

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Ljiljana Sabljic

**ISPITIVANJE NOVOG NAČINA APLIKACIJE
EKSKRETORNO-SEKRETORNIH PRODUKATA MIŠIĆNE
LARVE *TRICHINELLA SPIRALIS* U TRETMANU
EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG
ENCEFALOMIJELITISA KOD *DARK AGOUTI* PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ljiljana Sabljic

**EXAMINATION OF A NEW METHOD OF APPLICATION
OF EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS OF
TRICHINELLA SPIRALIS MUSCLE LARVAE IN THE
TREATMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE
ENCEPHALOMYELITIS IN *DARK AGUOTI* RATS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

dr Danica Bogunović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

Katedra za parazitologiju i parazitske bolesti

dr Alisa Gruden-Movsesijan, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije INEP

Odeljenje za imunologiju i imunoparazitologiju

Članovi komisije:

dr Darko Marinković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

Katedra za patologiju

dr Tijana Lužajić Božinovski, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

Katedra za histologiju i embriologiju

dr Nataša Radulović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Odeljenje za imunologiju

Datum odbrane:

ISPITIVANJE NOVOG NAČINA APLIKACIJE EKSKRETORNO-SEKRETORNIH PRODUKATA MIŠIĆNE LARVE *TRICHINELLA SPIRALIS* U TRETMANU EKSPERIMENTALNOG AUTOIMUNSKOG ENCEFALOMIJELITISA KOD *DARK AGOUTI* PACOVA

Kratak sadržaj

Ova doktorska disertacija dizajnirana je u cilju ispitivanja novih načina dostave ekskretorno-sekretornih produkata mišićne larve *Trichinella spiralis* (ESL1) u terapiji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) kod *Dark Agouti* (DA) pacova. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis je animalni model multiple skleroze (MS), hronične inflamatorne autoimunske bolesti centralnog nervnog sistema, koja dovodi do progresivnog neurološkog invaliditeta i značajno umanjuje kvalitet i dužinu života. Iako su istraživanja koja se bave različitim tretmanima MS brojna, do danas nije pronađena adekvatna terapija za ovu veoma tešku bolest, a terapije koje se koriste su simptomatske i samo delimično uspešne. Istraživanja su pokazala da infekcija parazitom *T. spiralis*, kao i primena ESL1 produkata ovog parazita, ublažavaju kliničku sliku eksperimentalnog modela multiple skleroze kod DA pacova i to pokretanjem regulatornih mehanizama koji su zaduženi za kontrolu imunskog odgovora, pa samim tim i za supresiju intenzivnog inflamatornog odgovora koja je karakteristična za autoimunske bolesti, kao što je MS. Iako su ovi tretmani bili uspešni, oni sa sobom nose određena ograničenja kada je reč o primeni kod ljudi. Ekskretorno-sekretorni produkti mišićne larve *T. spiralis* produkti su kompleksna smeša molekula, što predstavlja veliki izazov za njihovu masovnu proizvodnju, neophodnu za klinička ispitivanja. Kako je i način aplikacije imunomodulatornih molekula veoma važan, potrebno je razviti nove, adekvatne sisteme za efikasnu distribuciju ESL1 produkata koji će ujedno poboljšati njihov terapijski potencijal. Za ispitivanje su izabrana biorazgradiva nanovlakna izgrađena od poli(mlečne-ko-glikolne) kiseline (eng. *Poly Lactico-Glycolic Acid*, PLGA). Polimerni nanomaterijal od koga su napravljena vlakna je poznat po svojoj biokompatibilnosti i netoksičnosti, zbog čega je u širokoj upotrebi u sistemima za dostavu različitih terapeutika. Nanovlakna su se pokazala kao pogodni i bezbedni nosači koji poboljšavaju distribuciju i apsorpciju, i omogućavaju produženo delovanje leka na mestu primene.

Metodom elektrospininga ESL1 produkti su inkapsulirani u PLGA nanovlakna (PLGA/ESL1). Dinamika oslobađanja ESL1 procenjena je *in vitro*, i na životinjama kojima je izazvan EAE, sedam dana nakon supkutane implantacije PLGA/ESL1. Praćen je efekat PLGA/ESL1 na EAE simptome, kao i na fenotip različitih tipova imunskih ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima, Pajеровim pločama, slezini i centralnom nervnom sistemu (CNS), na vrhuncu bolesti i u fazi remisije.

ESL1 produkti oslobođeni iz PLGA implantata i drenirani kroz limfne čvorove putem mijeloidnih antigen-prezentujućih ćelija, efikasno su doprineli ublažavanju simptoma EAE. Postignuti efekti su bili u korelaciji sa smanjenom aktivacijom mijeloidnih ćelija, povećanom ekspresijom IL-10 i smanjenim nakupljanjem proinflamatornih ćelija „prirodnih ubica“ (NK), pomoćničkih Th1 i Th17 ćelija u slezini i CNS-u. Pored toga, zastupljenost CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ regulatornih T ćelija i IL-10-produkujućih B ćelija bila je povećana kod životinja tretiranih PLGA/ESL1 u poređenju sa životinjama iz kontrolnih grupa.

PLGA nanovlakna omogućila su efikasnu isporuku ESL1 produkata u *in vivo* uslovima, što je dovelo do sprečavanja razvoja simptoma EAE indukovanjem antiinflamatornog i regulatornog imunskog odgovora u slezini i CNS-u. Dalja istraživanja mehanizama kojim ESL1 produkti modulišu imunski odgovor u toku autoimunskih bolesti može dovesti do razvijanja novih perspektivnih pristupa u lečenju multiple skleroze i drugih oblika autoimunosti.

Ključne reči: eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis; ekskretorno-sekretorni produkti mišićne larve *Trichinella spiralis*; multipla skleroza; *Poly Lactic-co-Glycolic Acid* nanovlakna; *Trichinella spiralis*;

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Parazitologija

UDK broj:

EXAMINATION OF A NEW METHOD OF APPLICATION OF EXCRETORY-SECRETORY PRODUCTS OF MUSCLE LARVAE *TRICHINELLA SPIRALIS* IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS IN *DARK AGOUTI* RATS

Summary

This doctoral dissertation was designed with the aim of investigating novel strategies for the delivery of excretory-secretory products of the muscle larvae of *Trichinella spiralis* (ESL1) in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Dark Agouti rats. Experimental autoimmune encephalomyelitis is an animal model of multiple sclerosis (MS), a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system that leads to progressive neurological disability and significantly reduces both quality and length of life. Although numerous studies have investigated different treatment options for MS, no adequate treatment has been found to date, and existing therapies are primarily symptomatic and only partially effective. Research has shown that infection with *T. spiralis*, as well as treatment with ESL1 products derived from this parasite, alleviates clinical symptoms of the experimental model of MS in DA rats. This effect is achieved through the activation of regulatory mechanisms responsible for controlling immune responses, thereby suppressing the excessive inflammation characteristic of autoimmune diseases such as MS. Despite the observed therapeutic effects, the application of these treatments in humans remains limited. Excretory-secretory products of the muscle larvae of *Trichinella spiralis* products represent a complex mixture of molecules, posing a significant challenge for large-scale production required for clinical testing. Moreover, the method of delivery of immunomodulatory molecules plays a crucial role in their efficacy, making it necessary to develop new, suitable systems for the effective delivery of ESL1 products that would also enhance their therapeutic potential.

For this purpose, biodegradable Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) nanofibers were selected. The polymeric nanomaterial used for their fabrication is known for its biocompatibility and non-toxicity, and is widely used in drug delivery systems. Nanofibers have proven to be suitable and safe carriers that improve distribution and absorption, and enable prolonged drug release at the site of application.

Using the electrospinning method, ESL1 products were encapsulated in PLGA nanofibers. The release dynamics of ESL1 were assessed *in vitro* and in animals with EAE induced seven days after subcutaneous implantation of PLGA/ESL1. The effect of PLGA/ESL1 on EAE symptoms was monitored, along with the phenotype of various immune cell types in draining lymph nodes, Peyer's patches, the spleen, and the central nervous system (CNS), both at the peak of disease and during the recovery phase.

ESL1 products released from PLGA implants and transported by myeloid antigen-presenting cells through the lymph nodes effectively contributed to the alleviation of EAE symptoms. These effects were associated with reduced activation of myeloid cells, increased IL-10 expression, and decreased accumulation of pro-inflammatory natural killer (NK) cells, Th1 and Th17 helper T cells in the spleen and CNS. Additionally, the frequency of CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ regulatory T cells and IL-10-producing B cells was elevated in animals treated with PLGA/ESL1 compared to control animals.

PLGA nanofibers enabled efficient *in vivo* delivery of ESL1 products, leading to the prevention of EAE symptom development by inducing an anti-inflammatory and regulatory immune response in the spleen and CNS. Further investigation into the mechanisms by which ESL1 products modulate the immune response during autoimmune diseases may lead to the development of promising new approaches for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune disorders.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, excretory-secretory products of the muscle larvae of *Trichinella spiralis*, multiple sclerosis, Poly Lactic-co-Glycolic Acid nanofibers, *Trichinella spiralis*

Scientific Field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Parasitology

UDC Number:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Imunski sistem i hipoteza „starih prijatelja“	2
2.2. Multipla skleroza.....	3
2.2.1. Imunopatogeneza multiple skleroze.....	4
2.2.2. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) kao animalni model multiple skleroze	5
2.3. <i>Trichinella spiralis</i>	6
2.3.1. Životni ciklus <i>Trichinella spiralis</i>	7
2.3.2. Imunski odgovor tokom infekcije izazvane nematodom <i>Trichinella spiralis</i>	8
2.3.3. Antigeni <i>Trichinella spiralis</i>	8
2.3.4. Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larve <i>Trichinella spiralis</i>	9
2.4. Imunomodulacija autoimunosti pod uticajem nematode <i>Trichinella spiralis</i>	9
2.5. Nanomaterijal na bazi poli(mlečno-ko-glikolne) kiseline – PLGA	10
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	13
4. MATERIJAL I METODE	14
4.1. Izolovanje i priprema ESL1 produkta <i>Trichinella spiralis</i>	14
4.2. Odabir eksperimentalnih životinja	14
4.3. Priprema i karakterizacija PLGA i PLGA/ESL1 implantata	15
4.3.1. Izolacija eksudata iz sterilne rane	16
4.3.2. Ispitivanje otpuštanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana <i>in vitro</i>	16
4.3.3. Ispitivanje preuzimanja ESL1-FITC <i>in vitro</i>	16
4.3.4. Priprema i postavljanje PLGA implantata <i>in vivo</i>	16
4.4. Indukcija eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE).....	17
4.4.1. Izolovanje i kultivacija ćelija slezine, limfnih čvorova i infiltrata kičmene moždine	18
4.4.2. Praćenje oslobađanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana <i>in vivo</i>	18
4.4.3. Analiza produkcije citokina u ćelijama slezine <i>Dark Agouti</i> pacova	19
4.5. Ispitivanje uticaja PLGA nanomaterijala na imunski sistem zdravih životinja	19
4.5.1. Mlečnokiselinski test.....	19
4.5.2. Test apoptoze ćelija slezine tretiranih raspadnim produktima PLGA tj. PLGA kondicioniranim sterilnim eksudatom.....	19
4.5.3. Dobijanje dendritskih ćelija iz ćelija koštane srži <i>Dark Agouti</i> pacova	19
4.5.4. Kokultura dendritskih ćelija i alogernih T limfocita	20
4.5.5. Test proliferacije	20
4.5.6. Ispitivanje uticaja PLGA implantata na imunske ćelije slezina i limfnih čvorova zdravih <i>Dark Agouti</i> pacova	20
4.6. Protočna citometrija	20
4.7. Histološke analize	21

4.8. Statistička analiza.....	22
5. REZULTATI	23
5.1. Karakterizacija i otpuštanje ESL1 antigena iz PLGA nanovlakana	23
5.2. Dinamika oslobađanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana <i>in vitro</i>	24
5.3. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na tok i težinu EAE kod <i>Dark Agouti</i> pacova.....	25
5.3.1. Ispitivanje preuzimanja ESL1-FITC od strane mijeloidnih antigen-prezentujućih ćelija	27
5.3.2. Distribucija ESL1-FITC oslobođenih iz PLGA nanovlakana <i>in vivo</i>	27
5.4. Uticaj PLGA/ESL1 na imunski odgovor ćelija slezine tokom EAE	30
5.5. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na inflamaciju i udeo imunskih ćelija u CNS tokom EAE ...	32
5.6. Testiranje uticaja raspadnih produkata PLGA nanovlakana na ćelije slezine <i>Dark Agouti</i> pacova <i>in vitro</i>	35
5.6.1. Mlečnokiselinski test.....	35
5.6.2. Test apoptoze korišćenjem <i>Annexin-V</i> kita	35
5.6.3. Uticaj WE i WE/PLGA na sazrevanje dendritskih ćelija	36
5.6.4. Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija <i>Dark Agouti</i> pacova tretiranih sa WE/PLGA na proliferaciju alogernih T ćelija	38
5.6.5. Ispitivanje uticaja dendritskih ćelija <i>Dark Agouti</i> pacova tretiranih sa WE/PLGA na polarizaciju alogernih T ćelija.....	38
5.7. Ispitivanje uticaja PLGA nanovlakana na imunski sistem <i>Dark Agouti</i> pacova <i>in vivo</i>	39
5.7.1. Histološka analiza isečaka kože sa potkožnim tkivom	39
5.7.2. Odgovor makrofaga slezine i limfnih čvorova <i>Dark Agouti</i> pacova nakon potkožne implantacije PLGA nanovlakana	41
5.7.3. Uticaj PLGA implantata na odgovor T ćelija slezine i limfnih čvorova kod <i>Dark Agouti</i> pacova	42
6. DISKUSIJA	43
7. ZAKLJUČCI	48
8. LITERATURA	50

1. UVOD

Multipla skleroza (MS) je hronično neuroinflamatorno autoimunske oboljenje centralnog nervnog sistema (CNS) ljudi, koje dovodi do inflamacije, demijelinizacije i neurodegeneracije. Uprkos značajnom napretku u razumevanju patogeneze bolesti i razvoju novih terapijskih pristupa, još uvek ne postoje terapeutici koji deluju na sam uzrok bolesti, a to je poremećaj u regulaciji imunskog odgovora. Tokom evolucije imunski sistem se razvijao u stalnom kontaktu sa različitim organizmima iz spoljašnje sredine, između ostalih i sa parazitima. Prema higijenskoj hipotezi, smanjena izloženost parazitima u savremenim životnim uslovima može dovesti do poremećaja u funkcionisanju regulatornih mehanizama imunskog sistema, što može doprineti razvoju inflamatornih bolesti, kao što su autoimunske bolesti. *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) je helmint koji ceo svoj životni vek provodi u jednom domaćinu, kreirajući sredinu kojom dominiraju antiinflamatorni i regulatorni mehanizmi, neophodni za sprečavanje preterane aktivacije inflamatornog odgovora. Posredstvom svojih produkata, ova parazitska nematoda menja imunski odgovor domaćina, ne samo prema sebi, već i prema drugim antigenima, kao što su autoantigeni. Ranija istraživanja pokazala su značajan potencijal *T. spiralis* kao "majstora manipulacije" imunskog odgovora domaćina, jer ima mogućnost da putem svojih ekskretorno-sekretornih produkata izmeni fenotip patoloških inflamatornih imunskih ćelija i suprimira prekomernu inflamaciju tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE), koji predstavlja animalni model MS. Dosadašnja istraživanja pokazala su da ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi *T. spiralis* poseduju izražen imunomodulatorni potencijal i mogu da usmeravaju imunski odgovor ka antiinflamatornom fenotipu. Međutim, njihova direktna primena ograničena je kratkim vremenom zadržavanja u organizmu, nekontrolisanom biodistribucijom i potrebom za ponovljenim aplikacijama, što može umanjiti terapijski efekat i otežati njihovo uvođenje u kliničku praksu. Ova ograničenja ukazala su na potrebu za razvojem sistema koji bi omogućio lokalizovanu, kontrolisanu i dugotrajnu isporuku ovih bioaktivnih molekula. S obzirom na navedena ograničenja, nanovlakna zasnovana na poli(mlečno-ko-glikolnoj) kiselini (eng. *Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid – PLGA*) predstavljaju perspektivnu platformu za distribuciju biomolekula, zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, biorazgradivosti i sposobnosti da obezbede postepeno oslobađanje inkorporiranih biomolekula. Ideja da se PLGA koristi u formi nanovlakana proizilazi iz toga da ova formulacija, za razliku od nanočestica, omogućava postepeno otpuštanje i adekvatnije kontrolisanu distribuciju potencijalnih terapeutika. Ovakav način distribucije oponaša prirodnu infekciju parazitom *T. spiralis*, tokom koje se ekskretorno-sekretorni produkti kontinuirano oslobađaju i obezbeđuju dugotrajnu stimulaciju imunskog sistema domaćina. Za razliku od jednokratne primene slobodnih produkata mišićne larve *T. spiralis*, postepeno i kontrolisano oslobađanje ESL1 produkata iz PLGA nanovlakana moglo bi da omogućiti postepeno preusmeravanje imunskog odgovora od dominantno proinflamatornog okruženja, karakterističnog za multiplu sklerozu i eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE), ka antiinflamatornom i regulatornom odgovoru, čime bi se stvorili uslovi za dugotrajniju imunomodulaciju i konačnu rezoluciju bolesti.

