupljeni supernatanti iz ćelijske kulture i određivana je koncentracija citokina IL-10 i TNF u njima.

ELISA test za svaki od pomenutih citokina je urađen po protokolu koji je obezbedio proizvođač (R&D Systems), kao i uz korišćenje parova antitela iz ELISA setova. Najpre su bunari MaxiSorp ploče (Nunck, Roskilde, Danska) obloženi primarnim antitelom rastvorenim u PBS preko noći, na 4°C. Nakon inkubacije su bunari isprani sa PBS sa 0,05% Tween-20 tri puta zarad uklanjanja viška nevezanih antitela, pri čemu je ovaj rastvor korišćen u svim ostalim pranjima. Kako bi se blokirala mesta nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela, u bunare je sipan PBS sa dodatkom 10% FCS na 1 h, nakon čega je usledilo pranje tri puta. Uzorci i serije razblaženja citokina od interesa poznatih koncentracija su naliveni u odgovarajuće bunare. Po završetku 2 h inkubacije, RT, bunari su isprani tri puta i potom je dodato odgovarajuće sekundarno antitelo konjugovano sa biotinom na 1 h, RT. Zatim su bunari isprani tri puta i u bunare je sipan avidin konjugovan sa HRP (eBioscience). Po isteku inkubacije od 30 min, bunari su isprani tri puta. U bunare je dodat supstrat za peroksidazu (TMB, eBioscience) i uzorci su inkubirani do pojave plave boje, nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom 1 M HCl. Optička gustina uzoraka i serije poznatih koncentracija citokina od interesa je očitana pomoću BioTek Synergy H1 spektrofotometra, na talasnoj dužini od 450 nm, uz korektivnu talasnu dužinu od 540 nm. Na ovaj način je dobijena i standardna kriva pomoću koje je izračunavana koncentracija željenog citokina u uzorcima.

3.19.2 Merenje prisustva insulina metodom ELISA

U svrhu kvantitativnog određivanja insulina u serumu tretiranih naspram kontrolnih miševa korišćen je ELISA set specifičan za insulin (MercoDIA AB, Upsala, Švedska). Svi neophodni reagensi su snabdeveni u okviru samog seta. Serum je sakupljen u obliku supernatanta nakon centrifugiranja krvi dobijene punkcijom periorbitalne vene miševa (2000 g, 10 min, 4°C).

Dobijeni uzorci i serija kalibracionih rastvora poznate koncentracije, koji su dobijeni u okviru ELISA seta, su naliveni u duplikatu u bunare obložene anti-insulinskim antitelom. Ploča je onda inkubirana sa enzimskim konjugatom na šejkeru (700 rpm, 2 h, RT). Nakon tri ispiranja, u bunare je naliven TMB supstrat (15 min, RT), a reakcija je zaustavljena sa 1 M HCl. Optička gustina sadržaja

bunara je očitana pomoću BioTek Synergy H1 spektrofotometra na 450 nm, uz korektivnu talasnu dužinu na 670 nm. Koncentracija insulina u uzorcima je izračunata preko standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbancije serija kalibracionih rastvora poznatih koncentracija.

3.20 Histološka analiza

3.20.1 Priprema histoloških preparata u parafinu

Nakon eutanazije životinja, pankreas je odstranjen i prebačen u pufervisani 4% formaldehid na 48 h. Nakon toga je sproveden kroz seriju rastućih koncentracija etanola: dve izmene od po 30 min u 30% etanolu, dve izmene od po 30 min u 50% etanolu, dve izmene od po 30 min u 70% etanolu, dve izmene od po 1 h u 96% etanolu i dve izmene od po 1 h u 100% etanolu. Nakon etanola, tkiva su prebačena u ksilol u dva navrata po 3 min, a zatim su preneti u parafin na 1 h u termostatu na 58°C. Uzorci su onda prebačeni u drugi set parafina u termostatu na 15 min, nakon čega su ostavljeni preko noći na RT. U sledećem koraku, uzorci su vraćeni u termostat kako bi se parafin otopio a tkiva prenela u kalupe sa finalnim parafinom, nakon čega su ostavljena na RT. Preseci tako ukalupljenog tkiva debljine 5 µm su napravljeni pomoću mikrotoma Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka), dok je razmak između pojedinačnih preseka iznosio 100 µm. Preseci su postavljeni na SuperFrost predmetna stakla (Thermo Scientific).

3.20.2 Bojenje tkivnih isečaka hematoksilinom

Kako bi tkivo bilo dostupno za interagovanje sa izabranim bojama, izvršena je deparafinizacija tako što su predmetna stakla sa presecima uranjana najpre u ksilol u dva navrata od po 2 min, a zatim u set opadajućih koncentracija etanola (100%, 96%, 70%), pri čemu su preseci u svakoj držani po 5 min. Naposljetku su uzorci ostavljeni u destilovanoj vodi nas 5 min radi potpune rehidracije tkiva. Predmetna stakla su onda ostavljena u hematoksilinu 7 min, pa prebačena u posudu sa tekućom vodom 3 min. Kao poslednji korak, Biomount aqua medijum za prekrivanje mikroskopskih preparata (Biognost, Zagreb, Hrvatska) je nakapavan oko tkiva i preko je prislonjeno pokrovno staklo. Tako pripremljeni preseci su posmatrani na Leica svetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems GmbH) pomoću kojeg su napravljene mikrografije na 20× uveličanju. Posmatrana pankreasna ostrvca su grupisana u tri različite kategorije:

- Zdrava – imunske ćelije nisu prisutne oko ili u pankreasnom ostrvcu,
- Periinsulitis – imunske ćelije se nalaze po obodu pankreasnog ostrvca i započele su prodiranje u isto,
- Insulitis – primetne su nakupine imunskih ćelija u okviru samog ostrvca koje je ujedno izgubilo svoju homogenu strukturu.

3.20.3 Imunohistohemija

U svrhu merenja prisustva insulina u ostrvcima pankreasa, najpre je bilo neophodno demaskirati antigen što je učinjeno inkubiranjem preseka tkiva u 10 mM citratnom puferu (pH 6) sa 0,05% Tween-20 (tri puta po 8 min) u mikrotalasnoj pećnici na 80% snage. Nakon hlađenja preseka, uranjani su u metanol sa 0,1% H₂O₂ u trajanju od 20 min kako bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze i finalno su stavljeni u PBS. Na demaskirane preseke tkiva je dodato 600 µl antitela specifičnog za insulin proizvedeno u zecu koje je konjugovano sa FITC fluorescentnom bojom (1:400, Cell Signaling Technology). Preseci su inkubirani sa antitelom u vlažnoj komori u trajanju od 1 h, u mraku, na 4°C. Preseci su nakon završene inkubacije ispirani sa PBS u tri navrata po 5 min kako bi se uklonio višak antitela. Nakon ispiranja su jedra na tkivnim presecima bojena Hoechst 33342 bojom (2 µl/ml, ChemoMETEC, Alerod, Danska) tokom 10 min, a zatim su pločice opet isprane u PBS (tri puta po 5 min). Kako bi se kvantifikovalo prisustvo insulina u Langerhansovim ostrvcima, napravljene su mikrografije pankreasnih ostrvaca pomoću AxioVision mikroskopa (Carl Zeiss Meditec AG, Nemačka). Dobijene mikrografije su analizirane u Fiji programu gde su im boje najpre konvertovane u paletu sivih boja, a potom je intenzitet fluorescencije kvantifikovan utvrđivanjem srednje vrednosti sive boje (engl. *mean gray value*) koja predstavlja skup svih vrednosti sivih piksela unutar zadate oblasti od interesa koji se deli sa ukupnim brojem piksela.

3.21 Analiza statističkih podataka

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti između grupa je utvrđena korišćenjem Studentovog t-testa. Ukoliko je vrednost parametra p bila manja od 0,05, razlika između srednjih vrednosti je smatrana statistički značajnom. Statističke analize su obavljene korišćenjem softverskog programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Hoja, Kalifornija, SAD).

4. Rezultati

4.1 Ispitivanje efekata AGT-5 na vijabilnost, proliferaciju i diferencijaciju imunskih ćelija *in vitro*

AGT-5 je novosintetisan molekul koji je dizajniran kao AHR ligand. Usled činjenice da su njegovi efekti na žive organizme nepoznati, bilo je neophodno ispitati ih primenom u ćelijskoj kulturi *in vitro*.

Zarad utvrđivanja njegove mogućnosti da se vezuje za AHR, korišćene su reporterske ćelijske linije za AHR, Caco2 (humana ćelijska linija epitelnih ćelija raka debelog creva) i THP-1 (humana ćelijska linija izvedena iz perifernih mononuklearnih ćelija krvi) (Lozza i sar., 2019; Puyskens i sar., 2020). Pri aktivaciji AHR u ovim ćelijskim linijama dolazi do transkripcije proteina CYP1A1, što posledično dovodi do sinteze luciferaze (Richards i sar., 1999). Nakon 24 h inkubacije Caco2 ćelija sa rastućim koncentracijama AGT-5 (0,3 μM – 7,5 μM), povećana luciferazna aktivnost u odnosu na DMSO je zabeležena pri primeni svih koncentracija AGT-5. Na ovaj način je dokazana njegova sposobnost da aktivira AHR (Jonić i sar., 2024).

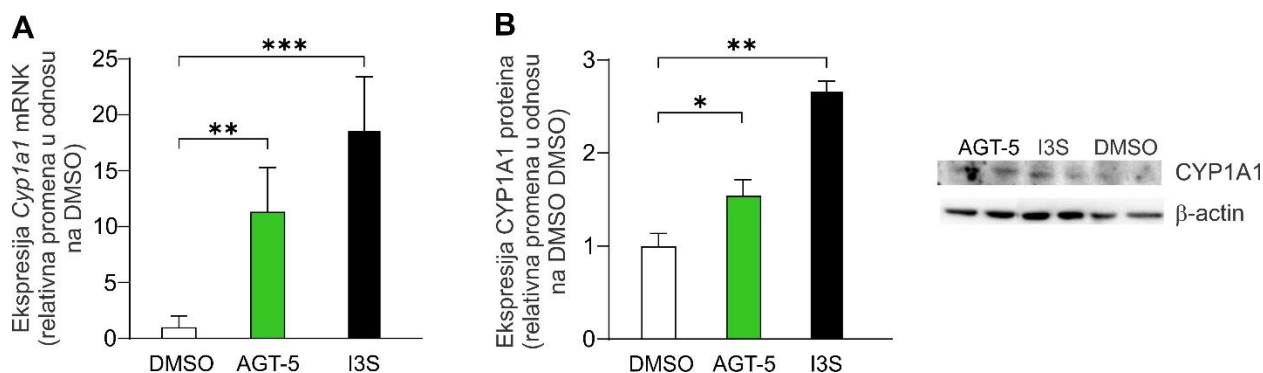
Na osnovu detekcije luciferazne aktivnosti reporterskih ćelijskih linija, utvrđeno je da koncentracija od 1,5 μM dovodi do optimalne aktivacije AHR nakon 24 h inkubacije (Jonić i sar., 2024), stoga je ova koncentracija AGT-5 uzeta kao najviša primenjivana koncentracija u daljem istraživanju *in vitro*.

U narednim eksperimentima je uticaj AGT-5 ispitivan na imunskim ćelijama, odnosno makrofagima i CD4⁺ T limfocitima.

4.1.1 Utvrđivanje sposobnosti AGT-5 da moduliše aktivnost AHR na mišjim makrofagima *in vitro*

Usled značajne razlike u građi AHR između različitih organizama, broj i prostorna struktura vezivnih mesta ovog receptora se razlikuju od vrste do vrste, što posledično može dovesti do različitih efekata koje jedan modulator AHR može izazvati, ili pak dovesti do potpunog odsustva bilo kakvog efekta (Xu i sar., 2021). Kako su obe korišćene reporterske ćelijske linije humanog porekla, bilo je neophodno testirati AGT-5 i na mišjim ćelijama. U tu svrhu su ispitivanja sprovedena na mišjim peritonealnim makrofagima, APC bitnim za aktivaciju adaptivne grane imunskog sistema.

Nakon inkubacije makrofaga u trajanju od 4 h u prisustvu AGT-5 ili komercijalno dostupnog AHR agoniste 3-indoksil sulfata (I3S), koji je predstavljao pozitivnu kontrolu, prvo je posmatrana ekspresija gena za CYP1A1 enzim koji se posledično transkribuje usled aktivacije AHR. Nakon izolacije RNK iz ovako kultivisanih ćelija, utvrđeno je da i I3S i AGT-5 jasno povećavaju relativnu ekspresiju *Cyp1a1* u odnosu na kontrolne ćelije tretirane DMSO (Slika 4A).



Slika 4. Efekat AGT-5 na ekspresiju *Cyp1a1* gena i CYP1A1 proteina na mišjim makrofagima. Peritonealni makrofagi izolovani iz miša su inkubirani 4 h sa AGT-5, I3S ili DMSO (svi u koncentraciji 1,5 μ M), nakon čega je merena ekspresija (A) RNK *Cyp1a1*, kao i (B) proteina CYP1A1, a čije ekspresije su normalizovane prema ekspresiji RNK ili proteina β aktina. Priložene su reprezentativne proteinske trake dobijene nakon detekcije Western blot metodom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ predstavljaju statistički značajnu razliku između ćelija tretiranih AGT-5, I3S ili DMSO.

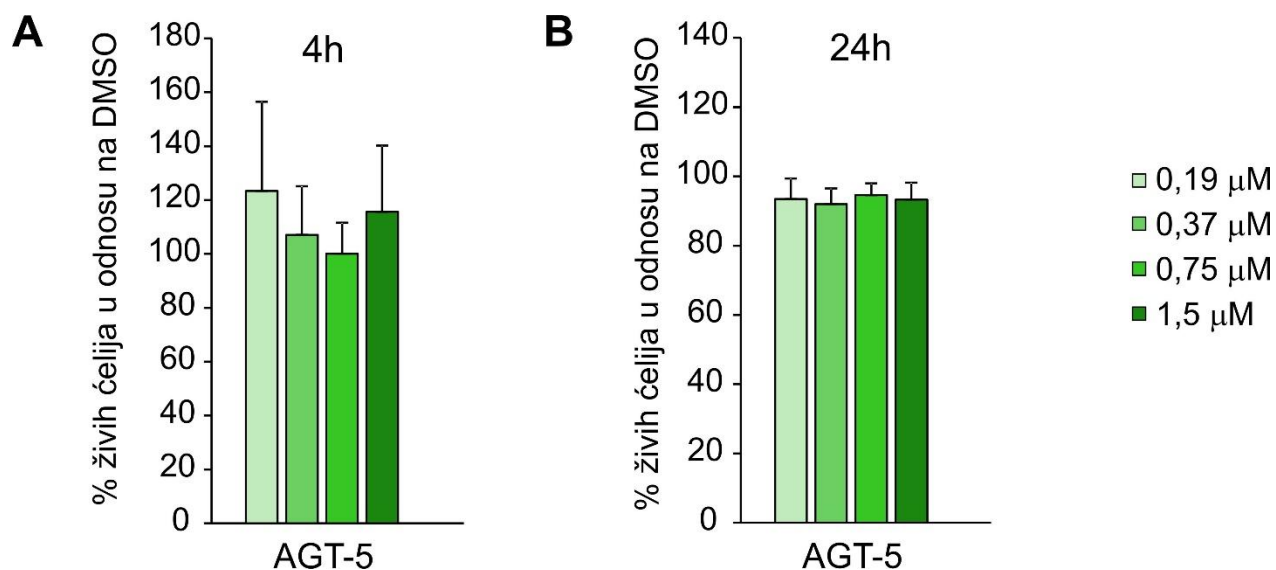
Pri istim uslovima, u peritonealnim makrofagima je Western blot metodom analizirana relativna ekspresija CYP1A1 proteina. Kao i u slučaju relativne ekspresije gena, CYP1A1 protein je bio više ekspimiran u ćelijama koje su inkubirane sa AGT-5 u odnosu na DMSO (Slika 4B).

Ovi rezultati potvrđuju da AGT-5, pored sposobnosti da moduliše aktivnost humanog AHR, ima sposobnost modulisanja i mišjeg AHR.

4.1.2 Uticaj AGT-5 na vijabilnost makrofaga modulacijom aktivnosti AHR *in vitro*

Peritonealni makrofagi su korišćeni za inicijalno testiranje uticaja AGT-5 na vijabilnost ćelija. Ustanovljeno je da AGT-5 ne smanjuje udeo vijabilnih ćelija ni pri najvećoj primenjenoj koncentraciji od 1,5 μ M, kako nakon 4 h (Slika 5A), tako ni nakon 24 h inkubacije (Slika 5B) u odnosu na kontrolne ćelije inkubirane sa ekvivalentnim koncentracijama DMSO.

Ovi rezultati su pokazali da AGT-5 nije citotoksičan ni pri jednoj od testiranih koncentracija.

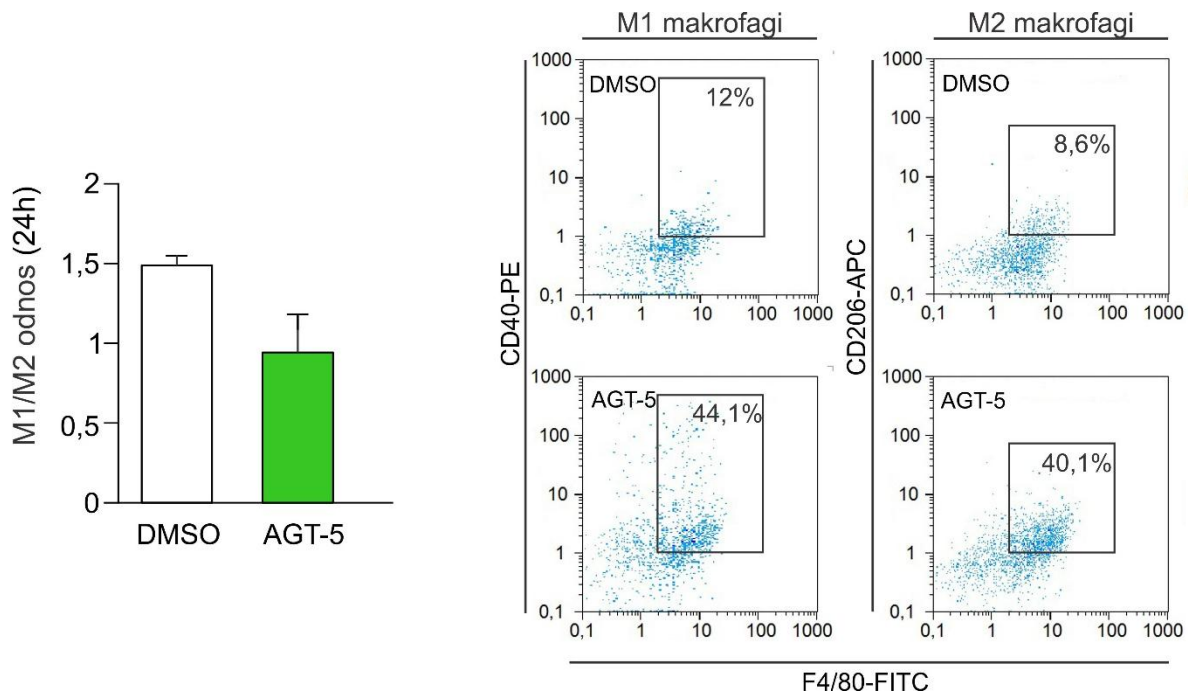


Slika 5. Efekat AGT-5 na vijabilnost makrofaga *in vitro*. Peritonealni makrofagi su inkubirani sa rastućim koncentracijama AGT-5 u trajanju od (A) 4 h ili (B) 24 h, nakon čega je vijabilnost merena pomoću MTT esejja.

4.1.3 Uticaj AGT-5 na diferencijaciju makrofaga modulacijom aktivnosti AHR *in vitro*

Efekti AGT-5 na diferencijaciju imunskih ćelija su najpre ispitani na peritonealnim makrofagima poreklom iz miša. Makrofagi se na osnovu svog fenotipa mogu svrstati u proinflamacijski M1 podtip koji eksprimira kostimulacioni molekul CD40 (Vogel i sar., 2013), i antiinflamacijski M2 podtip koji eksprimira manozni receptor CD206. Aktivirani M1 makrofagi imaju sposobnost produkcije IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 i TNF, dok M2 makrofagi proizvode IL-10 i TGF- β (Shapouri-Moghaddam i sar., 2018). Uticaj AGT-5 na diferencijaciju makrofaga je analiziran protočnom citofluorimetrijom, kojom je analizirana populacija makrofaga inkubirana sa AGT-5 tokom 24 h. Analiza je pokazala da su makrofagi tretirani AGT-5 više ekspimirali CD40 i CD206 u odnosu na kontrolnu grupu makrofaga. Međutim AGT-5 nije doveo do značajne polarizacije makrofaga prema M1 (F4/80⁺CD40⁺) ili M2 (F4/80⁺CD206⁺) fenotipu odnosno nije bilo značajnosti u odnosu M1 i M2 fenotipa između ćelija tretiranih DMSO ili AGT-5 (Slika 6).

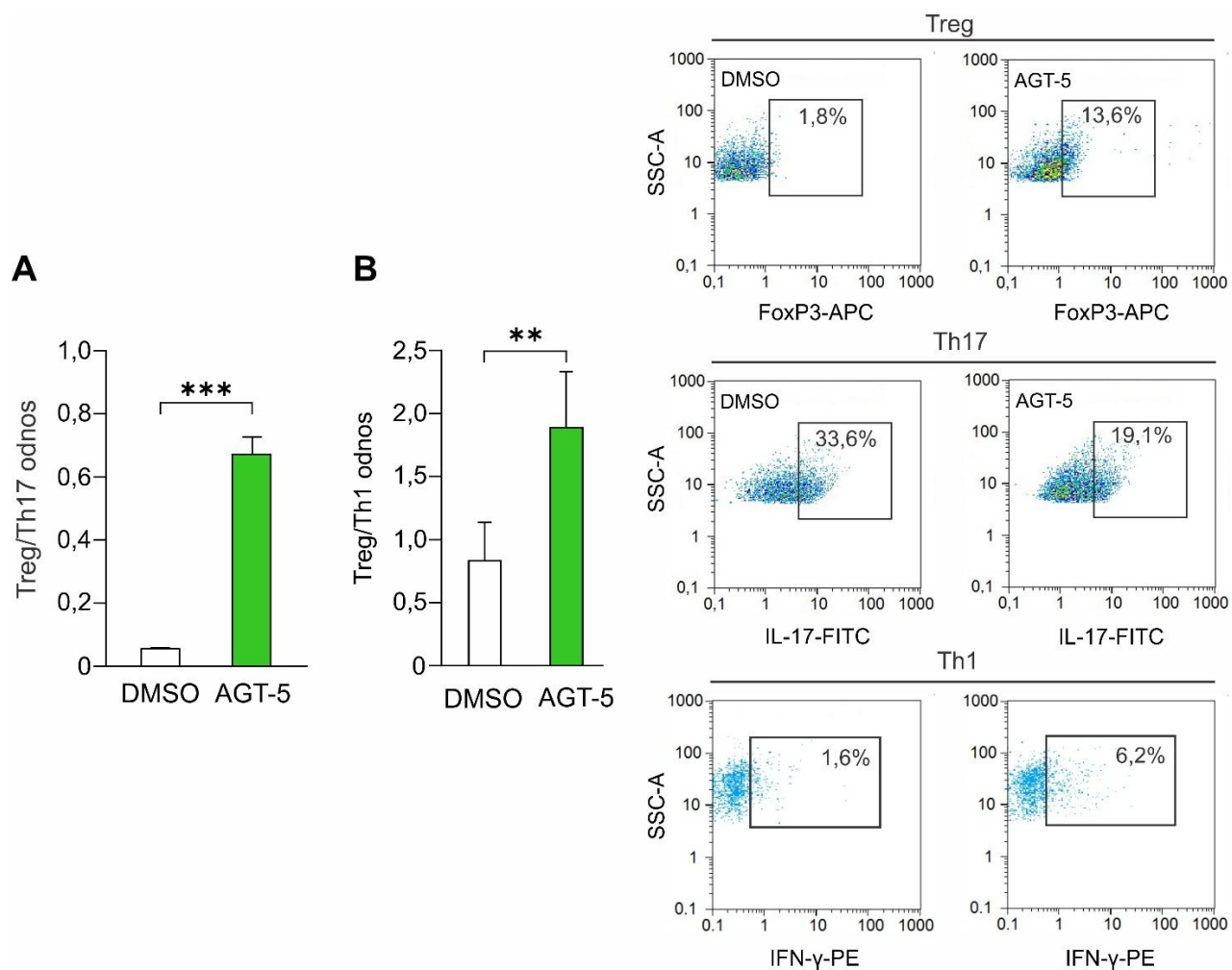
Ovaj rezultat pokazuje da se primenom AGT-5 ne ostvaruje favorizacija pri diferencijaciji makrofaga ni ka M1 ni ka M2 podtipu, već se indukuje stimulacija cele populacije makrofaga.



Slika 6. Efekat AGT-5 na diferencijaciju makrofaga *in vitro*. Peritonealni makrofagi su inkubirani sa 1,5 μ M AGT-5 ili DMSO, u trajanju od 24 h. Metodom protočne citofluorimetrije detektovani su M1 (F4/80⁺CD40⁺) i M2 (F4/80⁺CD206⁺) makrofagi. Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija makrofaga.

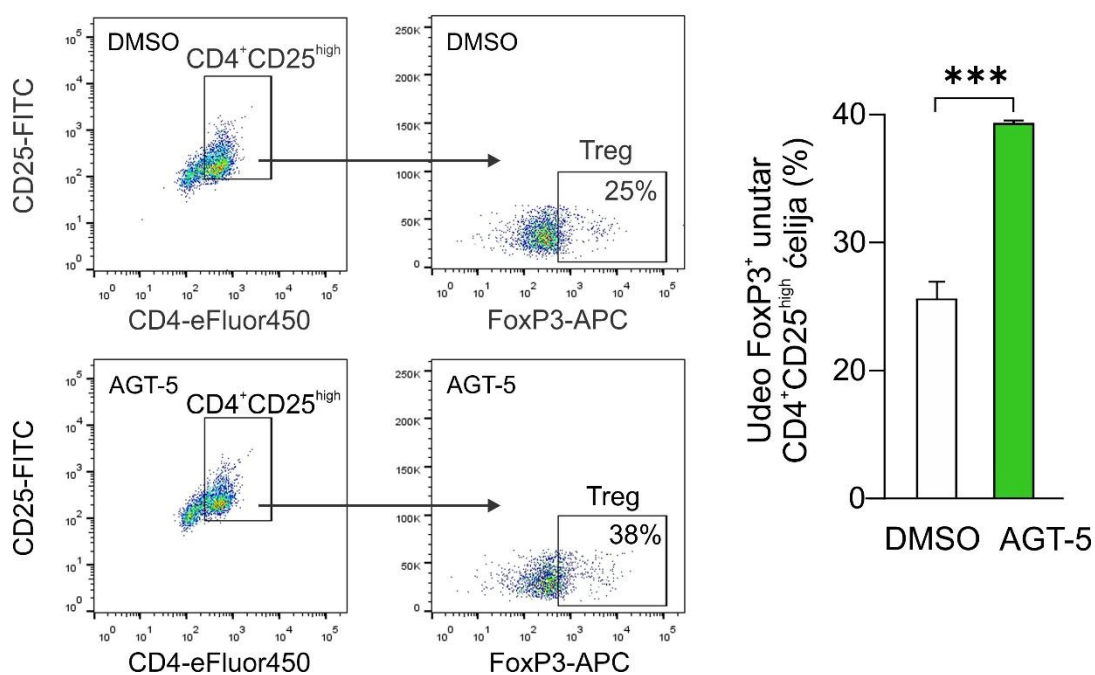
4.1.4 Uticaj AGT-5 na diferencijaciju T limfocita modulacijom AHR aktivnosti *in vitro*

Nakon ispitivanja uticaja AGT-5 na diferencijaciju makrofaga, ispitivan je njegov uticaj na diferencijaciju podtipova T limfocita. Prečišćeni CD4⁺ T limfociti izolovani iz mezenteričnog limfnog čvora miša su stimulisani pomoću anti-CD3 i anti-CD28 antitela (potpuna stimulacija), i inkubirani sa AGT-5 ili DMSO u trajanju od 48 h. Promene zastupljenosti subpopulacija CD4⁺ T limfocita su izražene kao odnos Treg i Th17, odnosno Treg i Th1 fenotipa. U oba slučaja je u prisustvu AGT-5 zabeležen povećan udeo Treg u odnosu na udeo Th17 (Slika 7A) odnosno Th1 ćelija (Slika 7B).



Slika 7. Efekat AGT-5 na diferencijaciju T limfocita *in vitro*. Prečišćeni CD4⁺ T limfociti iz mezenteričnog limfnog čvora su stimulisani sa anti-CD28 i anti-CD3, antitelima dok su istovremeno inkubirani sa 1,5 μ M AGT-5 ili DMSO 48 h. Protočnom citofluorimetrijom su detektovane Th17 (IL-17⁺) i Treg (FoxP3⁺) ćelije, a rezultati su predstavljeni kao odnos zastupljenosti Treg i Th17 ćelija (A). Na isti način su tretirani CD4⁺ T limfociti, među kojima su detektovane Th1 (IFN- γ ⁺) i Treg (CD25^{high}FoxP3⁺) ćelije, a rezultati su predstavljeni kao odnos zastupljenosti Treg i Th1 ćelija (B). Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija T limfocita. **p < 0,01, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između ćelija tretiranih AGT-5 ili DMSO.

Nakon što je utvrđena sposobnost AGT-5 da stimuliše diferencijaciju T limfocita ka Treg fenotipu pri potpunoj stimulaciji, ispitano je da li je AGT-5 u mogućnosti da postigne sličan efekat i u uslovima nepotpune stimulacije (uz odsustvo anti-CD28 antitela). Sortirane naivne CD4⁺CD25⁻ ćelije su stimulirane samo sa anti-CD3 antitelom kojim su bili obloženi bunari i inkubirane sa AGT-5 ili DMSO u trajanju od 48 h, nakon čega je analiza protočnom citofluorimetrijom pokazala da je u prisustvu AGT-5 došlo do značajnog povećanja procentualnog udela Treg ćelija (Slika 8).



Slika 8. Efekat AGT-5 na diferencijaciju Treg ćelija *in vitro*. Sortirane CD4⁺CD25⁻ ćelije su inkubirane sa 1,5 μM AGT-5 ili DMSO u prisustvu anti-CD3 antitela 48 h, a zatim je protočnom citofluorimetrijom utvrđen udeo FoxP3⁺ unutar CD4⁺CD25^{high} ćelija (Treg). Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za prikaz selekcije populacije Treg ćelija. ***p < 0,001 predstavlja statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih AGT-5 ili DMSO.

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da AGT-5 promoviše antiinflamacijsku sredinu podsticanjem diferencijacije T limfocita ka regulatornom fenotipu.

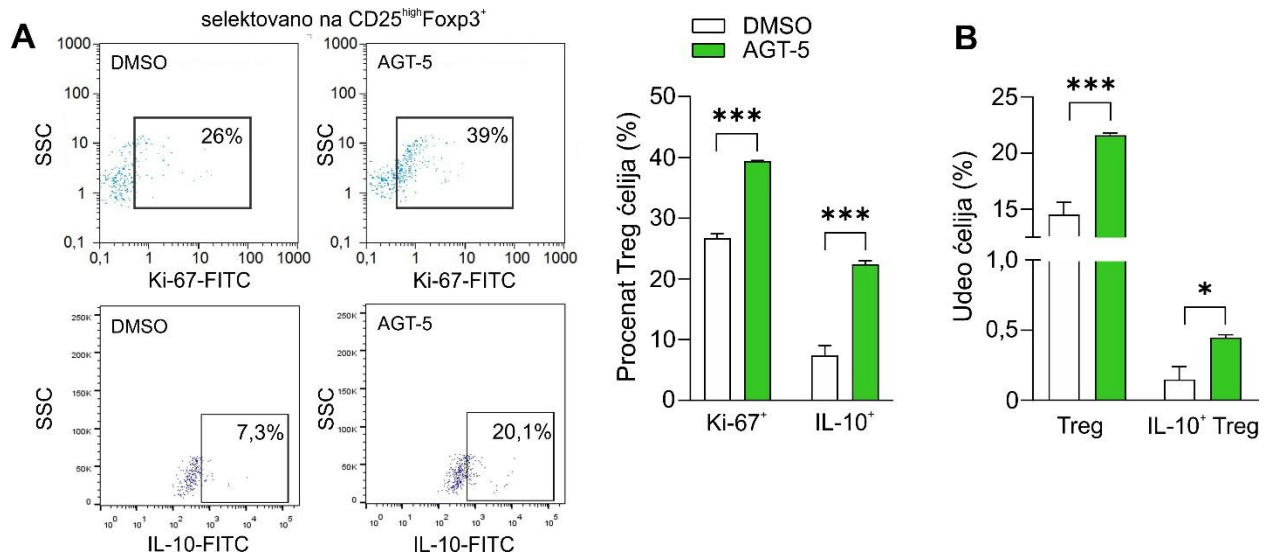
4.1.5 Uticaj AGT-5 na proliferaciju i funkciju Treg ćelija modulacijom AHR aktivnosti *in vitro*

Kako je pokazano da AGT-5 stimuliše diferencijaciju Treg ćelija, ispitani su njegovi efekti i na proliferaciju ovih ćelija. Treg (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺) ćelije koje su diferencirane u prisustvu AGT-5 su se odlikovale većom proliferacijom, čemu svedoči povećana zastupljenost markera proliferacije Ki67⁺ kod ćelija koje su bile izložene AGT-5 (Slika 9A).