Polazeći od ovih saznanja, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije usmerena su na razvoj i ispitivanje novog sistema dostave ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi *T. spiralis* (ESL1), zasnovanog na potkožno aplikovanim PLGA nanovlaknima, sa ciljem njihove potencijalne primene u imunomodulatornoj terapiji multiple skleroze. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju sposobnosti PLGA nanovlakana sa inkorporiranim ESL1 produktima (PLGA/ESL1) da modulišu inflamatorni odgovor u eksperimentalnom modelu relapsno-remitentnog eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) kod pacova *Dark Agouti* (DA) soja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Imunski sistem i hipoteza „starih prijatelja“

Autoimunska oboljenja su imunopatološka stanja koja karakteriše prekomerna imunološka reakcija na sopstvene antigene (autoantigene), koja dovodi do oštećenja tkiva i organa i posledično do njihove disfunkcije (Bartunkova i sar., 2009). Ova oboljenja najčešće nastaju kao posledica zajedničkog delovanja genetskih faktora i faktora spoljašnje sredine. Infekcije virusima, kao što su Epštajn-Bar virus (EBV), citomegalovirus, parvovirusi, pojedinim bakterijama i parazitima, dovode se u vezu sa nastankom autoimunskih bolesti (Bartunkova i sar., 2009; Grigoriadis i van Pesch, 2015). Međutim, sve više podataka ukazuje na to da infektivni agensi mogu pokrenuti regulatorne mehanizme koji kontrolišu funkcionisanje imunskog sistema i intenzitet imunskog odgovora, rezultirajući zaštitnim efektom u autoimunskim oboljenjima. Imunski sistem kičmenjaka se tokom evolucije razvijao u okruženju različitih patogenih i komensalskih mikroorganizama, što je dovelo do razvoja mehanizama koji, s jedne strane sprečavaju invaziju infektivnih agenasa, a sa druge ograničavaju intenzitet pokrenutog imunskog odgovora, čime se sprečava oštećenje tkiva. Nedostatak ovakve vrste stimulusa u spoljašnjoj sredini, koji je karakterističan za visokorazvijene, urbanizovane sredine, mogao bi da dovede do poremećaja u regulaciji imunskog odgovora, i time da poveća rizik za nastajanje hroničnih inflamatornih bolesti. „Higijenska hipoteza“, kasnije nazvana hipoteza „starih prijatelja“ (Rook, 2023) prva je predstavila koncept da izloženost infektivnim agensima u ranom dobu života smanjuje incidenciju alergija, hroničnih inflamatornih stanja i autoimunskih bolesti u određenoj populaciji. Rodonačelnik „higijenske hipoteze“ Strachan, povećan broj alergija u populacijama koje žive u industrijski razvijenim zemljama sa smanjenom izloženošću patogenima objašnjavao je poboljšanjem higijenskih uslova (Emanuel, 1988; Strachan, 2000). Različite epidemiološke studije (Patterson i sar., 1996; Zacccone i sar., 2006), istraživanja na eksperimentalnim modelima (Sewell i sar., 2003; Saunders i sar., 2007; Sofronić-Milosavljević i sar., 2013), i retke kliničke studije (Saunders i sar., 2007; Fleming i sar., 2011) pokazale su zaštitni efekat infektivnih agenasa, naročito parazita (Strachan, 2000; McKay, 2009; Versini i sar., 2015).

Parazitski helminti se smatraju majstorima manipulacije imunskog sistema organizma domaćina, kreirajući sredinu koja obezbeđuje njihov opstanak, a samim tim i opstanak domaćina. Infekcija helmintima pokreće antiinflamatorne i regulatorne mehanizme koji kontrolišu imunski odgovor usmeren ne samo protiv parazitskih antigena, već i antigena domaćina – autoantigena (Zacccone i sar., 2006; Jackson i sar., 2009). Sve veći broj podataka dobijenih u eksperimentalnim studijama na animalnim modelima ukazuju na zaštitni efekat helmintskih infekcija u autoimunskim bolestima. Istraživanje koje su sprovedeli Saunders i sar. (2007) pokazuje da infekcije nematodama kao što su *Trichinella spiralis* i *Heligmosomoides polygyrus*, mogu inhibirati pojavu dijabetesa kod *NOD* miševa (engl. *nonobese diabetic*) kroz indukciju Th2 odgovora, koji potencijalno štiti beta ćelije pankreasa od Th1-posredovanog oštećenja. U animalnom modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) kod miševa pokazano je da se nakon imunizacije antigenima metilja *Shistosoma mansoni* ublažava klinička slika kod obolelih životinja i da se imunski odgovor preusmerava ka zaštitnom Th2 odgovoru (Sewell i sar., 2003). Eksretorno-sekretorni produkti pantljičare *Taenia crassiceps* (TcES) efikasno smanjuju razvoj EAE, efikasnije od deksametazona, čak i kada se primene u kasnijoj fazi bolesti, a dodatno inhibiraju aktivaciju limfocita i preusmeravaju imunski odgovor sa Th1/Th17 ka Th2 odgovoru (Peón i sar., 2017).

Pored animalnog modela sprovedene su i kliničke studije sa nematodom *Trichuris suis*, pri čemu su postignuti ohrabrujući rezultati u terapiji obolelih od Kronove bolesti, a slabiji efekat ovaj parazit pokazao je u terapiji ulceroznog kolitisa (Summers i sar., 2005a, 2005b). Kod pet kliničkih ispitanika obolelih od relapsno-remitentnog oblika multiple skleroze (MS) aplikovana su peroralno jaja *T. suis*, što je dovelo do poboljšanja u vidu smanjenja broja lezija na mozgu, dok je kod četiri od pet ispitanika zabeležen porast antiinflamatornih citokina (IL-4, IL-10) (Fleming i sar., 2011).

Helminti pokreću Th2 odgovor i ekspanziju regulatornih T i B ćelija i posledičnu produkciju regulatornih citokina IL-10 i TGF- β , što suprimira intenziviran Th1/Th17 odgovor karakterističan za inflamatorne poremećaje, što je slučaj i kod autoimunskih oboljenja. Takođe, stimulišu aktivaciju ćelija monocitno-makrofagne loze i diferencijaciju monocita u makrofage i usmeravaju dendritske ćelije ka tolerogenom fenotipu, što sve zajedno rezultira kontrolom Th1/Th2/Th17 odgovora i uspostavljenjem homeostaze. Poznato je da tolerogene dendritske ćelije mogu sprečiti nastanak autoimunosti (*Saferding i Blüml, 2020*). Prva pomisao da helminti mogu da uspostave ravnotežu između Th1 i Th2 odgovora javila se nakon eksperimenata koji su sprovedeni na miševima inficiranim helmintima, kojima je indukovana autoimunska bolest. Pokazalo se da paraziti promovišu Th2 i inhibiraju polarizaciju Th1 odgovora, što rezultira zaštitnim efektom protiv Th1-posredovanih autoimunskih bolesti. Kasnije se pokazalo da u imunoregulaciji posredovanoj helmintima učestvuju i regulatorne T ćelije (Treg) (*Maizels i Smith, 2011*).

2.2. Multipla skleroza

Autoimunska oboljenja nastaju usled narušavanja kontrolnih mehanizama imunskog sistema, koje se na centralnom nivou, u timusu, ogleda u neodgovarajućoj selekciji autoreaktivnih T ćelija, dok se na perifernom nivou ogleda u neadekvatnoj regulaciji imunskog odgovora prema sopstvenim antigenima ili poremećenoj prezentaciji sopstvenih antigena (*Zaccone i sar., 2006*). Autoimunska oboljenja se javljaju kada T ili B ćelije prepoznaju antigene svojih ćelija kao strane. Pomoćničke T ćelije (Th) tada produkuju inflamatorne citokine i aktiviraju efektorske ćelije koje dovode do oštećenja organa. Otkrivanje mehanizama koji pokreću aktivaciju autoreaktivnih T i B ćelija važno je za razumevanje nastanka autoimunskih bolesti.

Multipla skleroza (MS) je složeno, neuroinflamatorno degenerativno oboljenje centralnog nervnog sistema (CNS) ljudi multifaktorijalne prirode, koje se javlja najčešće između dvadesete i četrdesete godine života. Razni uticaji iz spoljašnje sredine kao što su nedostatak vitamina D, ultraljubičasti B zraci, infekcija Epštajn-Bar virusom, gojaznost i pušenje mogu doprineti nastanku ovog oboljenja. Poznato je da periferno aktivirane CD4⁺ T pomoćničke ćelije tipa 1 (Th1) prolaze krvno-moždanu barijeru (KMB) dovodeći do oštećenja CNS-a. Citokini koje Th1 ćelije produkuju aktiviraju sazrevanje B ćelija, antitela se vezuju za sopstvene antigene na mijelinskom omotaču i dolazi do njegovog oštećenja. Aktivirani citotoksični makrofagi proizvode proinflamatorne citokine koji dodatno doprinose demijelinizaciji (*Matsuzaka i Yashiro, 2023*). Sve ovo dovodi do neurodegenerativnih promena i kliničkih manifestacija bolesti. Nervne ćelije međusobno komuniciraju na taj način što šalju električne impulse duž aksona koji su obmotani mijelinom, dok je kod MS prenos ovih signala otežan ili, u zavisnosti od oštećenja, u potpunosti onemogućen.

Većina pacijenata obolelih od MS (85%) razvija relapsno-remitentnu (RRMS) formu bolesti koju prati progresivno slabljenje motornih funkcija. Mali procenat pacijenata (10%) ima progresivnu formu od samog početka. U proseku 10–15% pacijenata sa RRMS ima blagi oblik bolesti i mogu klinički biti stabilni nekoliko decenija. Prve promene na CNS-u najčešće se javljaju na optičkom nervu, moždanom stablu i kičmenoj moždini, a prva manifestacija bolesti naziva se klinički izolovani sindrom (*Dobson i Giovannoni, 2019*).

U zavisnosti od toga koja nervna vlakna su demijelinizovana klinička slika među pacijentima varira. Najčešći rani simptomi su peckanje, utrnulost, bol, svrab, ponekad i gubitak čula dodira u rukama i nogama, slabost ili nemogućnost izvođenja preciznih pokreta u jednoj nozi ili ruci i oslabljen često zamagljen vid. Glavni simptomi koji mogu da se primete tokom čitavog toka MS su gubitak vida, diplopija, cerebelarna ataksija, paraliza udova, senzorni poremećaji, poremećaji hoda i bolne tonične konvulzije koji se razlikuju u zavisnosti od mesta lezije. Kako bolest napreduje, pokreti su nespreniji što rezultira otežanim hodom. Kod nekih osoba može se razviti delimična ili potpuna paraliza. Takođe se mogu javiti problemi sa govorom, gubitak kontrole nad emocijama ili depresija. Sposobnost racionalnog rasuđivanja može biti narušena. Bolest zahvata nerve koji regulišu uriniranje

i defekaciju, pa pacijenti ne mogu da kontrolišu ove fiziološke funkcije. Učestali relapsi dovode do teških i trajnih oštećenja, koja narušavaju kvalitet života pacijenata (*Matsuzaka i Yashiro, 2023*).

Većina terapijika koji se danas koriste u terapiji MS suprimiraju imunski odgovor što povećava rizik od infekcija i nastanka kancera. Pored upotrebe imunosupresiva, u terapiji se danas koriste imunomodulatorni lekovi, kao što su monoklonska antitela, interferon i modulatori sfingozin 1-receptora, koji su postigli veliki napredak u terapiji. Međutim, svi ovi lekovi deluju simptomatski, ograničenog su nivoa uspešnosti i izazivaju niz neželjenih efekata. Nijedan od danas poznatih terapijika ne cilja mehanizme koji regulišu imunski odgovor i održavaju toleranciju na sopstveno, a koji su poremećeni u autoimunskim bolestima (*Anderton i Wraith, 2008; Compston i Coles, 2008; Lanzillo i Bonavita, 2016*).

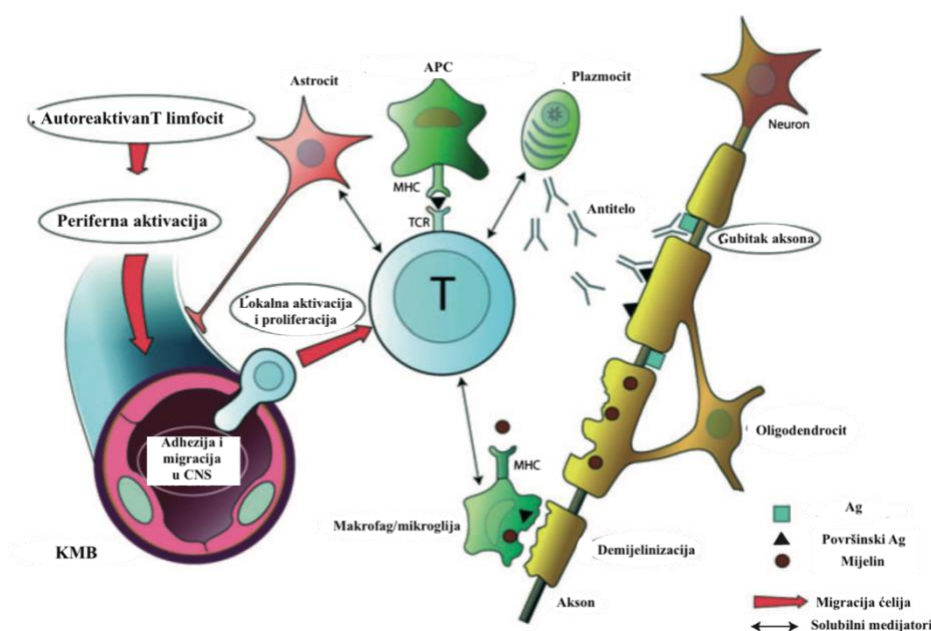
2.2.1. Imunopatogeneza multiple skleroze

Smatra se da multipla skleroza nastaje usled poremećaja u regulaciji imunskog sistema, koji je posledica različitih faktora, uključujući genetsku predispoziciju i faktore spoljašnje sredine. Glavni medijatori nastanka bolesti su autoreaktivne T ćelije koje napadaju CNS. Iako se precizni mehanizmi nastanka mijelin-specifičnih autoreaktivnih T ćelija još uvek ne zna, jedan od mogućih mehanizama je nespecifična poliklonalna aktivacija bakterijskim ili virusnim antigenima, kao što je infekcija Epštajn-Bar virusom (*Dobson i Giovannoni, 2019*). Mehanizmi kojim EBV posreduje u razvoju MS još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali je moguće objašnjenje molekulska mimikrija – postojanje strukturne homologije između određenih sekvenci proteina virusa i sekvenci mijelina i drugih proteina koji se nalaze u CNS-u. Uzorci periferne krvi obolelih osoba ukazuju na prisustvo T ćelija specifičnih za mijelin. Histopatološki nalazi u beloj masi mozga i kičmene moždine obolelih osoba ukazali su na fokalna polja demijelinizacije, koju prati infiltracija inflamatornih ćelija. Prepoznata su tri tipa MS lezija: tip 1 – kojim dominiraju T ćelije i makrofagi; tip 2 – kod koga se javljaju depoziti imunoglobulina i oštećenja nastala aktivacijom komplementa; tip 3 – u kom je uočljiva apoptoza oligodendroglialnih ćelija (*Gold i Wolinsky, 2011*). Razumevanju patogeneze MS umnogome su doprinela istraživanja na animalnom modelu – eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (EAE), kod koga je neuroinflamacija i demijelinizacija posredovana T ćelijama specifičnim za mijelin. Ranije se podrazumevalo da su Th1 ćelije koje proizvode IFN- γ odgovorne za inflamaciju i oštećenje CNS-a, međutim, istraživanja na animalnom modelu MS su pokazala da i miševi kojima nedostaje gen za IFN- γ mogu da razviju težak oblik bolesti (*Farber i sar., 1996*), pa čak i da uklanjanje ovog citokina dovodi do pogoršanja EAE (*Duong i sar., 1994*). Kasnija istraživanja su pokazala da CD4⁺ T ćelije koje proizvode IL-17 (Th17) igraju centralnu ulogu u nastanku i razvoju autoimunosti (*Bettelli i sar., 2006*). Kod ljudi je utvrđeno da su citokini IFN γ i IL-17 važni za razvoj MS (*Lock i sar., 2002*) dok je kod miševa glavni medijator nastanka EAE IL-17, a IFN γ može imati i zaštitnu ulogu (*Furlan i sar., 2001*). Na animalnom modelu se pokazalo da adaptivni transfer i Th1 i Th17 ćelija može izazvati EAE, pri čemu se histološki nalazi razlikuju (*Luger i sar., 2008*).

Autoreaktivne T ćelije aktivirane na periferiji u kontaktu sa antigen-prezentujućim ćelijama (eng. *antigen presenting cells – APC*) koje nose sopstvene antigene, diferenciraju se u efektorske patogene T ćelije koje oslobađaju proinflamatorne medijatore, i kao takve stiču sposobnost da prođu kroz krvno-moždanu barijeru i prodiru u CNS. U CNS-u bivaju reaktivirane, oslobađaju proinflamatorne citokine koji aktiviraju makrofage i mikrogliju, što predstavlja ključni korak ka infalmatornoj demijelinizaciji i nastanku lezija u MS. Makrofagi dalje proizvode proinflamatorne medijatore, kao i medijatore oksidativnog stresa. Na mesto oštećenja mijelinskog omotača dolaze monociti, B ćelije, T ćelije i dendritske ćelije (eng. *dendritic cells – DC*) (Slika 1).

Najzastupljenije ćelije u lezijama su mikroglia i makrofagi. Mikroglia, kao i makrofagi, mogu imati M1 (proinflamatorni) i M2 (antiinflamatorni) fenotip. Ove različite populacije ćelija učestvuju kako u procesima demijelinizacije, tako i u procesima remijelinizacije i oporavka. U patogenezi MS značajnu ulogu igraju CD8⁺ T ćelije. Za razliku od EAE, ove ćelije u MS-u mogu činiti većinsku populaciju T ćelija u CNS perivaskularnim infiltratima (*Baecher-Allan i sar., 2018*). Mijelin-senzitivne CD8⁺ T ćelije sekreciju IFN- γ i ispoljavaju svoje citotoksično dejstvo na ćelije

koje eksprimiraju endogeno produkovan mijelin, tako da bi mogle imati značajnu ulogu u oštećenju aksona. Smatra se takođe da subpopulacija $\gamma\delta$ T ćelija učestvuje u patogenezi MS. Ove ćelije su CD161 CCR6 pozitivne i proizvode IL-17. Prisutne su u lezijama i mogu da spreče efikasnost regulatornih T ćelija (Treg) i da promovišu antigen-specifičan efektorski T ćelijski odgovor, na taj način pospešujući autoimunost. Pored prisutnih T ćelija, u lezijama MS su prisutni i B limfociti koji stvaraju autoantitela, a kao APC aktiviraju T limfocite (*Grigoriadis i van Pesch, 2015*).



Slika 1. Šematski prikaz patofizioloških promena koje se dešavaju na nivou aksona pod uticajem T reaktivnih ćelija (prilagođeno iz: *Gold i Wolinsky*, 2011). APC – antigen prezentujuća ćelija, KMB – krvno-moždana barijera, MHC – glavni kompleks tkivne kompatibilnosti, TCR – T ćelijski receptor.

Animalni model multiple skleroze je eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE). Tridesetih godina 20. veka Tomas Rivers prvi je uveo ovaj model, koji je omogućio ispitivanje patogeneze bolesti, kao i testiranje različitih terapijskih pristupa lečenju MS (*Van Epps*, 2005). Ovaj model se indukuje kod zdravih eksperimentalnih životinja imunizacijom protiv komponenti proteina CNS-a. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis se može aktivno indukovati injekcijom komponenti mijelina, koje čine mijelin bazni protein (MBP), mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG) i proteolipidni protein (PLP) ili njegovi peptidni derivati, emulgovani u kompletnom Frojndovom adjuvansu ili pasivno uz pomoć encefalitogenih CD4+ Th1 ćelija (*Wekerle*, 2008). U zavisnosti od vrste životinja i prirode antigena upotrebljenog za imunizaciju, EAE može da odgovara

akutnoj, relapsno-remitentnoj ili hroničnoj formi MS. Prvi simptomi nakon imunizacije javljaju se već nakon 9–12 dana. Najveći nedostatak EAE modela je što se EAE forma oboljenja indukuje, dok se MS kod ljudi spontano razvija (Constantinescu i sar., 2011).

Uz pomoć ovog modela ustanovljeno je da aktivacijom autoreaktivnih T ćelija dolazi do inflamacije CNS-a. Nakon aktivacije, T ćelije prolaze krvno-moždanu barijeru, zahvaljujući ekspresiji integrina (VLA-4) na površini inflamatornih ćelija uz pomoć kojih im je omogućeno vezivanje za VCAM-1 molekule endotela kapilara. Ekspresija VCAM-1 molekula tokom inflamacije podstaknuta je citokinima TNF- α i IFN- γ . Značajnu ulogu u inflamaciji imaju Th-17 ćelije, čija aktivacija dovodi do oštećenja mijelina (Gold i Wolinsky, 2011). Analizom histoloških isečaka, akutne lezije se nalaze oko zidova krvnih sudova ili u perivaskularnom prostoru i ispunjene su leukocitima (Wekerle, 2008). T ćelije specifične za antigene mijelina bivaju reaktivirane u perivaskularnom prostoru (Kawakami i sar., 2005) gde najverovatnije antigeni mijelina bivaju prezentovani preko MHC receptora klase II. Aktivirane T ćelije proizvode efektorske citokine i hemokine u CNS-u, što za posledicu ima migraciju makrofaga i granulocita u CNS i pojavu tkivne inflamacije i demijelinizacije (Dijkstra i sar., 1992). Degradacija mijelina nastaje i kao posledica stvaranja reaktivnih molekula azot monoksida (NO) i faktora nekroze tumora – TNF (Willenborg i sar., 2007). Interleukin-17 koga stvaraju Th-17 ćelije ima ključnu ulogu u patogenezi.

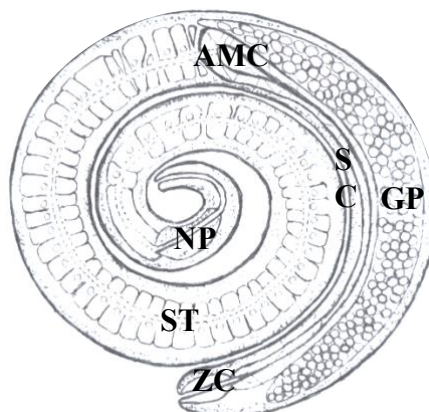
Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis se ispituje na velikom broju životinjskih vrsta uključujući pacove, miševе, kuniće, ovce i mnoge druge, ali se najčešće aktivna indukcija EAE vrši imunizacijom osetljivih visokosrodnih pacova i miševa. Nakon sedam dana od imunizacije u perifernom limfnom tkivu pojavljuju se autoreaktivne T ćelije specifične za mijelinske antigene (Wekerle i sar., 1994). Bolest se karakteriše pojavom ascedentne progresivne paralize u kaudo-rostralnom smeru uz gubitak telesne mase, pri čemu prvo dolazi do paralize repa, zatim do pareze, pa paralize zadnjih nogu, koja vremenom dovodi do pareze i paralize prednjih nogu i na kraju smrti kod težih slučajeva (Wekerle, 2008). Brzina razvoja simptoma i težina kliničke slike se razlikuje između vrsta, ali i unutar sojeva iste vrste. Izraženu prijemčivost ka razvoju EAE imaju Lewis i Dark Agouti (DA) sojevi pacova, dok su Albino-Oxford (AO) pacovi rezistentni na EAE (Mostarica-Stojković i sar., 1982.). Oboljenje kod DA pacova može imati produženu-relapsnu ili relapsno-remitentnu formu, u zavisnosti od načina indukcije. Bolest kod DA pacova praćena je demijelinizacijom i oštećenjem aksona (Pender, 1995; Stošić-Grujičić i sar., 2004). Za razliku od pacova, na miševima se može pored relapsno-remitentnog oblika indukovati i hronično-progresivan oblik. Za imunizaciju se najčešće koriste miševi C57BL/6 soja (Robinson i sar., 2014).

2.3. *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis je parazitska nematoda (klasa Adenophorea, red Enoplida, porodica Trichinellidae, rod *Trichinella*) koja izaziva bolest trihinelozu, primarno kod ljudi dok kod životinja najčešće prolazi asimptomatski. Čovek se zarazi konzumiranjem nedovoljno termički obrađenog mesa ili mesnih prerađevina koje u sebi sadrže infektivne L1 larve parazita (Gottstein i sar., 2009). U pitanju je parazit koji ima direktan razvojni ciklus, što znači da se kompletan razvoj, od infektivne larve, preko adulta, do infektivne mišićne larve odvija u jednom domaćinu. Primenom biohemijskih i molekularnih metoda utvrđeno je više genotipova, od kojih je većina označena kao vrste, a koje se na osnovu sposobnosti da stvaraju kapsulu dele u dve grupe: inkapsulirane – *T. spiralis* (genotip T1), *T. nativa* (genotip T2), *T. britovi* (genotip T3), *T. murelli* (genotip T5), *T. nelsoni* (genotip T7), *T. patagoniensis* (genotip T12), nedavno opisana *T. chanchalensis* (genotip T13), kao i genotipovi T6, T8 i T9; i neinkapsulirane: *T. pseudospiralis* (genotip T4), *T. papue* (genotip T10) i *T. zimbabwensis* (genotip T11) (Sharma i sar., 2020, Bruschi i sar., 2022).

Trichinella spiralis je mala nematoda, valjkastog oblika, beličaste boje, čiji su odrasli oblici dužine 1,4–1,6 mm. Telo nematode pokriveno je kutikulom složene građe, ispod koje se nalaze hipodermis i mišići koji omogućavaju kretanje parazita. Digestivni sistem predstavljen je pravom cev, koja počinje usnim, a završava se analnim otvorom. U prednjim partijama nalazi se tanak

jednjak. Crevo počinje ampularnim proširenjem (AMC) na koje se nastavljaju srednje (SC) i zadnje crevo (ZC). Crevo je postavljeno paralelno sa genitalnim primordiumom (GP). Nervni sistem je vrpčast i sastoji se od nervnog prstena (NP) koji okružuje jednjak. Adulte i mišićne larve karakteriše prisustvo egzokrinog organa – stihozoma (ST), izgrađenog od gusto upakovanih krupnih ćelija – stihocita (Slika 2). Stihociti proizvode ekskretorno-sekretorne produkte koji se oslobađaju u okolnu sredinu (Takahashi i sar., 1989).



Slika 2. Ilustrovani prikaz građe L1 mišićne larve *Trichinella spiralis*. Na ilustraciji su vidljivi unutrašnji organi mišićne larve: nervni prsten (NP), stihozom (ST), ampularno proširenje creva (AMC) na koje se nastavljaju srednje crevo (SC) i zadnje crevo (ZC). Paralelno pored creva, pruža se genitalni primordium (GP) (preuzeto iz: Takahashi, 2023).

2.3.1. Životni ciklus *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis je parazitska nematoda koja ostvaruje dugotrajnu infekciju u poprečno-prugastim mišićima domaćina. Razvojni ciklus parazita obuhvata tri faze: crevnu, fazu migracije i mišićnu fazu. Crevna faza počinje infekcijom, najčešće konzumiranjem mesa koje u sebi sadrži infektivnu larvu prvog stadijuma (L1). Paraziti se oslobađaju iz mišićnog tkiva pod dejstvom hlorovodonične kiseline i enzima u želucu, a zatim aktivirani žučnim sokovima prelaze u tanko crevo u kome počinje njihovo sazrevanje. U tom procesu larve prolaze kroz četiri presvlačenja (L2–L5) i postaju polno zreli odrasli paraziti koji naseljavaju epitel creva. Ženke oslobađaju feromone kojim privlače mužjake. Nakon oplodnje broj mužjaka se značajno smanjuje. Mužjaci i ženke se morfološki razlikuju. Nakon 6–7 dana, ženke polažu L1 larve, koje migriraju putem krvotoka i limfe (faza migracije) do poprečno-prugastih mišića domaćina (mišićna faza). Kada dospeju u mišićne ćelije, započinje proces transformišu u infektivne L1 larve. *Trichinella spiralis* poseduje sposobnost da mišićnu ćeliju u koju se inkorporira transformiše u specijalizovanu ćeliju koja se naziva „ćelija negovateljica“, a koja je neophodna za preživljavanje parazita u organizmu domaćina. Sam proces stvaranja ćelije negovateljice sličan je procesu regeneracije mišića nakon povrede. Parazit aktivira satelitske ćelije što dovodi do njihove proliferacije i remodeliranja (Wu i sar., 2008). U početku na mesto povrede dolaze inflamatorne ćelije i preovladavaju degenerativni procesi. Potom, neutrofili i makrofagi uklanjaju ćelijski debris i započinju proces reparacije aktivacijom miogenih i satelitskih ćelija. U uspostavljenoj ćeliji negovateljici oko larve se sintetiše kapsula izgrađena od kolagena domaćina. Kapsula funkcioniše kao polupropustljiva membrana, a povezana je i mrežom kapilara što omogućava komunikaciju inkapsulirane mišićne larve (L1) i domaćina, koja se ostvaruje putem ekskretorno-sekretornih produkata L1 larve (ESL1). Ujedno ova kapsula sprečava prodor imunoglobulina i ćelija imunskog sistema i na taj način mišićnoj larvi obezbeđuje imunološki privilegovano mesto i opstanak u organizmu domaćina (Bruschi i Murrell, 2002). Ovako zaštićena, larva može opstati u mišićima veoma dugo, mesecima ili godinama, zavisno od životnog veka domaćina (Wu i sar., 2008).

2.3.2. Imunski odgovor tokom infekcije izazvane nematodom *Trichinella spiralis*

Infekcija u crevnoj fazi pokreće prvenstveno Th1 odgovor, koji dominira veoma kratko (2–4 dana). Posebne hematosenzorne epitelne ćelije creva (engl. *tuft cells* – TC) bivaju aktivirane produktima parazita, kao i signalima iz okolnog oštećenog tkiva i počinju da proizvode citokine, interleukin IL-25, IL-33 i timusni stromalni limfopoetin (TSLP). Pod uticajem pozitivnih stimulusa na mesto infekcije dolaze i APC, i to u najvećem broju dendritske ćelije (DC), koje pokreću adaptivni imunski odgovor ključan u borbi protiv infekcije. Antigeni parazita u kontaktu sa TC i APC, stimulišu Th2 imunski odgovor, koga karakteriše stvaranje specifičnih IgE, IgG₁ i IgG₄ antitela, kao i citokina: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21 i IL-33, koji dalje stimulišu umnožavanje i aktivaciju pomoćničkih T limfocita, eozinofila, bazofila, mast ćelija, makrofaga i fibroblasta. Napredovanje crevne faze infekcije prati preusmeravanje imunskog odgovora ka Th2 tipu, koji postaje dominantan i traje tokom čitave mišićne, hronične faze infekcije (Bruschi i sar., 2022).

Bitnu ulogu u diferencijaciji eozinofila igra IL-5 kog proizvode Th2 ćelije. Eozinofili pomoću svojih produkata izazivaju oštećenja novonastalih larvi. Pod uticajem IL-4 i IL-13 u toku crevne faze dolazi do hiperplazije peharastih ćelija creva (engl. *goblet cells*), koje sekretuju molekule koji stvaraju fizičku barijeru na sluznici creva (Ding i sar., 2007). Ključnu ulogu u diferencijaciji B limfocita ima IL-4, koji ih usmereva ka produkciji IgE antitela. Osim što inicira sintezu specifičnih IgE antitela, IL-4 deluje i na enterocite, podstičući ih na preuzimanje i prenošenje ovih antitela kroz epitel creva. U lumenu creva IgE se vezuju za epitope na površini larvi *T. spiralis*, čime pomažu u sprečavanju invazije epitela creva. Takođe, IL-4 doprinosi povećanju broja mastocita u crevima, koji igraju ključnu ulogu u imunskoj odbrani protiv helmintskih infekcija (Bruschi i Murrell, 2002). Hroničnu, mišićnu fazu infekcije izazvane vrstom *T. spiralis* karakteriše i aktivacija antiinflamatornih i regulatornih mehanizama, koji obuhvataju indukciju antiinflamatornih i regulatornih citokina IL-10 i TGF- β , kao i regulatornih T ćelija (Treg), koje kontrolišu imunski odgovor usmeren ne samo protiv parazita već i protiv drugih antigena, kao što su autoantigeni i alergeni. Parazit na taj način menja imunski odgovor domaćina i obezbeđuje sebi sredinu pogodnu za opstanak. Regulatorni mehanizmi stavljaju pod kontrolu prekomernu inflamaciju i na taj način utiču na suzbijanje simptoma i povoljan ishod autoimunskih i alergijskih bolesti (Maizels i Yazdanbakhsh, 2003; Beiting i sar., 2007; Maizels i McSorley, 2016).