Na Treg ćelijama koje su diferencirane u prisustvu AGT-5 je ispitan i efekat AGT-5 na njihovu funkciju. Pokazano je da je postoji povećana produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10 od strane onih ćelija koje su tretirane AGT-5 (Slika 9A).

Dalje su sortirane CD4⁺CD25^{high} ćelije poreklom iz mezenteričnog čvora i kultivisane u prisustvu potpune stimulacije i AGT-5 ili DMSO tokom 48 h. Protočnom citofluorimetrijom je kvantifikovan procentualni udeo Treg (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺) ćelija, kao i učestalost IL-10-produkujućih Treg ćelija u

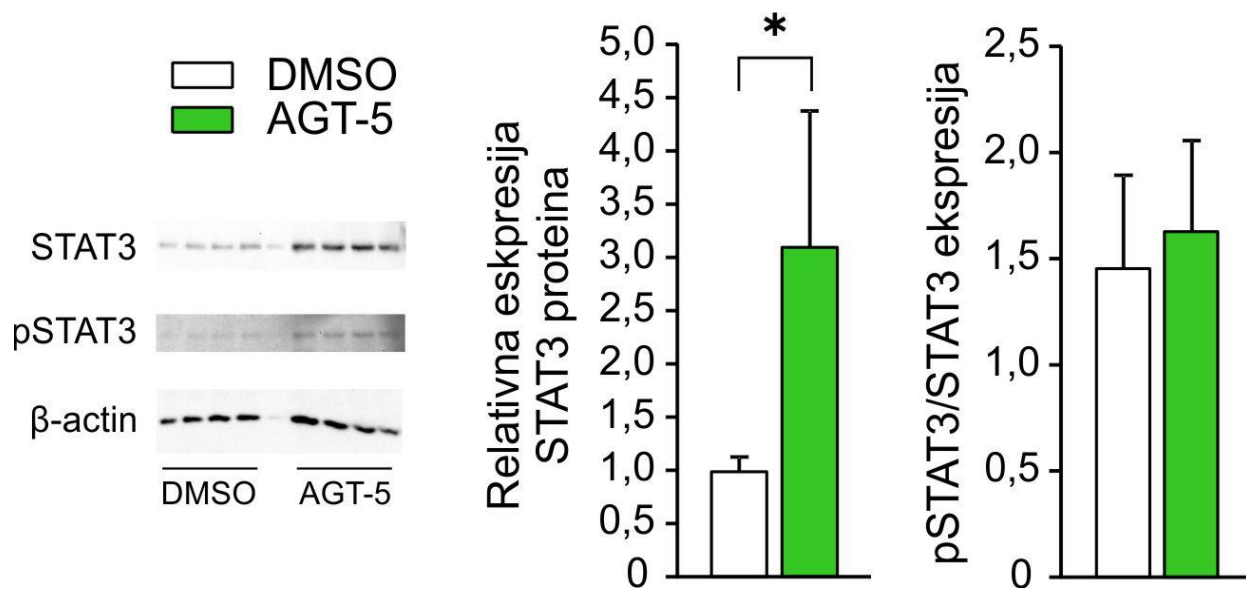
okviru iste populacije. Ustanovljeno je da je veći procenat Treg ćelija bio prisutan u onoj populaciji koja je bila izložena AGT-5, a ujedno je zabeležena i veća učestalost IL-10-produkujućih Treg ćelija (Slika 9B).



Slika 9. Efekat AGT-5 na proliferaciju i funkciju Treg ćelija *in vitro*. Naivne CD4⁺CD25⁻ ćelije su 48 h inkubirane sa 1,5 μ M AGT-5 ili DMSO uz stimulaciju sa anti-CD3 antitelom, a zatim su uzorci analizirani protočnom citofluorimetrijom. Kao marker proliferacije posmatran je Ki67, dok je kao pokazatelj funkcije posmatrana produkcija IL-10. Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za prikaz selekcije Ki67⁺ i IL-10⁺ populacija ćelija (A). Sortirane CD4⁺CD25^{high} ćelije su inkubirane 48 h sa anti-CD3 i anti-CD28 antelima u prisustvu 1,5 μ M AGT-5 ili DMSO, nakon čega je utvrđen udeo Treg (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) ćelija, kao IL-10⁺ Treg ćelija protočnom citofluorimetrijom (B). *p < 0,05, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih AGT-5 ili DMSO.

Kako bi se pojasnio mehanizam kojim je došlo do povećanja udela IL-10-produkujućih Treg ćelija, kvantifikovana je ekspresija ukupnog STAT3, kao i odnos ekspresije fosforilisane forme STAT3 (pSTAT3) i nefosforilisane forme STAT3, jer je fosforilacija STAT3 jedan od ključnih događaja u signalnom putu koji dovodi do produkcije IL-10. Kako bi se usmerila maturacija naivnih CD4⁺ T limfocita ka Treg fenotipu, ćelijska kultura je stimulirana sa anti-CD28 i anti-CD3 antitelima, IL-2 i TGF- β . Nakon pomenute stimulacije, ćelije su inkubirane sa AGT-5 ili DMSO u trajanju od 24 h. Western blot metodom je utvrđeno da, dok nije postojala značajna razlika u odnosu ekspresije pSTAT3 i STAT3, ekspresija ukupnog STAT3 je bila povećana kod ćelija koje su diferencirane u prisustvu AGT-5 (Slika 10).

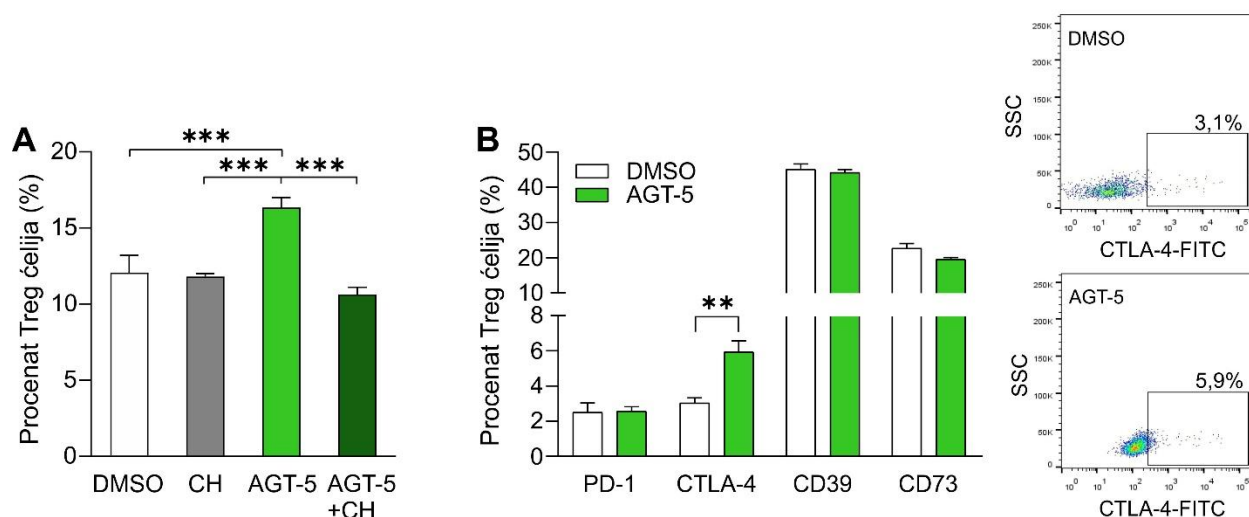
Dalje su ispitani efekti AGT-5 na diferencijaciju, proliferaciju i funkciju Treg ćelija, kao i da li je takav uticaj direktno uzrokovan interakcijom AGT-5 sa AHR. U tu svrhu su naivni T limfociti u uslovima potpune stimulacije tretirani ili samo AGT-5, ili AGT-5 u prisustvu komercijalno dostupnog antagoniste AHR, CH-223191 (CH). Nakon 48 h inkubacije je protočnom citofluorimetrijom pokazano



Slika 10. Efekat AGT-5 na ekspresiju proteina u signalnom putu za produkciju IL-10 *in vitro*. CD4⁺ T limfociti su 4 h stimulisani sa anti-CD28 i anti-CD3 antitelima, IL-2 i TGF-β. Zatim su inkubirani sa 1,5 μM AGT-5 ili DMSO u trajanju od 24 h. Western blot metodom je kvantifikovana ekspresija STAT3 proteina, kao i fosforilisane forme STAT3 (pSTAT3). Prikazane vrednosti su normalizovane prema ekspresiji proteina β aktina. Priložene su reprezentativne proteinske trake dobijene nakon detekcije Western blot metodom. *p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između ćelija tretiranih AGT-5 ili DMSO.

da dodatak CH-223191 u kulturu ćelija u prisustvu AGT-5 sprečava povećanje udela Treg ćelija (Slika 11A) koje je zabeleženo u prisustvu samo AGT-5 u *in vitro* kulturi (Slika 11A). Ovakav rezultat ukazuje da su svi zabeleženi efekti nedvosmisleno postignuti modulacijom aktivnosti AHR od strane AGT-5.

U želji da se dodatno utvrde efekti AGT-5 na fenotip diferenciranih Treg ćelija, ispitan je nivo ekspresije molekula koji su od suštinske važnosti za funkciju Treg ćelija – inhibitorni receptor programirane ćelijske smrti 1 (engl. Programmed cell death protein 1, PD-1) i CTLA-4, koji su ključni za uspostavljanje tolerancije, kao i ektoenzimi CD39 i CD73, koji posledično dovode do nastanka adenzina, koji ima inhibitorni efekat na ćelijski imunski odgovor. Iz tog razloga je sortiranim CD4⁺CD25^{high} ćelijama koje su inkubirane sa AGT-5 ili DMSO uz potpunu stimulaciju tokom 48 h protočnom citofluorimetrijom detektovana ekspresija pomenutih markera. Ustanovljeno je da veći udeo Treg ćelija eksprimira CTLA-4 ukoliko su tretirane AHR modulatorom AGT-5, dok u slučaju PD-1, CD39 i CD73 nije zabeležena značajna razlika između ćelija inkubiranih sa AGT-5 i kontrolnih ćelija inkubiranih sa DMSO (Slika 11B).



Slika 11. Efekat AGT-5 na funkciju Treg ćelija *in vitro*. CD4⁺CD25⁻ ćelije su stimulisane sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima uz primenu 1,5 μM AGT-5 ili DMSO, u prisustvu ili odsustvu AHR inhibitora CH-223191 (CH, 1,5 μM). Nakon 48 h, protočnom citofluorimetrijom je utvrđen udeo Treg (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) ćelija u uzorcima (A). Sortirane CD4⁺CD25^{high} ćelije su inkubirane sa 1,5 μM AGT-5 ili DMSO 48 h, uz stimulaciju sa anti-CD3 i anti-CD28 antitelima. protočnom citofluorimetrijom je utvrđen udeo Treg ćelija koje eksprimiraju PD-1, CTLA-4, CD39 i CD73. Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za populaciju Treg ćelija koje eksprimiraju CTLA-4 (B). **p < 0,01, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih AGT-5 ili DMSO, ili između uzoraka tretiranih AGT-5 ili AGT-5+CH-223191.

Na osnovu priloženih rezultata može se zaključiti da AGT-5 utiče na diferencijaciju naivnih CD4⁺ ćelija tako što favorizuje regulatorni fenotip (Treg) i ujedno podstiče njihovu antiinflamacijsku funkciju, čemu svedoče povećana produkcija IL-10 i ekspresija CTLA-4.

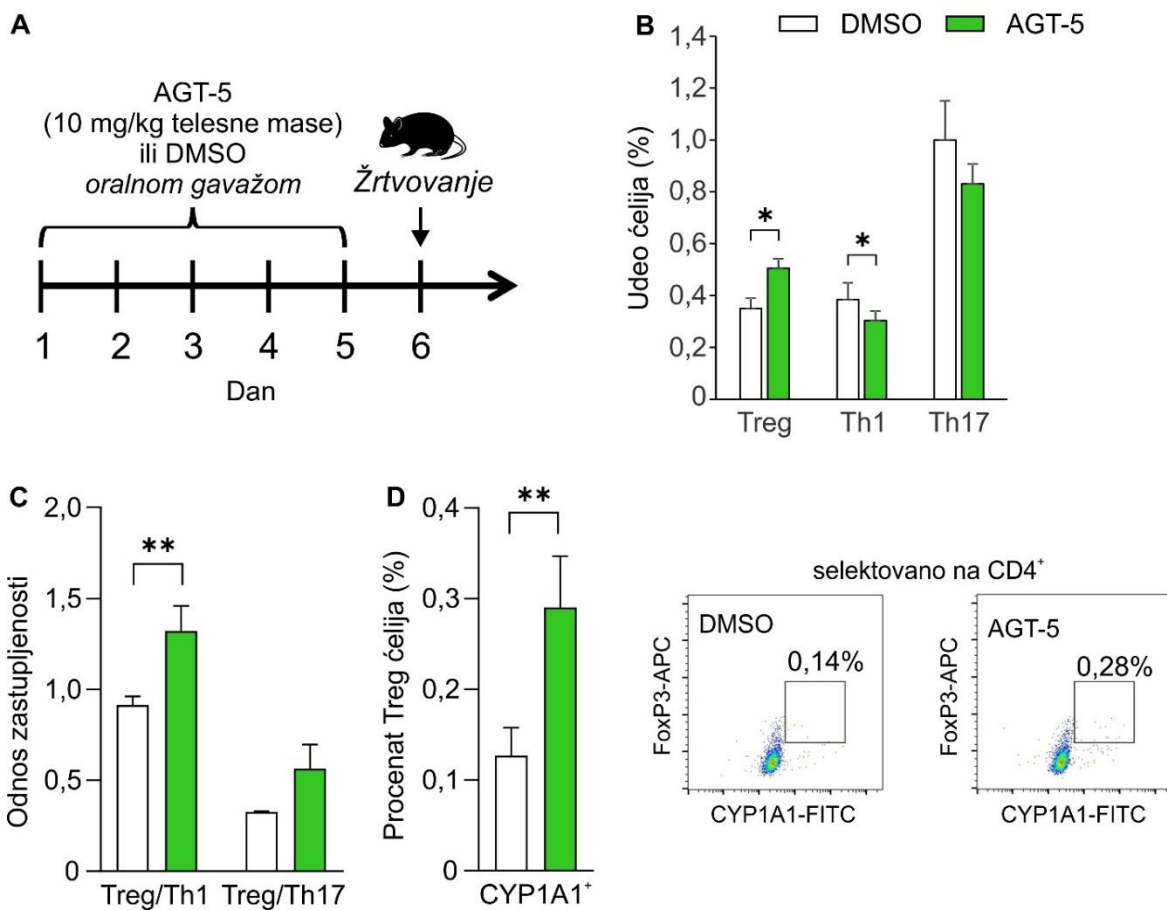
4.2 Uticaj AGT-5 tretmana na T limfocite u mezenteričnim limfnim čvorovima zdravih miševa *in vivo*

Uzimajući u obzir da je uočeno da AGT-5 ostvaruje antiinflamacijske efekte u *in vitro* uslovima, naredni korak je bilo ispitati da li ispoljava slične efekte i *in vivo*. Kako se određen broj AHR liganada, naročito onih koji su dobijeni u kontrolisanim uslovima (TCDD, FICZ, I3S), pokazao izuzetno potentnim ali ujedno i toksičnim (Esser i sar., 2018), bilo je neophodno odrediti toksikološki profil AGT-5 pre izvođenja *in vivo* eksperimenata na miševima. U ovu svrhu korišćeni su embrioni zebrića koji su u trajanju od pet dana tretirani različitim koncentracijama AGT-5 ili I3S. Posmatrano je da li se javljaju različiti oblici toksičnosti kod embriona – kardio-, nefro-, hepatotoksičnost, kao i da li se javljaju deformiteti skeleta. Dok je komercijalno dostupni agonista I3S izazivao smrt embriona već na koncentraciji od 25 μM, AGT-5 nije izazvao deformitete ili ispoljio toksične efekte ni pri najvećoj

primenjenoj koncentraciji (150 μ M) (Jonić i sar., 2024), što je potvrdilo da je AGT-5 bezbedan za *in vivo* primenu na miševima.

Radi inicijalnog ispitivanja imunomodulacijskih efekata AGT-5 *in vivo*, zdravim C57BL/6 miševima je oralnim putem davan AGT-5 (10 mg/kg telesne mase), dok je kontrolna grupa miševa dobijala uljanu emulziju koja je sadržala jednaku koncentraciju DMSO, a tretman je trajao pet dana (Slika 12A). Šestog dana su životinje žrtvovane i izolovani su mezenterični limfni čvorovi, kao glavni drenirajući limfni organi crevnog trakta.

Posmatranjem zastupljenosti različitih fenotipskih podtipova CD4⁺ T limfocita poreklom iz mezenteričnih limfnih čvorova koji dreniraju tanko crevo, uočen je porast uдела Treg ćelija kod životinja tretiranih AGT-5 u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Slika 12B), dok je udeo Th1 ćelija bio smanjen. Nije zabeležena značajna promena uдела Th17 ćelija (Slika 12B).



Slika 12. Efekat AGT-5 na T limfocite zdravih C57BL/6 miševa *in vivo*. Životinje su pet dana oralnim putem tretirane AGT-5 (10 mg/kg telesne mase) ili DMSO (A). Fenotip ćelija (Th1, Th17 i Treg) izolovanih iz mezenteričnih čvorova ovih životinja je utvrđen protočnom citofluorimetrijom – najpre njihov udeo (B), a zatim i odnos Treg i Th1 ćelija, odnosno Treg i Th17 ćelija (C). Istom metodom je utvrđen udeo Treg ćelija koje eskpiriraju CYP1A1 (D). Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za

populaciju CYP1A1⁺ Treg ćelija. *p < 0,05, **p < 0,01 predstavljaju statistički značajnu razliku između zdravih miševa tretiranih AGT-5 i zdravih miševa tretiranih sa DMSO.

Pri analizi odnosa Treg i Th1 odnosno Treg i Th17 fenotipa, kod zdravih miševa koji su tretirani AGT-5 je zabeleženo povećanje odnosa zastupljenosti antiinflamacijskih Treg ćelija i Th1 ćelija, dok pri upoređivanju odnosa zastupljenosti Treg i Th17 fenotipa nije zabeležena značajna promena (Slika 12C). Tretman AGT-5 je takođe doveo do povećanja udela Treg ćelija koje ekspimiraju CYP1A1 enzim (Slika 12D).

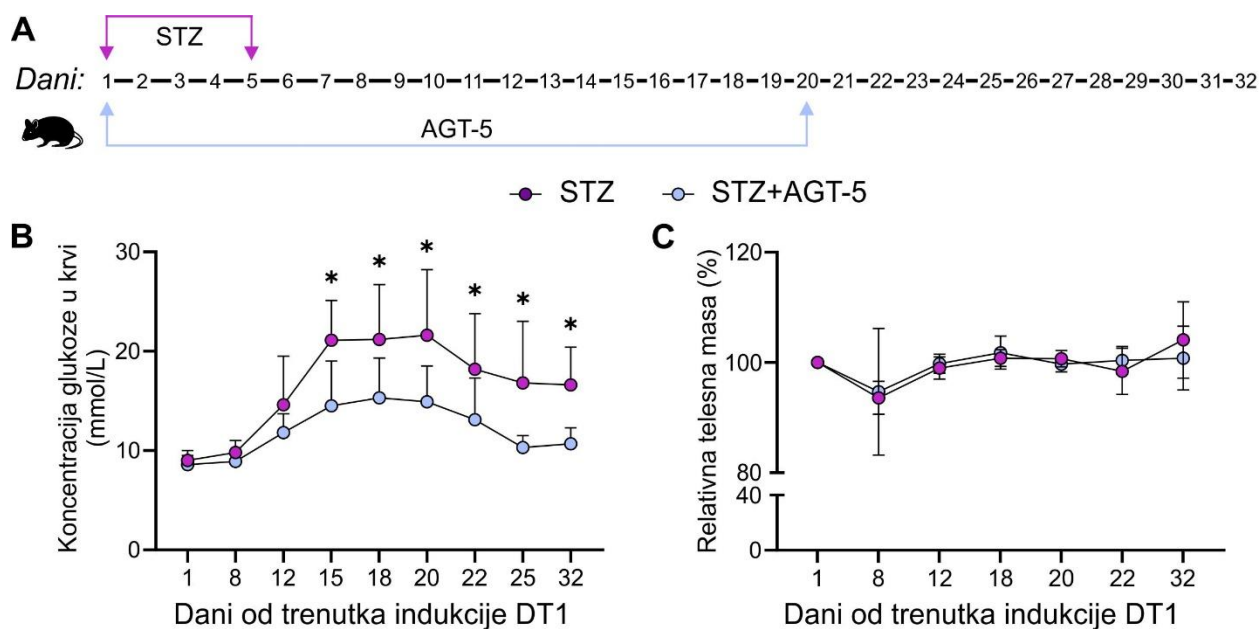
Kako je antiinflamacijski potencijal AGT-5 potvrđen dobijenim rezultatima na zdravim miševima *in vivo*, sledeći korak je bilo testiranje ovog potencijala u borbi protiv autoimunosti, u mišjem modelu DT1.

4.3 Ispitivanje uticaja *in vivo* tretmana AGT-5 na razvoj dijabetesa tipa 1

4.3.1 Uticaj AGT-5 na klinički tok dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa

Radi ispitivanja efekata AGT-5 na razvoj i patogenezu DT1, miševima je DT1 indukovano intraperitonealnim davanjem višestrukih malih doza STZ (40 mg/kg telesne mase) u trajanju od pet dana (Slika 13A). Kao i u slučaju tretmana zdravih životinja, miševi su podeljeni u dve eksperimentalne grupe – jedna grupa je 20 uzastopnih dana oralnim putem dobijala uljanu emulziju AGT-5 (10 mg/kg telesne mase), dok je kontrolna grupa dobijala uljanu emulziju koja je sadržala jednaku koncentraciju DMSO kao emulzija AGT-5 .

Periodičnim merenjem nivoa glukoze u krvi miševa kojima je indukovano DT1 ustanovljeno je da tretman AGT-5 značajno snižava glikemijske vrednosti u krvi počevši od 15. dana od početka eksperimenta pa sve do kraja istog (32. dan), čak 12 dana nakon davanja poslednje doze AGT-5 (Slika 13B). Dodatno, tretman AGT-5 nije uticao na promenu telesne mase životinja (Slika 13C).

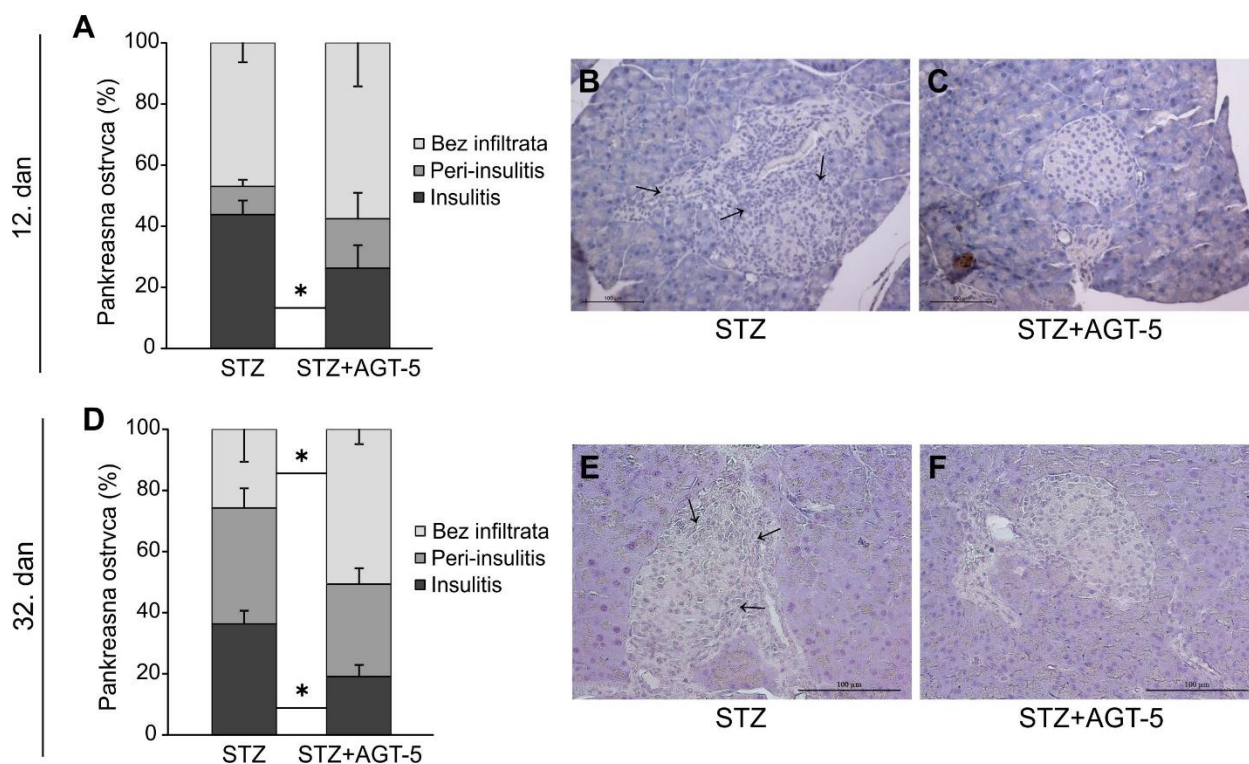


Slika 13. Efekat AGT-5 na klinički tok dijabetesa tipa 1. Miševi su oralnim putem tretirani AGT-5 (10 mg/kg telesne mase) ili DMSO počevši od prvog dana indukcije DT1 malim dozama STZ, sve do 20. dana. Plan indukcije DT1 i tretmana AGT-5 je prikazan dijagramom (A). Grafikom (B) je prikazana razlika u koncentraciji glukoze u krvi dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 i dijabetičnih netretiranih miševa, dok je promena u masi između pomenutih grupa životinja posmatrana naspram početne telesne mase (C). U obe grupe se nalazilo po 8 miševa. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 i dijabetičnih netretiranih miševa. STZ - streptozotocin.

Navedeni rezultati pokazuju da tretman AGT-5 ublažava kliničku sliku kod dijabetičnih miševa u odnosu na netretirane dijabetične miševе. Ublažena klinička slika DT1 ukazuje da AGT-5 ostvaruje određen nivo zaštite pankreasa, stoga je dalje istraživanje usmereno ka analizi stepena očuvanja pankreasa pri primeni AGT-5.

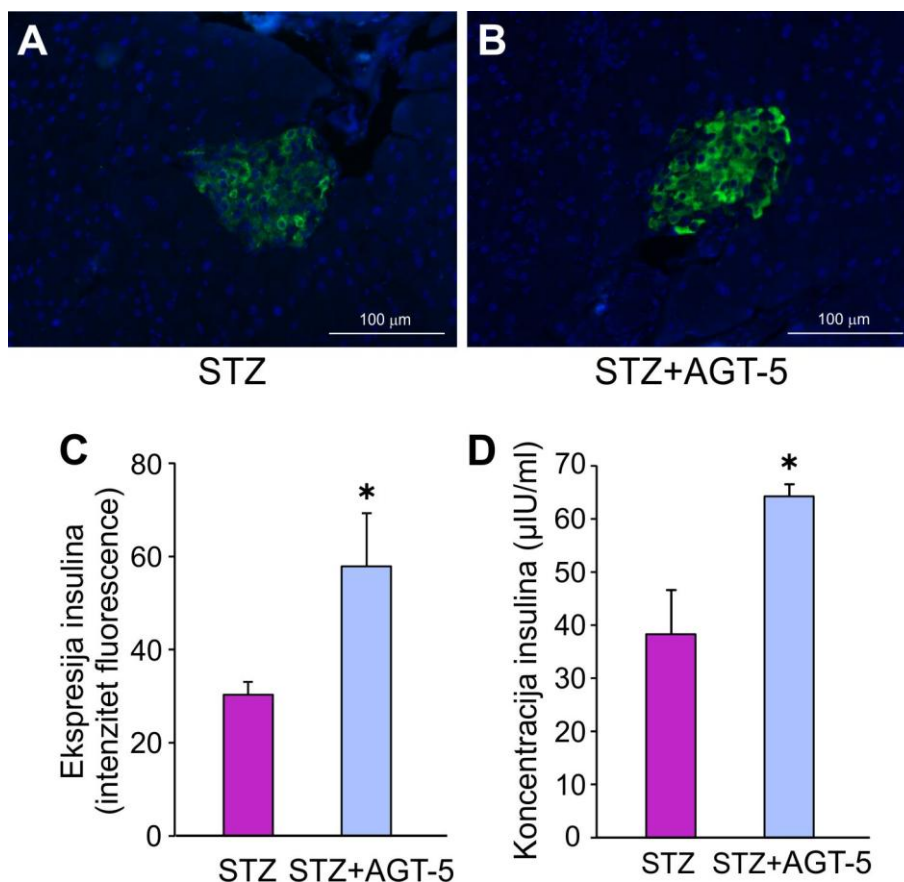
4.3.2 Uticaj AGT-5 na morfologiju pankreasnih ostrvaca i funkciju β ćelija *in vivo*

Kako bi se sagledali efekti tretmana sa AGT-5 u ranoj i kasnoj fazi DT1, pankreasna ostrvca su analizirana 12. i 32. dana od početka eksperimenta. Posmatrajući preseke pankreasa izolovanih 12. dana, kod životinja koje su tretirane sa AGT-5 je zabeležen značajno manji procenat pankreasnih ostrvaca kod kojih je prisutan insulitis (Slika 14A-C). Kada je u pitanju 32. dan, kod životinja koje su dobijale AGT-5 je pored smanjenog procenta pankreasnih ostrvaca sa insulitisom zabeleženo i značajno povećanje procenta pankreasnih ostrvaca bez infiltrata (Slika 14D-F).



Slika 14. Efekat AGT-5 na infiltraciju imunskih ćelija u pankreasna ostrvca. Pankreasi su izolovani 12. ili 32. dana od početka indukcije DT1 i tretmana AGT-5, nakon čega su histološki preseki tkiva obojeni hematoksilinom. Pri posmatranju histoloških preseka analizirano je 25 ostrvaca po pankreasu, pri čemu je ispitivano tri pankreasa po grupi miševa, koji su nasumično izabrani. Kvantitativna analiza stepena zahvaćenosti pankreasnih ostrvaca infiltracijom imunskih ćelija je predstavljena kao procenat ostrvaca bez infiltrata (imunske ćelije nisu prisutne oko ili u pankreasnom ostrvcu), sa peri-insulitisom (imunske ćelije se nalaze po obodu pankreasnog ostrvca i započele su prodiranje u isto) ili sa insulitisom (primetne su nakupine imunskih ćelija u okviru samog ostrvca koje je ujedno izgubilo svoju homogenu strukturu) u odnosu na ukupan broj zabeleženih ostrvaca. Dužina skale je 100 μ m. Stepen infiltracije 12. dana (A) i 32. dana (D). Prikazani su reprezentativni histološki preseki pankreasa 12. i 32. dana poreklom iz netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) (B,E) i dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 (C,F) (STZ+AGT-5). * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 i dijabetičnih netretiranih miševa. STZ - streptozotocin.

Dalje je ispitana ekspresija insulina u pankreasnim ostrvcima, kao indikator očuvanog vijabiliteta i funkcije β ćelija. Ekspresija insulina je merena 12. dana od početka indukcije DT1. U odnosu na pankreasna ostrvca netretiranih dijabetičnih miševa, veća ekspresija insulina je zabeležena u pankreasnim ostrvcima dijabetičnih miševa koji su tretirani AGT-5 (Slika 15A-C). Kao dodatni indikator funkcije β ćelija, u istoj vremenskoj tački izmerena je i koncentracija insulina u serumu životinja, pri čemu je značajno veća koncentracija insulina očitana u serumu dijabetičnih životinja koje su dobijale AGT-5 (Slika 15D).



Slika 15. Efekat AGT-5 na produkciju insulina. Pankreasi su izolovani 12. dana od početka indukcije DT1 i tretmana AGT-5, nakon čega su histološki preseki tkiva bojeni antitelom specifičnim za insulin (zeleno) uz dodatno bojenje jedara pomoću Hoechst 33342 boje (plavo). Priložene su reprezentativne slike obojenih tkivnih preseka iz dijabetičnih netretiranih (STZ) (A) i dijabetičnih životinja tretiranih sa AGT-5 (STZ+AGT-5) (B). Ekspresija insulina je određivana merenjem intenziteta fluorescence pomoću Fiji programa (C). Posmatrana su po tri pankreasa iz svake grupe životinja, pri čemu je analizirano po 30 ostrvaca po pankreasu. Metodom ELISA urađena je kvantifikacija koncentracije insulina u serumu izolovanom 12. dana od početka indukcije DT1 i tretmana AGT-5 (D). * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 i dijabetičnih netretiranih miševa. STZ - streptozotocin.

Prikazani rezultati ukazuju na sposobnost AGT-5 da ostvari zaštitne efekte usmerene ka pankreasnim ostrvcima, što se ogleda u smanjenju infiltracije imunskih ćelija i posledične manje destrukcije β ćelija, a što bi ujedno objasnilo i zabeležene snižene vrednosti glikemije u krvi dijabetičnih životinja tretiranih AHR modulatorom.