2.3.3. Antigeni *Trichinella spiralis*

Tokom crevne i mišićne faze infekcije, *T. spiralis* reaguje sa organizmom domaćina putem površinskih i sekretornih antigena, koji predstavljaju izazov za imunski sistem, a ujedno doprinose preživljavanju parazita. Razumevanje odnosa domaćin–parazit omogućava, sa jedne strane, razvoj boljih imunoloških metoda za detekciju antigena i samim tim ranije otkrivanje infekcije, a sa druge strane otkrivanje molekula, ćelija i mehanizama koji učestvuju u imunomodulaciji (Bien i sar., 2015). Postoje antigeni koji su zajednički za sve razvojne stadijume parazita, kao i oni koji su specifični za svaki stadijum ponaosob (Fabre i sar., 2009; Bien i sar., 2013).

Na osnovu mesta gde se nalaze, antigeni *T. spiralis* dele se na: površinske, ekskretorno-sekretorne i somatske antigene (Bolás-Fernandez i Corral Bezara, 2006).

Na osnovu pojave specifičnih antitela, tj. aktivacije humoralnog imunskog odgovora domaćina, razlikuju se dve grupe antigena. Prva grupa antigena indukuje humoralni imunski odgovor dve nedelje nakon infekcije. Antigeni ove grupe nalaze se na različitim tkivima larvi i adulta, kao što su kutikula, hemolimfa, epidermis, hipodermis, hipodermalna žlezda, egzokrine granule muškog reproduktivnog sistema. Druga grupa antigena indukuje humoralni imunski odgovor koji se detektuje 4–5 nedelja nakon infekcije. Detektovani su u kutikuli, stihocitnim granulama i ESL1 produktima L1 larvi *T. spiralis* i označeni su kao TSL antigeni. Antigeni druge grupe izazivaju snažan imunski odgovor domaćina, učestvuju u formiranju ćelije negovateljice i omogućavaju opstanak parazita u poprečno-prugastoj muskulaturi (Denkers i sar., 1990; Takahashi, 1997; Bolás-Fernandez i Corral

Bezara, 2006). U okviru ove grupe najviše su istraživani TSL1 antigeni, imunodominantni antigeni među kojima veliki broj poseduje tvelozu – šećer karakteristični za trihinelu (Guiliano i sar., 2009).

2.3.4. Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larve *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis ceo svoj životni ciklus provodi u jednom domaćinu i putem ESL1 produkata kreira sredinu u kojoj može da zaštiti i sebe i organizam domaćina. Izučavanjem ESL1 produkata mišićnih larvi, otkriveno je da ga čini 13 različitih proteina, koji postoje u različitim izoformama (Robinson i Connolly, 2005). Većina proteina u okviru ESL1 produkata su visko glikozilovani. Istraživanja su pokazala da glikoproteinska komponenta ESL1 inhibira funkciju neutrofila *in vitro*, smanjujući broj inflamatornih ćelija oko inkapsuliranog parazita u toku akutne faze inflamacije. Ekskretorno-sekretorni produkti sadrže u sebi funkcionalne proteine, kao što su preoteinaze, inhibitori preoteinaza, fosfataze, kinaze, endonukleaze i glikozidaze (Bruschi i sar., 2000). Uloga ovih proteina je raznovrsna, ali do sada nedovoljno ispitana. Poznato je da učestvuju u invaziji enterocita, kao i formiranju i održavanju ćelije negovateljice. Na ćelijskoj kulturi mioblasta dokazano je da ESL1 produkti stimulišu proliferaciju i sprečavaju njihovu dalju diferencijaciju (Bai i sar., 2016). Genskom analizom inficiranog mišićnog tkiva otkrivena je visoka ekspresija miogenih regulatornih faktora i miogenina, transkripcionog faktora neophodnog za miogenezu i oporavak mišića (Wu i sar., 2001). Stalna stimulacija imunskog sistema ESL1 produktima koji se otpuštaju u cirkulaciju tokom hronične, mišićne faze infekcije, dovodi do aktivacije regulatornih mehanizama imunskog sistema domaćina, a koji doprinose održavanju homeostaze organizma (Sofronić-Milosavljević i sar., 2015).

Glikoproteini mase 45 kDa, 49 kDa i 53 kDa, koji se nalaze u sastavu ESL1 učestvuju u pokretanju antiinflamatornog imunskog odgovora putem aktivacije tolerogenih DC (Cvetković i sar., 2020). Ustanovljeno je i da su značajni za transformaciju mišićne ćelije u ćeliju negovateljicu, formiranje kapsule oko parazita i parazitizam. Glikoprotein mase 53 kDa olakšava parazitu opstanak u organizmu domaćina tako što moduliše imunski odgovor. Protein mase 49 kDa učestvuje u formiranju ćelije negovateljice, a protein mase 45 kDa inhibira funkciju neutrofila, hemotaksu i oksidativni metabolizam (Bruschi i sar., 2000). Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larve *Trichinella spiralis* sadrže proteine slične galektinu-1, koji mogu da povećaju kapacitet DC da indukuju sintezu Treg (Ilić i sar., 2022). Novija istraživanja pokazuju da ESL1 sadrže i ekstracelularne vezikule, koje poseduju imunomodulatorni kapacitet i indukuju diferencijaciju tolerogenih DC i posledičnu polarizaciju Treg (Kosanović i sar., 2019; Glamočlija i sar., 2025).

2.4. Imunomodulacija autoimunosti pod uticajem nematode *Trichinella spiralis*

Najviše proučavana autoimunska oboljenja na životinjskim modelima su dijabetes melitus tipa 1, multipla skleroza i inflamatorna bolest creva. Autoimunske bolesti nastaju kao posledica prekomerne aktivacije Th1 i Th17 tipa imunskog odgovora usmerenog prema sopstvenim antigenima. S druge strane, infekcija izazvana vrstom *T. spiralis* ili ESL1 produkti ovog parazita pokreću Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora koji mogu da suprimiraju prekomerni Th1/Th17 odgovor i doprinesu rezoluciji bolesti (Motomura i sar., 2009; Sofronić-Milosavljević i sar., 2015).

Istraživanja koja su sproveli Khan i sar. (2002) pokazala su da prethodna infekcija vrstom *T. spiralis* može da ublaži tok ulceroznog kolitisa (manifestacija inflamatorne bolesti creva) kod miševa i dovede do smanjenja mortaliteta. Zhao i sar. (2013) su takođe na primeru ulceroznog kolitisa pokazali da na nivou ćelija izolovanih iz lamine proprije creva životinja inficiranih ovim parazitom, dolazi do promene imunskog odgovora od Th1 ka Th2, dok se na histološkim prepartima moglo uočiti manje oštećenje sluznice, tanji zid kolona kao i smanjen broj inflamatornih ćelija u crevnoj mukozi. Infekcija vrstom *T. spiralis* kod ulceroznog kolitisa dovodi do značajnog povećanja IL-4 i IL-10 na nivou kolona i ćelija slezine.

Ispitujući imunoregulatorne sposobnosti ekstracelularnih vezikula *T. spiralis*, Yang i sar. (2020) su otkrili da primena ovih vezikula može da ublaži indukovani ulcerozni kolitis kod miševa. Ekstracelularne vezikule *T. spiralis* sprečile su infiltraciju crevnog epitela neutrofilima, stvaranje proinflammatoryh citokina i dalja oštećenja sluznice creva. Broj Th1 i Th17 ćelija u mezenterijalnim limfnim čvorovima kao i njihovi citokini bili su znatno niži, dok je broj Th2 i Treg ćelija bio značajno povišen.

Infekcija NOD miševa helmintima *T. spiralis* i *Heligmosomoides polygyrus* sprečava destrukciju beta ćelija pankreasa, a samim tim i razvoj autoimunski poređovanog dijabetesa. Smatra se da bi pokretanje Th2 odgovora tokom infekcije helmintima moglo biti odgovorno za supresiju patogenog Th1 odgovora kod NOD miševa (Saunders i sar., 2007). Pored uticaja na balans Th1/Th2, hronična infekcija gastrointestinalnim helmintima *T. spiralis* i *H. polygyrus* dovodi do značajne aktivacije regulatornih mehanizama koji kontrolišu i ograničavaju imunski odgovor, pa tako i imunski odgovor prema sopstvenim antigenima.

Gruden-Movsesijan i sar. (2008) su dokazali da infekcija ovim parazitom značajno ublažava simptome oboljenja, tj. da su parametri koji ukazuju na težinu kliničke slike značajno blaži u odnosu na DA pacove kod kojih je indukovano EAE, a koji nisu bili inficirani. Demijelinizacija aksona i oštećenja koja se javljaju na nivou CNS-a nastaju usled inflamacije uzrokovane aktivnošću infiltriranih mononuklearnih ćelija, većinom autoreaktivnih CD4⁺ T limfocita koji proizvode inflamatorne citokine IL-17 i IFN- γ (Slika 1). Infekcija nematomom *T. spiralis* dovodi do značajnog smanjenja broja i veličine infiltrata. Mehanizmi koji leže u osnovi modulacije EAE obuhvataju povećanu produkciju Th2, antiinflammatoryh i regulatornih citokina IL-4, IL-10 i TGF- β , kao i smanjenu produkciju IL-17 i IFN- γ , ključnih citokina u indukciji i progresiji EAE. Infekcija vrstom *T. spiralis* takođe indukuje produkciju Treg koji imaju značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (Gruden-Movsesijan i sar., 2011).

Istraživanja koja su sprovedi Sofronić-Milosavljević i sar. (2013), pokazala su da aplikovanje DC koje su stimulisane ESL1 produktima dovodi do modulacije EAE na sličan način kao što to radi infekcija vrstom *T. spiralis*. Naime, DC stimulisane ESL1 produktima povećale su populaciju CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatornih T ćelija, kao i proizvodnju IL-4, IL-10 i TGF- β , dok su smanjile nivoe IFN- γ i IL-17. Do modulacije EAE može doći i primenom izolovanih ESL1 produkata (Radović i sar., 2015). U oba slučaja, tretmani su aplikovani intraperitonealno. Da bi se tretman ESL1 produktima razmatrao u kontekstu primene na ljudima, mora se ustanoviti novi način aplikacije, etički prihvatljiv za primenu u humanoj medicini.

2.5. Nanomaterijal na bazi poli(mlečno-ko-glikolne) kiseline – PLGA

Nanomedicina je polje koje se kontinuirano razvija, a fokus istraživanja je upotreba nanomaterijala u raznim oblastima medicine. Značajan napredak na ovom polju omogućio je mnoga rešenja kako u terapiji malignih, kardiovaskularnih tako i neurodegenerativnih oboljenja. Značajan broj nanoterapeutika već je prošao testiranja i dobio odobrenje za kliničku upotrebu u terapiji malignih neoplastičnih oboljenja, autoimunskih oboljenja, gljivičnih infekcija, hepatitisa i drugih stanja. Nanomaterijali se takođe koriste u proizvodnji vakcina, kao kontrastna sredstva za magnetnu rezonanciju, u dijagnostici za detekciju patogena, tkivnom inženjeringu kao i mnogim drugim poljima medicine (Ventola, 2012).

Velika pažnja u istraživanjima koja se bave primenom terapeutika u tretmanu bolesti usmerena je na adekvatno aplikovanje leka, na nalaženje načina kojim se postiže terapijski efekat. Proizvodi nanotehnologije – nanočestice i nanovlakna obezbeđuju ciljanu isporuku i aktivnost terapeutika u određenim delovima tela ili produženo oslobađanje na kontrolisan način (Lü i sar., 2009). Do sada je ispitan veliki broj prirodnih i sintetičkih polimera u cilju pronalaženja materijala koji bi zadovoljili kriterijume za biomedicinsku primenu. Pre svega je neophodno da materijal bude biokompatibilan, biorazgradiv, imunološki inertan i da ne reaguje sa terapijskom supstancom koju

treba da transportuje. Takođe se uzimaju u obzir mehaničke karakteristike materijala (jačina, tvrdoća, elastičnost, plastičnost itd.) (Panyam i Labhassetwar, 2003).

Jedan od najčešće korišćenih sintetskih polimera u izradi nanočestica i nanovlakana je poli(mlečna-ko-glikolna) kiselina (PLGA), kopolimer izgrađen od poli-glikolne kiseline (PGA) i poli-mlečne kiseline (PLA). Poli(mlečna-ko-glikolna) kiselina je odobrena od strane Agencije za hranu i lekove (*Food and Drugs Administration – FDA*) za terapijsku primenu zbog svojih svojstava koja ispunjavaju kriterijume za primenu u medicini. Poli(mlečna-ko-glikolna) kiselina pruža fleksibilnost da se oblikuje u raznovrsne oblike i veličine, olakšavajući inkapsulaciju molekula skoro svake dimenzije. Poli(mlečna-ko-glikolna) kiselina se hidrolitički razgrađuje do monomernih komponenti, glikolne i mlečne kiseline, koje se metabolišu u organizmu putem Krebsovog ciklusa, tako da je sistemski toksični uticaj raspadnih produkata minimalan. Takođe, nema potrebe za ekstrakcijom nanomaterijala iz organizma (Gentile i sar., 2014). Brzina razgradnje PLGA zavisi od molekulске mase i od odnosa PGA i PLA polimera od kojih je izgrađen. Što je veći sadržaj PGA to se materijal brže razgrađuje, a izuzetak je samo odnos 50:50 koji se najbrže razgrađuje. To znači da se brzina otpuštanja inkapsuliranih molekula može kontrolisati, naročito kada je reč o nanovlaknima, što ovaj nanomaterijal čini veoma pogodnom platformom za kontinuiranu i kontrolisanu dostavu terapijskih supstanci. Ukoliko se koristi kao nosač za dostavu lekova, PLGA mora da omogući da se terapijsko sredstvo dostavi u određenom vremenskom periodu, na određeno mesto i u određenoj koncentraciji kako bi ostvarilo svoj efekat (Makadia i Siegel, 2011; Milošević i sar., 2018).

Nanočestice PLGA imaju široku primenu u distribuciji različitih (hidrofobnih i hidrofilnih) lekova, vakcina, bioloških makromolekula (Makadia i Siegel, 2011; Danhier i sar., 2012). Inkapsulacija unutar čestica omogućava zaštitu sadržaja od raspadanja i interakcije sa spoljašnjom sredinom. Čestice takođe omogućavaju i ciljanu dostavu u tkiva i ćelije. Loša karakteristika PLGA nanomaterijala je to što je izuzetno hidrofoban, tako da je potrebno modifikovati njegovu strukturu (npr. korišćenjem biomolekula kao što su kolagen, fibronektin, faktori rasta i peptidi) kako bi se sprečilo prepoznavanje PLGA nanočestica od strane makrofaga i njegova eliminacija i omogućila specifična dostava terapeutika (Hara i sar., 2012; Zhao i sar., 2016). Nedostaci PLGA nanočestica kao nosača i dostavljača lekova je mali kapacitet punjenja, tj. mala nosivost, nemogućnost kontrole otpuštanja leka usled naglog, brzog otpuštanja (engl. *burst release*), tako da lek ne može da stigne do ciljnog tkiva, što samim tim smanjuje njegovu efikasnost (Sadat i sar., 2016; Cappellano i sar., 2019). Da bi sistem za dostavu lekova bio odobren za upotrebu kod ljudi potrebno je ispitati interakciju nosača sa biološkim sistemima, kako bi se u potpunosti pokazala njihova biokompatibilnost. Pored *in vitro* analize uticaja, neophodno je testirati nanonosače *in vivo*. Iako je njihova upotreba kao dostavljača terapeutika obećavajuća, PLGA nanočestice nose sa sobom i određeni rizik u kontekstu terapije autoimunskih oboljenja. Različite studije su pokazale da PLGA nanočestice mogu imati adjuvantna svojstva, što potencijalno može dovesti do aktivacije inflamatornog odgovora (Yoshida i Babensee, 2004; Ding i sar., 2007; Sharp i sar., 2009; Saito i sar., 2019; Ma i sar., 2021). Takođe, potencijalno toksičan efekat PLGA nanočestica opisan je u epitelnim ćelijama, gde su ove čestice pokazale izraženu sposobnost da indukuju apoptozu, autofagiju, stres endoplazmatskog retikuluma, oštećenje DNK, kao i sintezu proinflamatornih citokina (Wagner i sar., 2017).