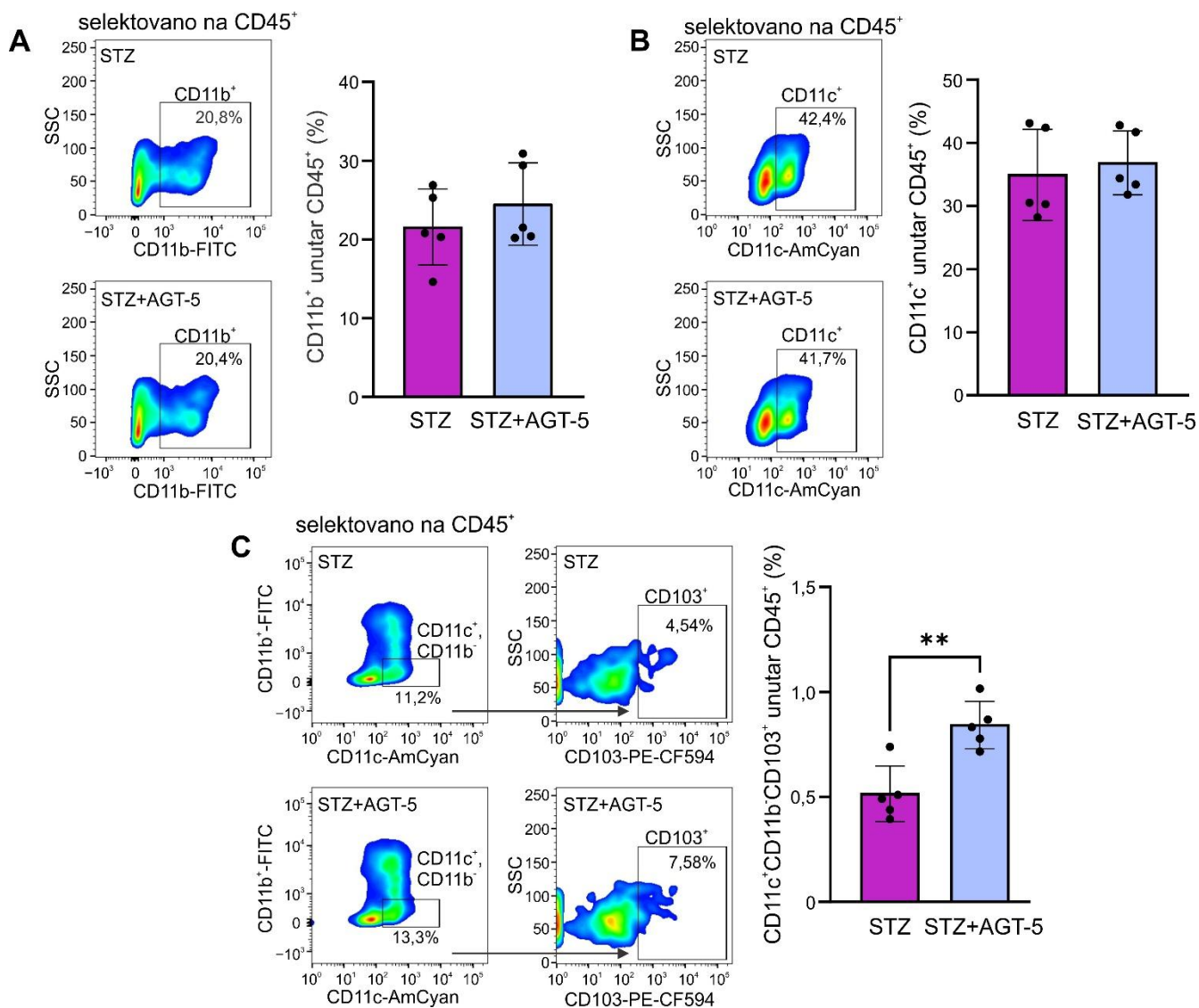
4.4 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor dijabetičnih C57BL/6 miševa *in vivo*

Imajući u vidu da AGT-5 ostvaruje uticaj na imunske ćelije *in vitro* i na imunske ćelije mezenteričnih limfnih čvorova zdravih C57BL/6 miševa *in vivo*, kao i da su dijabetične životinje tretirane AGT-5 imale očuvanija Langerhansova ostrvca, moglo se pretpostaviti da je uočena smanjena destrukcija pankreasa posredovana imunomodulacijskom sposobnošću AGT-5. U tu svrhu je ispitan imunski odgovor u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. Emulzije AGT-5 ili DMSO su oralnim putem davane miševima u trajanju od 11 dana, počevši od prvog dana indukcije DT1, nakon čega su životinje žrtvovane 12. dana.

4.4.1 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor u pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima *in vivo*

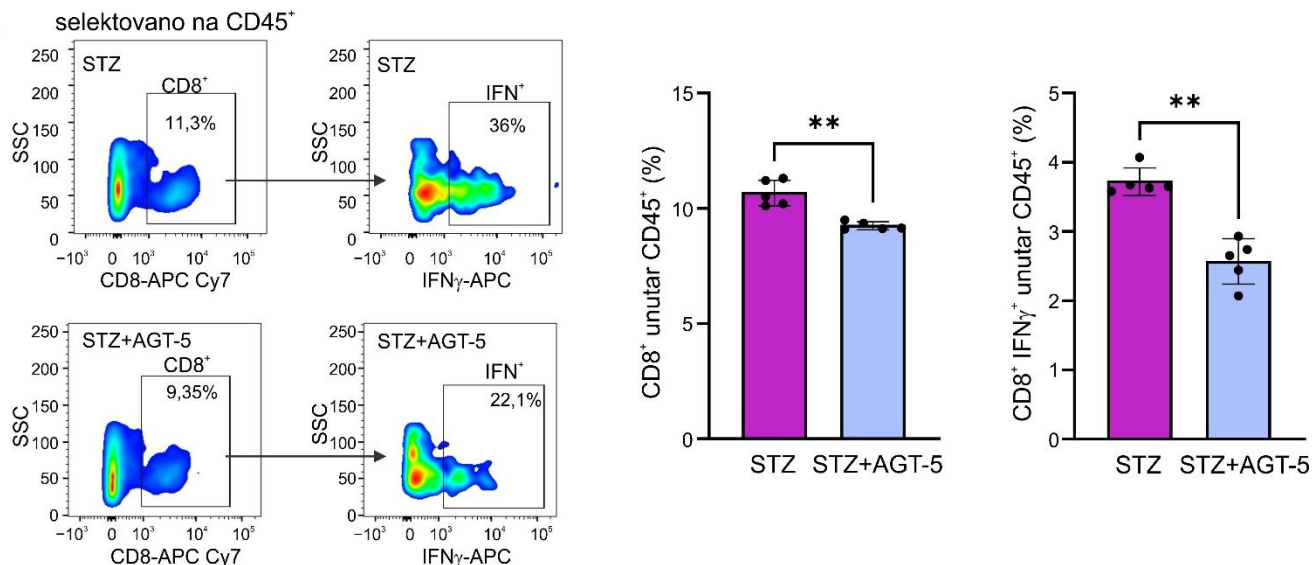
Usled toga što je pristizanje APC do pankreasa, privučenih inicijalnom smrću β ćelija, ključno u inicijaciji DT1, najpre je utvrđena zastupljenost CD11b⁺ i CD11c⁺ APC, a zatim efektorskih ćelija kao što su CD8⁺ i CD4⁺ T limfociti.

Pri analizi infiltrata pankreasa ustanovljeno je da AGT-5 tretman nije značajno uticao na promenu zastupljenosti klasičnih APC (Slika 16A,B), ali je sa druge strane povećao zastupljenost CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺ ćelija, koje najverovatnije predstavljaju tolDC (Slika 16C).



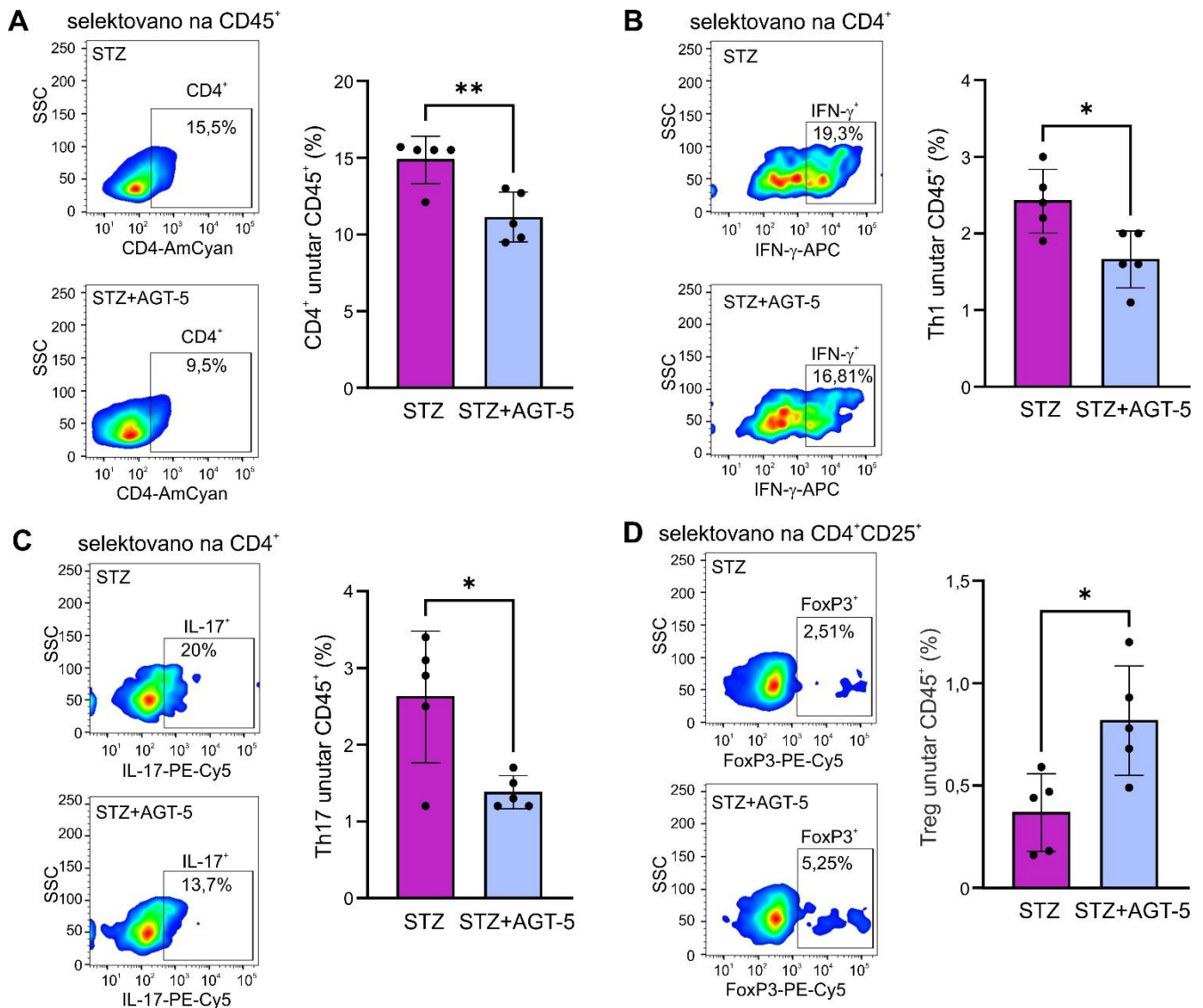
Slika 16. Efekat AGT-5 na antigen-prezentujuće ćelije u pankreasu *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat CD11b⁺ unutar CD45⁺ (A), CD11c⁺ unutar CD45⁺ (B) i tolDC (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) unutar CD45⁺ (C) APĆ u pankreasu. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za CD11b⁺ unutar CD45⁺ (A), CD11c⁺ unutar CD45⁺ (B) i CD103⁺ unutar CD11c⁺CD11b⁻ (C). Merenja su izvršena na uzorcima od pet životinja po grupi. **p < 0,01 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Kada je reč o prisustvu efektorskih imunskih ćelija u pankreasu, najpre su analizirani citotoksični CD8⁺ T limfociti, pri čemu je ustanovljeno da je njihov udeo, kao i udeo IFN- γ -produkujućih CD8⁺ T limfocita, snižen kod životinja koje su tretirane AGT-5 (Slika 17).



Slika 17. Efekat AGT-5 na citotoksične CD8⁺ T limfocite u pankreasu *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat CD8⁺ unutar CD45⁺ i IFN- γ -produkujućih CD8⁺ unutar CD45⁺ ćelija u pankreasu. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za IFN- γ -produkujuće CD8⁺ ćelije unutar CD45⁺. Merenja su izvršena na uzorcima od pet životinja po grupi. **p < 0,01 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

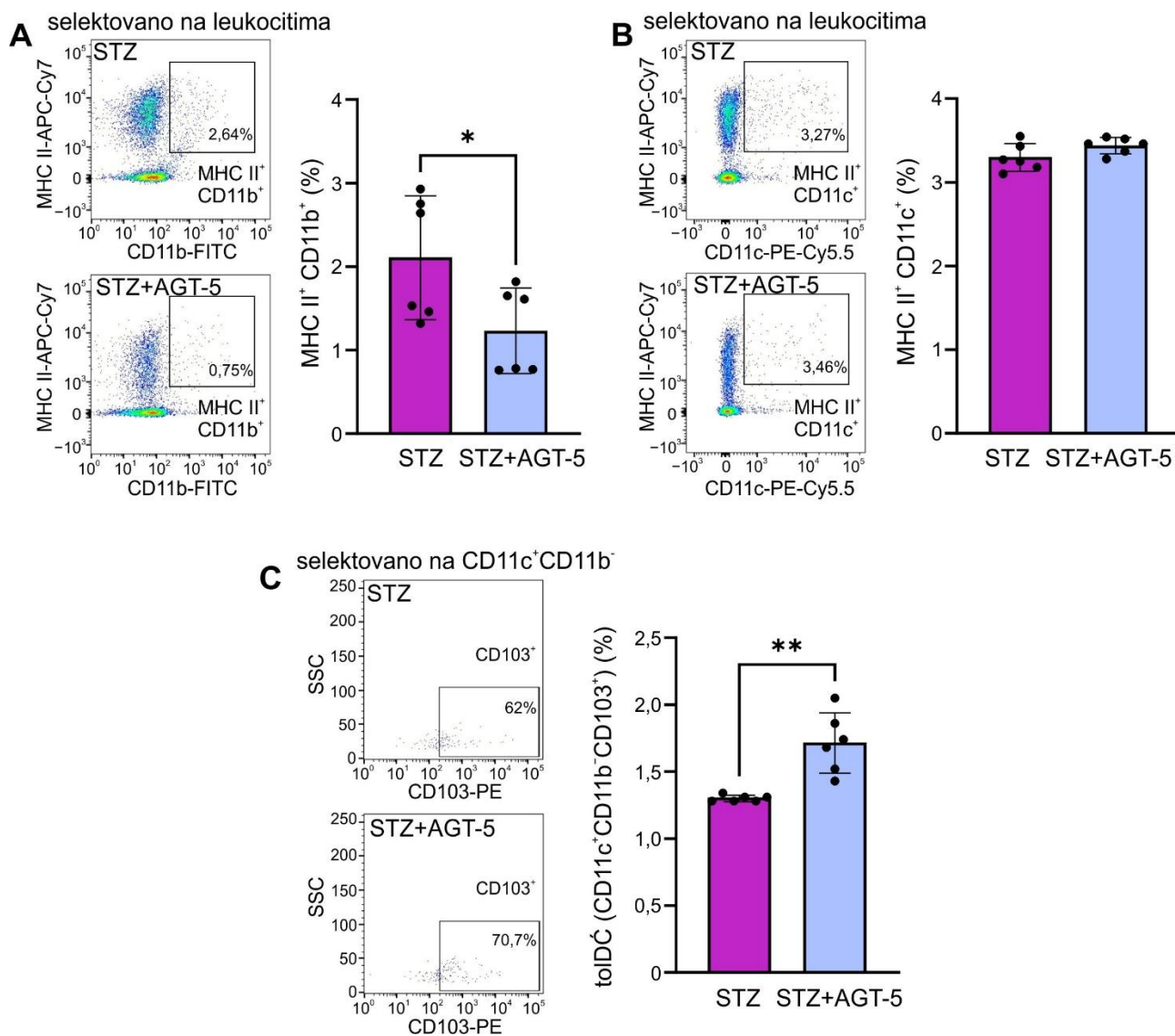
Ukupni udeo CD4⁺ T limfocita je bio snižen nakon tretmana AGT-5 (Slika 18A), pri čemu je ujedno bila smanjena i zastupljenost proinflamacijskih Th1 (Slika 18B) i Th17 (Slika 18C) podtipova CD4⁺ ćelija. Dodatno, zastupljenost antiinflamacijskih Treg ćelija je bila povećana nakon tretmana AGT-5 (Slika 18D).



Slika 18. Efekat AGT-5 na pomoćničke CD4⁺ T limfocite u pankreasu *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat CD4⁺ unutar CD45⁺ (A), Th1 unutar CD45⁺ (CD4⁺IFN- γ ⁺) (B), Th17 unutar CD45⁺ (CD4⁺IL-17⁺) (C) i Treg unutar CD45⁺ (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (D) ćelija u pankreasu. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za CD4⁺ unutar CD45⁺ (A), IFN- γ -produkujuće CD4⁺ (B), IL-17-produkujuće CD4⁺ (C) i FoxP3-ekspimirajuće CD4⁺CD25⁺ (D). Merjenja su izvršena na uzorcima od pet životinja po grupi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5. STZ - streptozotocin.

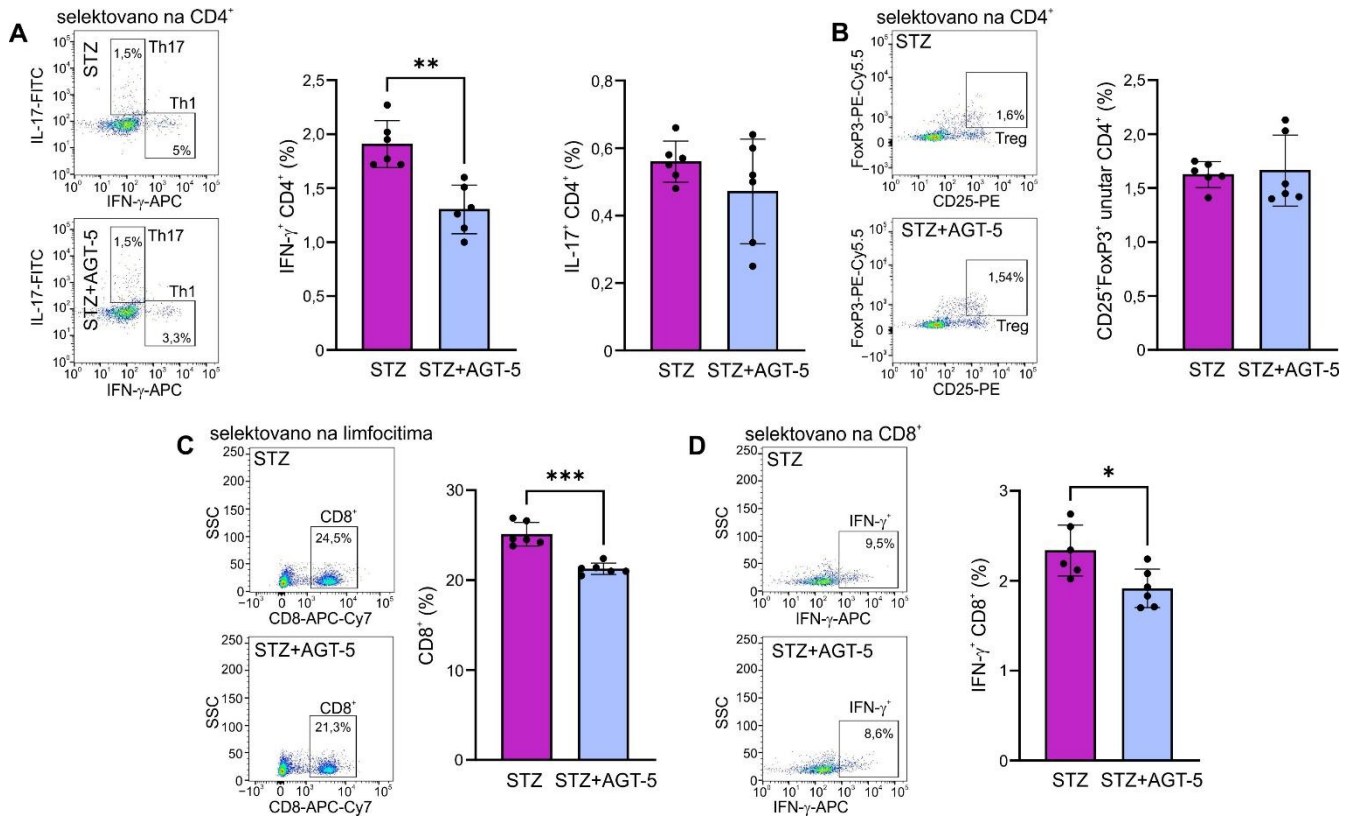
Analizom pankreasnih limfnih čvorova dobijeni su slični rezultati – tretman AGT-5 nije značajno uticao na zastupljenost MHCII⁺CD11c⁺ APC (Slika 19B), dok je povećao zastupljenost tolDČ

(CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) (Slika 19C). Takođe, kod AGT-5-tretiranih dijabetičnih životinja zabeleženo je smanjenje udela MHCII⁺CD11b⁺ APC (Slika 19A).



Slika 19. Efekat AGT-5 na antigen-prezentujuće ćelije u pankreasnim limfnim čvorovima *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat MHCII⁺CD11b⁺ (A), MHCII⁺CD11c⁺ (B) APC i toIDC (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) (C) u pankreasnim limfnim čvorovima. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za MHCII⁺CD11b⁺ (A), MHCII⁺CD11c⁺ (B) i toIDC unutar CD11c⁺CD11b⁻ (C). Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. *p < 0,05, **p < 0,01 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

U grupi dijabetičnih životinja tretiranih AGT-5 uočeno je smanjenje udela IFN- γ -produkujućih CD4⁺ T limfocita, dok je udeo IL-17-produkujućih CD4⁺ T limfocita (Slika 20A) i Treg ćelija ostao nepromenjen (Slika 20B). Kao i u pankreasu, ukupna zastupljenost CD8⁺ T limfocita (Slika 20C), kao i zastupljenost IFN- γ -produkujućih CD8⁺ T limfocita (Slika 20D), bila je snižena u pankreasnim limfnim čvorovima životinja koje su tretirane AGT-5.



Slika 20. Efekat AGT-5 na T limfocite u pankreasnim limfnim čvorovima *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat IFN- γ -produkujućih CD4⁺ ćelija definisanih kao Th1 (IFN- γ ⁺CD4⁺) i IL-17-produkujućih CD4⁺ ćelija definisanih kao Th17 (IL-17⁺CD4⁺) (A), Treg ćelija (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (B), CD8⁺ (C) i IFN- γ -produkujućih CD8⁺ (D) ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za subpopulacije Th1 i Th17 unutar CD4⁺ T limfocita (A), Treg ćelije unutar CD4⁺ T limfocita (B), CD8⁺ unutar T limfocita (C) i IFN- γ ⁺ unutar CD8⁺ (D). Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. *p < 0,05, **p < 0,01 ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Na osnovu prikazanih rezultata moguće je zaključiti da tretman AGT-5 ostvaruje svoje zaštitne efekte u mišjem modelu DT1 tako što povećava prisustvo tolD \dot{C} u pankreasnim limfnim čvorovima, kao i prisustvo tolD \dot{C} i Treg ćelija u pankreasu. Ovi tolerogeni efekti doveli su do smanjenog prisustva

pomoćničkih CD4⁺ i citotoksičnih CD8⁺ T limfocita, kao i do njihove smanjene sposobnosti da proizvode proinflamacijske citokine.

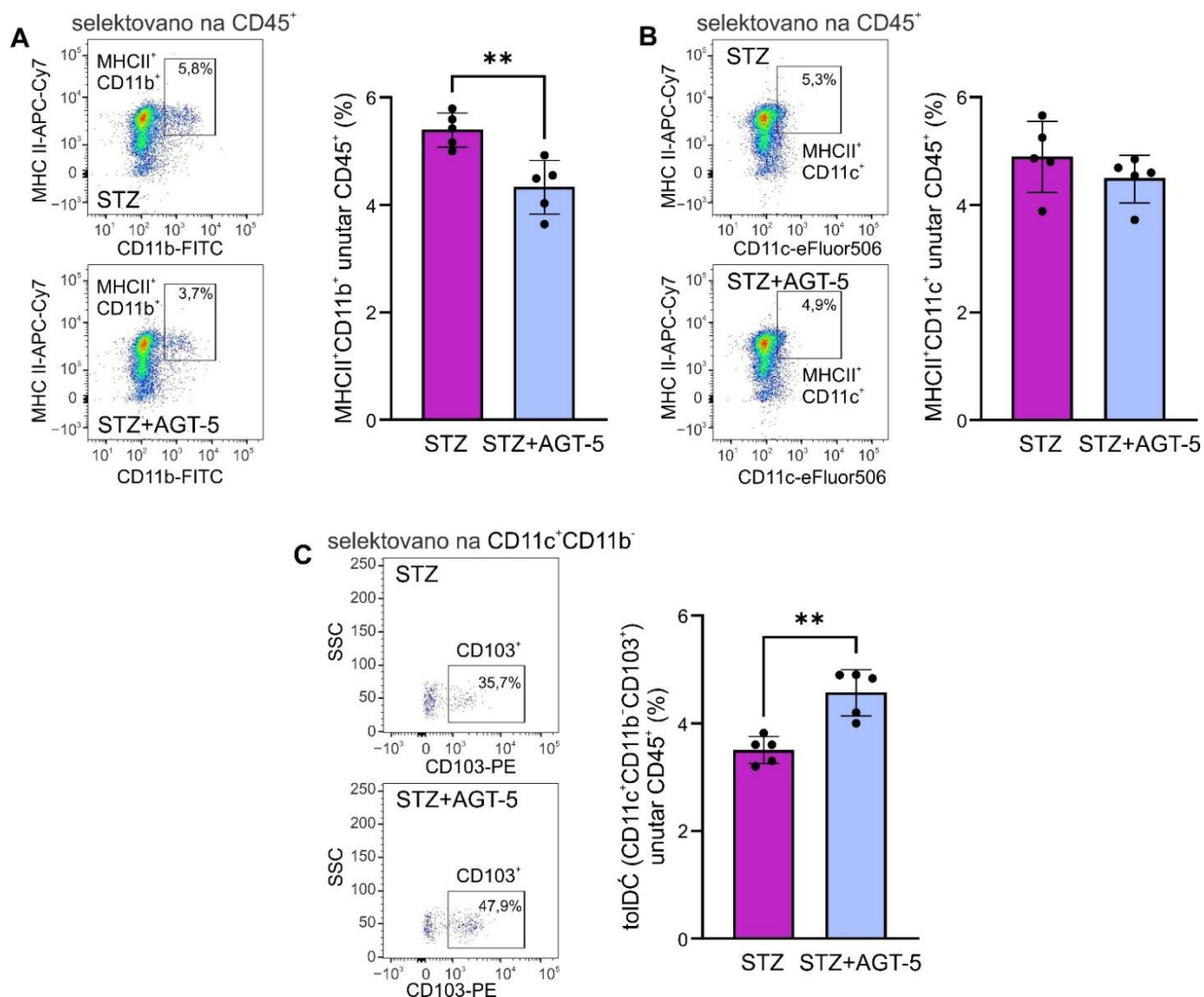
4.4.2 Uticaj AGT-5 na imunski odgovor u lamini propriji tankog creva *in vivo*

S obzirom da je AGT-5 primenjivan oralnim putem, očekivano je da bi prvi efekti bili ostvareni upravo na mestu njegove najveće apsorpcije - u tankom crevu. Lamina proprija se nalazi ispod sloja epitelnih ćelija tankog creva i sadrži brojne imunske ćelije različitih tipova, od kojih neke visoko ekspimiraju AHR (Pimentel-Muiños, 2021), kao što su ILC i CD4⁺ T limfociti (Yue i sar., 2020). Stoga su potencijalni antiinflamacijski efekti AGT-5 prevashodno posmatrani u lamini propriji tankog creva.

4.4.2.1 Uticaj AGT-5 na antigen-prezentujuće ćelije u lamini propriji tankog creva *in vivo*

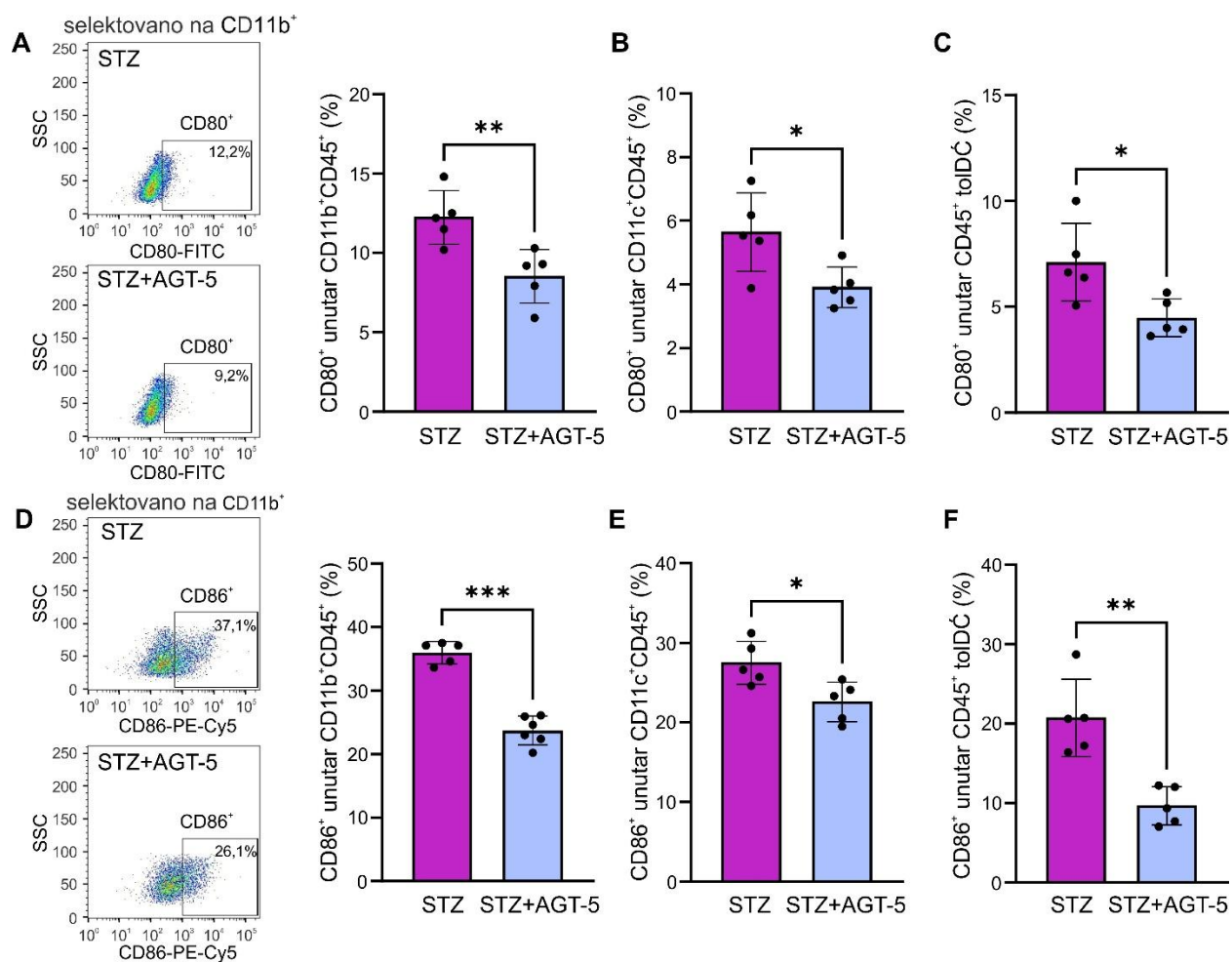
Kao i u slučaju prethodno analiziranih organa, najpre su posmatrani efekti AGT-5 tretmana na APC u mišjem modelu DT1⁻ na njihovu zastupljenost, sposobnost prikazivanja antigena, kao i sposobnost da posledično aktiviraju efektorske ćelije u lamini propriji tankog creva.

Tretman AGT-5 je značajno smanjio zastupljenost MHCII⁺CD11b⁺ APC (Slika 21A) i povećao udeo tolDC (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) (Slika 21C). Istovremeno, AGT-5 nije uticao na zastupljenost MHCII⁺CD11c⁺ APC u lamini propriji tankog creva (Slika 21B).



Slika 21. Efekat AGT-5 na antigen-prezentujuće ćelije u lamini propriji tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni prtočnom citofluorimetrijom. Procenat MHCII⁺CD11b⁺ (A), MHCII⁺CD11c⁺ (B) APC i tolDC (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) (C) u lamini propriji tankog creva. Prikazani su reprezentivni tačkasti grafici za MHCII⁺CD11b⁺ unutar CD45⁺ (A), MHCII⁺CD11c⁺ unutar CD45⁺ (B) i CD103⁺ populacija unutar CD11c⁺CD11b⁻ (C). Merjenja su izvršena na uzorcima od pet životinja po grupi. **p < 0,01 predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Kao indikator funkcionalnosti APC, posmatrana je ekspresija kostimulacionih molekula CD80 i CD86 koji su neophodni za aktivaciju i preživljavanje T limfocita. Ustanovljeno je da je ekspresija oba molekula smanjena nakon tretmana sa AGT-5 na svim posmatranim APC – CD11b⁺CD45⁺, CD11c⁺CD45⁺ APC i tolDC (Slika 22A-F).