Za razliku od nanočestica, struktura PLGA nanovlakana, njihova poroznost, prečnik vlakana, odnos leka i polimera se lako mogu prilagoditi specifičnoj nameni. Nanovlakna se dobijaju metodom elektrospininga. Dobra mehanička svojstva, visoka poroznost i veliki kapacitet za inkapsulaciju terapeutika su prednosti PLGA nanovlakana kao sistema dostave lekova. Visok odnos površine i zapremine omogućava sporo i kontrolisano otpuštanje terapeutika (Milošević i sar., 2018).

Prethodna istraživanja ukazuju na to da PLGA nanovlakna poseduju visok potencijal u podsticanju ćelijskog rasta i procesu zarastanja rana, zahvaljujući svojim izraženim biomimetičkim osobinama koje oponašaju strukturu i funkciju ekstracelularnog matriksa (Liu i sar., 2010; Milošević i sar., 2020). Imunomodulatorni efekti PLGA nanovlakna u velikoj meri zavise od specifičnih biomolekula koje su u njih inkorporirane. Na primer, nanovlakna obogaćena asiaticozidom pokazala su sposobnost smanjenja inflamatornog odgovora domaćina, istovremeno podstičući polarizaciju makrofaga ka M2 fenotipu (Huang i sar., 2020). Slično tome, PLGA nanovlakna sa ciklosporinom A

dovela su do smanjena produkcije proinflammatoryh citokina IL-2, IFN- γ i IL-17, dok su PLGA nanovlakna sa dodatkom vanilina ispoljila antioksidativna i antiinflammatoryna svojstva u *in vivo* uslovima (Holan i sar., 2011; Lee i sar., 2012). Za razliku od PLGA nanočestica, imunogenost PLGA nanovlakana je znatno manje istražena.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

- ispitivanje efikasnosti primene novog sistema za otpuštanje ESL1 produkata larvi *T. spiralis* uz pomoć Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) nanovlakana, aplikovanih potkožno kod *Dark agouti* pacova, radi ublažavanja kliničke slike relapsno-remitentnog oblika eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) *in vivo*, kao i imunski mehanizmi koji leže u osnovi proizvedenog efekta;
- praćenje distribucija ESL1 produkata u *in vivo* uslovima radi procene efikasnosti i kapaciteta otpuštanja produkata putem PLGA nanovlakana;
- analiza uticaja samih PLGA nanovlakana na imunski sistem zdravih pacova u *in vitro* i *in vivo* uslovima, radi procene bezbednosti primene PLGA nanovlakana u ove svrhe.

Na osnovu postavljenog cilja, definisani su sledeći zadaci:

1. Izolovanje ESL1 produkata gajenjem mišićnih larvi *T. spiralis* u *Dulbecco's Modified Eagle's* medijumu i njihova karakterizacija (određivanje njihove imunogenosti uz pomoć *in house* Western blot i ELISA testova), kao i konjugovanje sa PLGA nanovlaknima (ESL1/PLGA).
2. Ispitivanje distribucije ESL1 produkata koji se oslobađaju iz PLGA implantata obeležavanjem ESL1 produkata fluorescein izotiocijanatom (ESL1-FITC), kao i praćenje distribucije ESL1-FITC u drenirajućim limfnim čvorovima metodom protočne citometrije.
3. Ispitivanje delovanja ESL1 produkata otpuštenih putem PLGA implantata na razvoj i progresiju relapsno-remitentnog oblika EAE, praćenjem pojave i intenziteta kliničkih simptoma bolesti tokom faza relapsa i remisije.
4. Ispitivanje mehanizama koji leže u osnovi efekata ESL1 produkta na EAE, praćenjem imunskog odgovora na sistemskom nivou (ćelije slezine), kao i na nivou ciljnog organa – kičmene moždine, histohemijskim metodama i protočnom citometrijom, korišćenjem specifičnih antitela.
5. Ispitivanje efekta PLGA nanovlakana na imunski sistem DA pacova u *in vivo* uslovima, histohemijskom analizom tkiva u okolini implantata i analizom imunskog odgovora na nivou drenirajućih limfnih čvorova i slezine metodom protočne citometrije. Praćenje delovanja raspadnih produkata PLGA nanovlakana na imunske ćelije u *in vitro* uslovima u kulturi imunskih ćelija izolovanih iz slezine zdravih DA pacova.
6. Statistička obrada dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Izolovanje i priprema ESL1 produkta *Trichinella spiralis*

Za izolaciju ESL1 produkata *T. spiralis* korišćen je soj ISS 161 *T. spiralis*, koji se održava u Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu za eksperimentalne svrhe, a okarakterisan je i potvrđen izoenzimskim analizama od strane Međunarodnog referentnog centra za trihinelozu u Rimu (Dr *Edoardo Pozio*). Za održavanje soja ISS 161 *T. spiralis* u laboratoriji Instituta koriste se ženke pacova soja *Wistar* starosti 10–12 nedelja (životinje su odgajane u Centru veterinarske službe u okviru Vojnomedicinske Akademije u Beogradu) koje se veštački inficiraju sa 8500 infektivnih mišićnih larvi L1 *T. spiralis* uz pomoć gastrične sonde.

Za potrebe našeg istraživanja ESL1 produkti *T. spiralis* izolovani su kultivacijom mišićnih larvi dobijenih digestijom mišića veštački inficiranih pacova soja *Wistar* u DMEM medijumu (*Dulbecco's modified eagle's medium*), prečišćeni dijalizom i koncentrovani. Infektivne larve *T. spiralis* dobijene su digestijom skeletnih mišića veštački inficiranih pacova soja *Wistar*. Kako bi se larve oslobodile iz mišića, tkivo je podvrgnuto enzimskoj digestiji (na temperaturi vode 46–48 °C, sa dodatkom 32 ml 26% HCl i 20 g pepsina (1:10000)). Nakon digestije larve su tri puta isprane u DMEM i kultivisane u T-175 flaskovima (1ml medijuma/5000 larvi) u obogaćenom DMEM medijumu (sadržaj glukoze 4,5 g/l). Larve su inkubirane preko noći (16–18 h) na 37 °C i u atmosferi sa dodatkom 10% CO₂.

Posle perioda kultivacije, medijum sa larvama prebačen je u konusne epruvete zapremine 50 ml, pri čemu dolazi do sedimentacije larvi na dnu epruvete. Nakon sedimentacije odliven je supernatant (medijum). Sakupljeni medijum filtriran je kroz filter promera 0,22 µm (*Millipore*, SAD), a zatim dijalizovan (ispran) fosfatnim puferom (PBS, pH 7,4) zapreminom koja je tri puta veća od zapremine početnog medijuma i koncentrovan pomoću *Amicon* sistema za ultrafiltraciju (*Stirred cells 8400, 8010, Amicon Corp*, SAD) uz korišćenje membrane promera pora 10.000 NMWL (*Nominal molecular weight limit*) (*Amicon PM 10 Ultrafiltration Discs, polyethersulfone*). Koncentracija izolovanih ESL1 produkata proverena je uz pomoć spektrofotometrijske analize i BCA testa (*Bicinchoninic Acid Assay*), dok je njihova imunogenost potvrđena korišćenjem *in house* Western blot i ELISA testa koji se rutinski koriste za kontrolu kvaliteta ESL1 produkata u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za trihinelozu (NRLT-INEP). Produkti ESL1, dobijeni na ovaj način, filtrirani su kroz filter promera 0,22 µm i čuvani na temperaturi –20 °C. Produkti ESL1 su upotrebljeni za konjugovanje sa PLGA nanovlaknima (PLGA/ESL1), kao i za obeležavanje fluorescein izotiocijanatom (ESL1-FITC). Takođe, ESL1-FITC je bio konjugovan sa PLGA (PLGA/ESL1-FITC), za potrebe istraživanja oslobađanja ESL1 iz PLGA nanovlakana u *in vitro* i distribucije ESL1 u *in vivo* analizama. Implantat od PLGA nanovlakana napunjenih ESL1 produktima napravljen je isecanjem kvadrata dimenzija 1×1 cm.

4.2. Odabir eksperimentalnih životinja

U eksperimentima je korišćeno 140 jedinki pacova ženskog pola, genetski visokosrodnog soja *Dark Agouti* (DA), starosti 12–14 nedelja, telesne mase 130–160 g, koji su uzgajani u standardnim uslovima u vivarijumu Centra veterinarske službe Beograd u okviru Vojnomedicinske Akademije, Beograd (VMA). Životinje su tokom eksperimenata bile smeštene u vivarijumu Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu.

U okviru **prvog cilja** za potrebe ispitivanja efikasnosti PLGA nanovlakana kao sistema za isporuku biomolekula, korišćeno je **30 životinja**, podeljenih u dve grupe od po 14 životinja (PLGA/ESL1-FITC i PLGA/ESL1), a 2 životinje su korišćene kao *sham* kontrole (žrtvovana po jedna za termin 7. i 14. dana i korišćene su isključivo kao interna kontrola za protočnu citometriju).

U okviru **drugog cilja**, u **prvoj fazi *in vivo* ispitivanja**, u kojoj je praćen uticaj ESL1 na tok i težinu EAE, korišćeno je **20 životinja** podeljenih u četiri grupe od po 5 životinja – jedna eksperimentalna (EAE-PLGA/ESL1) i tri kontrolne grupe (EAE-PLGA, EAE-ESL1, EAE).

U **drugoj fazi *in vivo* ispitivanja** mehanizama koji se nalaze u osnovi modulacije toka EAE, korišćeno je ukupno **66 životinja**. Korišćene su dve grupe od po 15 životinja – eksperimentalna (EAE-ESL1/PLGA) i kontrolna (EAE) grupu, a tri životinje su korišćene kao *sham* kontrole za sva tri termina žrtvovanja. Po pet životinja u okviru svake eksperimentalne grupe je žrtvovano u tri termina, Ovaj eksperiment je rađen dva puta.

U okviru trećeg cilja, za potrebe ispitivanje uticaja PLGA implantata na imunske ćelije zdravih DA pacova *in vitro*, korišćena je ukupno **21 životinja**. Životinje su podeljene u 2 grupe – sa potkožnim PLGA implantom i *sham* kontrole, kojima je samo hirurški zesečena koža. Za grupu kojoj je implantiran PLGA iskorišćeno je **18 životinja**, dok su kao *sham* kontrole korišćene **3 životinje**. Po 6 životinja iz PLGA grupe i 1 životinja iz kontrolne grupe žrtvovane su u tri termina.

Dva DA pacova su korišćena za pravljenje sterilnog eksudata, a **jedan** za izolovanje koštane srži i gajenje dendritskih ćelija.

Sve životinje su bile anestezirane intramuskularnom primenom kombinacije tiletamina i zolazepam (Zoletil, Virbac S.A., Francuska) u dozi 20 mg/kg. Za eksperimentalni rad korišćeni su klasični hirurški instrumenti i aparati namenjeni hirurškim procedurama uz strogo poštovanje principa asepse i antiseptice. Žrtvovanje životinja je obavljeno primenom prekomerne količine opšteg anestetika. Sve procedure u radu sa životinjama u skladu su sa pravilnikom i odobrenjima Etičkog komiteta Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu, Srbija (rešenje br. 119-01-5/14/2017-09 izdato od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Republike Srbije).

4.3. Priprema i karakterizacija PLGA i PLGA/ESL1 implantata

Za potrebe izrade PLGA nanovlakana korišćene su komercijalne hemikalije: poli(mlečno-koglikolna) kiselina (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid* – PLGA) (prosečne molekulske mase 30.000–60.000 g/mol, u kojoj je odnos mlečne i glikolne kiseline 50 : 50), span 80, N-N dimetilformamid (DMF) i hloroform (CHCl₃) (*Sigma-Aldrich Co.*, SAD). Odnos kiselina 50 : 50 u PLGA izabran je zbog predvidljivosti brzine raspadanja koja je određena količinom glikolne kiseline (*Makadia i Siegel*, 2011). Polimerna smeša (PLGA 2g) je prvo rastvorena u smeši organskih rastvarača hloroform/DMF (8.25/2.75g). Proces rastvaranja obavljen je na magnetnoj mešalici, pri brzini od 200 rpm na sobnoj temperaturi (18–20 °C), tokom 24 sata. Zatim je u polimernu smešu dodat span-80 (50 mg) i ESL1 ili FITC-om obeležen ESL1 (ESL1-FITC), koji se nalazi u 2ml PBS (2,5 mg/ml), uz nastavak mešanja tokom naredna 2 sata. Pripremljena na ovaj način, emulzija sadrži 20% PLGA i 0,25% ESL1. Kontrolna PLGA nanovlakna pripremljena su na isti način samo bez dodavanja ESL1 u rastvoreni polimer.

Kao metoda za dobijanje nanovlakana korišćena je tehnika vertikalnog elektrospininga (*CH-01, Linari Engineering*, Piza, Italija). Da bi se dobila što finija vlakna, polimerna smeša je raspršivana na aluminijumsku foliju sa razdaljine od 10 cm, brzinom od 3 ml/sat primenom napona 20 kV uz pomoć šprica od 20 ml i metalne igle (promera 1 mm) (*Milošević i sar.*, 2018). Ovako dobijena vlakna formirala su tanak sloj (ploču) površine ~100 cm² koja je sadržala 5 mg ESL1 (50 µg/cm²).

Morfologija nanovlakana ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (engl. *Field emission scanning electron microscopy*, FE-SEM) na 20 kV, uz pomoć *Tescan Mira3 XMU* uređaja (*Tescan Orsay Holding AS*, Brno, Češka). U svakom sistemu, izabrano je 50 nanovlakana sa pet FE-SEM slika, a mikrofotografije su analizirane korišćenjem softvera *Image-Pro Plus 6.0* (*Media Cybernetics*, Rockville, MD, SAD) kako bi se dobila distribucija njihovih prečnika. Površinska hemijska struktura pripremljenog nanovlakana i ESL1 analizirana je primenom infracrvene spektrometrije sa prigušenom refleksijom (engl. *Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared* – ATR-FTIR) (*Nicolet iS10, Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, SAD). Dobijeni

rezultati analizirani su uz pomoć spektralnog softvera *OMNICTM* u opsegu 1800–1400 cm⁻¹ (*Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD*). Nanovlakna obeležena ESL1-FITC-om analizirana su uz pomoć fluorescentnog mikroskopa (*CarlZeiss Axiolmager A1, Jena, Nemačka*).

4.3.1. Izolacija eksudata iz sterilne rane

Polivinilni sunderi implantirani su dorzalno, potkožno u skapularnoj regiji **dva DA** pacova. Pre aplikacije životinje su kompletno anestetizirane kombinacijom zolazepama i tiletamina. Mesto aplikacije je obrijano i dezinfikovano 70% alkoholom. Implantirana su četiri sundera, veličine 5×5 mm. Sunderi su sterilisani autoklaviranjem, a potom su pre aplikovanja stajali 24 sata pod UV svetlom. Pre implantacije potopljeni su u sterilan rastvor fosfatnog pufera (PBS). Mesto na kom je napravljen rez ušiveno je neresorptivnim 3/0 polifilamentnim koncem (*SMI, Belgija*). Nakon 72 sata od aplikacije, tečnost koja se nakupila u okolini sundera sakupljena je u sterilne epruvete. Kako bi se ekstrahovao eksudat iz rane koji je sunder prikupljao tokom proces implantacije, sunder je pažljivo postavljen unutar šprica i pritiskom klipa sakupljena je tečnost koja predstavlja eksudat nastao kao posledica reakcije okolnog tkiva na implantaciju stranog materijala pod kožu. Dobijeni sadržaj centrifugiran je na 2000 rpm, tokom 10 minuta kako bi se oslobodili zaostalih ćelija. Eksudat iz sterilne rane (engl. *wound exudate – WE*) je korišćen za *in vitro* testiranje bioloških karakteristika materijala.

4.3.2. Ispitivanje otpuštanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana *in vitro*

Kako bi se pratilo oslobađanje ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana, listovi nanovlakana isečeni na kvadrate (1×1 cm) koji sadrže približno 50 µg ESL1-FITC su postavljeni u otvore ploče sa 24 mesta, koji su sadržali 1ml WE:PBS pH 7,4 u odnosu 1:1.

Tokom 42 dana PLGA/ESL1-FITC nanovlakna su inkubirana na 37 °C, a svaki treći dan uzorkovano je 0,5 ml supernatanta za analizu i ista količina svežeg WE:PBS je dodavana u otvore mikrotacionih ploča. Kao blanko kontrola korišćeni su supernatanti kontrolnih PBS/PLGA nanovlakana. Uzorci su analizirani uz pomoć spektrofлуорimetra (*Shimadzu, Japan*) na talasnoj dužini 519 nm (talasna dužina koja registruje FITC emisiju). Na osnovu sprovedenih merenja izračunat je procent kumulativnog otpuštanja u vremenu.