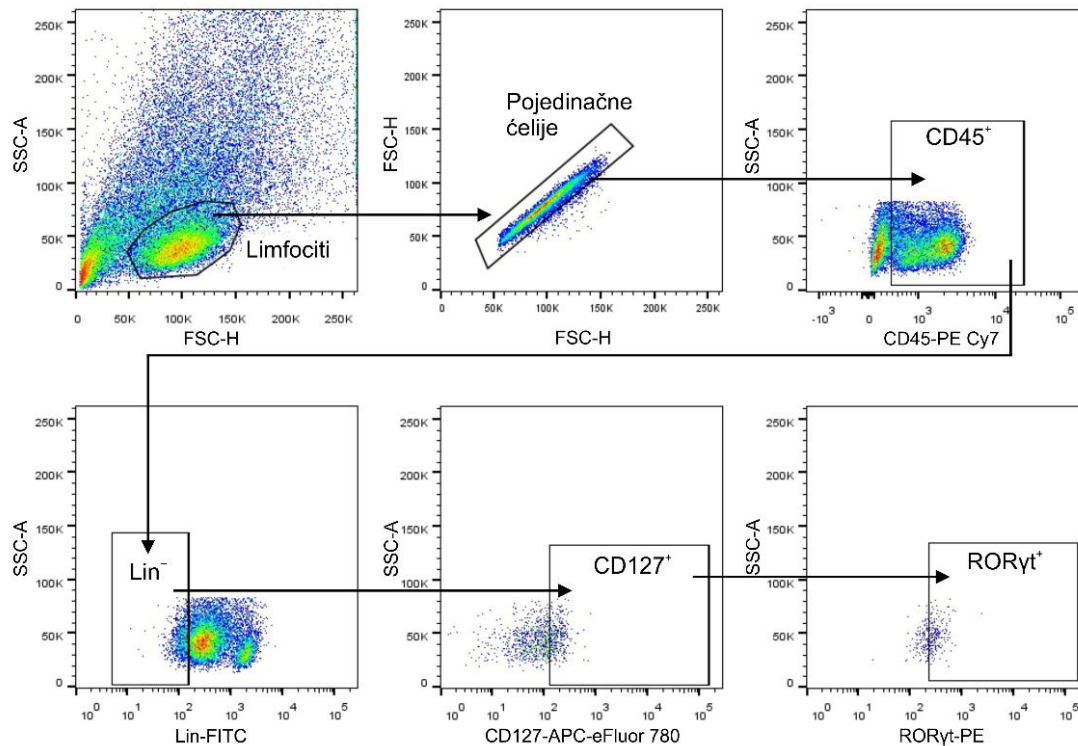


Slika 22. Efekat AGT-5 na funkciju antigen-prezentujućih ćelija u lamini proprijii tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat CD80⁺CD11b⁺CD45⁺ (A), CD80⁺CD11c⁺CD45⁺ (B), tolDC (CD80⁺CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺CD45⁺) (C), CD86⁺CD11b⁺CD45⁺ (D), CD86⁺CD11c⁺CD45⁺ (E) i tolDC (CD86⁺CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺CD45⁺) (F) APC u lamini proprijii tankog creva. Prikazani su reprezentivni tačkasti grafici za CD80⁺ ćelije unutar CD11b⁺CD45⁺ (A) i CD86⁺ ćelije unutar CD11b⁺CD45⁺ (D). Merenja su izvršena na uzorcima od pet životinja po grupi. * p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Ovi rezultati ukazuju da AGT-5 umanjuje kostimulacionu sposobnost ćelija u lamini proprijii tankog creva, dok bi uočena stimulacija tolDC mogla dodatno promovisati antiinflamacijsku sredinu, posledično inhibirajući aktivaciju efektorskih ćelija.

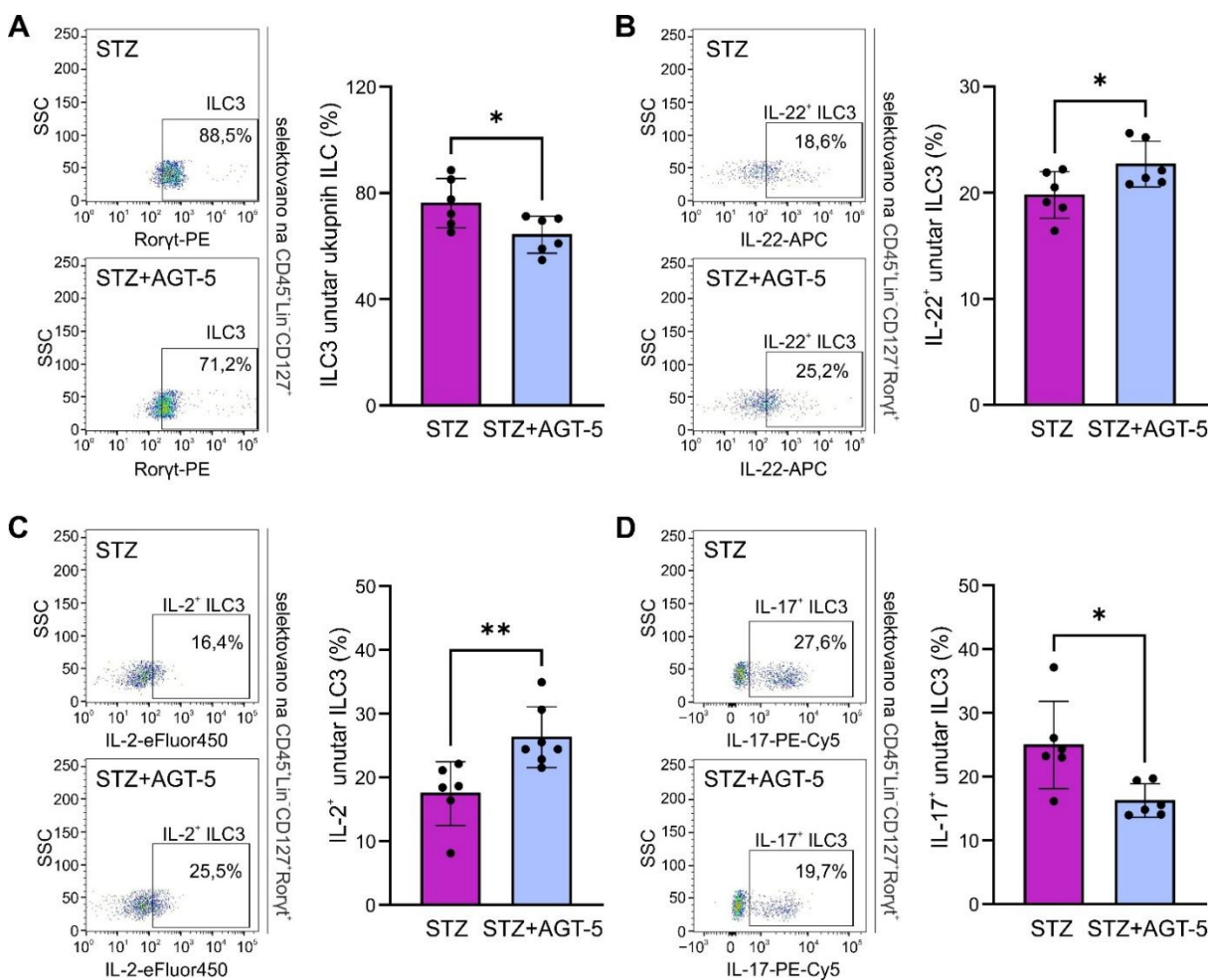
4.4.2.2 Uticaj tretmana AGT-5 na urodene limfoidne ćelije u lamini propriji tankog creva *in vivo*

U digestivnom traktu je najveći broj imunskih ćelija smešten u GALT limfoidnoj mreži (Griebel, 2016) koju čine lamina proprija, mezenterični limfni čvorovi i Pejerove ploče. Upravo u lamini propriji se nalazi populacija imunskih ćelija urođenog imunskog odgovora – ILC, koje imaju bitnu ulogu u inicijaciji imunskog odgovora u crevima. ILC3 subpopulacija se odlikuje visokom ekspresijom AHR (Kiss i sar., 2011) i shodno tome ove ćelije bi mogle u većoj meri podleći uticaju AGT-5 naspram ćelija koje imaju manju ekspresiju AHR. Stoga je ispitana sposobnost AGT-5 da moduliše ILC3 (Slika 23).



Slika 23. Strategija odabira ILC3 ćelija pri analizi protočnom citofluorimetrijom. Tačkasti grafici prikazuju pristup selekciji populacije ILC3, koje su definisane kao $CD45^+Lin^-CD127^+ROR\gamma t^+$ ćelije.

Iako je AGT-5 tretman doveo do smanjenja ukupne zastupljenosti ILC3 u lamini propriji tankog creva (Slika 24A), zabeležen je povećan udeo IL-22-produkujućih (Slika 24B) i IL-2-produkujućih (Slika 24C) ILC3, dok je u slučaju IL-17-produkujućih ILC3 zabeleženo smanjenje zastupljenosti u odnosu na kontrolne dijabetične životinje (Slika 24D).



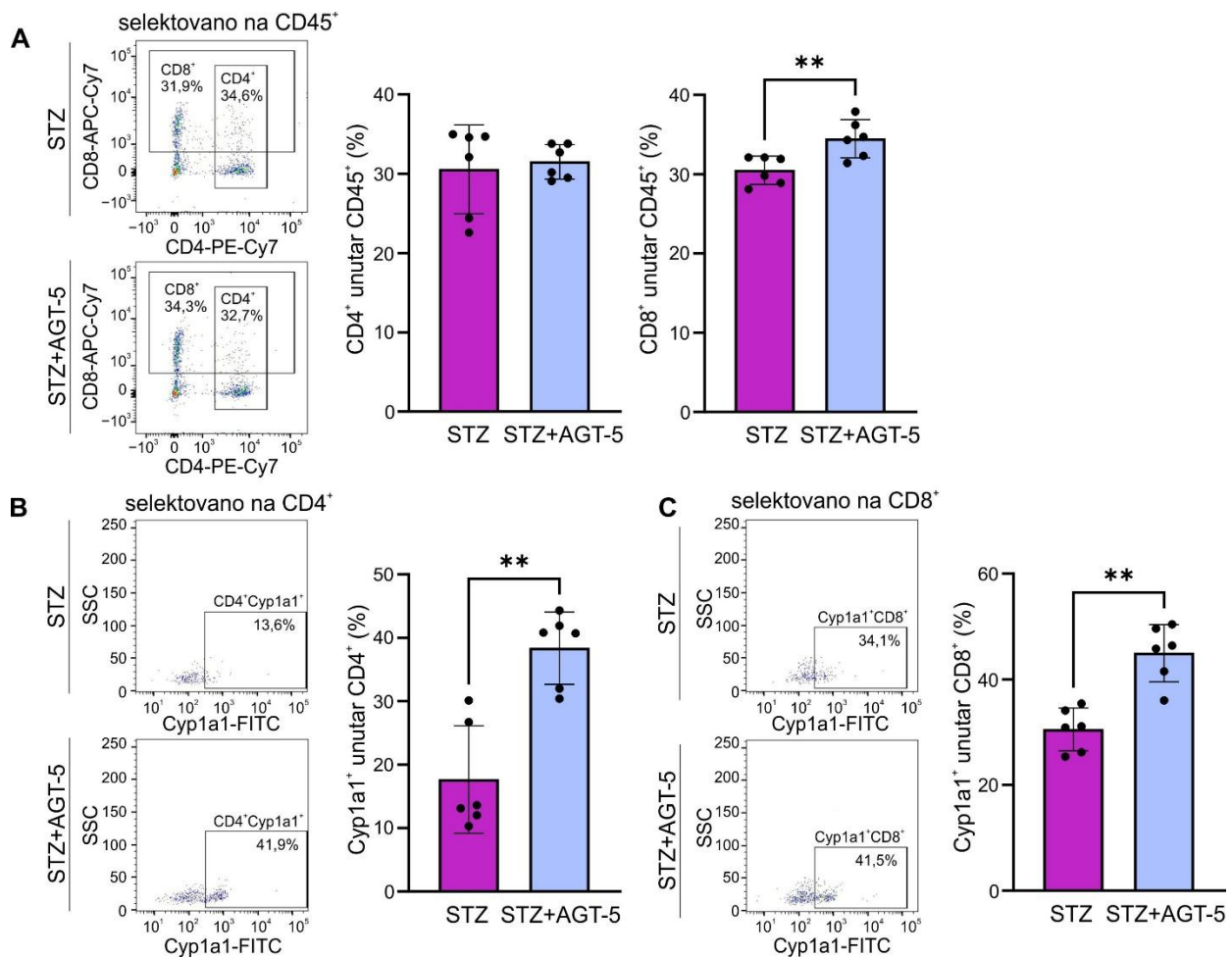
Slika 24. Efekat AGT-5 na urodene limfoidne ćelije u lamini proprijii tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat ILC3 (CD45⁺Lin⁻CD127⁺RORγt⁺) (A), IL-22-produkujućih ILC3 (CD45⁺Lin⁻CD127⁺RORγt⁺IL-22⁺) (B), IL-2-produkujućih ILC3 (CD45⁺Lin⁻CD127⁺RORγt⁺IL-2⁺) (C) i IL-17-produkujućih ILC3 (CD45⁺Lin⁻CD127⁺RORγt⁺IL-17⁺) (D) u lamini proprijii tankog creva. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija. Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. * p < 0,05, **p < 0,01 predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Ovi rezultati ukazuju da AGT-5 može modulirati ćelije urodene imunosti u lamini proprijii tankog creva, ostvarujući antiinflamacijske efekte koji se ogledaju u stimulaciji produkcije IL-2 i IL-22 od strane ILC3.

4.4.2.3 Uticaj AGT-5 na ćelije adaptivne imunosti u lamini propriji tankog creva *in vivo*

Nakon ispitivanja uticaja AGT-5 na ćelije urođene imunosti, u lamini propriji tankog creva dijabetičnih miševa su sledstveno analizirane efektorske ćelije adaptivne imunosti koje su značajne u patogenezi DT1, pomoćnički CD4⁺ i citotoksični CD8⁺ T limfociti.

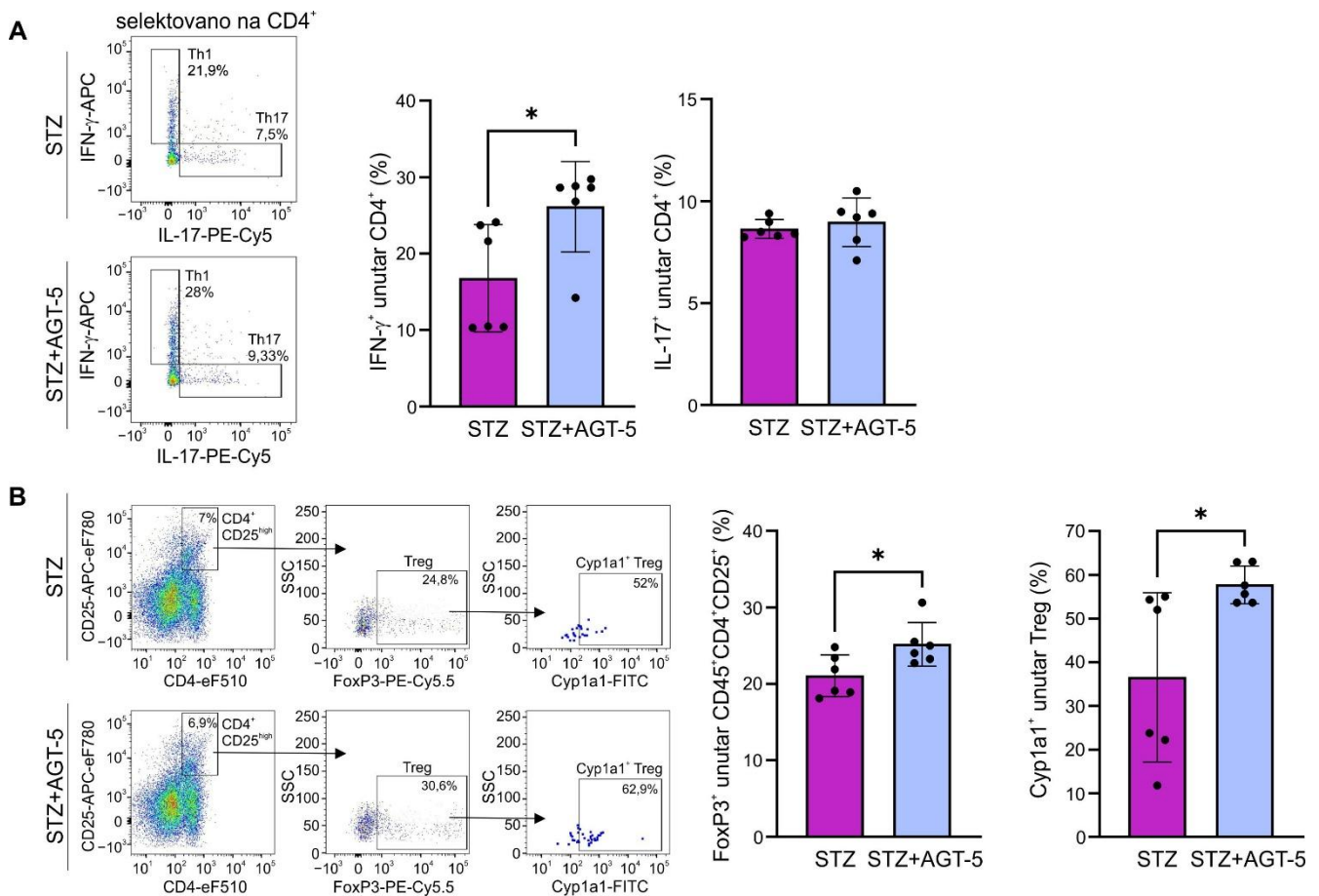
Za razliku od efekata uočenih u prethodno pominjanim tkivima, u lamini propriji tankog creva AGT-5 nije značajno uticao na udeo CD4⁺ ćelija, ali jeste doveo do povećanja udela CD8⁺ T limfocita (Slika 25A).



Slika 25. Efekat AGT-5 na ćelije adaptivne imunosti u lamini propriji tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat CD4⁺CD45⁺ i CD8⁺CD45⁺ (A), CYP1A1-ekspimirajućih CD4⁺ (CD4⁺ CYP1A1⁺) (B) i CYP1A1-ekspimirajućih CD8⁺ (CD8⁺ CYP1A1⁺) (C) ćelija u lamini propriji tankog creva. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija. Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. **p < 0,01,

predstavljaju statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Zarad potvrde da je AGT-5 svoje efekte u crevu ostvario upravo interakcijom sa AHR, posmatrana je ekspresija CYP1A1 – u slučaju CD4⁺ (Slika 25B), kao i CD8⁺ T limfocita (Slika 25C) je kod životinja tretiranih sa AGT-5 zabeležena veća procentualna zastupljenost ćelija koje ekspimiraju CYP1A1. U lamini propriji tankog creva ovih životinja je zabeleženo i povećanje udela Th1 (IFN- γ ⁺CD4⁺) ćelija, dok nije bilo efekta na zastupljenost Th17 (IL-17⁺CD4⁺) ćelija (Slika 26A).



Slika 26. Efekat AGT-5 na Th1, Th17 i Treg podtipove CD4⁺ T limfocita u lamini propriji tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat IFN- γ -produkujućih CD4⁺ (CD4⁺IFN- γ ⁺) i IL-17-produkujućih CD4⁺ (CD4⁺IL-17⁺) (A), Treg ćelija (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) i CYP1A1-ekspimirajućih Treg ćelija (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ CYP1A1⁺) (B) u lamini propriji tankog creva. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija. Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. *p < 0,05 predstavlja statistički

značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

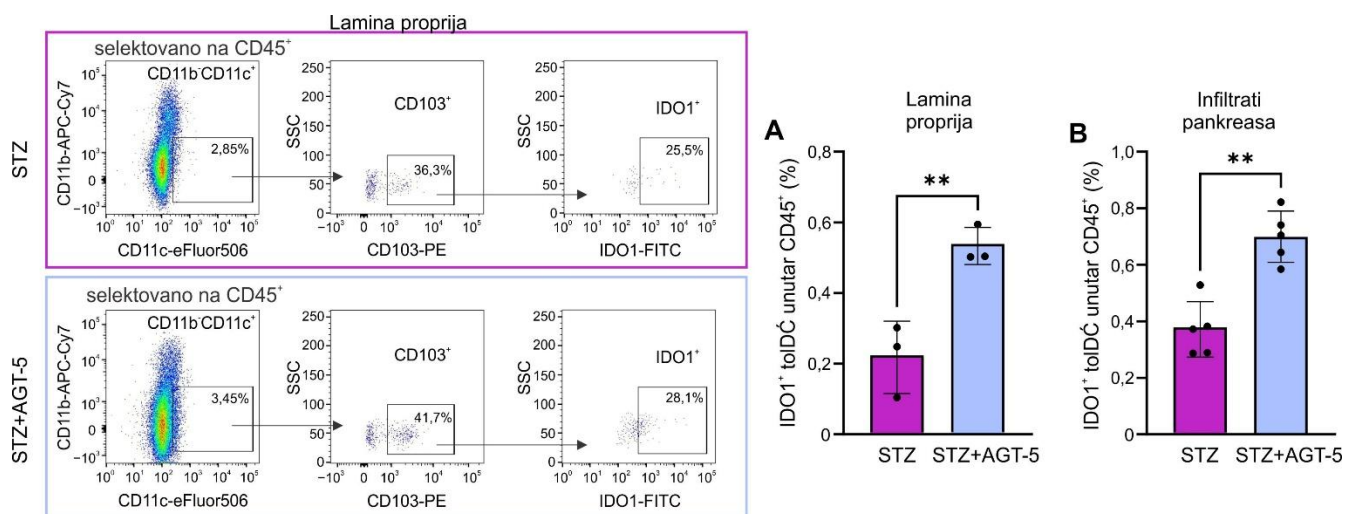
Pored ova dva podtipa CD4⁺ T limfocita, posmatrane su i Treg ćelije. Tretman sa AGT-5 je doveo do povećanja zastupljenosti Treg ćelija, a ujedno je potvrđeno da je pomenuti efekat posredovan modulacijom AHR na osnovu uočenog povećanja udela Treg ćelija koje eskprimiraju CYP1A1 kod dijabetičnih životinja koje su dobijale AGT-5 (Slike 26B).

Dobijeni rezultati u kojima je zabeleženo povećanje zastupljenosti CD4⁺, CD8⁺ i Treg ćelija koje eskprimiraju CYP1A1, ukazuju na sposobnost AGT-5 da putem interakcije sa AHR utiče na prirodu adaptivnog imunskog odgovora, što se i moglo uočiti u povećanoj zastupljenosti CD8⁺ i Treg ćelija u lamini propriji tankog creva nakon AGT-5 tretmana.

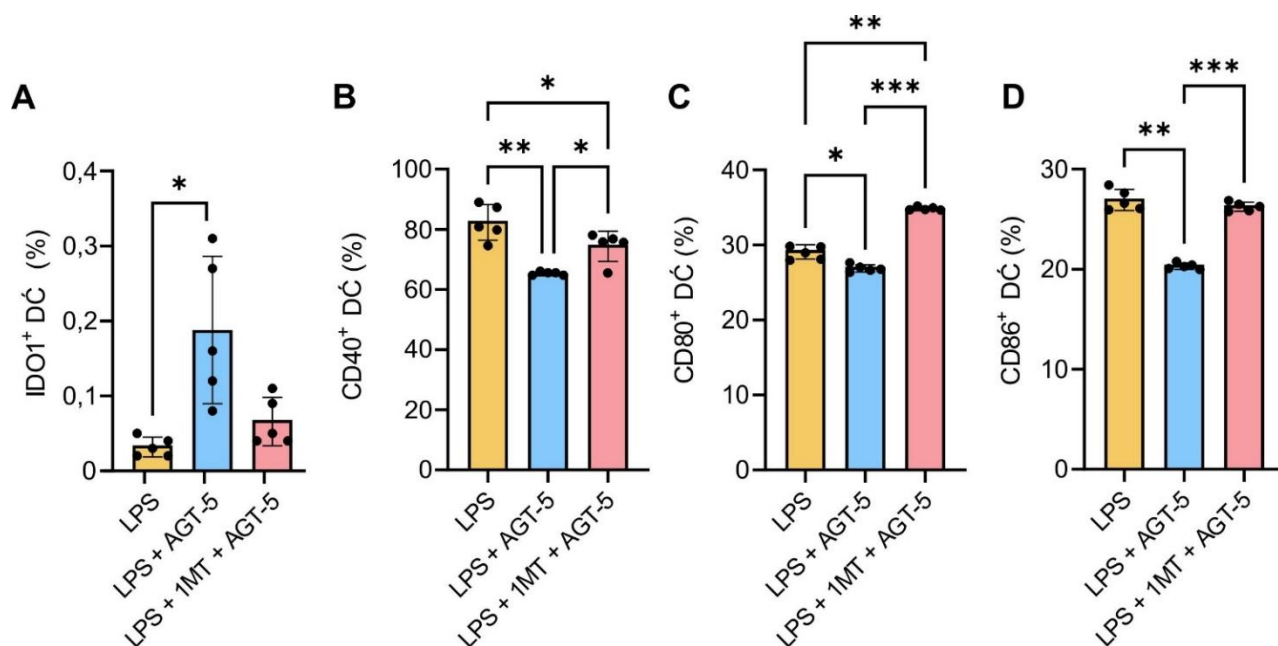
4.4.3 Uticaj AGT-5 na funkciju tolerogenih dendritskih ćelija i Treg ćelija

S obzirom da su dosadašnji rezultati pokazali da je tretman dijabetičnih miševa sa AGT-5 najveći efekat ostvarivao na tolDC i Treg ćelije, povećavajući njihovu zastupljenost u pankreasu i lamini propriji tankog creva, postavljeno je pitanje da li pored toga AGT-5 utiče i na njihovu sposobnost da iniciraju i uspostave tolerogenu sredinu. Stoga je pri analizi tolDC fokus bio na određivanju ekspresije indolamin 2,3-dioksidogenaze (IDO1). IDO1 je jedan od ključnih markera kojim se procenjuje tolerogena sposobnost tolDC, a pokazano je da aktivacija AHR može uticati na nivo ekspresije ovog enzima (Pallotta i sar., 2014).

U lamini propriji tankog creva (Slika 27A) i pankreasu (Slika 27B) dijabetičnih životinja koje su dobijale AGT-5 je zabeležen veći udeo tolDC koje eskprimiraju IDO1. Dodatno, inkubiranje *in vitro* diferenciranih DC poreklom iz koštane srži zdravog miša sa AGT-5 je dovelo do povećanja zastupljenosti DC koje su eskprimirale IDO1 (Slika 28A), dok je ekspresija kostimulacionih molekula CD40, CD80 i CD86 bila smanjena (Slika 28B-D). Prilikom primene 1-metil triptofana (1MT), inhibitora IDO1, odustvovali su svi zabeleženi efekti AGT-5 na DC (Slika 28A-D), što je potvrdilo da AGT-5 ostvaruje svoje efekte upravo dejstvom na IDO1.



Slika 27. Efekat AGT-5 na tolDC u lamini propriji tankog creva i pankreasu *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Procenat IDO1-ekspimirajućih tolDC (CD45⁺CD11b⁻CD11c⁺CD103⁺IDO1⁺) u lamini propriji tankog creva (A), IDO1-ekspimirajućih tolDC (CD45⁺CD11b⁻CD11c⁺CD103⁺IDO1⁺) u infiltratima pankreasa (B). Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za CD103⁺ unutar CD45⁺ i IDO1-ekspimirajuće ćelije unutar CD103⁺. Merenja su izvršena na uzorcima od tri ili pet životinja po grupi. **p < 0,01 predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ – streptozotocin.

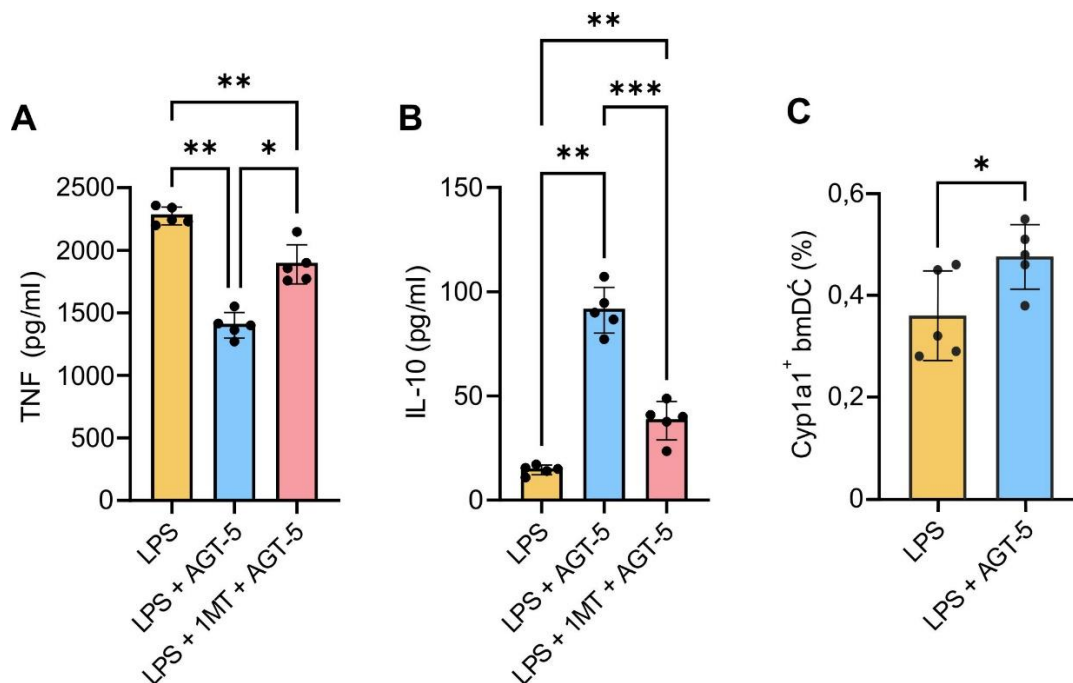


Slika 28. Efekat AGT-5 na ekspresiju IDO1 i kostimulacionih molekula na DC *in vitro*. DC izolovane iz koštane srži miša koje su diferencirane *in vitro*, inkubirane su sa LPS+DMSO, LPS+AGT-

5 (0,75 μ M) ili LPS+AGT-5 (0,75 μ M) uz prisustvo 1MT (0,5 mM) u trajanju od 24 h. DĆ su okarakterisane kao CD11c⁺CD103⁺ populacija ćelija. Protočnom citofluorimetrijom je utvrđen udeo IDO1-ekspimirajućih DĆ (A), CD40-ekspimirajućih DĆ (B), CD80-ekspimirajućih DĆ (C) i CD86-ekspimirajućih DĆ (D). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između LPS+DMSO, LPS+AGT-5 i LPS+AGT-5+1MT limfocita. 1MT – 1-metil triptofan.

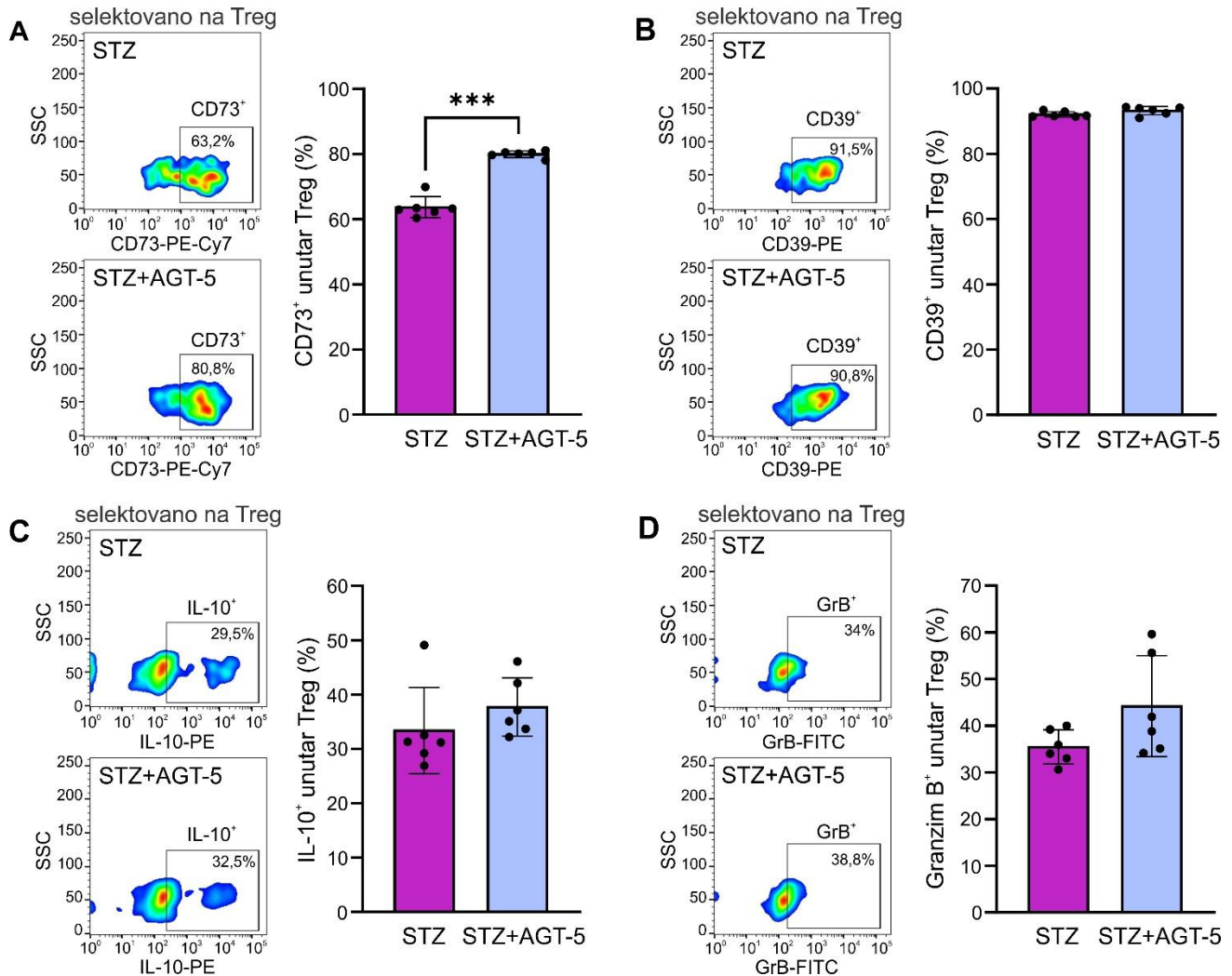
In vitro diferencirane DĆ poreklom iz koštane srži zdravog miša inkubirane sa AGT-5 su se takođe odlikovale smanjenjenom produkcijom TNF i povećanom produkcijom IL-10 (Slika 29A,B). Primena 1MT u ćelijskoj kulturi je poništila i ove efekte (Slika 29A,B).

U svakoj od pomenutih ćelijskih kultura je dodavan LPS radi testiranja efekata AGT-5 na sazrelim i aktiviranim dendritskim ćelijama. *In vitro* je zabeležen i porast u zastupljenosti DĆ koje su ekspimirale Cyp1a1 nakon izlaganja AGT-5 (Slika 29C), što dodatno potvrđuje da AGT-5 svoje imunomodulacijske efekte ostvaruje interakcijom sa AHR i sledstvenom indukcijom IDO1.



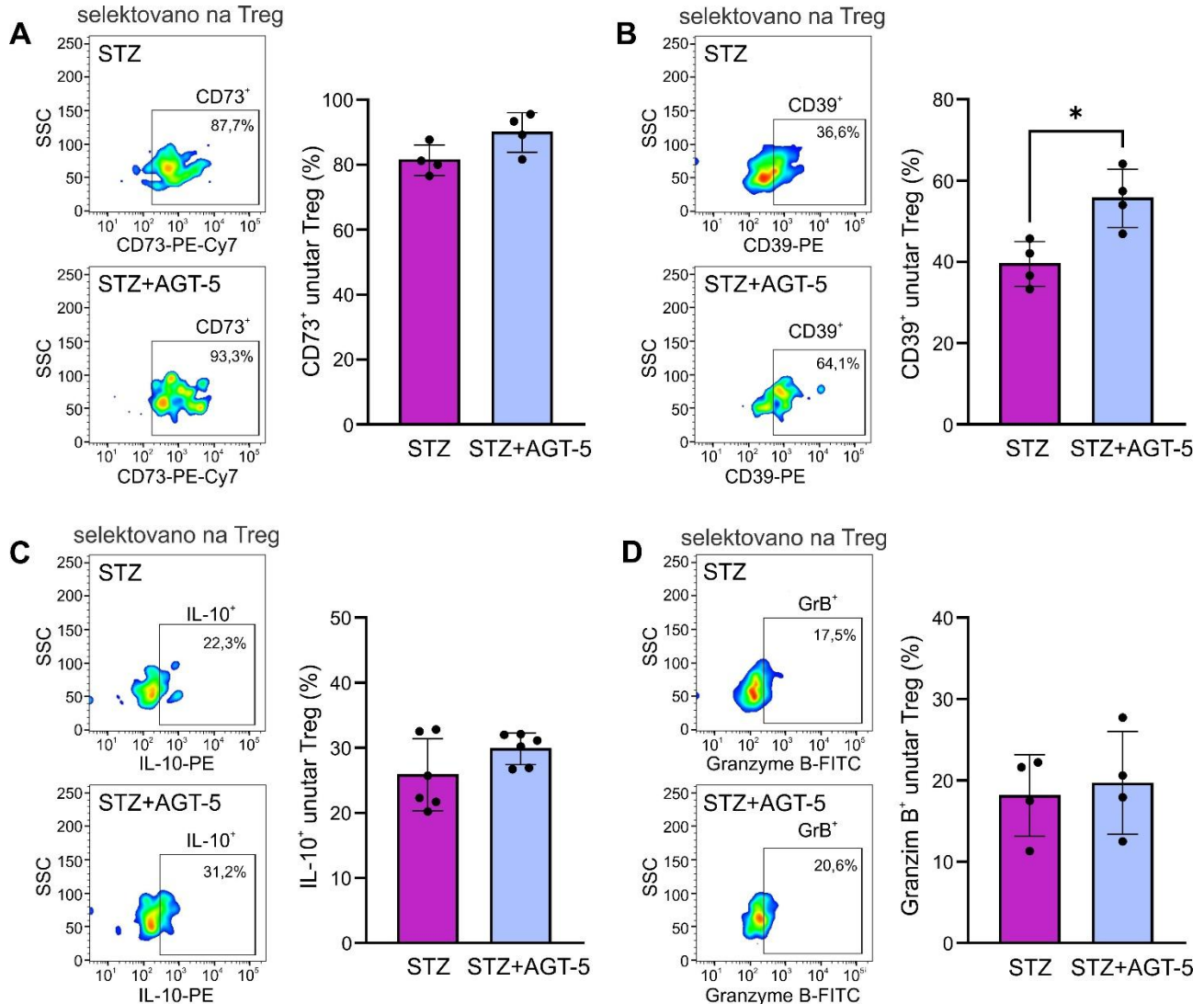
Slika 29. Efekat AGT-5 na produkciju citokina i ekspresiju CYP1A1 kod DĆ *in vitro*. DĆ izolovane iz koštane srži miša koje su diferencirane *in vitro*, inkubirane su sa LPS+DMSO, LPS+AGT-5 (0,75 μ M) ili LPS+AGT-5 (0,75 μ M) uz prisustvo 1MT (0,5 mM) u trajanju od 24 h. Pomoću ELISA metode je u supernatantima DĆ utvrđena koncentracija TNF (A) i IL-10 (B). Protočnom citofluorimetrijom je utvrđen udeo CYP1A1-ekspimirajućih DĆ (C). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 predstavljaju statistički značajnu razliku između LPS+DMSO, LPS+AGT-5 i LPS+AGT-5+1MT limfocita. 1MT – 1-metil triptofan.

Sposobnost AGT-5 da promoviše tolerogenu sredinu je merena i posmatranjem ekspresije markera funkcije Treg ćelija kao što su CD39, CD79, IL-10 i granzim B. Analizirajući uticaj AGT-5 tretmana na funkciju Treg ćelija dijabetičnih miševa, u lamini propriji tankog creva tretiranih životinja je utvrđeno povećanje zastupljenosti CD73⁺ Treg ćelija (Slika 30A), dok u pankreasu nije bilo promene u ekspresiji CD73 (Slika 31A). U pankreasu životinja tretiranih sa AGT-5 je uočeno povećanje zastupljenosti CD39⁺ Treg ćelija (Slika 31B), dok u lamini propriji nije zabeležena ova promena (Slika 30B). Pri upoređivanju dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5, ni u lamini propriji ni u pankreasu nije zabeležena promena u produkciji IL-10 i granzima B od strane Treg ćelija (Slika 30C,D i Slika 31C,D).



Slika 30. Efekat AGT-5 na funkciju Treg ćelija u lamini propriji tankog creva *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Treg ćelije su okarakterisane kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T limfociti. Procenat CD73-ekspimirajućih Treg ćelija (A), CD39-ekspimirajućih Treg ćelija (B), IL-10-produkujućih Treg ćelija (C) i Granzim B-ekspimirajućih Treg ćelija (D) u lamini

propriji tankog creva. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija. Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. *** $p < 0,001$ predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.



Slika 31. Efekat AGT-5 na funkciju Treg ćelija u pankreasu *in vivo*. Procenti ćelija izolovanih iz dijabetičnih netretiranih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5 (STZ+AGT-5) su utvrđeni protočnom citofluorimetrijom. Treg ćelije su okarakterisane kao CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T limfociti. Procenat CD73-ekspimirajućih Treg ćelija (A), CD39-ekspimirajućih Treg ćelija (B), IL-10-produkujućih Treg ćelija (C) i Granzim B-ekspimirajućih Treg ćelija (D) u pankreasu. Prikazani su reprezentativni tačkasti grafici za svaku od pomenutih populacija. Merenja su izvršena na uzorcima od šest životinja po grupi. * $p < 0,05$ predstavlja statistički značajnu razliku između dijabetičnih netretiranih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. STZ - streptozotocin.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da AGT-5 direktnom modulacijom IDO1 preko AHR utiče na funkciju tolDĆ, dok modulacijom ekspresije ektoenzima CD39 u pankreasu i CD73 u lamini propriji tankog creva povećava antiinflamacijske sposobnosti Treg ćelija.

4.5 Uticaj AGT-5 na humane imunske ćelije modulacijom AHR aktivnosti *in vitro*

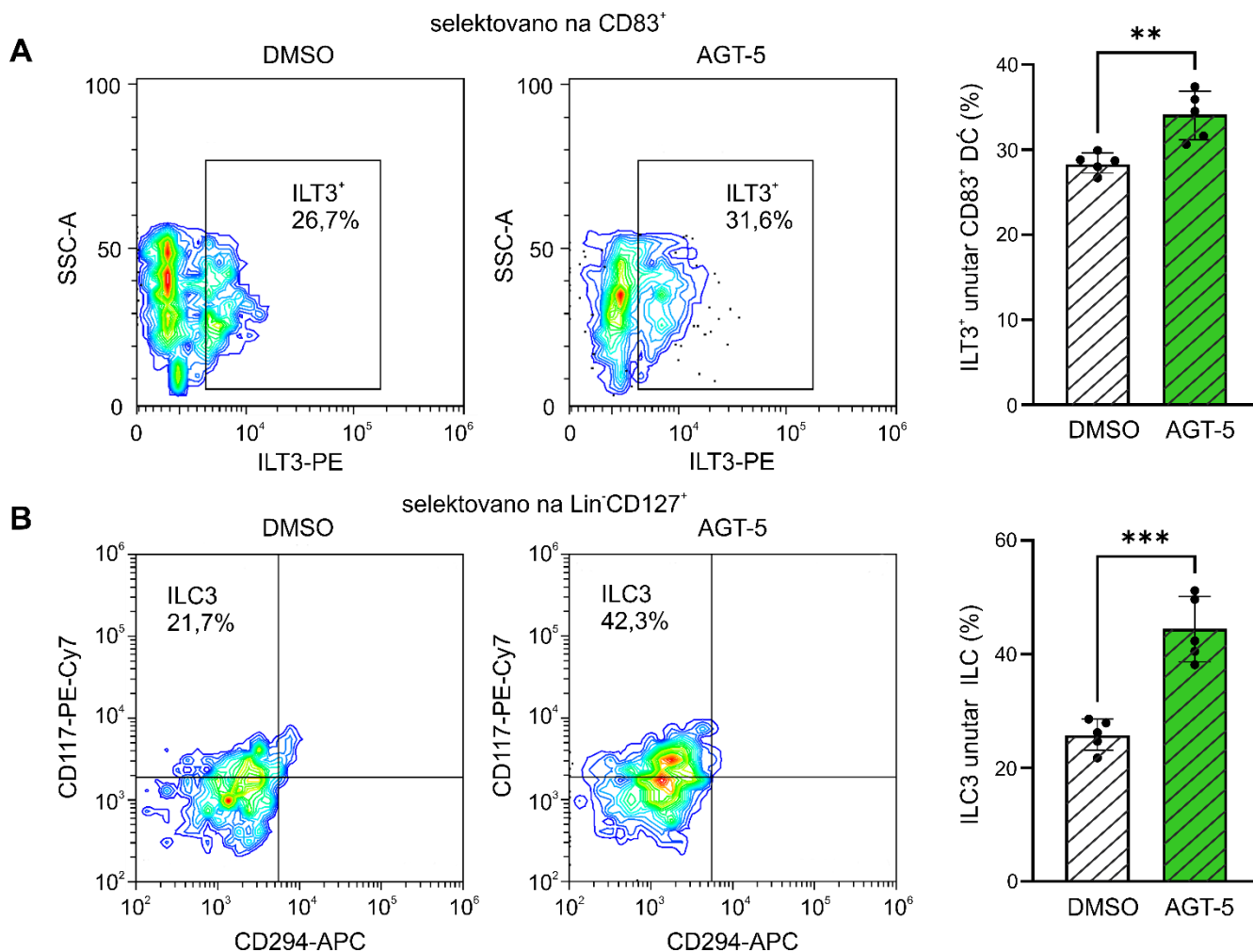
Kako je pokazano da AGT-5 može da ostvaruje imunomodulacijske efekte na mišjim ćelijama *in vitro* i na ćelijskim linijama humanog porekla, AGT-5 je testiran na imunskim ćelijama izolovanim iz humanih tonzila, kao pandan životinjskom modelu DT1.

4.5.1 Uticaj AGT-5 na humane DĆ i ILC3 *in vitro*

Da bi se utvrdio uticaj AGT-5 na funkciju humanih DĆ, posmatran je nivo ekspresije inhibitorynog receptora ILT3 (engl. Immunoglobulin-like transcript 3) putem kojeg ove ćelije mogu negativno regulisati T limfocite, pa dovesti i do njihove anergije (Allan i sar., 2000).

Suspenzija ćelija tonzila je inkubirana sa DMSO ili AGT-5 u trajanju od 48 h, nakon čega je protočnom citofluorimetrijom detektovana ILT3⁺ DĆ populacija, a određena je i zastupljenost ILC3 populacije. Utvrđeno je da AGT-5 dovodi do povećanja udela zrelih DĆ (CD45⁺CD11c⁺CD83⁺) koje ekspimiraju inhibitoryni molekul ILT3 (Slika 32A), iz čega se može zaključiti da AGT-5 ostvaruje sličan efekat, kako na mišjim, tako i na humanim DĆ. Dodatno, zabeleženo je da nakon inkubacije sa AGT-5 dolazi i do povećanja udela ILC3 u okviru ukupne populacije ILC (Slika 32B).

Ovim rezultatima se jasno pokazuje da AGT-5 ostvaruje imunomodulacijske efekte na humanim ćelijama urođene imunosti, što se ogleda u pospešivanju zastupljenosti antiinflamacijskih podtipova DĆ i ILC.



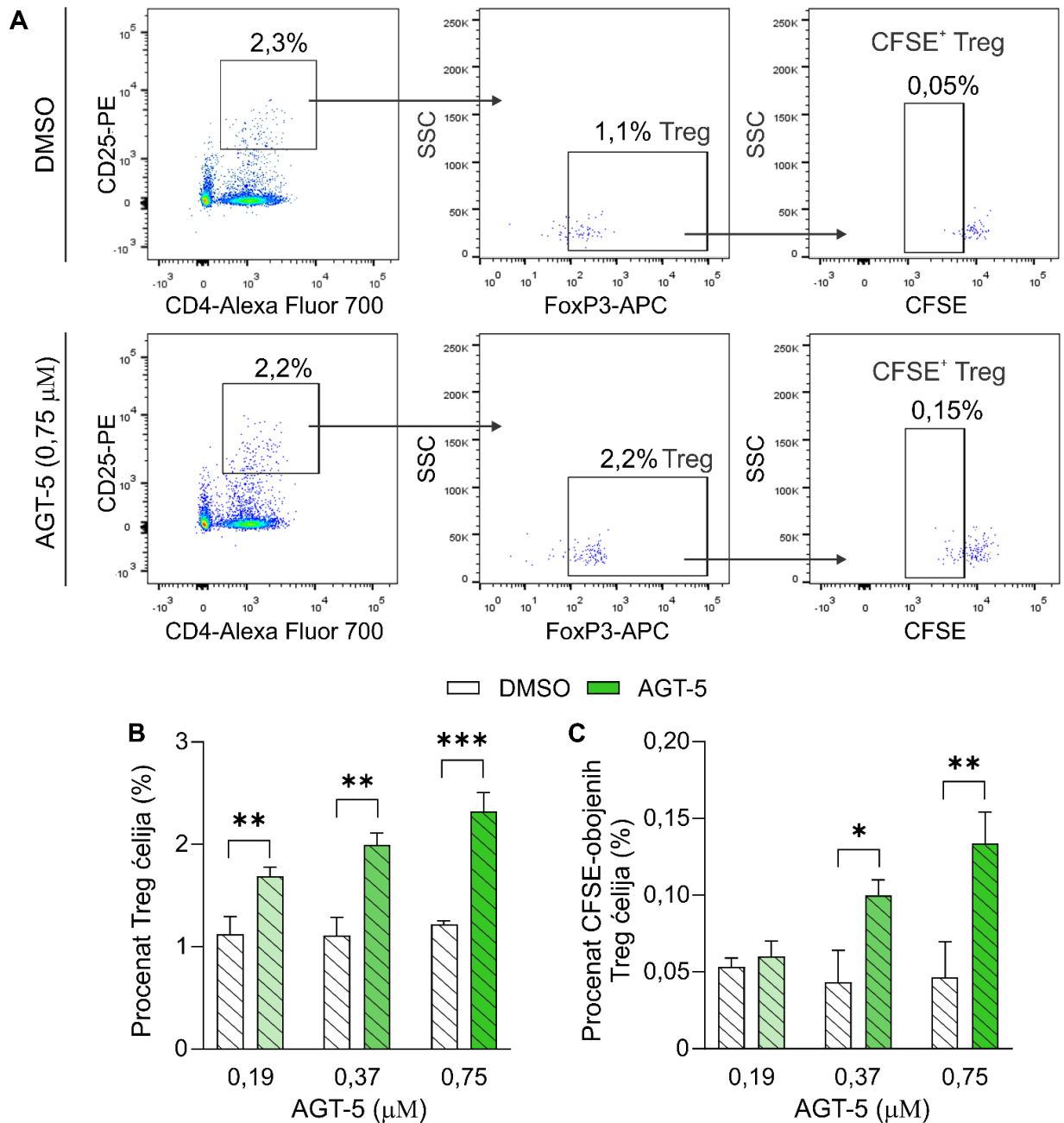
Slika 32. Efekat AGT-5 na humane DĆ i ILC3 *in vitro*. AGT-5 (0,75 μ M) ili DMSO su primenjeni na ćelijsku suspenziju iz humanih tonzila u trajanju od 48 h. Protočnom citofluorimetrijom je utvrđen udeo ILT3⁺ zrelih DĆ (CD45⁺CD11c⁺CD83⁺) (A) i ILC3 (Lin⁻CD127⁺CD294⁻CD117⁺) (B). Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za obe populacije ćelija. **p < 0,01 predstavlja statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih sa AGT-5 ili DMSO.

4.5.2 Uticaj AGT-5 na humane Treg ćelije *in vitro*

Kako je pokazano da AGT-5 ima sposobnost da moduliše mišje imunske ćelije urođenog i adaptivnog imunskog odgovora *in vitro* i *in vivo*, kao i humane urođene imunske ćelije *in vitro*, sledeći korak u istraživanju je podrazumevao ispitivanje uticaja AGT-5 na diferencijaciju humanih Treg ćelija. U ovu svrhu su korišćene ćelije izolovane iz humanih tonzila.

Nakon tretmana serijom različitih koncentracija AGT-5 ili DMSO (0,19 μ M, 0,37 μ M, 0,75 μ M) u trajanju od 48 h, FACS analizom je utvrđeno dozno-zavisno povećanje udela Treg fenotipa kod ćelija

inkubiranih u prisustvu AGT-5 (Slika 33A,B). Ispitana je i sposobnost proliferacije istih ćelija pomoću CFSE bojenja, pri čemu je zabeležen povećan udeo CFSE⁺ Treg ćelija kada su ćelije tretirane koncentracijama 0,37 μ M i 0,75 μ M AGT-5 (Slika 33A,C).



Slika 33. Efekat AGT-5 na diferencijaciju humanih Treg ćelija *in vitro*. Ćelije humanih tonzila su inkubirane sa rastućim koncentracijama AGT-5 ili DMSO u trajanju od 48 h. Pomoću FACS metode je utvrđen udeo Treg ćelija (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) (B), kao i proliferišućih Treg (CFSE⁺) ćelija (C). Priloženi su reprezentativni tačkasti grafici za populaciju CFSE⁺ Treg ćelija prilikom primene 0,75 μ M

AGT-5 (A). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ predstavljaju statistički značajnu razliku između uzoraka tretiranih AGT-5 i DMSO.

Ovakvi rezultati jasno ukazuju da AGT-5 ostvaruje antiinflamacijske efekte pri primeni na humanim ćelijama, sličnim efektima koji su zabeleženi na ćelijama poreklom iz miša – povećavajući udeo Treg ćelija i njihovu proliferaciju, na dozno-zavisani način.

5. Diskusija

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da AGT-5 ostvaruje antiinflamacijske efekte modulacijom AHR, i da njegova primena u mišjem modelu DT1 može dovesti do smanjenja stepena uništenja β ćelija pankreasa, ostvarujući povoljniju kliničku sliku. Postignuti antiinflamacijski efekti su posredovani oslabljenom sposobnošću APC da aktiviraju autoreaktivne T limfocite, kao i povećanjem zastupljenosti Treg ćelija i tolDC i stimulacijom njihove funkcije u crevu i u pankreasu nakon AGT-5 tretmana.

AHR je dugo posmatran kao receptor čija je najbitnija uloga da detektuje zagađivače kao što su policiklični aromatični ugljovodonici, dioksini (TCDD) i dugotrajni organski zagađivači (McIntosh i sar., 2009; Zhou i sar., 2010). Njihovom interakcijom sa AHR se pokreće transkripcija gena za enzime iz porodice citohroma P450 (CYP1A1, CYP1B1), čijom aktivnošću ovi molekuli bivaju uklonjeni (Gutiérrez-Vázquez i Quintana, 2018). Ipak, otkriveno je da ligandi poreklom iz hrane (kao što su flavonoidi, resveratol, derivati triptofana) mogu aktivirati AHR i time regulisati imunski odgovor (Nguyen i sar., 2015; Szelest i sar., 2021; Xue i sar., 2017). Razumevanjem mehanizama imunoregulatornih aktivnosti AHR i njihovom manipulacijom bi moglo doći do razvoja novih vidova terapija za inflamatorna i autoimunska oboljenja (Quintana, 2013).

Efekte koje AHR može ostvariti određuje kombinacija različitih faktora. Ovi efekti delom zavise od interakcija koje AHR može ostvariti sa transkripcionim faktorima, genima od značaja i šaperonskim molekulima, kao i od prirode liganda (antagonista ili agonista). Sem toga, na oblikovanje efekta koje AHR ostvaruje utiču koncentracija liganada, dužina aktivacije AHR (Ehrlich i sar., 2018), kao i mesto vezivanja na AHR molekulu sa kojim je ligand interagovao (Corre i sar., 2018). Dodatno, kako se neki ligandi mogu vezivati i za AHR i za druge transkripcione faktore, na ligand-specifičan efekat koji se ostvaruje preko AHR može uticati i unakrsna koaktivacija drugih transkripcionih faktora (Denison i Faber, 2017).

Dok je većina podataka o funkcijama AHR stečena koristeći ćelije i modele životinjskog porekla, struktura AHR varira između vrsta. Samim tim, isti ligand može izazvati drugačije efekte u zavisnosti od vrste na kojoj se primenjuje, što predstavlja jedan od najvećih ograničenja u translaciji saznanja dobijenih na životinjama (Unkila i sar., 1995). Kao finalni presek faktora od kojih najviše zavisi priroda aktivacije AHR, kao i posledičnih efekata te aktivacije, navode se: i) tip ćelija i tkiva, ii) afinitet vezivanja/interakcije liganda sa receptorom, iii) struktura i priroda liganda, iv) postojanje koaktivatorskih molekula (Gargaro i sar., 2016; Hankinson, 2005). Zbog svih navedenih faktora, dizajn novog potencijalnog AHR modulatora mora podrazumevati posedovanje najpovoljnije strukture i afiniteta za vezivanje AHR, kao i optimalne vrednosti drugih biohemijskih odlika i parametara bitnih za primenu molekula kao terapijskog agensa. U tu svrhu je sintetisan AGT-5, baziran na strukturi indirubina (Jonić i sar., 2024), jednog od najpotentnijih, netoksičnih AHR liganada koji je ispoljio antiinflamacijske efekte na životinjskim modelima različitih autoimunskih i inflamatornih oboljenja (Chuang i sar., 2024; Yang i sar., 2022).

Koristeći *in silico* pristup, utvrđena je sposobnost AGT-5 da se vezuje za AHR, što je zatim i potvrđeno *in vitro* primenom AGT-5 na reporterskim ćelijskim linijama humanog porekla (Caco2, THP-1), pri čemu je zabeležena povećana ekspresija RNK za Cyp1a1 gen, kao indikator aktiviranja AHR (Jonić i sar., 2024). Pored efekta na humanim ćelijama, AGT-5 je testiran i na mišjim peritonealnim makrofagima – nakon tretmana je detektovana veća ekspresija RNK za Cyp1a1 gen, kao i proteinski oblik enzima CYP1A1, čime je potvrđeno da AGT-5 može interagovati i sa humanom i mišjom

varijantom AHR. Istovremenom upotrebom AGT-5 i komercijalno dostupnog antagoniste AHR, CH-223191, izostao je efekat AGT-5 na T limfocitima, što je dodatno potvrdilo da AGT-5 svoje efekte postiže aktivacijom AHR. Takođe, uočen je i veći procenat Treg ćelija koje ekspimiraju CYP1A1 u mezenteričnim limfnim čvorovima zdravih miševa tretiranih AGT-5 u odnosu na netretirane miševe.

Toksičnost AHR liganada u velikoj meri ograničava njihovo korišćenje u terapijske svrhe. TCDD i I3S koji su prepoznati kao jedni od najpotentnijih AHR liganada indukuju citotoksične efekte pri različitim koncentracijama (Mimura i Fujii-Kuriyama, 2003; Schroeder i sar., 2010). Iz ovog razloga je testiran *in vitro* i *in vivo* uticaj AGT-5 na vijabilnost ćelija u više navrata, kao i njegova sposobnost da ispolji bilo kakav toksičan efekat. Najpre je utvrđeno da AGT-5 nije citotoksičan – poređenjem peritonealnih makrofaga inkubiranih sa DMSO i onih inkubiranih sa AGT-5, nije uočena značajna razlika procenata živih ćelija u uzorcima. Njegova toksičnost *in vivo* je najpre testirana na embrionima zebrića (*Danio rerio*) po pravilima i protokolima testiranja hemijskih supstanci (Delasoie i sar., 2020). Kao pozitivna kontrola je korišćen komercijalno dostupan AHR agonista I3S, uremični toksin koji nastaje tokom metaboličke obrade triptofana (Wikoff i sar., 2009). Izlaganjem embriona zebrića rastućim koncentracijama AGT-5 ili I3S, počevši 6 sati nakon fertilizacije a u trajanju do 120 sati nakon fertilizacije, pokazalo se da AGT-5 nije indukovao nijedan oblik deformacije ili oštećenja organa embriona ni pri najvećoj primenjenoj koncentraciji od 150 μM . Sa druge strane, I3S je već pri koncentraciji od 5 μM u embrionima zebrića indukovao nerkožu jetre, deformaciju skeleta (vilice i lobanje) i očiju, perikardijalni edem i nefrotoksičnost, dok je pri koncentraciji od 25 μM izazivao smrt embriona (Jonić i sar., 2024). Sumirano, ovi rezultati svedoče da je AGT-5 bezbedan za primenu na živim organizmima.

Prilikom izučavanja autoimunskih oboljenja, osim posmatranja imunološke niše u pogođenim organima ili sistemima organa, često je korisno uporedo izučavati imunski sistem gastrointestinalnog trakta, koji sadrži najveći udeo imunskih ćelija u telu, a koje su nalaze u tzv. GALT limfoidnoj mreži (Rivera i Lennon-Duménil, 2023). Poremećena mikrobiota, narušena mukozna barijera creva, kao i hronična inflamacija creva mogu učestvovati u inicijaciji i/ili progresiji autoimunskih oboljenja (Cai i sar., 2025; Nouri i sar., 2014). U slučaju DT1, postoje podaci koji jasno ukazuju da pri narušenoj mukoznoj barijeri creva dolazi do gubitka tolerancije na antigene poreklom od hrane i bakterija mikrobiote creva (Vaarala, 2012). Smatra se da je ovakva komunikacija između udaljenih organa, pankreasa i creva, odnosno GALT, omogućena preko mreže limfnih čvorova (Brown i sar., 2023). GALT naseljavaju specijalizovane populacije imunskih ćelija, od kojih najveći značaj u imunoregulaciji i održavanju tolerancije imaju tolDC i Treg ćelije (Wells i sar., 2010), dok je za očuvanje crevne barijere i opstanak pomenutih Treg ćelija ključna populacija ILC3 (Stojanović i sar., 2021). Takođe, otkriće da u destrukciji β ćelija pankreasa učestvuju CD8^+ T ćelije poreklom iz creva (Su i sar., 2025) dodatno ukazuje na značaj imunskog sistema creva u patogenezi DT1.

Uzimajući u obzir postojanje ose pankreas-crevo, kao i da postoje podaci da se promene u crevima odražavaju na imunski odgovor u drugim organima (Cai i sar., 2025), može se pretpostaviti da bi modulacija imunskog odgovora u crevima mogla da se odrazi i na pankreas. S obzirom da su metaboliti koji nastaju kao proizvodi razgradnje hrane u crevima, aktivnošću mikrobiote, prepoznati kao potentni AHR ligandi, nesumnjivo je da AHR učestvuje u oblikovanju imunskog odgovora u crevima (Rothhammer i Quintana, 2019). Stoga ideja manipulacije tj. stimulacije imunoregulatornih ćelija u crevima predstavlja pristup sa terapijskim potencijalom za lečenje DT1, naročito ukoliko je konkretna

meta modulacije AHR, koji je visoko eksprimiran kako u samom tkivu creva, tako i na DĆ i Treg ćelijama (Yue i sar., 2020).

Pored toga što je AGT-5 pokazao zadovoljavajući afinitet interagovanja sa odgovarajućim mestom vezivanja za AHR, upotrebom prediktivnog modelovanja je izračunato da AGT-5 poseduje i povoljne parametre koji određuju biološku dostupnost u gastrointestinalnom traktu (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) (Jonić i sar., 2024). Na osnovu svega navedenog, odlučeno je da se AGT-5 primenjuje na dijabetičnim miševima oralnom gavažom kako bi ostvario uticaj na imunski odgovor creva.

Oralni tretman sa AGT-5 je započet istog dana kada je miševima intraperitonealno data prva doza STZ, sa namerom da se ispituju mogućnosti sprečavanja nastanka DT1 od strane pomenutog AHR modulatora. Redovno merenje koncentracije glukoze u krvi dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 je pokazalo da je hiperglikemija i dalje bila prisutna ali u znatno blažem obliku nego kod netretiranih dijabetičnih miševa. Kontinuirano niže glikemijske vrednosti kod dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 od 15. dana od početka indukcije bolesti pa sve do kraja ogleada (32. dan), kao i smanjeno prisustvo insulitisa u pankreasnim ostrvcima u obe vremenske tačke ukazuju da AGT-5 ima antiinflamacijski i imunomodulacijski potencijal u DT1.

U studiji u kojoj je na NOD miševima primenjivan TCDD rastvoren u ulju od kikirikija, postignuti su slični rezultati. Naime, pri analizi histoloških preseka pankreasa, zabeležen je značajno niži procenat pankreasnih ostrvaca sa insulitisom i veći procenat zdravih ostrvaca kod tretiranih NOD miševa u odnosu na grupu životinja koje su dobijale samo ulje od kikirikija. Kako bi potvrdili da su protektivni efekti zaista posredovani aktivacijom AHR, polovini TCDD-tretiranih životinja su nastavili da daju samo ulje od kikirikija još osam nedelja. Nakon analize njihovih pankreasnih preseka, uočeno je značajno više pankreasnih ostrvaca sa insulitisom u odnosu na histološke preseke NOD miševa koji su nastavili da primaju TCDD. Takođe, svi NOD miševi koji su tretirani TCDD nisu razvili DT1 tokom tretmana, već tek nakon završetka istog. Time je u ovoj studiji još jednom prikazan potencijal aktivacije AHR da atenuira autoimunski odgovor (Kerkvliet i sar., 2009). Iako AGT-5 tretman nije sprečio razvoj bolesti u potpunosti, rezultati su komplementarni prethodnoj studiji – umnogome je smanjena destrukcija β ćelija, što pokazuju rezultati dobijeni analizom histoloških preseka pankreasa netretiranih dijabetičnih i dijabetičnih miševa tretiranih AGT-5. Dodatno, detektivano je više insulina u ostrvcima miševa tretiranih AGT-5 nego u netretiranim dijabetičnim miševima, što ukazuje na bolju očuvanost vijabiliteta i/ili funkcije β ćelija u pankreasnim ostrvcima.

U početnoj fazi indukcije DT1 u modelu izazvanom višestrukim malim dozama STZ dolazi do inicijalnog oštećenja β ćelija, usled čega se stvaraju i oslobađaju autoantigeni. APC migriraju u pankreas kako bi bili pokrenuti mehanizmi reparacije tkiva, ali neminovno, APC preuzimaju autoantigene β ćelija i prikazuju ih, čime se dalje indukuje aktivacija autoreaktivnih efektorskih ćelija (Koprivica i sar., 2025; Wu i sar., 2020). Kako su APC urođenog imunskog odgovora ključne u inicijaciji infiltracije efektorskih imunskih ćelija koje dovode do masovne destrukcije β ćelija (Bruggeman i sar., 2023), analiziran je uticaj AGT-5 na makrofage, DĆ i ILC.