4.3.3. Ispitivanje preuzimanja ESL1-FITC *in vitro*

Ćelije slezine izolavane iz DA pacova (opisano u poglavlju 4.4.1.) nanosene su u otvore ploče sa 6 mesta (1×10⁷ po otvoru). Kao medijum je korišćen RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Media, Sigma-Aldrich, Nemačka*) sa 10% fetalnim goveđim serumom (FBS) (*Sigma-Aldrich, Nemačka*), L-glutamin, 2-merkaptometanol uz dodatak antibiotika (penicilin, streptomycin, *Pan Biotech*). Ćelije su inkubirane 3 sata na temperaturi 37 °C, u atmosferi sa 5% CO₂ nakon čega je dodat ESL1-FITC ili neobeleženi ESL1 u koncentraciji 50 µg/ml. Ćelije su sakupljane nakon 4 i 24 sata, ispirane u PBS/0,01% NaN₃, i potom obojene sa anti-CD11b (OX42) i sa anti-MHC klasa II-PE (OX6) (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*) pod uslovima koji su opisani u poglavlju 4.7. Analizom rezultata protočne citometrije određen je procenat ćelija koje su preuzele ESL1-FITC (ESL1-FITC pozitivne ćelije) i koje na svojoj površini ekspimiraju CD11b i MHCII, markere mijeloidnih antigen prezentujućih ćelija (APC).

4.3.4. Priprema i postavljanje PLGA implantata *in vivo*

Pre primene, PLGA nanovlakna – kontrolna (napunjena PBS-om; PLGA) ili napunjena sa ESL1 (PLGA/ESL1) ili ESL1-FITC (PLGA/ESL1-FITC), isečena su u kvadrate dimenzija 1×1 cm. Kvadrat površine 1 cm² napravljen od PLGA/ESL1 i PLGA/ESL1-FITC nanovlakana sadržao je

približno 50 µg ESL1, odnosno 50 µg ESL1-FITC. Pojedinačni kvadrati su zatim spojeni kako bi se napravili implantati, koji su pre aplikacije sterilisani izlaganjem UV svetlu u trajanju od 2 sata. Da bi se postigla koncentracija ESL1 produkta od 350 µg/implantatu (*Sabljić i sar., 2025*), kombinovano je sedam kvadarata. Pacovi DA su potpuno anestetizirani na već pomenut način (potpoglavlje 4.2), njihova leđa su obrijana i dezinfikovana 70% alkoholom, a implantati su postavljeni potkožno u skapularnoj regiji pod sterilnim uslovima. Ovo područje je izabrano kako bi se smanjila mogućnost povrede mesta implantacije.

4.4. Indukcija eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE)

Radi utvrđivanja potencijala ESL1 produkata, dostavljenih putem PLGA nanovlakana, da spreče pojavu ili ublaže tok relapsno-remitentnog EAE, ukupno **20 DA pacova** je podeljeno u četiri grupe od po 5 životinja – jedna eksperimentalna (EAE-PLGA/ESL1) i tri kontrolne grupe (EAE-PLGA, EAE-ESL1, EAE). Eksperimentalnoj grupi životinja (EAE-PLGA/ESL1) je postavljen PLGA/ESL1 implant koji je sadržao 350 µg ESL1. Kontrolne grupe uključivale su grupu kojoj je implantiran samo PLGA – EAE-PLGA; grupu kojoj je na istom mestu zasečena koža i potkožno aplikovan ESL1 – EAE-ESL1 (350 µg/životinji u 200 µl PBS); i grupu kojoj je samo zasečena koža – EAE grupa. Svim životinjama je 7 dana nakon implantacije indukovano EAE parenteralnom injekcionom aplikacijom 0,1 ml emulzije homogenata kičmenih moždina u kompletnom Frojndovom adjuvansu (*Sigma*, Nemačka) u odnosu 1:1, uz dodatak 5 mg/ml inaktivisane bakterije *Mycobacterium tuberculosis* (*Difco, Fischer Scientific*, UK), intradermalno u zadnji desni taban. Životinje u eksperimentalnoj i sve tri kontrolne grupe (5 životinja po grupi) su praćene tokom 38 dana radi merenja telesne mase i praćena pojave kliničkih simptoma. Pojava prvog simptoma – atonije repa označavala je početak bolesti. Neurološki simptomi su vrednovani prema skali stepena težine od 0–4, na sledeći način:

- 0 – odsustvo kliničkih manifestacija bolesti;
- 1 – parcijalna ili kompletna atonija repa (gubitak tonusa repa);
- 2 – pareza zadnjih ekstremiteta;
- 3 – kompletna bilateralna paraliza zadnjih ekstremiteta obično praćena inkontinencijom;
- 4 – moribundno stanje ili smrt životinje. Ukoliko su simptomi bolesti bili blaži od datih vrednosti, bodovali su se intermedijarnom vrednosti.

Da bi se procenila težina EAE određivano je nekoliko parametara:

- incidencija bolesti (broj pacova u jednoj grupi koji su razvili bolest čiji je stepen težine 1 ili više, u odnosu na ukupan broj životinja u grupi);
- dan pojave bolesti (srednja vrednost);
- srednja maksimalna vrednost težine bolesti (srednja vrednost maksimalnih vrednosti indeksa bolesti za svaku životinju u grupi u toku eksperimenta);
- kumulativni stepen težine bolesti – kumulativni indeks (zbir svih srednjih dnevnih stepena težine bolesti tj. indeksa bolesti po broju dana trajanja eksperimenta);
- dužina trajanja bolesti (ukupan broj dana tokom kojih su ispoljeni simptomi EAE);

Životinje su nakon 40 dana bile žrtvovane prekomernom upotrebom anestetika.

Za ispitivanje mehanizama, DA pacovi su podeljeni u dve grupe od po 15 životinja, jedna eksperimentalna grupa životinja kojoj je postavljen PLGA/ESL1 implant – EAE-PLGA/ESL1, koji je sadržao 350 µg ESL1; i jedna kontrolna grupa kojoj je samo zasečena koža – EAE. Svaka grupa imala je po jednu *sham* kontrolu za sva tri termina žrtvovanja. Životinjama iz obe grupe je 7 dana nakon implantacije indukovano EAE na gore opisan način. Po 5 životinja iz svake grupe je žrtvovano na vrhuncu bolesti (14. dana) i tokom faze remisije (21. dana), kako bi se analizirale ćelije izolovane iz slezine i CNS-a. Kod po 5 životinja iz obe grupe praćeni su klinički simptomi do kraja oglada.

4.4.1. Izolovanje i kultivacija ćelija slezine, limfnih čvorova i infiltrata kičmene moždine

Slezina je uzorkovana pod aseptičnim uslovima. Sadržaj slezine je istisnut iz kapsule i resuspendovan u RPMI 1640 (*PAA Laboratories*, Austrija) koji je obogaćen sa 5% fetalnog goveđeg seruma (FBS) (*PAA Laboratories*, Austrija) i antibiotikom/antimikotikom (*Biowest*, *Nualle*, Francuska). Ćelije slezine su potom stavljene na gradijent gustine *Percoll* (*Merck*, SAD) i centrifugirane 15 min na 4000 rpm. Nakon centrifugiranja izdvoji se prsten bogat mononuklearnim ćelijama, koji je pokupljen i ispran dva puta u medijumu na 1200 rpm, tokom 10 min. Kako bi se oslobodili eritrocita, ćelijski talog je tretiran hemolizinom (NH_4Cl , pH 7,3). Ćelije su potom ispirane u medijumu, a zatim je deo ćelija resuspendovan u RPMI medijumu sa 10% FBS i dodatim antibiotikom/antimikotikom (*Biowest*, *Nualle*, Francuska). Za potrebe analize produkcije citokina, ćelije su gajene u pločama za ćelijsku kulturu sa 24 otvora i ravnim dnom (2×10^6 ćelija po otvoru) 48h, na 37 °C, sa 5% CO_2 . Ostatak ćelija je korišćen za ispitivanje preuzimanja ESL1-FITC, kao i za fenotipsku karakterizaciju protočnom citometrijom.

Suspenzija ćelija iz limfnih čvorova dobijena je protiskivanjem kroz metalnu mrežicu. Dobijene ćelije su resuspendovane u 5% FBS/RPMI, i centrifugirane na 1800 rpm, 10 min. Fenotipske i funkcionalne karakteristike ćelija ispitane su metodom protočne citometrije. Za tu analizu izdvojeno je 2×10^6 ćelija/životinji.

Pre ekstrakcije kičmene moždine, neophodno je uraditi perfuziju velikog krvotoka uz pomoć fiziološkog rastvora kako bi se što je više moguće oslobodili ćelija poreklom iz krvi. Tkivo kičmene moždine je postavljeno u Petri šolju na čeličnu mrežicu i homogenizovano pomoću klipa šprica dok se nije dobila homogena masa. Suspenzija je prebačena u epruvetu i centrifugirana na 1700 rpm, 2 minuta. Nakon centrifugiranja talog je resuspendovan u 4 ml 40% *Percoll* reagensa (*Merck*, SAD), a zatim je pažljivo i polako naslojavan na 2,5 ml prethodno nalivenog 70% *Percoll* reagensa (*Merck*, SAD). Ovi koraci se rade kako bi se ćelije razdvojile po gustini gradijenta i izdvojile željene populacije. Sledeći korak je centrifugiranje na 2250 rpm u trajanju 50 minuta. Između *Percoll* reagensa dve različite gustine formira se prsten od ćelija koji se pažljivo pokupi pipetom i prebacuje u novu epruvetu. Ćelije su ispirane medijumom, centrifugirane na 2200 rpm, 10 minuta, a zatim je dobijeni talog resuspendovan u 1 ml RPMI 1640 sa 2% FBS uz dodatak antibiotika. Nakon brojanja, ćelije su pripremljene za fenotipsku i funkcionalnu karakterizaciju protočnom citometrijom.

4.4.2. Praćenje oslobađanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana *in vivo*

Kako bi se ispitalo otpuštanje ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana i distribucija *in vivo*, DA pacovi su podeljeni u dve grupe od po 14 životinja, a 2 životinje su korišćene kao *sham* kontrole (žrtvovane po jedna za termin 7. i 14. dana, a korišćene su isključivo kao interna kontrola za protočnu citometriju). **Ukupan broj životinja iskorišćenih u ovom delu eksperimenata je 30.** Jednoj grupi DA pacova je subkutano implantiran PLGA/ESL1-FITC, dok je drugoj, kontrolnoj, implantiran PLGA/ESL1. Dodatno, 7 dana nakon implantacije, po 4 životinje iz svake grupe podvrgnute su indukciji EAE na način opisan u odeljku 4.4. Nakon 4, 7 i 14 dana od implantacije životinje su žrtvovane i uzorkovane su tkiva za analizu. Nakon 4 dana žrtvovane su po 2 zdrave životinje iz svake grupe i uzorkovano je tkivo iz implantacionog područja za histopatološke analize. U sledećim terminima (7. i 14. dana) žrtvovane su po 4 zdrave životinje iz svake grupe i uzorkovani su drenirajući (aksilarni, cervikalni i ingvinalni) limfni čvorovi, slezina, Pajerove ploče i kičmena moždina. Životinjama kojima je indukovana EAE (po 4 životinje iz svake grupe) navedeni organi su sakupljeni 7 dana od imunizacije, a 14 dana od implantacije. Ćelije su pripremljene na način koji je već opisan i obeležene sa anti-CD11b i anti-MHC klasa II (*Bio Rad*, *Hercules*, Kalifornija, SAD) kako bi se odredio broj pozitivnih mijeloidnih APC koje su preuzele ES L1-FITC.

4.4.3. Analiza produkcije citokina u ćelijama slezine *Dark Aguti* pacova

Supernatanti su uzorkovani 48 sati nakon kultivacije slezina životinja žrtvovanih u piku i fazi oporavka od bolesti. Za određivanje proizvodnje IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 citokina korišćeni su komercijalni ELISA kitovi (*R&D Systems*, SAD) prema uputstvu proizvođača.

4.5. Ispitivanje uticaja PLGA nanomaterijala na imunski sistem zdravih životinja

4.5.1. Mlečnokiselinski test

Sterilni eksudat, u odnosu 1:1 sa PBS-om, korišćen je kao medijum u kome su stajali isecci PLGA nanovlakana kvadratnog oblika, površine 1 cm², 7 dana na 37 °C. Sterilni eksudat (WE) je izabran zato što imitira mikrosredinu u kojoj se nalazi PLGA implantat i u kojoj se taj implantat razgrađuje kroz vreme. Krajnji produkt razgradnje PLGA materijala je mlečna kiselina (*Makadia i Siegel*, 2011). S obzirom na to da je u pitanju metabolički aktivna supstanca koja ima imunomodulatorni efekat, raspadnim produktima PLGA nanovlakana (PLGA kondicionirani eksudat – WE/PLGA) tretirane su ćelije slezine, kao i dendritske ćelije poreklom od koštane srži DA pacova. Koncentracija mlečne kiseline u sterilnom eksudatu (WE), kao i u kondicioniranom eksudatu u kojem su sedam dana stajala PLGA nanovlakna (WE/PLGA) određena je enzimskom metodom.

4.5.2. Test apoptoze ćelija slezine tretiranih raspadnim produktima PLGA tj. PLGA kondicioniranim sterilnim eksudatom

Za procenu vijabilnosti ćelija korišćen je komercijalni kit *Annexin V-FITC* (*Miltenyi Biotec*). *Annexin V-FITC* komplet sadrži reagensu za istovremenu fluorescentnu detekciju apoptotičnih i nekrotičnih ćelija. Ćelije slezine su izolovane iz zdravog DA pacova na način opisan u odeljku 4.4.1. Ćelije su gajene 24 sata u kulturi sa sledećim tretmanima: a) mlečna kiselina (LA, početna koncentracija 22 mg/dl) u razblaženju 1:4 i 1:100; b) PLGA kondicionirani eksudat (WE/PLGA) u razblaženju 1:4 i 1:100; c) sterilni eksudat (WE) u razblaženju 1:20 i 1:100; d) ćelije gajene samo u medijumu. Ćelije su inkubirane u ploče za ćelijsku kulturu sa 96 mesta, u koncentraciji 2×10^5 /200 μ L. Nakon kultivacije ćelije su sakupljene u epruvete, isprane u 500 μ l pufera za vezivanje (prema uputstvu proizvođača), centrifugirane na 1600 rpm 10 min. *Annexin V* obeležen FITC-om dodat je u razblaženju 1:40. Inkubacija je izvedena na sobnoj temperaturi u mraku tokom 15 minuta. Ćelije su potom isprane u odgovarajućem puferu, centrifugirane na 1600 obrtaja, 10 minuta, i pred samu analizu na protočnom citometru dodato im je 5 μ g/ml propidijum jodida (PI), koji boji isključivo mrtve (nekrotične) ćelije.

4.5.3. Dobijanje dendritskih ćelija iz ćelija koštane srži *Dark Agouti* pacova

Za izolaciju ćelija koštane srži korišćene su kosti zadnjih ekstremiteta, femur i tibija, DA pacova. Kroz medularni kanal izvršeno je ispiranje pod pritiskom šprica sterilnim PBS-om da bi se istisnula koštana srž. Ćelije koštane srži su isprane medijumom RPMI 1640 koji je sadržao 5% FBS i inkubirane u ploče sa 6 mesta u 10% FBS/RPMI, u koji je dodat antibiotik (penicilin-streptomycin, *Pan Biotech*) kao i faktori rasta: 20 ng/ml GM-CSF (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), 20 ng/ml IL-4 i 20 ng/ml Flt-3 (eng. *FMS-like tyrosine kinase 3*) ligand. Po otvoru je zasađeno 5×10^6 ćelija u 2 ml medijuma. Kultivacija je trajala 8 dana, a medijum je svakog trećeg dana osvežavan dodatkom faktora rasta. Osmog dana, kultura DC je tretirana sterilnim eksudatom (WE) i PLGA kondicioniranim eksudatom (WE/PLGA) u razblaženju 1:200. Nakon 24 sata DC kojima je dodavan tretman, kao i DC koje nisu primile tretman i koje su gajene samo u medijumu, su stimulirane lipopolisaharidom (LPS) u koncentraciji 200 ng/ml, stimulusom koji dovodi do potpune maturacije DC. Fenotipske karakteristike ćelije analizirane su uz pomoć protočne citometrije.