Makrofagi eksprimiraju AHR i modulacija ovog receptora može uticati na njihovu diferencijaciju ka proinflamacijskom M1 ili antiinflamacijskom M2 fenotipu (Cannon i sar., 2022; Schiering i sar., 2017). Pri primeni CH-223191, antagoniste AHR, na mišjem modelu skvamoznog raka jednjaka,

zabeležen je smanjen procenat makrofaga M2 fenotipa, dok je kod transgenih miševa koji ne eksprimiraju AHR ustanovljena favorizacija M1 fenotipa makrofaga (Malany i sar., 2024). Sa druge strane, *in vivo* primena FICZ na mišjem modelu kolitisa je stimulisala diferencijaciju makrofaga ka M2 fenotipu, što je uticalo na smanjenje inflamacije u crevima (Li i sar., 2025). Iako poseduje sposobnost da aktivira AHR, AGT-5 nije ostvario primetne efekte na polarizaciju peritonealnih makrofaga miša, posmatrajući odnos M1 i M2 fenotipova u *in vitro* uslovima, u poređenju sa uzorcima na kojima je primenjivan samo DMSO. Sa druge strane, dok sam odnos M1 i M2 fenotipova nije bio promenjen, inkubacija sa AGT-5 je dovela do skoro pet puta veće zastupljenosti oba fenotipa makrofaga. Ovakav rezultat se može protumačiti u skladu sa prirodom AHR liganada – njihovi efekti u velikoj meri zavise od uslova sredine u kojoj se primene, kao i od samog primenjenog liganda. Primera radi, studija u kojoj su izučavani efekti indol-3-karbinola (I3C) i TCDD na polarizaciju THP-1 ćelija je dala zanimljive rezultate – iako su oba liganda opisana kao agoniste AHR, I3C je značajno stimulisao diferencijaciju ka M2 fenotipu makrofaga, dok je TCDD u manjoj meri favorizovao diferencijaciju ka M1 fenotipu (Omrani i sar., 2025). Dodatno, sazrevanjem/diferencijacijom makrofaga raste i ekspresija AHR u ovim ćelijama (Peres i sar., 2017), što bi moglo objasniti intenzitet uočenog efekta.

Osim makrofaga, DC su još jedna bitna grupa profesionalnih APC koje učestvuju u aktivaciji autoreaktivnih T limfocita u DT1 (Bruggeman i sar., 2023). Rasprostranjenost i cirkulacija DC po tkivima je takva da su svakodnevno izložene AHR ligandima, a s obzirom da su DC jedne od APC koje visoko eksprimiraju AHR, neminovno je da aktivacija/inhibicija AHR utiče na njihovu diferencijaciju i funkciju, pri čemu efekti koji se postižu mogu značajno varirati od liganda do liganda (Quintana i sar., 2014; Rothhammer i Quintana, 2019). Primena AHR liganada kao što su 2-(1'H-indol-3'-karbonil)-tiazol-4-metil ester karboksilne kiseline (ITE) ili lakvinimod u eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), modelu multiple skleroze, stimulisala je diferencijaciju DC u tolDC i na taj način modulirala ovo autoimunsko oboljenje (Jolivel i sar., 2013; Quintana i sar., 2010). Slično, AGT-5 tretman je povećao procentualnu zastupljenost tolDC u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva, ali nije uticao na zastupljenost klasičnih MHCII⁺CD11c⁺ APC ni u jednom od ova tri tkiva. Osim uticaja na zastupljenost, AGT-5 je atenuirao sposobnost ovih ćelija da aktiviraju efektorske T limfocite u lamini propriji tankog creva – nakon tretmana dijabetičnih miševa sa AGT-5 zabeležen je manji broj klasičnih APC (CD11b⁺, CD11c⁺) i tolDC koje eksprimiraju kostimulacione molekule CD80 i CD86. Značajnost u smanjenju ekspresije ovih kostimulacionih molekula se ogleda u činjenici da je njihova interakcija sa CD28 receptorom na T limfocitima neophodna za aktivaciju, diferencijaciju i preživljavanje T limfocita – smanjenjem ekspresije CD80 i CD86 se prevashodno ograničava proliferacija proinflamacijskih podtipova T limfocita (Li i sar., 2016). Osim ovih kostimulacionih molekula, modulacijom AHR na DC može biti stimulisana ekspresija enzima IDO1 i IDO2 koji razgrađuju triptofan do L-kinurenina (Nguyen i sar., 2010). L-kinurenin deluje kao AHR agonista i stimuliše diferencijaciju Treg ćelija (Fallarino i sar., 2006). Tretman sa AGT-5 je kod dijabetičnih miševa povećao zastupljenost tolDC koje eksprimiraju IDO1 i u lamini propriji tankog creva, i u pankreasu. Dodatno, u *in vitro* uslovima, AGT-5 je sprečio sazrevanje DC, čemu svedoči umanjena ekspresija kostimulacionih molekula CD40, CD80 i CD86. Istovremenom primenom 1MT, inhibitora IDO1, ti efekti su bili sprečeni u ćelijskoj kulturi. Ujedno, primenom AGT-5 u kulturi DC, zabeležena je veća ekspresija CYP1A1 enzima i produkcija citokina IL-10, dok je produkcija TNF bila smanjena. Na ovaj način, ne samo da je potvrđeno da AGT-5 ostvaruje efekat aktivacijom AHR, već i da usmerava DC ka tolerogenom fenotipu i pospešuje njihove imunosupresivne sposobnosti, što bi trebalo dodatno potvrditi primenom funkcionalnih eseja u budućim istraživanjima. Takođe, analizom DC humanog

porekla tretiranih sa AGT-5 je ustanovljeno da AGT-5 može indukovati efekte slične onim ostvarenim na DC mišjeg porekla.

Kao marker zrelosti humanih DC je posmatrana ekspresija CD83, molekula čija ekspresija se indukuje u odgovoru na aktivaciju receptora sličnih Tollu (Prazma i Tedder, 2008). Iako su pojedina istraživanja ukazivala da CD83 može ostvariti inhibicioni efekat na aktivaciju T ćelija *in vivo* i *in vitro* (Xu i sar., 2007; Zinser i sar., 2004), slične studije nisu mogle da potvrde ovakve rezultate (Pashine i sar., 2008), stoga je njegova uloga u regulaciji T ćelijskog odgovora ostala nepoznata. Potencijal DC da suprimira imunske ćelije je procenjivan po ekspresiji ILT3 molekula. Povećana ekspresija ILT3 je asocirana sa tolerogenim svojstvima DC, a pokazano je i da je neophodna i za indukciju Treg ćelija (Brenk i sar., 2009). Nakon *in vitro* primene AGT-5 u kulturi humanih ćelija, zabeleženo je povećanje udela ILT3⁺CD83⁺ DC, što ukazuje da AGT-5 usmerava diferencijaciju DC ka tolerogenom fenotipu i stimuliše njihovu regulatornu funkciju. Ovakvi efekti AGT-5 su u skladu sa rezultatima studije u kojoj je testirana sposobnost AHR liganda benzo(a)pirena (BP) da moduliše diferencijaciju i funkciju DC – nakon *in vitro* tretmana zrelih DC sa BP, zabeležena je povećana ekspresija ILT3 receptora, što su autori naveli kao pokazatelj sposobnosti BP da putem aktivacije AHR indukuje tolerogen fenotip kod DC (Sadeghi Shermeh i sar., 2023).

ILC3 su ćelije urođenog imuniteta koje imaju bitnu ulogu u održavanju i jačanju crevne barijere (Miani i sar., 2018), što može biti od naročitog značaja u DT1 jer je narušavanje crevne barijere jedan od faktora koji doprinosi nastanku ove bolesti (Mejía-León i Calderón de la Barca, 2015). ILC3 visoko ekspimiraju AHR (Yue i sar., 2020), a ustanovljeno je da AHR poseduje bitnu ulogu u diferencijaciji i proliferaciji ove podgrupe ILC (Kiss i sar., 2011). Iako je AGT-5 uzrokovao smanjenje zastupljenosti ILC3 u odnosu na ukupnu populaciju ILC u lamini propriji tankog creva dijabetičnih miševa, značajno je smanjio udeo ILC3 koje su produkovale proinflamacijski IL-17, a povećao udeo ILC3 koje su produkovale antiinflamacijske IL-2 i IL-22. S obzirom da ima dokaza da je crevna barijera narušena tokom predijabetičnog stanja (Sorini i sar., 2019), povećana produkcija IL-22, citokina koji je ključan za očuvanje crevne barijere (Li i sar., 2023), bi mogla predstavljati značajan efekat AGT-5. Ipak, radi potvrde efikasnosti pomenutih efekata AGT-5 u očuvanju crevne barijere potrebno je u budućim studijama ispitati funkcionalnost i propustljivost crevne barijere dijabetičnih životinja tretiranih AGT-5. IL-2 je bitan za opstanak i proliferaciju Treg ćelija, a IL-2 poreklom od ILC3 je neophodan za pravilnu aktivaciju Treg ćelija u lamini propriji (Saksida i sar., 2023). U skladu sa ovim podacima, pokazano je i da je zastupljenost ILC3, IL-2-produkujućih ILC3 i Treg ćelija u lamini propriji tankog creva snižen prilikom razvoja DT1 kod NOD miševa, kao i nakon indukcije DT1 pomoću višestrukih malih doza STZ (Saksida i sar., 2023). Dodatno, AGT-5 je u ćelijskoj kulturi dobijenoj iz humanih tonzila doveo do povećanja udela ILC3 unutar ukupnog broja ILC. Tokom inicijacije DT1, nakon dospeća autoreaktivnih T limfocita u pankreasne limfne čvorove, odnosno pankreas, i njihove aktivacije pri susretu sa APC, započinje proces uništavanja β ćelija Langerhansovih ostrvaca. Destrukciju vrše autoreaktivni Th1 i Th17 pomoćnički CD4⁺ limfociti, kao i citotoksični CD8⁺ T limfociti (Bruggeman i sar., 2023; Ferraro i sar., 2011).

Th17 ćelije ekspimiraju AHR i aktivacija ovog receptora igra ključnu ulogu u njihovoj diferencijaciji (Veldhoen i sar., 2009). Ipak, pokazano je da su AHR ligandi istog tipa, kao što su AHR agonisti endogenog porekla, indukovali suprotne efekte u različitim studijama. *In vitro* i *in vivo* primena FICZ, endogenog AHR agoniste, selektivno je stimulisala diferencijaciju i proliferaciju Th17 ćelija (Quintana i sar., 2008; Veldhoen i sar., 2008). Sa druge strane, endogeni AHR ligand ITE je pri *in vitro*

diferencijaciji CD4⁺ T ćelija smanjio udeo Th17 CD4⁺ T ćelija (Wei i sar., 2014). Kod tretiranih dijabetičnih životinja, AGT-5 je ostvario efekat nalik ITE – indukovao je smanjenje udela Th17 ćelija u pankreasu, dok u pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva nije zabeležena značajna promena brojnosti u odnosu na netretirane dijabetične životinje. Kako je inhibicija funkcije Th17 ćelija u NOD miševima dovela do smanjenog inteziteta bolesti (Emamaullee i sar., 2009), efekat AGT-5 tretmana na Th17 ćelije u pankreasu bi mogao delom objasniti ublažavanje uočene kliničke slike kod dijabetičnih miševa.

Primena AGT-5 u stanju homeostaze tj. na zdravim C57BL/6 miševima, uzrokovala je smanjenje udela Th1 CD4⁺ T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima, stoga je bilo očekivano smanjenje iste populacije ćelija u DT1. Iako je zabeleženo smanjenje ukupnog udela CD4⁺ T limfocita u pankreasu, kao i smanjenje zastupljenosti Th1 ćelija u pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima tretiranih dijabetičnih životinja, AGT-5 je postigao suprotni efekat u lamini propriji tankog creva ovih životinja. Naime, u lamini propriji dijabetičnih miševa je, nakon tretmana sa AGT-5, zabeležena povećana zastupljenost IFN- γ -produkujućih CD4⁺ T ćelija, bez ostvarivanja značajnog uticaja na zastupljenost ukupnih CD4⁺ T limfocita. Pokazano je da aktivacija AHR na Th17 T ćelijama u prisustvu IL-27 kojeg proizvode lokalne APC može povećati diferencijaciju T ćelija ka Th1 fenotipu (Stumhofer i sar., 2006). Okidač za produkciju IL-27 bi bila promena mikrobiote. Na ovaj način, organizam pokušava da povrati homeostazu mikrobiote creva, uklanjanjem bakterija patogenog soja ili prenamnoženog soja bakterije (Maynard i Weaver, 2009). Kako je poznato da je poremećena mikrobiota asocirana sa razvojem DT1 (Giongo i sar., 2011), moguće je da je tretman sa AGT-5 kroz pospešivanje Th1 ćelija u lamini propriji tankog creva doprineo kontroli disbioze u crevima dijabetičnih miševa, iako promene u mikrobioti nisu bile predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji.

Pored CD4⁺ T limfocita, u destrukciji β ćelija učestvuju i citotoksični CD8⁺ T limfociti (Bruggeman i sar., 2023). Pokazano je da aktivacija AHR u CD8⁺ T limfocitima može indukovati epigenetičke promene (Winans i sar., 2015), kao i suprimirati njihovu efektorsku funkciju u virusnoj infekciji (Lawrence i sar., 2006). AGT-5 je ostvario suprimirajuće efekte u pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima tretiranih dijabetičnih miševa, gde je zabeležen smanjen udeo IFN- γ -produkujućih i ukupnih CD8⁺ T limfocita. Za razliku od ovih tkiva, u lamini propriji tankog creva dijabetičnih miševa je nakon AGT-5 tretmana zabeležena povećana ukupna zastupljenost CD8⁺ T limfocita. Kao objašnjenje ovakvog fenomena mogu poslužiti zaključci studije koju su sprovedli Dean i saradnici. Naime, ustanovljeno je da AHR stimuliše diferencijaciju tkivno-rezidentnih CD8⁺ T ćelija koje deluju isključivo lokalno i u infekciji (Dean i sar., 2023), što je u skladu sa prikazanim efektom AGT-5 u lamini propriji tankog creva. Dodatno, povišeni procenti CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita koji ekspimiraju CYP1A1 u lamini propriji tankog creva dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 mogu poslužiti kao potvrda da su zabeleženi efekti posledica modulacije AHR koje je ovo jedinjenje postiglo.

Pored Th17 podtipa CD4⁺ T limfocita i ILC3, Treg ćelije su još jedna populacija koja visoko ekspimirira AHR (Apetoh i sar., 2010; Veldhoen i sar., 2009). To ukazuje da AGT-5 može uticati na njihovu funkciju i diferencijaciju modulacijom AHR. Dosadašnja istraživanja su pokazala da u DT1 postoji neadekvatna protivteža proinflamacijskim ćelijama koje svojim delovanjem aktivno uništavaju β ćelije. Razlog ovome je nemogućnost Treg ćelija da suprimiraju takve efektorske ćelije, kako zbog njihove smanjene brojnosti tako i zbog poremećaja u njihovoj funkciji (Hull i sar., 2017; Yu i sar., 2018). Treg ćelije atenuiraju APC i efektorske ćelije na više načina: produkcijom antiinflamacijskih citokina

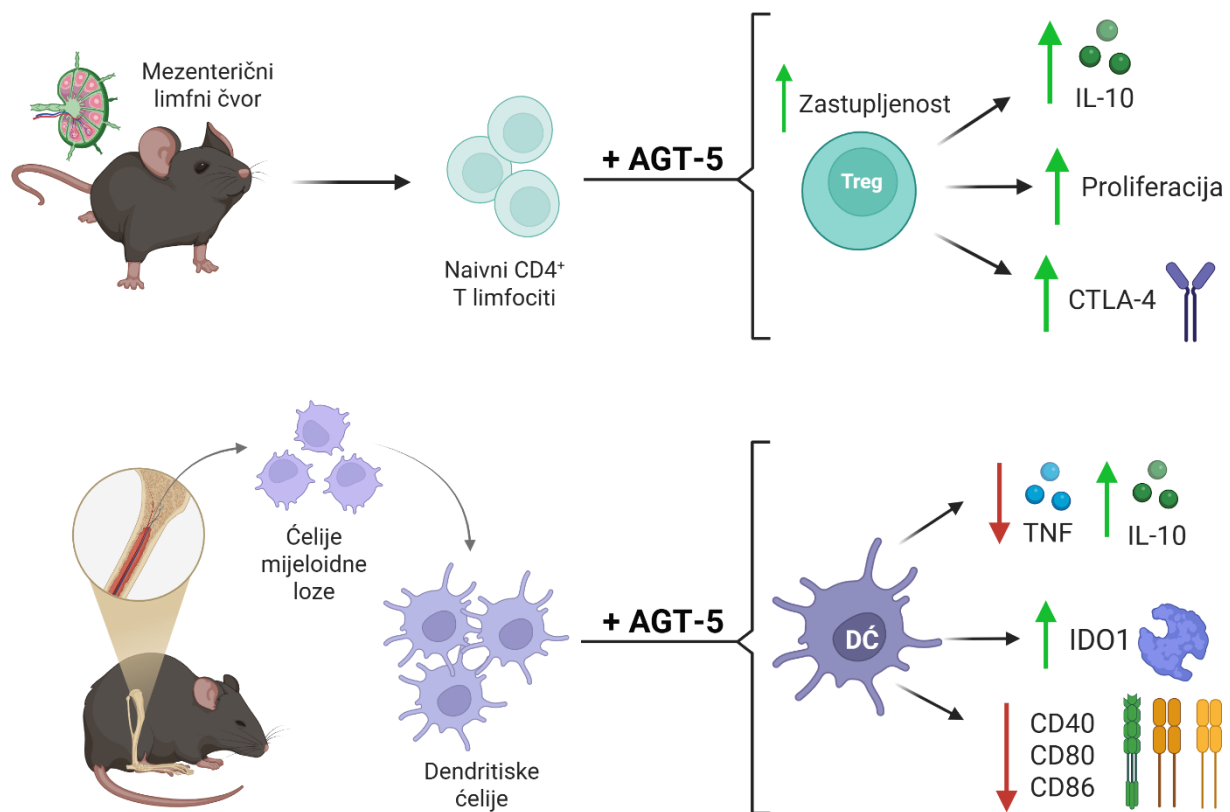
IL-10 i IL-35, ekspresijom CTLA-4 i PD-1 inhibitorynog receptora, produkcijom perforina i granzima B, i ekspresijom ektoenzima CD39 i CD73 (Arce-Sillas i sar., 2016). Stoga su, osim efekata koje bi AGT-5 mogao ostvariti na brojnost Treg ćelija, analizirani i njegovi uticaji na funkciju ovih antiinflamacijskih ćelija, kako *in vitro* tako i *in vivo*.

Quintana i saradnici su pokazali da su efekti koje aktivacija AHR ostvaruje na diferencijaciju Treg i Th17 ćelija ligand-specifični. Tako je pri aktivaciji AHR sa FICZ u modelu EAE stimulirana diferencijacija Th17 ćelija, dok je diferencijacija Treg ćelija bila značajno smanjena, čime je pogoršana klinička slika bolesti. Sa druge strane, pri aktivaciji AHR sa TCDD u istom modelu EAE je indukovana diferencijacija i stimulirana funkcija Treg ćelija, na taj način suprimirajući patogenezu bolesti (Quintana i sar., 2008). U tom smislu, najpre je testiran uticaj AGT-5 na diferencijaciju podtipova T limfocita i prilikom *in vitro* i *in vivo* testiranja je posmatran odnos zastupljenosti antiinflamacijskih Treg ćelija i proinflamacijskih Th17 ili Th1 ćelija. U uslovima potpune *in vitro* stimulacije CD4⁺ T limfocita, AGT-5 je favorizovao diferencijaciju ka Treg fenotipu, što se ogleda u povećanju udela Treg ćelija naspram Th17 ćelija, kao i u povećanju udela Treg ćelija naspram Th1 ćelija. Istovremenom primenom AGT-5 i komercijalno dostupnog antagoniste AHR, CH-223191, izostalo je povećanje udela Treg ćelija u ćelijskoj kulturi koje je zabeleženo kada je primenjen samo AGT-5, što dodatno potvrđuje da AGT-5 svoje efekte postiže kroz interakciju sa AHR. Zanimljivo je da je u *in vitro* kulturi T limfocita dobijenih iz mezenteričnih limfnih čvorova AGT-5 je čak i u odsustvu kostimulacionog signala od anti-CD28 antitela doveo do porasta udela Treg ćelija. S obzirom da je pokazano da aktivacija AHR ima najveći uticaj na diferencijaciju perifernih Treg ćelija poreklom iz creva (Ye i sar., 2017), kao i da AHR može ostvariti epigenetičke promene koje značajno utiču na ekspresiju Foxp3 transkripcionog faktora (Singh i sar., 2011), ovakav rezultat može ukazivati da se aktivacijom AHR od strane AGT-5 može prevazići nedostatak kostimulacionog signala i potpomoći diferencijaciju Treg ćelija. AGT-5 je ostvario efekat i kada je primenjen u kulturi humanih imunskih ćelija izolovanih iz tonzila, i to na dozno-zavisan način – sa porastom koncentracije AGT-5 primenjenog u ćelijskoj kulturi rastao je i udeo Treg ćelija, kao i udeo proliferišućih Treg ćelija. Ovakav rezultat je naročito značajan s obzirom da u literaturi postoji samo nekolicina studija koje su testirale efekte AHR liganada na humanim ćelijama i/ili ostvarile stimulaciju proliferacije Treg ćelija *in vitro* (Gandhi i sar., 2010; Quintana i sar., 2010).

U uslovima homeostaze, nakon AGT-5 tretmana zdravih miševa zabeleženo je povećanje udela Treg ćelija i smanjenje udela Th1 ćelija u mezenteričnim limfnim čvorovima, što je posledično dovelo i do povećanja odnosa zastupljenosti Treg ćelija u odnosu na Th1 ćelije. Dodatno, uočen je i veći procenat Treg ćelija koje ekspresiraju CYP1A1, kao indikator aktiviranja AHR, kod miševa koji su bili tretirani sa AGT-5 u odnosu na netretirane miševe. Tretman dijabetičnih miševa sa AGT-5 je potvrdio efekte koji su ostvareni *in vitro* i u stanju homeostaze – zabeleženo je povećanje zastupljenosti Treg ćelija u lamini proprijii tankog creva i pankreasu, a kao potvrda da su efekti ostvareni modulacijom AHR, utvrđen je veći udeo Treg ćelija koje ekspresiraju Cyp1a1 u lamini proprijii tankog creva dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5.

Više studija je pokazalo da aktivnost AHR može regulisati ekspresiju antiinflamacijskog citokina IL-10 (Avancini i sar., 2023; Zhu i sar., 2018). *In vitro* primena AGT-5 je u kulturi naivnih T limfocita indukovala povećanje udela Treg ćelija koje su proizvele IL-10. Jedan od načina na koji aktivacija AHR može dovesti do transaktivacije promotora gena za IL-10 je regrutovanjem c-Maf transkripcionog faktora (Gandhi i sar., 2010), dok je stimulacija ekspresije IL-10 kao efekat aktivacije AHR regulisana Src-STAT3 signalnim putem (Zhu i sar., 2018). Rezultati ove disertacije ukazuju da je povećana

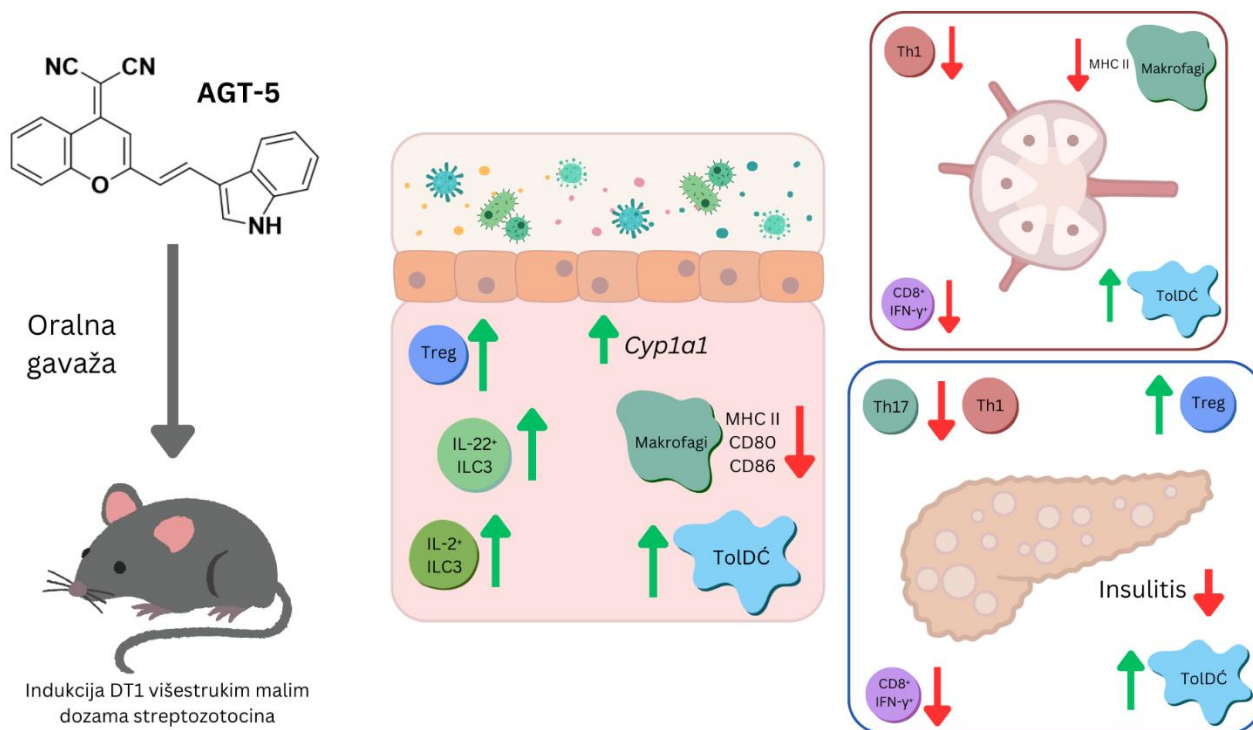
produkcija IL-10 od strane Treg ćelija pri primeni AGT-5 posredovana upravo aktivnošću STAT3 signalnog puta. Povećanje ekspresije ukupnog STAT3, kao i odsustvo značajne promene u odnosu ekspresije fosforilisane i ukupne forme STAT3 u prisustvu AGT-5, potencijalno ukazuju da je povećana i ekspresija pSTAT kod indukovanih Treg ćelija. Sa druge strane, u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji dijabetičnih miševa tretiranih sa AGT-5 nije uočeno povećanje zastupljenosti IL-10-produkujućih Treg ćelija. Ovakav rezultat se može objasniti na više načina: i) efekti koji se ostvaruju lokalnom primenom AHR liganada u kontrolisanim uslovima se umnogome razlikuju od efekata ostvarenih sistemskom primenom liganada zbog uticaja lokalne sredine; ii) pri *in vivo* primeni, AHR ligandi neminovno stohastički dospevaju do različitih organa – do ciljnih populacija, kao što su Treg ćelije, može dospeti različita količina AHR liganada i samim tim može indukovati jaču ili slabiju aktivaciju AHR; iii) AHR ligandi mogu ostvariti efekte na različite populacije imunskih ćelija, koje onda mogu suprimirati antiinflamacijske efekte Treg ćelija (Duarte i sar., 2013).



Slika 34. Efekti primene AGT-5 u *in vitro* diferencijaciji Treg ćelija i DĆ.

Testiranje terapijskog potencijala ITE u modelu kolitisa na humanizovanim miševima je pokazalo da aktivacija AHR pored stimulacije ekspresije Foxp3, transkripcionog faktora koji je ključan za nastanak Treg ćelija, ostvaruje efekat i na supresivnu funkciju Treg ćelija (Goettel i sar., 2016). U tom smislu, nakon primene AHR agoniste ITE, Treg ćelije su se odlikovale većom ekspresijom IL-10, CD39

i granzima B (Goettel i sar., 2016). U kulturi sortiranih CD4⁺CD25^{high} T limfocita, primena AGT-5 je indukovala povećanu ekspresiju CTLA-4. Sa druge strane, povećanje zastupljenosti Treg ćelija koje su eksprimirale CD39 je zabeleženo u pankreasnim infiltratima, a veći procenat Treg ćelija u lamini propriji je eksprimirao CD73 pri tretmanu sa AGT-5. CD39 najpre razgrađuje ATP do AMP, kojeg će CD73 zatim razgraditi do adenozina. Na taj način se depletira proinflamacijski ATP i stvara antiinflamacijski adenzin, čime se sprečava dalje razvijanje inflamacije (Antonioli i sar., 2013). Uočeno povećanje ekspresije ektoenzima CD39 i CD73 svedoči o sposobnosti AGT-5 da stimuliše antiinflamacijske efekte na tkivno-specifičan način, ciljno promovišući supresivnu funkciju Treg ćelija.



Slika 35. Pretpostavljeni mehanizmi dejstva AGT-5 koji su omogućili atenuaciju dijabetesa tipa 1 u ovoj disertaciji.

Svi navedeni rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da AGT-5 može dovesti do povećanja udela Treg ćelija, direktnim ili indirektnim putem. Stimulacija diferencijacije Treg ćelija može biti direktno uzrokovana stimulacijom ekspresije Foxp3 transkripcionog faktora od strane aktiviranog AHR (Singh i sar., 2011). Sa druge strane, do favorizacije i stimulacije diferencijacije Treg ćelija može doći indirektno, zahvaljujući sposobnosti AGT-5 da stimuliše diferencijaciju i zastupljenost ILC3 i TolDC.

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da tretman sa AGT-5 značajno stimuliše antiinflamacijsku imunskog odgovora i time ograničava intenzitet destrukcije β ćelija pankreasa. Samim tim postoji veća produkcija insulina i njegova koncentracija u krvi, što posledično omogućava održavanje

koncentracije glukoze u serumu bliže normoglikemičnim vrednostima nego kod netretiranih dijabetičnih životinja. Konkretnije, AGT-5 stimuliše tolDC i Treg ćelije, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. U *in vitro* uslovima AGT-5 stimuliše diferencijaciju CD4⁺ T limfocita ka regulatornom fenotipu, stimuliše proliferaciju i funkciju Treg ćelija, a promoviše i sposobnost DC da suprimiraju efektorske ćelije (Slika 34). U modelu DT1, AGT-5 stimuliše zastupljenost tolDC u lamini propriji tankog creva, pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima. AGT-5 ujedno pospešuje suprimirajuću funkciju ovih ćelija, sudeći po smanjenoj ekspresiji kostimulacionih molekula i povišenoj ekspresiji IDO1 enzima. Tretman sa AGT-5 takođe povećava zastupljenost Treg ćelija u lamini propriji tankog creva i pankreasu, kao i njihovu ekspresiju ektoenzima CD73 u lamini propriji i CD39 u pankreasu (Slika 35).

Selektivnom stimulacijom regulatornih imunskih ćelija, AGT-5 ostvaruje povoljne efekte koji se efikasno mogu suprotstaviti proinflamacijskom odgovoru koji se nalazi u osnovi patogenog stanja kao što je DT1. Nedavno je pokazano da u životinjskim modelima DT1 postoji jasno smanjenje Treg ćelija i IL-2-produkujućih ILC3 u lamini propriji tankog creva i da se njihovo odsustvo podudara sa progresijom i težinom kliničke slike DT1 (Saksida i sar., 2023). U tom pogledu, povećanje zastupljenosti Treg ćelija i IL-2-produkujućih ILC3 u lamini propriji tankog creva koje se postiže *in vivo* primenom AGT-5 predstavlja jedan od najznačajnijih efekata ovog jedinjenja. Pored pokazane atenuacije antiinflamacijskih imunskih ćelija u DT1, sve veći broj istraživanja ukazuje da je jedan od ključnih okidača za nastanak DT1 disbioza u crevima i narušavanje crevne barijere (Miani i sar., 2018; Xiaoxiao Yuan i sar., 2022). U održavanju barijere u crevima bitnu ulogu imaju IL-22-produkujuće ILC3 (Li i sar., 2023), a povećana zastupljenost ove populacije ćelija u lamini propriji tankog creva dijabetičnih životinja tretiranih sa AGT-5 se može pripisati modulaciji AHR na ILC3. U tom smislu, efekti AGT-5 se prevashodno ostvaruju uticajem na antiinflamacijsku granu imunskog odgovora i stimulacijom zastupljenosti i funkcije Treg ćelija i tolDC duž ose creva-pankreasni limfni čvorovi-pankreas, kao i stimulacijom zastupljenosti ILC3 koje proizvode IL-2 neophodan za opstanak i proliferaciju Treg ćelija u crevima (Zhou i sar., 2019). Uz produkciju IL-2, povišena zastupljenost ILC3 koje proizvode IL-22 nakon primene AGT-5 ujedno može stimulisati tolerogenu mikrosredinu u crevima i pospešiti oralnu toleranciju (Penny i sar., 2018).

Terapija za DT1, čiji bi efekti specifično bili usmereni na efektorske ćelije čijom aktivnošću dolazi do destrukcije Langerhansovih ostrvaca i dalje ne postoji. Protektivni efekti AGT-5 na životinjskom modelu DT1, kao i sposobnost AGT-5 da modulacijom AHR pospešuje tolerogene populacije imunskih ćelija humanog porekla, uz odsustvo toksičnih efekata, čine AGT-5 potencijalnim terapeutikom koji bi mogao biti testiran u prekliničkim studijama radi indukcije i stimulacije proliferacije Treg ćelija i tolDC tokom DT1.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva ove doktorske teze i prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. AGT-5 ostvaruje svoje efekte modulacijom aktivnosti AHR, na šta ukazuje:

- Povećana ekspresija CYP1A1 u različitim populacijama imunskih ćelija u prisustvu AGT-5 *in vitro* ili nakon *in vivo* tretmana AGT-5
- Odsustvo efekata AGT-5 u slučaju primene inhibitora aktivnosti AHR u ćelijskoj kulturi

2. *In vitro* primena AGT-5 ispoljava pozitivne efekte na udeo i funkcije Treg ćelija diferenciranih iz naivnih CD4⁺ T limfocita, na šta ukazuje:

- Povećanje udela Treg ćelija u odnosu na Th1 i Th17 CD4⁺ T limfocite
- Pospešivanje diferencijacije Treg ćelija
- Povećana ekspresija supresivnih molekula i antiinflamacijskih citokina od strane Treg ćelija

3. *In vivo* tretman AGT-5 kod zdravih C57BL/6 miševa dovodi do povećanja udela Treg ćelija u odnosu na Th1 CD4⁺ T limfocite u mezenteričnim limfnim čvorovima, što je praćeno i povećanom zastupljenošću Treg ćelija koje ekspimiraju CYP1A1

4. *In vivo* tretman AGT-5 značajno ublažava tok razvoja DT1 kod C57BL/6 miševa kojima je bolest indukovana višestrukim malim dozama STZ, na šta ukazuju:

- Snižene glikemijske vrednosti, smanjena infiltracija imunskih ćelija u Langerhansova ostrvca, kao i očuvanja funkcija β ćelija, što se ogleda u većoj ekspresiji insulina i njegovoj većoj koncentraciji u serumu
- Povećana zastupljenost tolDC u pankreasu, pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva, a smanjena zastupljenost klasičnih APC u pankreasnim limfnim čvorovima i lamini propriji tankog creva
- Smanjena kostimulaciona sposobnost APC snižavanjem ekspresije kostimulacionih molekula CD40, CD80 i CD86
- Osnaživanje regulatorne funkcije APC koja se ogleda u povećanoj ekspresiji IDO1 i produkciji IL-10, a smanjenoj produkciji TNF
- Povećana zastupljenost Treg ćelija u pankreasu i lamini propriji tankog creva
- Osnaživanje supresivne funkcije Treg ćelija stimulacijom ekspresije ektoenzima CD73 u lamini propriji, odnosno ektoenzima CD39 u pankreasu
- Smanjena zastupljenost proinflamacijskih subpopulacija Th1, Th17 i ukupnih CD4⁺ T limfocita u pankreasu

- Smanjena zastupljenost ukupnih CD8⁺ T limfocita, kao i IFN- γ -produkujućih CD8⁺ T limfocita u pankreasu i pankreasnim limfnim čvorovima
- Smanjena zastupljenost IFN- γ -produkujućih CD4⁺ T limfocita u pankreasnim limfnim čvorovima
- Stimulacija antiinflamacijske funkcije ILC koja se ogleda u povećanju zastupljenosti IL-22-produkujućih i IL-2-produkujućih ILC3

5. *In vitro* primena AGT-5 na humanim imunskim ćelijama izolovanim iz tonzila dovodi do stimulacije imunosupresivnih sposobnosti, što se ogleda u:

- Povećanju zastupljenosti Treg ćelija koje prati povećanje koncentracije AGT-5 u ćelijskoj kulturi, kao i u njihovoj povećanoj proliferaciji
- Povećanju zastupljenosti ILT3-eksprimirajućih DĆ
- Povećanju zastupljenosti ILC3

Na osnovu konkretnih iznetih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da tretman sa AGT-5 ostvaruje sistemski antiinflamacijski efekat modulacijom aktivnosti AHR u stanju gde postoji autoimunski odgovor usmeren protiv autoantigena β ćelija. Njegovi efekti se ponajviše ogledaju u favorizaciji antiinflamacijskih tolDĆ i Treg ćelija, kao i u stimulaciji njihovih supresivnih sposobnosti u lamini propriji tankog creva, pankreasnim limfnim čvorovima i pankreasu. Dodatno, u lamini propriji tankog creva AGT-5 pospešuje funkciju ILC3, koje imaju ključnu ulogu u očuvanju crevne barijere, jednim od okidača za nastanak DT1.

7. Literatura

1. Abdelsamed, H. A., Zebly, C. C., Nguyen, H., Rutishauser, R. L., Fan, Y., Ghoneim, H. E., Crawford, J. C., Alfei, F., Alli, S., Ribeiro, S. P., Castellaw, A. H., McGargill, M. A., Jin, H., Boi, S. K., Speake, C., Serti, E., Turka, L. A., Busch, M. E., Stone, M., ... Youngblood, B. (2020). Beta cell-specific CD8+ T cells maintain stem cell memory-associated epigenetic programs during type 1 diabetes. *Nature Immunology*, *21*(5), 578–587. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-0633-5>,
2. Allan, D. S. J., McMichael, A. J., & Braud, V. M. (2000). The ILT Family of Leukocyte Receptors. *Immunobiology*, *202*(1), 34–41. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(00\)80050-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(00)80050-9)
3. Alleva, D. G., Pavlovich, R. P., Grant, C., Kaser, S. B., & Beller, D. I. (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: Elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor- α and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes*, *49*(7), 1106–1115. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.49.7.1106>,
4. ALTINDIS, E., VOMUND, A. N., CHOW, I.-T., DAMASIO, M., KWOK, W., UNANUE, E. R., & KAHN, C. R. (2018). Identification of Cross Reactive Insulin Immunogenic Epitopes from Commensal Gut Microbes. *Diabetes*, *67*(Supplement_1). <https://doi.org/10.2337/DB18-95-OR>
5. Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(6), 355. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2013.03.005>
6. Apetoh, L., Quintana, F. J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E. J., Sherr, D. H., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nature Immunology*, *11*(9), 854–861. <https://doi.org/10.1038/NI.1912>,
7. Arce-Sillas, A., Álvarez-Luquín, D. D., Tamaya-Domínguez, B., Gomez-Fuentes, S., Trejo-García, A., Melo-Salas, M., Cárdenas, G., Rodríguez-Ramírez, J., & Adalid-Peralta, L. (2016). Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of Immunology Research*, *2016*(1), 1720827. <https://doi.org/10.1155/2016/1720827>
8. Arif, S., Moore, F., Marks, K., Bouckenoghe, T., Dayan, C. M., Planas, R., Vives-Pi, M., Powrie, J., Tree, T., Marchetti, P., Huang, G. C., Gurzov, E. N., Pujol-Borrell, R., Eizirik, D. L., & Peakman, M. (2011). Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated β -cell death. *Diabetes*, *60*(8), 2112–2119. <https://doi.org/10.2337/DB10-1643>,
9. Arndt, T., Jörns, A., & Wedekind, D. (2018). Changes in immune cell frequencies in primary and secondary lymphatic organs of LEW.1AR1-iddm rats, a model of human type 1 diabetes compared to other MHC congenic LEW inbred strains. *Immunologic Research*, *66*(4), 462–470. <https://doi.org/10.1007/S12026-018-9015-6>,
10. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(7), 995–1004. <https://doi.org/10.1084/JEM.190.7.995>
11. Athmuri, D. N., & Shiekh, P. A. (2023). Experimental diabetic animal models to study diabetes and diabetic complications. *MethodsX*, *11*(January), 102474. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102474>
12. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, *383*(9911), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
13. Atkinson, M. A., & Mirmira, R. G. (2023). The pathogenic “symphony” in type 1 diabetes: A

- disorder of the immune system, β cells, and exocrine pancreas. *Cell Metabolism*, 35(9), 1500–1518. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.06.018>
14. Avancini, D., Testori, A., Fresolone, L., Andolfi, G., Vuono, M., Martinelli, V., Santoni de Sio, F. R., & Gregori, S. (2023). Aryl hydrocarbon receptor activity downstream of IL-10 signaling is required to promote regulatory functions in human dendritic cells. *Cell Reports*, 42(3), 112193. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2023.112193>
 15. Bach, J. F. (2018). The hygiene hypothesis in autoimmunity: The role of pathogens and commensals. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 105–120. <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.111>,
 16. Barrett, J. C., Clayton, D. G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J. D., Erlich, H. A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., Plagnol, V., Pociot, F., Schuilenburg, H., Smyth, D. J., Stevens, H., Todd, J. A., Walker, N. M., Rich, S. S., Baskerville, T., ... Zhang, Q. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 41(6), 703–707. <https://doi.org/10.1038/NG.381>,
 17. Bedi, S., Richardson, T. M., Jia, B., Saab, H., Brinkman, F. S. L., & Westley, M. (2022). Similarities between bacterial GAD and human GAD65: Implications in gut mediated autoimmune type 1 diabetes. *PLoS ONE*, 17(2 February). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0261103>,
 18. Bengalli, R., Molteni, E., Longhin, E., Refsnes, M., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013). Release of IL-1 β triggered by milan Summer PM10: Molecular pathways involved in the cytokine release. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/158093>,
 19. Bernink, J. H., Krabbendam, L., Germar, K., de Jong, E., Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., Munneke, J. M., Hazenberg, M. D., Villaudy, J., Buskens, C. J., Bemelman, W. A., Diefenbach, A., Blom, B., & Spits, H. (2015). Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127+ Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity*, 43(1), 146–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.019>
 20. Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356–368. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2546>,
 21. Bosma, G. C., Custer, R. P., & Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301(5900), 527–530. <https://doi.org/10.1038/301527A0>,
 22. Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Häcker, G., Bieber, T., & von Bubnoff, D. (2009). Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(1), 145–154. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803277>
 23. Brown, H., Komnick, M. R., Brigleb, P. H., Dermody, T. S., & Esterházy, D. (2023). Lymph node sharing between pancreas, gut, and liver leads to immune crosstalk and regulation of pancreatic autoimmunity. *Immunity*, 56(9), 2070-2085.e11. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2023.07.008>
 24. Bruggeman, Y., Martens, P. J., Sassi, G., Viaene, M., Wasserfall, C. H., Mathieu, C., & Gysemans, C. (2023). Footprint of pancreas infiltrating and circulating immune cells throughout type 1 diabetes development. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1275316. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1275316/FULL>
 25. Brusko, T. M., Putnam, A. L., & Bluestone, J. A. (2008). Human regulatory T cells: Role in

- autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunological Reviews*, 223(1), 371–390. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00637.X>,
26. Cai, B., Giri, R., Cameron, A. J., Rahman, M. A., Small, A., Altmann, C., Lim, Y., Rehaume, L. M., Morrison, M., Wechalekar, M. D., Begun, J., Bergot, A.-S., & Thomas, R. (2025). Pro-inflammatory macrophages transporting gut-derived bacterial DNA drive autoimmune arthritis in spondyloarthritis. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.188028>
 27. Cannon, A. S., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2022). Targeting AhR as a Novel Therapeutic Modality against Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010288>
 28. Carrero, J. A., McCarthy, D. P., Ferris, S. T., Wan, X., Hu, H., Zinselmeyer, B. H., Vomund, A. N., & Unanue, E. R. (2017). Resident macrophages of pancreatic islets have a seminal role in the initiation of autoimmune diabetes of NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), E10418–E10427. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1713543114>,
 29. Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J. K. M., Doherty, J. M., Mills, J. C., & Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 457(7230), 722–725. <https://doi.org/10.1038/NATURE07537>,
 30. Cella, M., Otero, K., & Colonna, M. (2010). Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10961–10966. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1005641107>,
 31. Chatenoud, L., Marquet, C., Valette, F., Scott, L., Quan, J., Bu, C. H., Hildebrand, S., Moresco, E. M. Y., Bach, J. F., & Beutler, B. (2022). Modulation of autoimmune diabetes by N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutations in non-obese diabetic mice. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 15(6). <https://doi.org/10.1242/DMM.049484>,
 32. Chuang, H. C., Chuang, K. J., Cheng, P. C., Hsieh, C. L., Fan, Y. Y., & Lee, Y. L. (2024). Indirubin induces tolerogenic dendritic cells via aryl hydrocarbon receptor activation and ameliorates allergic asthma in a murine model by expanding Foxp3-expressing regulatory T cells. *Phytomedicine*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.156013>
 33. Citro, A., Campo, F., Dugnani, E., & Piemonti, L. (2021). Innate Immunity Mediated Inflammation and Beta Cell Function: Neighbors or Enemies? *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.606332/PDF>
 34. Cnop, M., Hannaert, J. C., Gruppig, A. Y., & Pipeleers, D. G. (2002). Low density lipoprotein can cause death of islet β -cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology*, 143(9), 3449–3453. <https://doi.org/10.1210/EN.2002-220273>,
 35. Cole, D. K., Bulek, A. M., Dolton, G., Schauenberg, A. J., Szomolay, B., Rittase, W., Trimby, A., Jothikumar, P., Fuller, A., Skowera, A., Rossjohn, J., Zhu, C., Miles, J. J., Peakman, M., Wooldridge, L., Rizkallah, P. J., & Sewell, A. K. (2016). Hotspot autoimmune T cell receptor binding underlies pathogen and insulin peptide cross-reactivity. *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), 2191–2204. <https://doi.org/10.1172/JCI85679>,
 36. Corre, S., Tardif, N., Mouchet, N., Leclair, H. M., Boussemer, L., Gautron, A., Bachelot, L., Perrot, A., Soshilov, A., Rogiers, A., Rambow, F., Dumontet, E., Tarte, K., Bessedé, A., Guillemin, G. J., Marine, J. C., Denison, M. S., Gilot, D., & Galibert, M. D. (2018). Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018->

37. Dalfrà, M. G., & Burlina, S. (2023). Ketoacidosis. *Frontiers in Diabetes*, 28, 123–131. <https://doi.org/10.1159/000487096>
38. Damasceno, D. C., Netto, A. O., Iessi, I. L., Gallego, F. Q., Corvino, S. B., Dallaqua, B., Sinzato, Y. K., Bueno, A., Calderon, I. M. P., & Rudge, M. V. C. (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/819065>,
39. De Beeck, A. O., & Eizirik, D. L. (2016). Viral infections in type 1 diabetes mellitus-why the β cells? *Nature Reviews Endocrinology*, 12(5), 263–273. <https://doi.org/10.1038/NRENDO.2016.30>,
40. De Goffau, M. C., Luopajarvi, K., Knip, M., Ilonen, J., Ruohtula, T., Härkönen, T., Orivuori, L., Hakala, S., Welling, G. W., Harmsen, H. J., & Vaarala, O. (2013). Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes*, 62(4), 1238–1244. <https://doi.org/10.2337/DB12-0526>,
41. Dean, J. W., Helm, E. Y., Fu, Z., Xiong, L., Sun, N., Oliff, K. N., Muehlbauer, M., Avram, D., & Zhou, L. (2023). The aryl hydrocarbon receptor cell intrinsically promotes resident memory CD8⁺ T cell differentiation and function. *Cell Reports*, 42(1), 111963. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111963>
42. Đedović, N., Paunović, V., & Stojanović, I. (2019). Isolation and enrichment of mouse insulin-specific CD4⁺ T regulatory cells. *Journal of Immunological Methods*, 470, 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2019.04.011>
43. Del Chierico, F., Rapini, N., Deodati, A., Matteoli, M. C., Cianfarani, S., & Putignani, L. (2022). Pathophysiology of Type 1 Diabetes and Gut Microbiota Role. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS232314650>,
44. Delasoie, J., Pavic, A., Voutier, N., Vojnovic, S., Crochet, A., Nikodinovic-Runic, J., & Zobi, F. (2020). Identification of novel potent and non-toxic anticancer, anti-angiogenic and antimetastatic rhenium complexes against colorectal carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112583. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112583>
45. Denison, M. S., & Faber, S. C. (2017). And now for something completely different: Diversity in ligand-dependent activation of Ah receptor responses. *Current Opinion in Toxicology*, 2, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.006>
46. Di Lorenzo, T. P., Peakman, M., & Roep, B. O. (2007). Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 148(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03244.x>
47. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2019). Type 1 Diabetes. HHS Public Access. *Lancet (London, England)*, 393(10163), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5).Type
48. Driver, J. P., Chen, Y. G., & Mathews, C. E. (2012). Comparative genetics: Synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Review of Diabetic Studies*, 9(4), 169–187. <https://doi.org/10.1900/RDS.2012.9.169>,
49. Duarte, J. H., Di Meglio, P., Hirota, K., Ahlfors, H., & Stockinger, B. (2013). Differential Influences of the Aryl Hydrocarbon Receptor on Th17 Mediated Responses in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 8(11), e79819. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079819>
50. Ehrlich, A. K., Pennington, J. M., Bisson, W. H., Kolluri, S. K., & Kerkvliet, N. I. (2018). TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4⁺ T

- Cell Differentiation. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 161(2), 310–320. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFX215>
51. Ehrlich, A. K., Pennington, J. M., Wang, X., Rohlman, D., Punj, S., Löhr, C. V., Newman, M. T., Kolluri, S. K., & Kerkvliet, N. I. (2016). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by 10-Cl-BBQ Prevents Insulinitis and Effector T Cell Development Independently of Foxp3+ Regulatory T Cells in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology*, 196(1), 264–273. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1501789>
 52. Eizirik, D. L., Colli, M. L., & Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4), 219–226. <https://doi.org/10.1038/NRENDO.2009.21;KWRD=MEDICINE>
 53. Eksler, B., & Cooper, D. K. C. (2010). Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert Review of Clinical Immunology*, 6(2), 219–230. <https://doi.org/10.1586/eci.09.81>
 54. Emamaullee, J. A., Davis, J., Merani, S., Toso, C., Elliott, J. F., Thiesen, A., & Shapiro, A. M. J. (2009). Inhibition of Th17 Cells Regulates Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Diabetes*, 58(6), 1302. <https://doi.org/10.2337/DB08-1113>
 55. Esser, C., Haarmann-Stemmann, T., Hochrath, K., Schikowski, T., & Krutmann, J. (2018). AHR and the issue of immunotoxicity. *Current Opinion in Toxicology*, 10, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2018.03.001>
 56. Eveleens Maarse, B. C., Hofstede, A. D., Jansen, M. A. A., & Moerland, M. (2025). A systematic review of pharmaceutical targets in the mucosal immune system for treatment of non-intestinal auto-immune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 188, 118205. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2025.118205>
 57. Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor ζ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *The Journal of Immunology*, 176(11), 6752–6761. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.11.6752>,
 58. Fasano, A. (2012). Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(10), 1096–1100. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2012.08.012>,
 59. Ferraro, A., Soggi, C., Stabilini, A., Valle, A., Monti, P., Piemonti, L., Nano, R., Olek, S., Maffi, P., Scavini, M., Secchi, A., Staudacher, C., Bonifacio, E., & Battaglia, M. (2011). Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 60(11), 2903–2913. <https://doi.org/10.2337/DB11-0090/-/DC1>
 60. Ferris, S. T., Liu, T., Chen, J., Ohara, R. A., Ou, F., Wu, R., Kim, S., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2023). WDFY4 deficiency in NOD mice ameliorates autoimmune diabetes and insulinitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(13). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2219956120>,
 61. Fu, H., Vuononvirta, J., Fanti, S., Bonacina, F., D'Amati, A., Wang, G., Poobalasingam, T., Fankhaenel, M., Lucchesi, D., Coleby, R., Tarussio, D., Thorens, B., Hearnden, R. J., Longhi, M. P., Grevitt, P., Sheikh, M. H., Solito, E., Godinho, S. A., Bombardieri, M., ... Marelli-Berg, F. M. (2023). The glucose transporter 2 regulates CD8+ T cell function via environment sensing. *Nature Metabolism*, 5(11), 1969–1985. <https://doi.org/10.1038/S42255-023-00913-9>

62. Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1002/CPZ1.78>,
63. Furman, D. P., Oshchepkova, E. A., Oshchepkov, D. Y., Shamanina, M. Y., & Mordvinov, V. A. (2009). Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor. *Computational Biology and Chemistry*, 33(6), 465–468. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2009.10.004>
64. Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H. L., & Quintana, F. J. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 11(9), 846–853. <https://doi.org/10.1038/ni.1915>
65. Gardner, G., & Fraker, C. A. (2021). Natural Killer Cells as Key Mediators in Type I Diabetes Immunopathology. *Frontiers in Immunology*, 12, 722979. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.722979>
66. Gargaro, M., Pirro, M., Romani, R., Zelante, T., & Fallarino, F. (2016). Aryl Hydrocarbon Receptor–Dependent Pathways in Immune Regulation. *American Journal of Transplantation*, 16(8), 2270–2276. <https://doi.org/10.1111/ajt.13716>
67. Gearty, S. V., Dündar, F., Zumbo, P., Espinosa-Carrasco, G., Shakiba, M., Sanchez-Rivera, F. J., Socci, N. D., Trivedi, P., Lowe, S. W., Lauer, P., Mohibullah, N., Viale, A., DiLorenzo, T. P., Betel, D., & Schietinger, A. (2022). An autoimmune stem-like CD8 T cell population drives type 1 diabetes. *Nature*, 602(7895), 156–161. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-04248-X>,
68. Giannoukakis, N. (2023). Tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetes: no longer a concept. *Frontiers in Immunology*, 14, 1212641. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1212641/XML>
69. Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J., & Trucco, M. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 34(9), 2026–2032. <https://doi.org/10.2337/DC11-0472>,
70. Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Novelo, L. L., Casella, G., Drew, J. C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A., & Triplett, E. W. (2011). Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME Journal*, 5(1), 82–91. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2010.92>,
71. Girdhar, K., Huang, Q., Chow, I. T., Vatanen, T., Brady, C., Raisingani, A., Autissier, P., Atkinson, M. A., Kwok, W. W., Ronald Kahn, C., & Altindis, E. (2022). A gut microbial peptide and molecular mimicry in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(31). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2120028119>,
72. Goettel, J. A., Gandhi, R., Kenison, J. E., Yeste, A., Murugaiyan, G., Sambanthamoorthy, S., Griffith, A. E., Patel, B., Shouval, D. S., Weiner, H. L., Snapper, S. B., & Quintana, F. J. (2016). AHR activation is protective against colitis driven by T cells in humanized mice. *Cell Reports*, 17(5), 1318. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.09.082>
73. Griebel, P. J. (2016). B Cell Development in Mucosa-Associated Lymphoid Tissues. *Encyclopedia of Immunobiology*, 1, 135–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.01019-5>
74. Gruszczuk, J., Grandvilllemin, L., Lai-Kee-Him, J., Paloni, M., Savva, C. G., Germain, P., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Kwong, H. S., Bous, J., Ancelin, A., Bechara, C., Barducci, A.,

- Balaguer, P., & Bourguet, W. (2022). Cryo-EM structure of the agonist-bound Hsp90-XAP2-AHR cytosolic complex. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34773-w>
75. Guengerich, F. P. (1992). Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *The FASEB Journal*, 6(2), 745–748. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.6.2.1537465>
 76. Gutiérrez-Vázquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, 48(1), 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.012>
 77. Hankinson, O. (2005). Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(2), 379–386. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2004.09.031>
 78. Hasnain, S. Z., Borg, D. J., Harcourt, B. E., Tong, H., Sheng, Y. H., Ng, C. P., Das, I., Wang, R., Chen, A. C. H., Loudovaris, T., Kay, T. W., Thomas, H. E., Whitehead, J. P., Forbes, J. M., Prins, J. B., & McGuckin, M. A. (2014). Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nature Medicine*, 20(12), 1417–1426. <https://doi.org/10.1038/NM.3705>,
 79. Hebbandi Nanjundappa, R., Ronchi, F., Wang, J., Clemente-Casares, X., Yamanouchi, J., Sokke Umeshappa, C., Yang, Y., Blanco, J., Bassolas-Molina, H., Salas, A., Khan, H., Slattery, R. M., Wyss, M., Mooser, C., Macpherson, A. J., Sycuro, L. K., Serra, P., McKay, D. M., McCoy, K. D., & Santamaria, P. (2017). A Gut Microbial Mimic that Hijacks Diabetogenic Autoreactivity to Suppress Colitis. *Cell*, 171(3), 655–667.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.022>
 80. Herold, K. C., DeLong, T., Perdigoto, A. L., Biru, N., Brusko, T. M., & Walker, L. S. K. (2024). The immunology of type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology*, 24(6), 435–451. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00985-4>
 81. Herold, K. C., Gitelman, S. E., Gottlieb, P. A., Knecht, L. A., Raymond, R., & Ramos, E. L. (2023). Teplizumab: A Disease-Modifying Therapy for Type 1 Diabetes That Preserves β -Cell Function. *Diabetes Care*, 46(10), 1848. <https://doi.org/10.2337/DC23-0675>
 82. Holendová, B., Benáková, Š., Křivonosková, M., & Plecítá-Hlavatá, L. (2024). Redox Status as a Key Driver of Healthy Pancreatic β -Cells. *Physiological Research*, 73(Suppl 1), S139. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.935259>
 83. Hu, C. Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F. S., Shlomchik, M. J., & Wen, L. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3857–3867. <https://doi.org/10.1172/JCI32405>,
 84. Hull, C. M., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2017). Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what’s broken and how can we fix it? *Diabetologia*, 60(10), 1839–1850. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4377-1>
 85. Hyppönen, E., Virtanen, S. M., Kenward, M. G., Knip, M., & Åkerblom, H. K. (2000). Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*, 23(12), 1755–1760. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.23.12.1755>,
 86. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., & Nakahata, T. (2002). NOD/SCID/ γ cnull mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9), 3175–3182. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2001-12-0207>
 87. Jamshidi, P., Hasanzadeh, S., Tahvildari, A., Farsi, Y., Arbabi, M., Mota, J. F., Sechi, L. A., & Nasiri, M. J. (2019). Is there any association between gut microbiota and type 1 diabetes? A

- systematic review. *Gut Pathogens*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/S13099-019-0332-7>,
88. Jeffery, N., Richardson, S., Chambers, D., Morgan, N. G., & Harries, L. W. (2019). Cellular stressors may alter islet hormone cell proportions by moderation of alternative splicing patterns. *Human Molecular Genetics*, *28*(16), 2763–2774. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDZ094>,
 89. Jia, L., Lu, J., Zhou, Y., Tao, Y., Xu, H., Zheng, W., Zhao, J., Liang, G., & Xu, L. (2018). Tolerogenic dendritic cells induced the enrichment of CD4+Foxp3+ regulatory T cells via TGF- β in mesenteric lymph nodes of murine LPS-induced tolerance model. *Clinical Immunology*, *197*, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.09.010>
 90. Jin, F., Xie, L., Zhang, H., Fan, X., Tian, J., Liu, W., Xiao, Y., & Fan, X. (2025). Dendritic Cells: Origin, Classification, Development, Biological Functions, and Therapeutic Potential. *MedComm*, *6*(11). <https://doi.org/10.1002/MCO2.70455>
 91. Jolivel, V., Luessi, F., Masri, J., Kraus, S. H. P., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., Klebow, S., Paterka, M., Yogeve, N., Tumani, H., Furlan, R., Siffrin, V., Jonuleit, H., Zipp, F., & Waisman, A. (2013). Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, *136*(4), 1048–1066. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWT023>
 92. Jonić, N., Koprivica, I., Chatzigiannis, C. M., Tsiailanis, A. D., Kyrkou, S. G., Tzakos, E. P., Pavić, A., Dimitrijević, M., Jovanović, A., Jovanović, M. B., Marinho, S., Castro-Almeida, I., Otašević, V., Moura-Alves, P., Tzakos, A. G., & Stojanović, I. (2024). Development of FluoAHRL: A Novel Synthetic Fluorescent Compound That Activates AHR and Potentiates Anti-Inflammatory T Regulatory Cells. *Molecules*, *29*(13), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules29132988>
 93. Kaddis, J. S., Olack, B. J., Sowinski, J., Cravens, J., Contreras, J. L., & Niland, J. C. (2009). Human Pancreatic Islets and Diabetes Research. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *301*(15), 1580. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2009.482>
 94. Kerkvliet, N. I., Steppan, L. B., Vorachek, W., Oda, S., Farrer, D., Wong, C. P., Pham, D., & Mourich, D. V. (2009). Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3 + T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy*, *1*(4), 539–547. <https://doi.org/10.2217/IMT.09.24>
 95. Kibirige, M., Metcalf, B., Renuka, R., & Wilkin, T. J. (2003). Testing the accelerator hypothesis: The relationship between body mass and age at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care*, *26*(10), 2865–2870. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.26.10.2865>,
 96. Kim, H. Y., Yoo, T. H., Cho, J. Y., Kim, H. C., & Lee, W. W. (2019). Indoxyl sulfate-induced TNF- α is regulated by crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor, NF- κ B, and SOCS2 in human macrophages. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(10), 10844–10858. <https://doi.org/10.1096/FJ.201900730R>
 97. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(28), 9721–9726. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804231105>
 98. King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, *166*(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.01911.X>,
 99. Kiss, E. A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., & Diefenbach, A. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*, *334*(6062), 1561–1565.

- https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1214914/SUPPL_FILE/KISS.SOM.PDF
100. Koprivica, I., Stanislavljević, S., Mićanović, D., Stojanović, I., & Miljković, Đ. (2025). Multiple low dose streptozotocin-induced diabetes as a model for studying autoimmune diabetes in humans. *Animal Models and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1002/AME2.70050;SUBPAGE:STRING:FULL>
 101. Kostic, A. D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen, A. M., Peet, A., Tillmann, V., Pöhö, P., Mattila, I., Lähdesmäki, H., Franzosa, E. A., Vaarala, O., De Goffau, M., Harmsen, H., Ilonen, J., Virtanen, S. M., Clish, C. B., Orešič, M., ... Xavier, R. J. (2015). The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host and Microbe*, *17*(2), 260–273. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2015.01.001>
 102. Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V., & Sankaran, U. (2021). Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review. *Laboratory Animal Research*, *37*(1). <https://doi.org/10.1186/S42826-021-00101-4>,
 103. Krischer, J. P., Liu, X., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J. X., Toppari, J., Ziegler, A. G., & Akolkar, B. (2021). Characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes before vs after 6 years of age in the TEDDY cohort study. *Diabetologia*, *64*(10), 2247. <https://doi.org/10.1007/S00125-021-05514-3>
 104. Krischer, J. P., Liu, X., Vehik, K., Akolkar, B., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J. X., Toppari, J., Ziegler, A. G., & Lernmark, A. (2019). Predicting islet cell autoimmunity and type 1 diabetes: An 8-year teddy study progress report. *Diabetes Care*, *42*(6), 1051–1060. <https://doi.org/10.2337/DC18-2282>,
 105. Krischer, J. P., Lynch, K. F., Schatz, D. A., Ilonen, J., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J.-X., Simell, O. G., Toppari, J., Ziegler, A.-G., Akolkar, B., & Bonifacio, E. (2015). The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia*, *58*(5), 980–987. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3514-y>
 106. Lawrence, B. P., Roberts, A. D., Neumiller, J. J., Cundiff, J. A., & Woodland, D. L. (2006). Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8+ T cells in the lung. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(9), 5819–5828. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.9.5819>
 107. Lee, J. S., Han, P., Chaudhury, R., Khan, S., Bickerton, S., McHugh, M. D., Park, H. B., Siefert, A. L., Rea, G., Carballido, J. M., Horwitz, D. A., Criscione, J., Perica, K., Samstein, R., Rageb, R., Kim, D., & Fahmy, T. M. (2021). Metabolic and immunomodulatory control of type 1 diabetes via orally delivered bile-acid-polymer nanocarriers of insulin or rapamycin. *Nature Biomedical Engineering*, *5*(9), 983–997. <https://doi.org/10.1038/S41551-021-00791-0>,
 108. Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., & Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology*, *10*(7), 501–513. <https://doi.org/10.1038/nri2787>
 109. Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, *51*(2), 216–226. <https://doi.org/10.1007/S00125-007-0886-7>,
 110. Lernmark, Å., Agardh, D., Akolkar, B., Gesualdo, P., Hagopian, W. A., Haller, M. J., Hyöty, H., Johnson, S. B., Elding Larsson, H., Liu, E., Lynch, K. F., McKinney, E. F., McIndoe, R., Melin, J., Norris, J. M., Rewers, M., Rich, S. S., Toppari, J., Triplett, E., ... Krischer, J. (2025). Looking back at the TEDDY study: lessons and future directions. *Nature Reviews Endocrinology*, *21*(3), 154–165. <https://doi.org/10.1038/S41574-024-01045-0>,
 111. Levin, E. C., Koo, J. Y. M., & Gottlieb, A. B. (2024). Infliximab. *Moderate to Severe Psoriasis:*