4.5.4. Kokultura dendritskih ćelija i alogernih T limfocita

Prečišćeni alogerni T limfociti, poreklom iz slezine zdravih *Albino Oxford* pacova, pripremljeni za potrebe ovog eksperimenta na Odeljenju imunologije Biološkog Instituta „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Ćelije resuspendovane u RPMI 1640 medijuma koji je sadržao 10% FBS su nanešene u otvore ploče sa 96 mesta, u koncentraciji 1×10^5 . Dendritske ćelije i T ćelije gajene su u kokulturi u odnosu 1:20 (za ispitivanje produkcije citokina), odnosno 1:50 (za ispitivanje regulatornog odgovora). Kokultivacija DC i T ćelija trajala je 5 dana. U kokulturu je 0. i 4. dana dodat RPMI 1640 sa 10% FBS obogaćen IL-2 (*Peprotech*, SAD) u sledećim koncentracijama: 2 ng/ml i 10 ng/ml. Fenotipske i funkcionalne karakteristike ćelija analizirane su metodom protočne citometrije (*BD LSR II*, *BD Biosciences*, SAD).

4.5.5. Test proliferacije

Alostimulatorna svojstva DC poreklom iz koštane srži DA pacova ispitana su u kokulturi sa ćelijama slezine koje su prethodno obeležene karboksifluorescein sukcinimidil estrom – CFSE (*TermoFisher Scientific*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Ćelije su gajene u pločama za ćelijsku kulturu sa 96 mesta, u odnosu DC i CFSE-obeležene ćelije: 1:5, 1:10 i 1:20. Ćelije su inkubirane 4 dana na temperaturi 37 °C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 90% vlažnosti. Kao kontrolne ćelije korišćene su CFSE obeležene ćelije slezine stimulisane sa konkanavalinom A (ConA, 1,5 µg/ml). Tehničke kontrole su bili neobeleženi stimulisani splenociti i CFSE obeleženi ali nestimulisani splenociti. Nakon kultivacije, ćelije su sakupljene i obeležene sa propidijum jodidom (PI) (5 µg/ml) i analizirane protočnom citometrijom (*BD LSR II*, *BD Biosciences*, SAD). Proliferacija ćelija procenjena je nakon isključivanja mrtvih ćelija (PI+ ćelije).

4.5.6. Ispitivanje uticaja PLGA implantata na imunske ćelije slezina i limfnih čvorova zdravih *Dark Agouti* pacova

Za potrebe ovog istraživanja zdravi DA pacovi su podeljeni u 2 grupe (PLGA i *sham* kontrola). Kontrolnoj grupi životinja (3 životinje) napravljen je horizontalan hirurški rez dužine 1 cm u skapularnoj regiji, bez postavljanja implantata (*sham* kontrola). Drugoj grupi DA pacova (18 životinja) implantati načinjeni od PLGA nanovlakana postavljeni su potkožno u skapularnoj regiji na način opisan u delu 4.3.4. Slezine i limfni čvorovi (cervikalni i aksilarni) izolovani su iz po 6 DA pacova 7., 14., i 21. dana od implantacije PLGA. U istim terminima su uzorkovani organi iz po 1 *sham* kontrole. Ćelije slezine i limfnih čvorova su analizirane protočnom citometrijom.

4.6. Protočna citometrija

Ćelije pripremljene za analizu površinskih i intracelularnih antigena protočnom citometrijom prvo su isprane u PBS rastvoru koji sadrži 0,01% natrijum azida (*Sigma-Aldrich*, SAD). Potom je Fc receptor blokiran ispiranjem ćelija u 2% normalnom pacovskom serumu (*eBioscience*, Frankfurt, Nemačka) u trajanju 15 minuta. Površinsko bojenje odgovarajućim monoklonskim antitelima po preporuci proizvođača trajalo je 30 min na +4 °C. Za potrebe intracelularnog bojenja ćelije su prvo aktivirane phorbol-12-myristate-13-acetatom (PMA, 20 ng/ml) i jonomicinom (500 ng/ml) u prisustvu monensina (2 µM) (*Sigma-Aldrich*) u trajanju od 6 sati, a potom fiksirane i permeabilizovane uz pomoć kita za fiksaciju/permeabilizaciju (*RiD Systems*, SAD) prema uputstvu proizvođača.

Tabelarni prikaz korišćenih antitela i njihovih proizvođača dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz antitela korišćenih u eksperimentima sa nazivima proizvođača

Antitelo	Proizvođač
mišja IgG1 negativna kontrola-Alexa Fluor 488 (F8-11-13),	<i>Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD</i>
mišja IgG1 negativna kontrola-phycoerythrin (PE) (F8-11-13),	
anti CD68-Alexa Fluor 647 (ED1),	
anti-CD4-biotin (klon W3/25),	
anti-CD11b- FITC (OX-42),	
anti-MHC klasa II-RPE (OX-6),	
anti-CD3-Alexa Fluor 647 (1F4)	
mišja IgG1 negativna kontrola (MOPC-21)-Alexa Fluor 647,	<i>Thermo Fisher Scientific, SAD</i>
mišja IgG1 negativna kontrola-biotin (AB 2550616),	
anti-IL-17A-FITC (eBio17B7),	
anti-CD45R antitelo-FITC (HIS24),	
anti-CD161-Biotin (10/78)	
anti-CD25-FITC (OX-39),	<i>BD Pharmingen, SAD</i>
anti-IL-10-PE (A5-4),	
anti-IL-4-PE (OX-81),	
anti-CD103-biotin (OX-62),	
anti-CD86-biotin (24F)	
mišja IgG1 kapa negativna kontrola-Allophycocyanin (APC) (P3.6.2.8.1),	<i>eBioscience, SAD</i>
anti-FoxP3-APC (FJK-16s)	
anti-IFN- γ -FITC (DB-1),	<i>BioLegend, Kalifornija, SAD</i>
anti-CD86-FITC (24F), PE/Cyanine7	
Streptavidin, APC/Cyanine7 Streptavidin	<i>Sigma-Aldrich, SAD</i>
kunićsko poliklonsko anti-mišje IgG antitelo (ceo molekul)-FITC	

Isključivanje mrtvih ćelija tokom analize protočnom citometrijom vršeno je na osnovu obeležavanja ćelija vijabilnom bojom 7AAD (*viability dye, BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD*) ili bojom Fixable Viability Stain 620 (FVS) (*BD Bioscience*).

Preklapanje signala između kanala je kompenzovano na početku analize, korišćenjem ćelija obeleženih pojedinačnim antitelima, a nespecifična fluorescencija je određena korišćenjem odgovarajućih izotipskih negativnih kontrola. Analiza fenotipa je vršena na BD LSR II protočnom citometru (*BD Biosciences*) dok su rezultati analizirani uz pomoć FlowJoVX (*BD Biosciences*).

4.7. Histološke analize

Tokom pika bolesti i faze remisije uzorkovan je lumbalni deo kičmene moždine od po 4 životinje iz svake grupe. Uzorci su fiksirani u 10 % formalinu (*Sigma, SAD*) 48–72h, potom je tkivo prebačeno u 95% alkohol u kome je inkubirano 2 dana, zatim 3 dana u apsolutnom alkoholu (sa promenama alkohola svakog dana). Nakon isteka ovog perioda tkivo je držano u mešavini sastavljenoj od dva dela alkohola i jednog dela ksilola, zatim 10 minuta u mešavini dva dela ksilola i jednog dela alkohola. Nastavljeno je držanje tkiva 3 puta po 20 minuta u ksilolu, nakon čega je tkivo ukalupljeno u parafin uz pomoć *Modular Tissue Embedding Centre EC 350* nakon procesa dehidracije u etanolu i ksilolu (*Zorka Pharma, Srbija*). Isečci debljine (~5 μ m) dobijeni su sečenjem na mikrotomu (*Manuel Rotary Microtome, Biobase, Kina*). Tkivni isečci su obojeni standardnom metodom bojenja tkiva hematoksilinom i eozinom (*Fisher Scientific, SAD*). Step en infiltracije

kičmene moždine mononuklearnim ćelijama bodovan je na skali od 0–4 u zavisnosti od položaja i broja infiltrata:

- 0 – nema inflamatornih ćelija
- 1 – leptomeningealna i granična subpijalna infiltracija
- 2 – 1–3 perivaskularna i parenhimalna infiltrata
- 3 – 3–6 perivaskularnih i parenhimalnih infiltrata
- 4 – više od 6 perivaskularnih i parenhimalnih infiltrata

Dodatno, isecci tkiva kičmene moždine su pripremljeni za epifluorescentnu mikroskopiju. Kako bi se antigenske grupe oslobodile, pre obeležavanja fluorescentnim antitelima, antigen je kuvan u citratnom puferu na temperaturi 95 °C tokom 20 minuta, nakon čega je usledilo spontano hlađenje do sobne temperature. Isecci su preko noći inkubirani na temperaturi 4 °C sa antitelima: kunić anti-bazni protein mijelina (MBP, *Abcam* SAD, 1:100) i anti-pacovskim CD-45 obeležen biotinom. Nakon inkubacije su isprani u PBS-u. Potom je usledila inkubacija sa sekunadarnim anti-kunić IgG (H+L)-Alexa 488 (1:500) u trajanju od dva sata i streptavidinom-Aleksa 546 (1:500) tokom 30 minuta (*Thermo Fisher*, SAD). Periimplantacioni isecci životinja tretiranih PLGA/ESL1 bojeni su hematoksilinom i eozinom, dok su periimplantacioni isecci i isecci aksilarnih limfnih čvorova PLGA/ESL1-FITC tretiranih DA pacova inkubirani preko noći sa anti-FITC biotinizovanim antitelom (*Biolegend*, *GmbH*) u odnosu 1:200. Nakon ispiranja u PBS-u, isecci su inkubirani sa streptavidin-Aleksa 546 tokom 30 minuta. Isecci su potom inkubirani sa DAPI bojom za jedarca (*Thermo Fisher*, SAD) u razmeri 1:10000 tokom 15 minuta. Uzorci su analizirani uz pomoć *Zeiss Axioimager A1* mikroskopa korišćenjem sledećih filtera: ultravioletni set za DAPI (UV-2B, ekscitacija (eng. ex): 330–380 nm, dihroično ogledalo (eng. DM) 400, filter barijere (eng. BA) 435), zeleni filter za detekciju mijelina (MBP) (B-2A, ex: 450–490 nm, DM 505, BA 520) i crveni filter za detekciju CD45 ili ES L1 antigena (G-2A, ex: 510–560 nm, DM 575, BA 590). Slike koje je napravio svaki set filtera su kasnije spojene uz pomoć softvera *ImageJ* (Nacionalni institut za zdravlje, Merilend, SAD).

Tkivo periimplantacione regije PLGA implantata uzorkovano je 7., 14. i 21. dana od implantacije. Uzorkovano tkivo je fiksirano u 10% puferizovanom formalinu i nakon obrade u automatskom tkivnom procesoru KD-TS3D (Kedee, PR China) ukalupljeno je u parafinske blokove. Isecci debljine 3–5 µm bojeni su standardnom metodom bojenja hematoksilinom i eozinom. Morfološke i histometrijske analize izvršene su na mikroskopu *Olympus BX51* sa kolor digitalnom CCD kamerom (*Color View III*, *Olympus*, Japan) koja je povezana za kompjuterizovan sistem za analizu slike (*Olympus Cell B*, *Olympus*, Japan) na Katedri za patologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

4.8. Statistička analiza

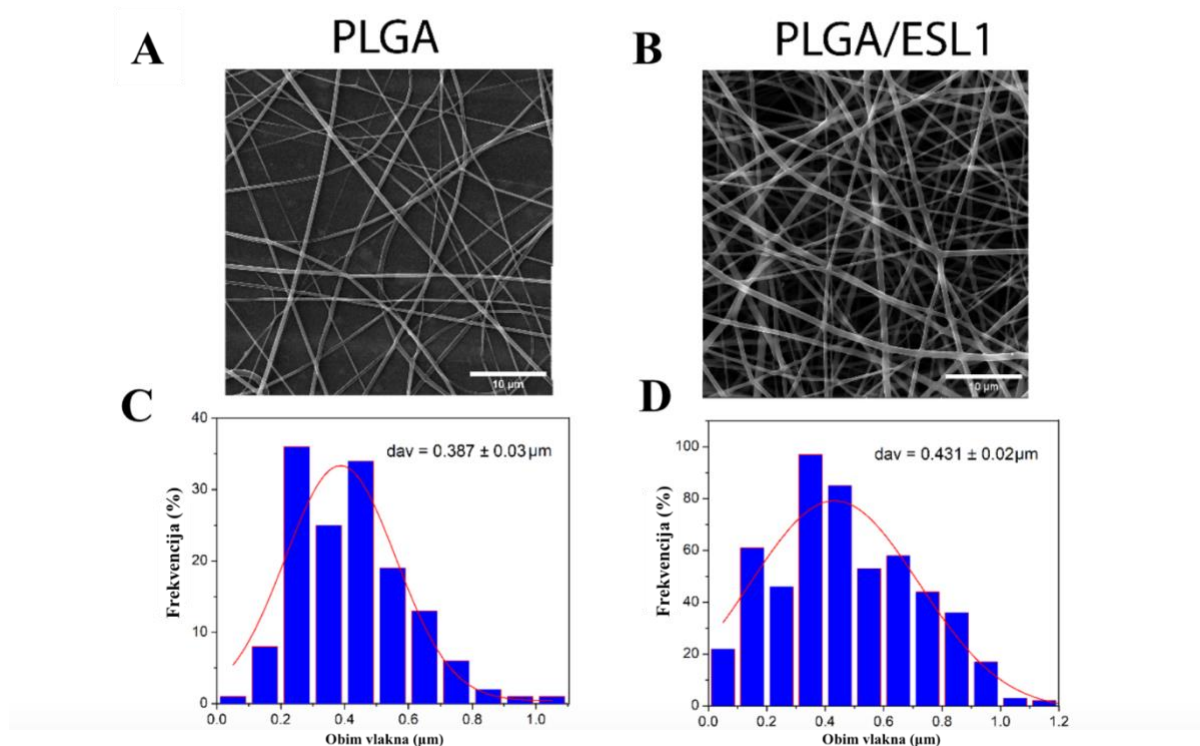
Distribucija podataka analizirana je uz pomoć *Shapiro-Vilk* testa. Za analizu statističke značajnosti korišćeni su ili jednosmerna ANOVA sa Tukijevim testom višestrukih poređenja ili Kruškal-Valis test za upoređivanje ćelija od interesa unutar testiranih grupa. Statistička značajnost rezultata između vremenskih tačaka u četiri grupe određena je korišćenjem *two-way* ANOVA testa sa *Dunett*-ovim *post-hoc* testom. Parametri težine bolesti između grupa su ispitani korišćenjem *one-way* ANOVA testa sa Tukijevim testom. *Log-rank* test je korišćen za poređenje pojedinačnih ocena EAE bolesti između grupa. Svi rezultati predstavljeni su kao srednje vrednosti ($\pm$ SD). U svim slučajevima, razlika je bila značajna za vrednost $p < 0,05$. Sve statističke analize su obavljene korišćenjem *GraphPad Prism 8* (v. 9.1.0) softvera.

5. REZULTATI

5.1. Karakterizacija i otpuštanje ESL1 antigena iz PLGA nanovlakana

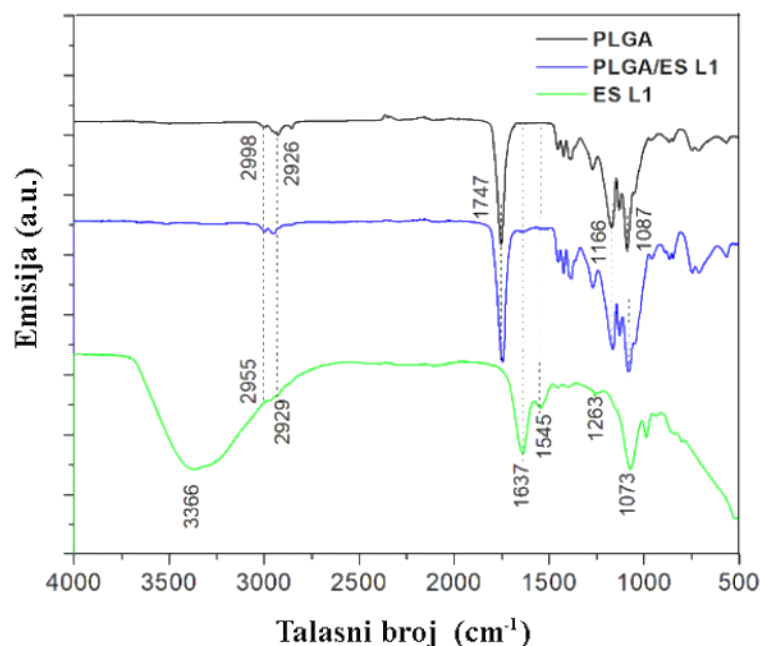
Izolovani ESL1 produkti dobijeni kultivacijom mišićnih larvi *T. spiralis* u *DMEM* medijumu, korišćeni za pripremu PLGA/ESL1 sistema, uspešno su okarakterisani, čime je potvrđen njihov odgovarajući kvalitet i očuvana imunoreaktivnost za dalju primenu u eksperimentalnim analizama. Na osnovu potvrđenih karakteristika ESL1 produkata omogućena je njihova inkorporacija u PLGA nanovlakna i razvoj PLGA/ESL1 sistema za kontrolisanu dostavu imunomodulatornih molekula.