- Fourth Edition*, 231–247. <https://doi.org/10.1201/b16633-14>
112. Li, J. G., Du, Y. M., Yan, Z. D., Yan, J., Zhuansun, Y. X., Chen, R., Zhang, W., Feng, S. L., & Ran, P. X. (2016). CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *11*(3), 878. <https://doi.org/10.3892/ETM.2016.2989>
 113. Li, J., Wang, L., Wang, M., & Zhang, H. (2025). Activation of aryl hydrocarbon receptor attenuates intestinal inflammation by enhancing IRF4-mediated macrophage M2 polarization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1871*(4), 167735. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2025.167735>
 114. Li, M., Wang, Z., Jiang, W., Lu, Y., & Zhang, J. (2023). The role of group 3 innate lymphoid cell in intestinal disease. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1171826. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1171826>
 115. Li, Y., Liu, Y., & Chu, C. Q. (2015). Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 638470. <https://doi.org/10.1155/2015/638470>
 116. Liu, B., Xie, Y., Mei, X., Sun, Y., Shi, W., & Wu, Z. (2020). Reciprocal regulation of interleukin-17A and interleukin-22 secretion through aryl hydrocarbon receptor activation in CD4+ T cells of patients with vitiligo. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(2), 158. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.9589>
 117. Long, S. A., & Buckner, J. H. (2011). CD4+FOXP3+ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. *The Journal of Immunology*, *187*(5), 2061–2066. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1003224>,
 118. Lozza, L., Moura-Alves, P., Domaszewska, T., Lage Crespo, C., Streata, I., Kreuchwig, A., Puyskens, A., Bechtle, M., Klemm, M., Zedler, U., Silviu Ungureanu, B., Guhlich-Bornhof, U., Koehler, A. B., Stäber, M., Mollenkopf, H. J., Hurwitz, R., Furkert, J., Krause, G., Weiner, J., ... Kaufmann, S. H. E. (2019). The Henna pigment Lawsone activates the Aryl Hydrocarbon Receptor and impacts skin homeostasis. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47350-x>
 119. Lyon, J., Manning Fox, J. E., Spigelman, A. F., Kim, R., Smith, N., O’Gorman, D., Kin, T., Shapiro, A. M. J., Rajotte, R. V., & MacDonald, P. E. (2016). Research-Focused Isolation of Human Islets From Donors With and Without Diabetes at the Alberta Diabetes Institute IsletCore. *Endocrinology*, *157*(2), 560–569. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1562>
 120. Malany, K., Li, X., Vogel, C. F. A., & Ehrlich, A. K. (2024). Mechanisms underlying aryl hydrocarbon receptor-driven divergent macrophage function. *Toxicological Sciences*, *200*(1), 1. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFAE050>
 121. Marafini, I., Monteleone, I., Laudisi, F., & Monteleone, G. (2024). Aryl Hydrocarbon Receptor Signalling in the Control of Gut Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 4527*, *25*(8), 4527. <https://doi.org/10.3390/IJMS25084527>
 122. Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S. H., Wang, Y. H., & Dong, C. (2009). Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *European Journal of Immunology*, *39*(1), 216–224. <https://doi.org/10.1002/EJI.200838475>,
 123. Mauvais, F. X., & van Endert, P. M. (2025). Type 1 Diabetes: A Guide to Autoimmune Mechanisms for Clinicians. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *27*(S6), 40–56. <https://doi.org/10.1111/dom.16460>

124. Maynard, C. L., & Weaver, C. T. (2009). Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. *Immunity*, 31(3), 389. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2009.08.012>
125. McIntosh, B. E., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2009). Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual Review of Physiology*, 72, 625–645. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021909-135922>,
126. Mejía-León, M. E., & Calderón de la Barca, A. M. (2015). Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. *Nutrients* 2015, Vol. 7, Pages 9171-9184, 7(11), 9171–9184. <https://doi.org/10.3390/NU7115461>
127. Mellor, A. L., Keskin, D. B., Johnson, T., Chandler, P., & Munn, D. H. (2002). Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibit T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 168(8), 3771–3776. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.8.3771>,
128. Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., & Bradfield, C. A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 185(6), 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>
129. Miani, M., Le Naour, J., Waeckel-Enée, E., Verma, S. chand, Straube, M., Emond, P., Ryffel, B., van Endert, P., Sokol, H., & Diana, J. (2018). Gut Microbiota-Stimulated Innate Lymphoid Cells Support β -Defensin 14 Expression in Pancreatic Endocrine Cells, Preventing Autoimmune Diabetes. *Cell Metabolism*, 28(4), 557-572.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.012>
130. Mimura, J., & Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1619(3), 263–268. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00485-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00485-3)
131. Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F., & Monteleone, G. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 141(1), 237-248.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.007>
132. Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2010). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 19961–19966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014465107>
133. Nguyen, N. T., Nakahama, T., Nguyen, C. H., Tran, T. T., Le, V. S., Chu, H. H., & Kishimoto, T. (2015). Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. *Journal of Experimental Pharmacology*, 7, 29–35. <https://doi.org/10.2147/JEP.S63549>
134. Nikolic, T., Suwandi, J. S., Wesselius, J., Laban, S., Joosten, A. M., Sonneveld, P., Mul, D., Aanstoot, H. J., Kaddis, J. S., Zwaginga, J. J., & Roep, B. O. (2022). Tolerogenic dendritic cells pulsed with islet antigen induce long-term reduction in T-cell autoreactivity in type 1 diabetes patients. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1054968>,
135. Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B., & Lavasani, S. (2014). Intestinal Barrier Dysfunction Develops at the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, and Can Be Induced by Adoptive Transfer of Auto-Reactive T Cells. *PLoS ONE*, 9(9), e106335. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0106335>
136. Ogle, G. D., Wang, F., Haynes, A., Gregory, G. A., King, T. W., Deng, K., Dabelea, D., James, S., Jenkins, A. J., Li, X., Ma, R. C. W., Maahs, D. M., Oram, R. A., Pihoker, C., Svensson, J., Zhou, Z., Magliano, D. J., & Maniam, J. (2025). Global type 1 diabetes prevalence, incidence,

- and mortality estimates 2025: Results from the International diabetes Federation Atlas, 11th Edition, and the T1D Index Version 3.0. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 225(March), 112277. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2025.112277>
137. Ogrotis, I., Koufakis, T., & Kotsa, K. (2023). Changes in the Global Epidemiology of Type 1 Diabetes in an Evolving Landscape of Environmental Factors: Causes, Challenges, and Opportunities. *Medicina (Lithuania)*, 59(4). <https://doi.org/10.3390/medicina59040668>
 138. Okubo, Y., Torrey, H., Butterworth, J., Zheng, H., & Faustman, D. L. (2016). Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clinical and Translational Immunology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/CTI.2015.43>,
 139. Omrani, D., Mohammadi, S., Malekzadeh, M., Saeidi, M., Seyedhosseini, F. S., Al-Harrasi, A., & Yazdani, Y. (2025). Indole-3-Carbinol Enhances Alternative Activation of Macrophages via AHR Pathway and Glucose Transporter Regulation. *Immuno 2025, Vol. 5, Page 15*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/IMMUNO5020015>
 140. Opitz, C. A., Holfelder, P., Prentzell, M. T., & Trump, S. (2023). The complex biology of aryl hydrocarbon receptor activation in cancer and beyond. *Biochemical Pharmacology*, 216, 115798. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115798>
 141. Pallotta, M. T., Fallarino, F., Matino, D., Macchiarulo, A., & Orabona, C. (2014). AhR-mediated, non-genomic modulation of IDO1 function. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 497. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00497/PDF>
 142. Pashine, A., Göpfert, U., Chen, J., Hoffmann, E., Dietrich, P. S., & Peng, S. L. (2008). Failed efficacy of soluble human CD83-Ig in allogeneic mixed lymphocyte reactions and experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for a lack of therapeutic potential. *Immunology Letters*, 115(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2007.10.015>
 143. Passerini, L., Forlani, A., & Gregori, S. (2025). Advances in Regulatory Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Emerging Strategies and Future Directions. *European Journal of Immunology*, 55(5), 1–9. <https://doi.org/10.1002/eji.202451722>
 144. Pathak, V., Pathak, N. M., O'Neill, C. L., Guduric-Fuchs, J., & Medina, R. J. (2019). Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clinical Medicine Insights. Endocrinology and Diabetes*, 12. <https://doi.org/10.1177/1179551419844521>
 145. Peng, X., Rao, G., Li, X., Tong, N., Tian, Y., & Fu, X. (2023). Preclinical models for Type 1 Diabetes Mellitus-A practical approach for research. *International Journal of Medical Sciences*, 20(12), 1644–1661. <https://doi.org/10.7150/ijms.86566>
 146. Penny, H. A., Hodge, S. H., & Hepworth, M. R. (2018). Orchestration of intestinal homeostasis and tolerance by group 3 innate lymphoid cells. *Seminars in Immunopathology*, 40(4), 357–370. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0687-8>
 147. Peres, A. G., Zamboni, R., King, I. L., & Madrenas, J. (2017). Suppression of CYP1 members of the AHR response by pathogen-associated molecular patterns. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(6), 1471–1480. <https://doi.org/10.1189/JLB.4A0617-218RR>
 148. Perlman, R. L. (2016). Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1), 170. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOW014>
 149. Pérol, L., Lindner, J. M., Caudana, P., Nunez, N. G., Baeyens, A., Valle, A., Sedlik, C., Loirat, D., Boyer, O., Créange, A., Cohen, J. L., Rogner, U. C., Yamanouchi, J., Marchant, M., Leber, X. C., Scharenberg, M., Gagnerault, M. C., Mallone, R., Battaglia, M., ... Piaggio, E. (2016). Loss of immune tolerance to IL-2 in type 1 diabetes. *Nature Communications*, 7, 13027. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS13027>

150. Pescovitz, M. D., Greenbaum, C. J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D. J., Gitelman, S. E., Goland, R., Gottlieb, P. A., Marks, J. B., McGee, P. F., Moran, A. M., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D. A., Wherrett, D., Wilson, D. M., Lachin, J. M., & Skyler, J. S. (2009). Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. *New England Journal of Medicine*, *361*(22), 2143–2152. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904452>
151. Pimentel-Muñoz, F. X. (2021). Autophagy in the gastrointestinal system and cross talk with microbiota. *Autophagy in Health and Disease*, 321–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822003-0.00016-4>
152. Pociot, F., & Lernmark, Å. (2016). Genetic risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, *387*(10035), 2331–2339. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30582-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30582-7)
153. Prazma, C. M., & Tedder, T. F. (2008). Dendritic cell CD83: A therapeutic target or innocent bystander? *Immunology Letters*, *115*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2007.10.001>
154. Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Zalberg, L. J., Bartlett, R. J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G. S., Bennett, S. T., & Patel, D. D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics*, *15*(3), 293–297. <https://doi.org/10.1038/NG0397-293>,
155. Puyskens, A., Stinn, A., van der Vaart, M., Kreuchwig, A., Protze, J., Pei, G., Klemm, M., Gühlich-Bornhof, U., Hurwitz, R., Krishnamoorthy, G., Schaaf, M., Krause, G., Meijer, A. H., Kaufmann, S. H. E., & Moura-Alves, P. (2020). Aryl Hydrocarbon Receptor Modulation by Tuberculosis Drugs Impairs Host Defense and Treatment Outcomes. *Cell Host and Microbe*, *27*(2), 238–248.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.12.005/ATTACHMENT/5BFF7AF4-CC1C-41EE-8F95-666C564413B4/MMC2.PDF>
156. Queiroz, L. A. D., Assis, J. B., Guimarães, J. P. T., Sousa, E. S. A., Milhomem, A. C., Sunahara, K. K. S., Sá-Nunes, A., & Martins, J. O. (2021). Endangered Lymphocytes: The Effects of Alloxan and Streptozotocin on Immune Cells in Type 1 Induced Diabetes. *Mediators of Inflammation*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9940009>
157. Quintana, F. J., Yeste, A., & Mascanfroni, I. D. (2014). Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. *Cell Death & Differentiation* 2015 22:2, *22*(2), 215–224. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.125>
158. Quintana, Francisco J. (2013). The aryl hydrocarbon receptor: A molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology*, *138*(3), 183–189. <https://doi.org/10.1111/imm.12046>
159. Quintana, Francisco J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., & Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, *453*(7191), 65–71. <https://doi.org/10.1038/NATURE06880>
160. Quintana, Francisco J., Murugaiyan, G., Farez, M. F., Mitsdoerffer, M., Tukupah, A. M., Burns, E. J., & Weiner, H. L. (2010). An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(48), 20768–20773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009201107>
161. Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A. H., & Powrie, F. (2006). Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ Regulatory T Cells Abrogates Their Function In Vivo. *The Journal of Immunology*, *177*(7), 4376–4383. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.177.7.4376>,

162. Redondo, M. J., Steck, A. K., & Pugliese, A. (2018). Genetics of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, *19*(3), 346–353. <https://doi.org/10.1111/PEDI.12597>,
163. Rewers, M., & Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, *387*(10035), 2340–2348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30507-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30507-4)
164. Richards, B., Karpilow, J., Dunn, C., Zharkikh, L., Maxfield, A., Kamb, A., & Teng, D. H. F. (1999). Creation of a Stable Human Reporter Cell Line Suitable for FACS-Based, Transdominant Genetic Selection. *Somatic Cell and Molecular Genetics* *1999* *25*:4, *25*(4), 191–205. <https://doi.org/10.1023/A:1019206625658>
165. Rivera, C. A., & Lennon-Duménil, A. M. (2023). Gut immune cells and intestinal niche imprinting. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *150–151*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2023.01.006>
166. Rodriguez-Calvo, T., Chen, Y. C., Verchere, C. B., Haataja, L., Arvan, P., Leete, P., Richardson, S. J., Morgan, N. G., Qian, W. J., Pugliese, A., Atkinson, M., Evans-Molina, C., & Sims, E. K. (2021). Altered β -Cell Prohormone Processing and Secretion in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, *70*(5), 1038–1050. <https://doi.org/10.2337/DBI20-0034>,
167. Roesch, L. F., Lorca, G. L., Casella, G., Giongo, A., Naranjo, A., Pionzio, A. M., Li, N., Mai, V., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A., Neu, J., & Triplett, E. W. (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME Journal*, *3*(5), 536–548. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2009.5>,
168. Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 184–197). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0125-8>
169. Rutz, S., & Ouyang, W. (2011). Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells. *Current Opinion in Immunology*, *23*(5), 605–612. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2011.07.018>
170. Ryu, S., Lim, M. Y., Kim, J., & Kim, H. Y. (2023). Versatile roles of innate lymphoid cells at the mucosal barrier: from homeostasis to pathological inflammation. *Experimental & Molecular Medicine* *2023* *55*:9, *55*(9), 1845–1857. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01022-z>
171. Sadeghi Shermeh, A., Royzman, D., Kuhnt, C., Draßner, C., Stich, L., Steinkasserer, A., Knippertz, I., & Wild, A. B. (2023). Differential Modulation of Dendritic Cell Biology by Endogenous and Exogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms24097801>
172. Saksida, T., Paunović, V., Koprivica, I., Mićanović, D., Jevtić, B., Jonić, N., Stojanović, I. D., & Pejnović, N. (2023). Development of Type 1 Diabetes in Mice Is Associated with a Decrease in IL-2-Producing ILC3 and FoxP3+ Treg in the Small Intestine. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules28083366>
173. Sakurai, S., Shimizu, T., & Ohto, U. (2017). The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(43), 17609–17616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812974>
174. Salisbury, R. L., & Sulentic, C. E. W. (2015). The AhR and NF- κ B/Rel Proteins Mediate the Inhibitory Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on the 3' Immunoglobulin Heavy Chain Regulatory Region. *Toxicological Sciences*, *148*(2), 443–459. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV193>,
175. Sano, H., Terasaki, J., Mishiba, Y., Imagawa, A., & Hanafusa, T. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, suppresses pancreatic β -cell destruction induced by

- encephalomyocarditis virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(3), 756–761. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.020>
176. Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A. J., Omenetti, S., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Nebert, D. W., & Stockinger, B. (2017). Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity. *Nature*, 542(7640), 242–245. <https://doi.org/10.1038/NATURE21080;SUBJMETA=250,2516,256,347,631;KWRD=ACUTE+INFLAMMATION,MUCOSAL+IMMUNOLOGY>
 177. Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., & Buckner, J. H. (2008). The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 181(10), 7350–7355. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.10.7350>,
 178. Schroeder, J. C., DiNatale, B. C., Murray, I. A., Flaveny, C. A., Liu, Q., Laurenzana, E. M., Lin, J. M., Strom, S. C., Omiecinski, C. J., Amin, S., & Perdew, G. H. (2010). The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry*, 49(2), 393. <https://doi.org/10.1021/BI901786X>
 179. Seok, S. H., Ma, Z. X., Feltenberger, J. B., Chen, H., Chen, H., Scarlett, C., Lin, Z., Satyshur, K. A., Cortopassi, M., Jefcoate, C. R., Ge, Y., Tang, W., Bradfield, C. A., & Xing, Y. (2018). Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 1994–2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000631>
 180. Shalapour, S., Deiser, K., Sercan, Ö., Tuckermann, J., Minnich, K., Willmsky, G., Blankenstein, T., Hämmerling, G. J., Arnold, B., & Schüler, T. (2010). Commensal microflora and interferon- γ promote steady-state interleukin-7 production in vivo. *European Journal of Immunology*, 40(9), 2391–2400. <https://doi.org/10.1002/EJL.201040441>,
 181. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/JCP.26429>
 182. Singh, N. P., Singh, U. P., Singh, B., Price, R. L., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2011). Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Leads to Reciprocal Epigenetic Regulation of FoxP3 and IL-17 Expression and Amelioration of Experimental Colitis. *PLoS ONE*, 6(8), e23522. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023522>
 183. Sorini, C., Cosorich, I., Conte, M. Lo, De Giorgi, L., Facciotti, F., Lucianò, R., Rocchi, M., Ferrarese, R., Sanvito, F., Canducci, F., & Falcone, M. (2019). Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(30), 15140–15149. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814558116>
 184. Speight, J., & Pouwer, F. (2024). Type 1 Diabetes. *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine: Third Edition*, 477–480. <https://doi.org/10.29309/tpmj/2017.24.12.614>
 185. St. Rose, M. C., Taylor, R. A., Bandyopadhyay, S., Qui, H. Z., Hagymasi, A. T., Vella, A. T., & Adler, A. J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN- γ maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunology and Cell Biology*, 91(2), 173–183. <https://doi.org/10.1038/ICB.2012.74>,
 186. Stadinski, B. D., Cleveland, S. B., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Huseby, P. G., & Huseby, E. S. (2023). I-Ag7 β 56/57 polymorphisms regulate non-cognate negative selection to CD4+ T cell orchestrators of type 1 diabetes. *Nature Immunology*, 24(4), 652–663.

- <https://doi.org/10.1038/S41590-023-01441-0>,
187. Stockinger, B., Diaz, O. E., & Wincent, E. (2024). The influence of AHR on immune and tissue biology. *EMBO Molecular Medicine*, *16*(10), 2290. <https://doi.org/10.1038/S44321-024-00135-W>
 188. Stojanović, I., Saksida, T., Miljković, Đ., & Pejnović, N. (2021). Modulation of Intestinal ILC3 for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *12*, 653560. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.653560/FULL>
 189. Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C. J. M., O'Shea, J. J., Hennighausen, L., Ernst, M., & Hunter, C. A. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology*, *7*(9), 937–945. <https://doi.org/10.1038/NI1376>
 190. Su, Z., Bian, L., Zhao, H., Cai, Y., Yang, T., Li, S., & Xu, X. (2025). Gut-tropic $\alpha 4\beta 7 + CD8 +$ T cells contribute to pancreatic β cell destruction in type 1 diabetes. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1623428. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2025.1623428/FULL>
 191. Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A. K., Blumberg, R. S., Xavier, R. J., & Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 534–544. <https://doi.org/10.1172/JCI33194>,
 192. Sun, L., Xi, S., He, G., Li, Z., Gang, X., Sun, C., Guo, W., & Wang, G. (2020). Two to Tango: Dialogue between Adaptive and Innate Immunity in Type 1 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/4106518>,
 193. Szelest, M., Walczak, K., & Plech, T. (2021). A new insight into the potential role of tryptophan-derived ahr ligands in skin physiological and pathological processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/IJMS22031104>,
 194. Tai, N., Peng, J., Liu, F., Gulden, E., Hu, Y., Zhang, X., Chen, L., Susan Wong, F., & Wen, L. (2016). Microbial antigen mimics activate diabetogenic CD8 T cells in NOD mice. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(10), 2129–2146. <https://doi.org/10.1084/jem.20160526>
 195. Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A., & Shevach, E. M. (2004). Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *The Journal of Immunology*, *172*(11), 6519–6523. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.11.6519>,
 196. Thornton, A. M., Piccirillo, C. A., & Shevach, E. M. (2004). Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *European Journal of Immunology*, *34*(2), 366–376. <https://doi.org/10.1002/EJI.200324455>,
 197. Tong, Z., Liu, W., Yan, H., & Dong, C. (2015). Interleukin-17A deficiency ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Immunology*, *146*(2), 339–346. <https://doi.org/10.1111/IMM.12512>,
 198. Tsai, D. H., Riediker, M., Berchet, A., Paccaud, F., Waeber, G., Vollenweider, P., & Bochud, M. (2019). Effects of short- and long-term exposures to particulate matter on inflammatory marker levels in the general population. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(19), 19697–19704. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-05194-Y>,
 199. Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., & Mathis, D. (2003). Physiological β Cell Death Triggers Priming of Self-reactive T Cells by Dendritic Cells in a Type-1 Diabetes Model. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(10), 1527–1537. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030966>,

200. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *Journal of Nutrition*, *141*(5), 769–776. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>
201. Unanue, E. R. (2014). Antigen presentation in the autoimmune diabetes of the nod mouse. *Annual Review of Immunology*, *32*, 579–608. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032712-095941>,
202. Unkila, M., Ruotsalainen, M., Pohjanvirta, R., Viluksela, M., MacDonald, E., Tuomisto, J. T., Rozman, K., & Tuomisto, J. (1995). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on tryptophan and glucose homeostasis in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant species, guinea pigs and hamsters. *Archives of Toxicology*, *69*(10), 677–683. <https://doi.org/10.1007/S002040050231>,
203. Vaarala, O. (2012). Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunology and Cell Biology*, *90*(3), 271–276. <https://doi.org/10.1038/ICB.2011.115;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
204. Vatanen, T., Franzosa, E. A., Schwager, R., Tripathi, S., Arthur, T. D., Vehik, K., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J. X., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Stewart, C. J., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Gevers, D., Lähdesmäki, H., ... Xavier, R. J. (2018a). The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*, *562*(7728), 589–594. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0620-2>
205. Vatanen, T., Franzosa, E. A., Schwager, R., Tripathi, S., Arthur, T. D., Vehik, K., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J. X., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Stewart, C. J., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Gevers, D., Lähdesmäki, H., ... Xavier, R. J. (2018b). The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*, *562*(7728), 589–594. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0620-2>,
206. Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O’Garra, A., & Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1084/jem.20081438>
207. Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, *453*(7191), 106–109. <https://doi.org/10.1038/NATURE06881>
208. Vogel, C. F. A., Khan, E. M., Leung, P. S. C., Gershwin, M. E., Chang, W. L. W., Wu, D., Haarmann-Stemann, T., Hoffmann, A., & Denison, M. S. (2014). Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: A role for nuclear factor-κB. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(3), 1866–1875. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.505578>,
209. Vogel, D. Y. S., Vereyken, E. J. F., Glim, J. E., Heijnen, P. D. A. M., Moeton, M., van der Valk, P., Amor, S., Teunissen, C. E., van Horssen, J., & Dijkstra, C. D. (2013). Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *Journal of Neuroinflammation* *2013 10:1*, *10*(1), 809-. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-35>
210. Vomund, A. N., Lichti, C. F., Peterson, O. J., Arbelaez, A. M., Wan, X., & Unanue, E. R. (2021). Blood leukocytes recapitulate diabetogenic peptide–MHC-II complexes displayed in the pancreatic islets. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(6). <https://doi.org/10.1084/JEM.20202530/211955>
211. Vomund, A. N., Zinselmeyer, B. H., Hughes, J., Calderon, B., Valderrama, C., Ferris, S. T., Wan, X., Kanekura, K., Carrero, J. A., Urano, F., & Unanue, E. R. (2015). Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(40), E5496–E5502.

https://doi.org/10.1073/PNAS.1515954112/SUPPL_FILE/PNAS.1515954112.SM03.MP4

212. Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V. L., Hernandez, P. P., Kiss, E. A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., Hönig, M., Pannicke, U., Schwarz, K., Ware, C. F., Finke, D., & Diefenbach, A. (2010). Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t⁺ innate lymphocytes. *Immunity*, 33(5), 736–751. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.017>
213. Wallis, R. H., Wang, K., Marandi, L., Hsieh, E., Ning, T., Chao, G. Y. C., Sarmiento, J., Paterson, A. D., & Poussier, P. (2009). Type 1 diabetes in the BB rat: A polygenic disease. *Diabetes*, 58(4), 1007–1017. <https://doi.org/10.2337/DB08-1215>,
214. Wasyl-Nawrot, B., Wójcik, M., Nazim, J., Skupień, J., & Starzyk, J. B. (2020). Increased Incidence of Type 1 Diabetes in Children and No Change in the Age of Diagnosis and BMI-SDS at the Onset - is the Accelerator Hypothesis not Working? *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 12(3), 281. <https://doi.org/10.4274/JCRPE.GALENOS.2020.2019.0133>
215. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/NATURE01262>
216. Wei, P., Hu, G. H., Kang, H. Y., Yao, H. B., Kou, W., Liu, H., Zhang, C., & Hong, S. L. (2014). An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Laboratory Investigation*, 94(5), 528–535. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.2014.8/ASSET/1D3110D9-D446-4DAD-A240-EE2011404426/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>
217. Weide, L. G., & Lacy, P. E. (1991). Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes*, 40(9), 1157–1162. <https://doi.org/10.2337/diab.40.9.1157>
218. Wells, J. M., Loonen, L. M. P., & Karczewski, J. M. (2010). The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2009.08.008>
219. Welzen-Coppens, J. M. C., van Helden-Meeuwsen, C. G., Leenen, P. J. M., Drexhage, H. A., & Versnel, M. A. (2012). Reduced numbers of dendritic cells with a tolerogenic phenotype in the prediabetic pancreas of NOD mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(6), 1207–1213. <https://doi.org/10.1189/JLB.0312168>,
220. Wershil, B. K., & Furuta, G. T. (2008). 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), S380–S383. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2007.10.023>
221. Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3698. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0812874106>
222. Winans, B., Nagari, A., Chae, M., Post, C. M., Ko, C.-I., Puga, A., Kraus, W. L., & Lawrence, B. P. (2015). Linking the aryl hydrocarbon receptor with altered DNA methylation patterns and developmentally induced aberrant antiviral CD8⁺ T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(9), 4446–4457. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1402044>
223. Wong, F. S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L. G., Janeway, C. A., & Shlomchik, M. J. (2004). Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes

- in the NOD mouse. *Diabetes*, 53(10), 2581–2587. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.10.2581>,
224. Wu, J., Zhang, L., Shi, J., He, R., Yang, W., Habtezion, A., Niu, N., Lu, P., & Xue, J. (2020). Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102920>
 225. Xu, J. F., Huang, B. J., Yin, H., Xiong, P., Feng, W., Xu, Y., Fang, M., Zheng, F., Wang, C. Y., & Gong, F. L. (2007). A limited course of soluble CD83 delays acute cellular rejection of MHC-mismatched mouse skin allografts. *Transplant International*, 20(3), 266–276. <https://doi.org/10.1111/J.1432-2277.2006.00426.X;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
 226. Xu, X., Zhang, X., Yuan, Y., Zhao, Y., Fares, H. M., Yang, M., Wen, Q., Taha, R., & Sun, L. (2021). Species-Specific Differences in Aryl Hydrocarbon Receptor Responses: How and Why? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13293. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413293>
 227. Xue, Z., Li, D., Yu, W., Zhang, Q., Hou, X., He, Y., & Kou, X. (2017). Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. *Food & Function*, 8(4), 1414–1437. <https://doi.org/10.1039/C6FO01810F>
 228. Yang, L., Li, X., Huang, W., Rao, X., & Lai, Y. (2022). Pharmacological properties of indirubin and its derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151, 113112. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113112>
 229. Ye, J., Qiu, J., Bostick, J. W., Ueda, A., Schjerven, H., Li, S., Jobin, C., Chen, Z. ming E., & Zhou, L. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Preferentially Marks and Promotes Gut Regulatory T Cells. *Cell Reports*, 21(8), 2277. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.10.114>
 230. Yu, H., Paiva, R., & Flavell, R. A. (2018). Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*, 153(2), 161–170. <https://doi.org/10.1111/IMM.12867>
 231. Yuan, X., Wang, R., Han, B., Sun, C. J., Chen, R., Wei, H., Chen, L., Du, H., Li, G., Yang, Y., Chen, X., Cui, L., Xu, Z., Fu, J., Wu, J., Gu, W., Chen, Z., Fang, X., Yang, H., ... Luo, F. (2022). Functional and metabolic alterations of gut microbiota in children with new-onset type 1 diabetes. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 6356-. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33656-4>
 232. Yue, T., Sun, F., Yang, C., Wang, F., Luo, J., Yang, P., Xiong, F., Zhang, S., Yu, Q., & Wang, C. Y. (2020). The AHR Signaling Attenuates Autoimmune Responses During the Development of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, 11(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01510>
 233. Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., Carvalho, A., Puccetti, P., & Romani, L. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>
 234. Zhang, Y., Feng, X., Chen, J., Liu, J., Wu, J., Tan, H., Mi, Z., & Rong, P. (2023). Controversial role of ILC3s in intestinal diseases: A novelty perspective on immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 14, 1134636. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1134636/FULL>
 235. Zhao, C. N., Xu, Z., Wu, G. C., Mao, Y. M., Liu, L. N., Qian-Wu, Dan, Y. L., Tao, S. S., Zhang, Q., Sam, N. B., Fan, Y. G., Zou, Y. F., Ye, D. Q., & Pan, H. F. (2019). Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 18(6), 607–614. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2018.12.010>

236. Zheng, H., Xu, P., Jiang, Q., Xu, Q., Zheng, Y., Yan, J., Ji, H., Ning, J., Zhang, X., Li, C., Zhang, L., Li, Y., Li, X., Song, W., & Gao, H. (2021). Depletion of acetate-producing bacteria from the gut microbiota facilitates cognitive impairment through the gut-brain neural mechanism in diabetic mice. *Microbiome*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01088-9>,
237. Zhou, H., Wu, H., Liao, C., Diao, X., Zhen, J., Chen, L., & Xue, Q. (2010). Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *20*(6), 279–286. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.485227>,
238. Zhou, Lei, Chu, C., Teng, F., Bessman, N. J., Goc, J., Santosa, E. K., Putzel, G. G., Kabata, H., Kelsen, J. R., Baldassano, R. N., Shah, M. A., Sockolow, R. E., Vivier, E., Eberl, G., Smith, K. A., & Sonnenberg, G. F. (2019). Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature*, *568*(7752), 405–409. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1082-x>
239. Zhou, Li, He, X., Cai, P., Li, T., Peng, R., Dang, J., Li, Y., Li, H., Huang, F., Shi, G., Xie, C., Lu, Y., & Chen, Y. (2021). Induced regulatory T cells suppress Tc1 cells through TGF- β signaling to ameliorate STZ-induced type 1 diabetes mellitus. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(3), 698–710. <https://doi.org/10.1038/S41423-020-00623-2>,
240. Zhou, X., Paulsson, G., Stemme, S., & Hansson, G. K. (1998). Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(8), 1717–1725. <https://doi.org/10.1172/JCI1216>,
241. Zhu, J., Luo, L., Tian, L., Yin, S., Ma, X., Cheng, S., Tang, W., Yu, J., Ma, W., Zhou, X., Fan, X., Yang, X., Yan, J., Xu, X., Lv, C., & Liang, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 expression in inflammatory macrophages through Src-STAT3 signaling pathway. *Frontiers in Immunology*, *9*(SEP), 407242. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02033/BIBTEX>
242. Zieliński, M., Żalińska, M., Iwaszkiewicz-Grześ, D., Gliwiński, M., Hennig, M., Jaźwińska-Curyło, A., Kamińska, H., Sakowska, J., Wołoszyn-Durkiewicz, A., Owczuk, R., Młynarski, W., Jarosz-Chobot, P., Bossowski, A., Szadkowska, A., Siebert, J., Myśliwiec, M., Marek-Trzonkowska, N., & Trzonkowski, P. (2022). Combined therapy with CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ T regulatory cells and anti-CD20 antibody in recent-onset type 1 diabetes is superior to monotherapy: Randomized phase I/II trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *24*(8), 1534–1543. <https://doi.org/10.1111/DOM.14723>,
243. Zinser, E., Lechmann, M., Golka, A., Lutz, M. B., & Steinkasserer, A. (2004). Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *The Journal of Experimental Medicine*, *200*(3), 345–351. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030973>

BIOGRAFIJA AUTORA

Natalija Jonić je rođena 13. maja 1996. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Školske 2015/16. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne akademske studije završila je 2019. godine sa prosečnom ocenom 8,51. Iste godine upisala je master akademske studije na smeru Imunobiologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. 2020. godine završila je master studije, sa prosečnom ocenom 9,83. Eksperimentalni deo master rada pod nazivom „Efekat N-acetil cisteina na ćelije uključene u regulaciju imunskog odgovora u tankom crevu miša u modelu autoimunskog dijabetesa – *in vivo* i *in vitro*“, je uradila pod mentorstvom dr Ivane Stojanović na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i odbranila sa ocenom 10. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu upisala je školske 2020/21. godine i položila je sve ispite predviđene programom, sa prosečnom ocenom 10.

Natalija je u novembru 2020. godine izabrana u zvanje istraživač pripravnik, dok je u januaru 2021. godine dobila zaposlenje na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Zvanje istraživač saradnik stekla je u julu 2023. godine.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS).

Natalija Jonić je koautor na sedam naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Ima tri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i tri saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, objavljena u časopisima M21 kategorije.

U okviru njenih angažovanja u svrhu promocije nauke, bila je učesnik Noći istraživača 2023. godine i bila je jedan od predavača u ciklusu predavanja pod nazivom „Zagađenje i imunski sistem“, koji je organizovan u saradnji sa Zadužbinom Ilije M. Kolarca 2024. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Наталија Јонић _____

Број индекса _____ М3021/2020 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат модулације арил-угљоводоничног рецептора на имунски одговор у лимфоидним
ткивима повезаним са гастроинтестиналним трактом у мишјем моделу дијабетеса типа 1

- 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 Наталија Јонић

Број индекса М3021/2020

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Ефекат модулације арил-угљоводоничног рецептора на имунски одговор у лимфоидним ткивима повезаним са гастроинтестиналним трактом у мишћем моделу дијабетеса типа 1

Ментор др Иван Копривица, др Биљана Божић Недељковић

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:

Ефекат модулације арил-угљоводоничног рецептора на имунски одговор у лимфоидним ткивима повезаним са гастроинтестиналним трактом у мишјем моделу дијабетеса типа 1

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.