Obim PLGA nanovlakana (Slika 3A) kao i kompleksa PLGA/ESL1 (Slika 3B) izmeren je na osnovu FE-SEM slika, dobijenih uz pomoć elektronskog mikroskopa kao što je prethodno opisano u potpoglavlju 4.3. Dobijeni podaci sugerišu da je prosečan prečnik PLGA/ESL1 nanovlakana $0,431 \pm 0,02 \mu\text{m}$, sa rasponom veličina prečnika od $0,1\text{--}1,2 \mu\text{m}$. Mikrostruktura kontrolnih PLGA nanovlakana se je imala relativno ujednačen cilindrični oblik sa prosečnim prečnikom od $0,387 \pm 0,03 \mu\text{m}$, sa istim rasponom veličina prečnika kao i kod PLGA/ESL1 (Slika 3C i 3D).



Slika 3. Prikaz reprezentativnih FE-SEM slika PLGA (A) i PLGA/ESL1 nanovlakana (B) koje su korišćene za merenje prečnika vlakana. Grafički prikaz raspodele frekvencija prečnika PLGA (C) i PLGA/ESL1 (D) nanovlakana prikazan pomoću prilagođene krive.

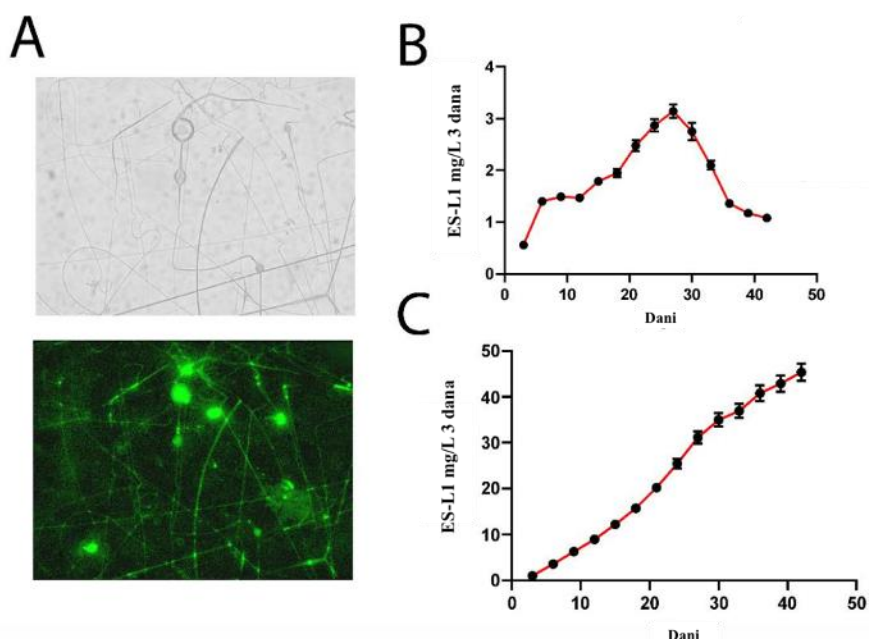
Površinska hemijska struktura pripremljenih nanovlakana i samog ESL1 analizirana je primenom infracrvene spektrometrije sa prigušenom refleksijom. Poređenje ATR-FTIR spektra PLGA i PLGA/ESL1 potvrdilo je prisustvo ESL1 unutar PLGA/ESL1 nanovlakana, kao i da prilikom inkorporacije nije došlo da narušavanja njihove strukture (Slika 4).



Slika 4. Grafički prikaz ATR-FTIR spektara PLGA, PLGA/ESL1 i ESL1 sa označenim vrhovima transmisije za relevantne veze (a.u. – absorbance units/jedinica apsorpcije).

5.2. Dinamika oslobađanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana *in vitro*

Kako bi mogla da se prati dinamika oslobađanja ESL1 iz PLGA/ESL1 nanovlakana, ESL1 produkti su obeleženi fluorescein izotiocijanatom (FITC), a zatim je ESL1-FITC inkorporiran u PLGA nanovlakna metodom elektrospininga, tako da je 1 cm² dobijenih nanovlakana sadržao 50 µg ESL1-FITC. Prisustvo ESL1-FITC u nanovlaknima je potvrđeno pomoću epifluorescentnog mikroskopa (Slika 5A). ESL1-FITC/PLGA nanovlakna isečena u kvadratiće površine 1 cm² stavljena su u otvore sterilne ploče sa 24 mesta u kojima se nalazila mešavina PBS i sterilnog eksudata (WE) u odnosu 1:1. Oslobađanje ESL1-FITC tokom 42 dana praćeno je prikupljanjem kondicioniranog sterilnog eksudata svaka 3 dana. Fluorimetrijska merenja prikupljenih uzoraka pokazala su da je oslobođeni ESL1-FITC bio detektovan nakon prvog merenja, a njegovo oslobađanje se kontinuirano povećavalo tokom prvih 27 dana, do nivoa 1 µg/ml/dan (Slika 5B). Nakon toga ESL1-FITC je i dalje mogao da se detektuje, ali je njegovo otpuštanje bilo sporije. Približno 90% ESL1-FITC je oslobođeno iz PLGA nanovlakana u sterilni eksudat tokom 42 dana praćenja, pri čemu je najveći skok u otpuštanju bio u prvih 27 dana (Slika 5C).

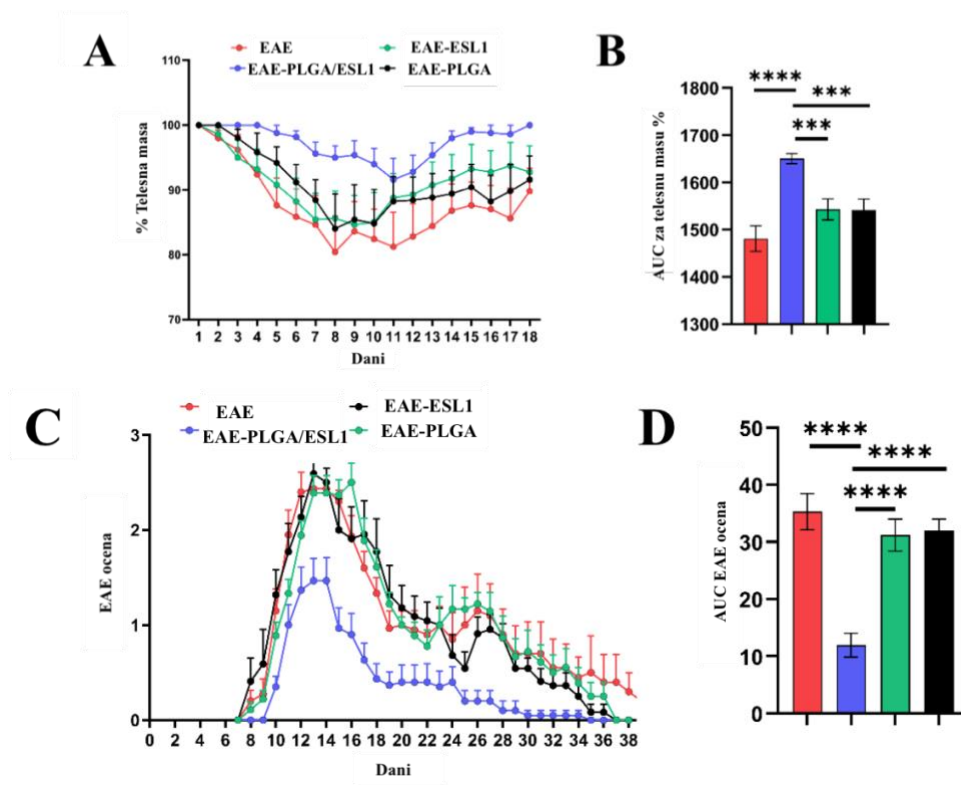


Slika 5. Dinamika oslobađanja ESL1-FITC iz PLGA nanovlakana *in vitro*. A) Slika PLGA nanovlakana napunjenih ESL1-FITC kompleksom – fazni kontrast (gore) i fluorescencija (dole) (uveličanje 40×). B) Grafički prikaz brzine oslobađanja ESL1-FITC (50 µg) iz PLGA (1 cm²) nanovlakana koja su inkubirana u smeši sterilnog eksudata i PBS-a (1:1) tokom 42 dana. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja ± SD, a merenje je vršeno svaka 3 dana. C) Kumulativni prikaz oslobađanja ESL1-FITC tokom 42 dana. Na slici su izražene srednje vrednosti ± SD.

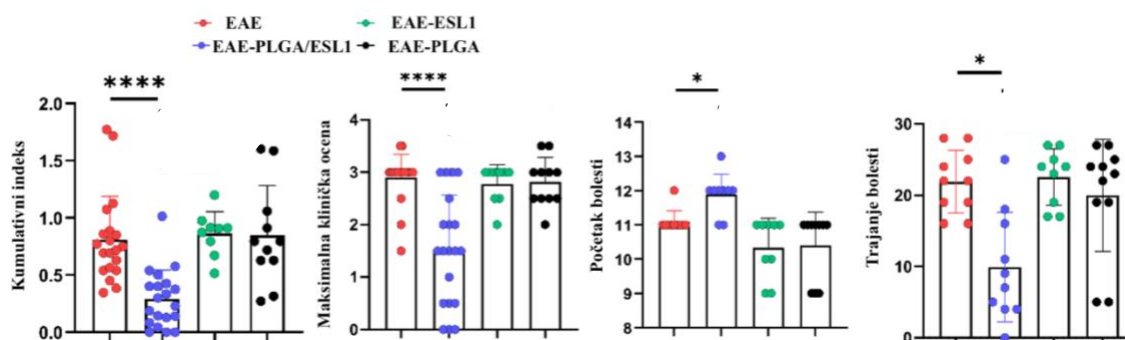
5.3. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na tok i težinu EAE kod *Dark Agouti* pacova

Nakon indukcije EAE telesna masa životinja i klinički znaci bolesti su praćeni svakodnevno tokom 38 dana (Slika 6). Najveći gubitak telesne mase zabeležen je u prvih 8 dana nakon indukcije EAE u kontrolnim grupama (Slika 6A). Procenat gubitka telesne mase bio je najniži u EAE-PLGA/ESL1 grupi (Slika 6B). Kontrolna EAE grupa životinja razvila je relapsno-remitentni oblik EAE sa pojavom simptoma između 7. i 10. dana nakon indukcije. Težina simptoma bolesti je određivana prema skali koja je data u poglavlju 4.5. Pik bolesti evidentiran je 14. ± 1 dana, nakon čega je usledila delimična remisija do 20. dana, i dodatni relaps između 24. i 27. dana. Sličan tok i težinu bolesti imale su životinje iz kontrolnih grupa EAE-ESL1 i EAE-PLGA (Slika 6C). Nasuprot tome, grupa kojoj su potkožno postavljeni PLGA/ESL1 implantati pokazala je ublažavanje simptoma i značajno sniženje parametara koji opisuju težinu bolesti, kao što su kumulativni indeks, prosečna maksimalna vrednost težine bolesti (prosečni maksimalni klinički skor), dan otpočinjanja bolesti i trajanje bolesti (Slika 6C). Na osnovu površine ispod krive može se zaključiti da je samo grupa EAE-PLGA/ESL1 pokazala značajno blaži tok bolesti u poređenju sa ostalim testiranim grupama (Slika 6D). Kumulativni indeks, parametar koji najbolje opisuje težinu EAE, takođe ukazuje da grupa EAE-PLGA/ESL1 ima značajno blaže simptome u poređenju sa sve tri kontrolne grupe: EAE, EAE-ESL1, EAE-PLGA (Slika 7). Životinje iz grupe EAE-PLGA/ESL1 pokazale su najnižu srednju maksimalnu vrednost težine bolesti, kod njih se bolest javila najkasnije i najkraće je trajala. Za procenu razlika u težini bolesti između testiranih grupa korišćena je *log-rank* analiza incidencije EAE. Rezultati su pokazali da je incidencija EAE, bez obzira na maksimalnu vrednost težine bolesti, u kontrolnim grupama EAE, EAE-PLGA i EAE-ESL1 iznosila 100%, dok je u grupi EAE-PLGA/ESL1 samo 75%

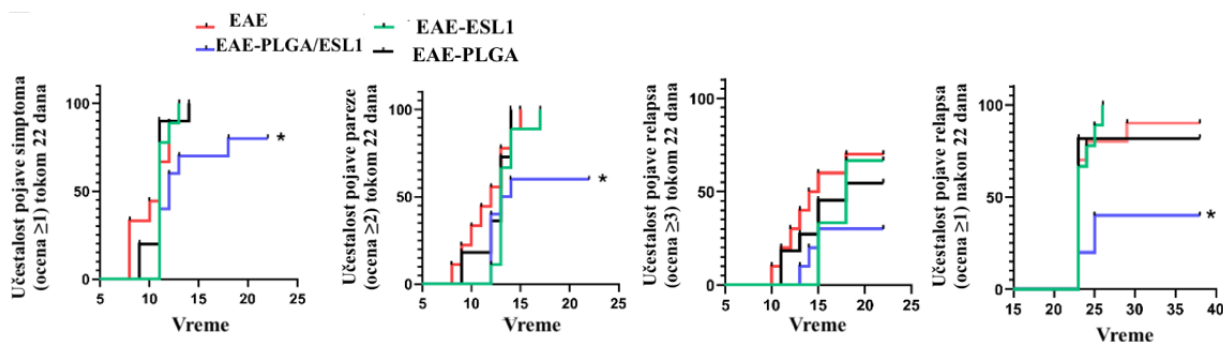
životinja razvilo simptome. Učestalost pareze (skor ≥ 2) i paralize (skor ≥ 3) značajno je smanjena u grupi EAE-PLGA/ESL1 u poređenju sa grupom EAE (Slika 8). Pored toga incidencija relapsa (drugi pik EAE čiji je klinički skor ≥ 1) bila je ispod 40% u grupi EAE-PLGA/ESL1, dok je kod životinja iz drugih testiranih grupa procenat prelazio 80%.



Slika 6. Efekat PLGA/ESL1 implantata na razvoj EAE kod DA pacova. A) Telesna masa životinja je svakodnevno merena tokom 18 dana, rezultati su prikazani kao srednja vrednost telesne mase $\pm$ standardana greška (SEM). B) Polje ispod krive (AUC) za telesnu masu %, izračunato za svaku životinju, prikazano je kao srednja vrednost $\pm$ SEM. C) Tokom 38 dana praćeni su simptomi bolesti. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ SEM (isti broj životinje kao i pod A). D) AUC za EAE svake životinje prikazan je kao srednja vrednost $\pm$ SEM.



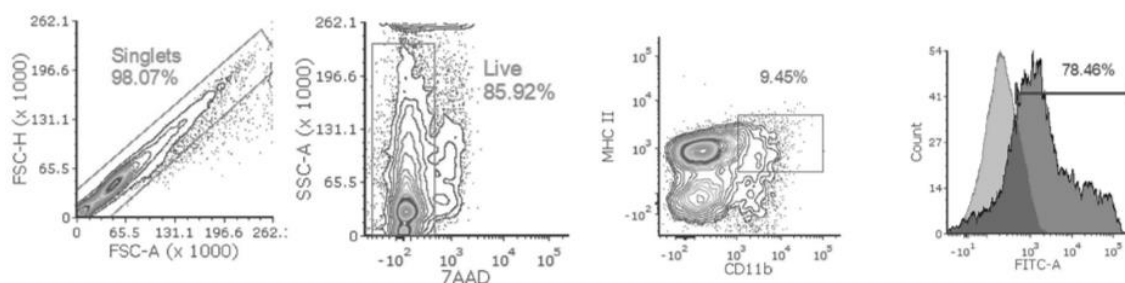
Slika 7. Parametri težine bolesti. Kumulativni indeks, maksimalni klinički skor, početak i trajanje bolesti prikazani su kao srednje vrednosti $\pm$ SEM. Svaka životinja predstavljena je tačkom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$, (Kruškal-Walis test praćen Danovim testom za višestruka poređenja).



Slika 8. Incidencija pojave simptoma. Tokom 22 dana u svakoj grupi je praćena incidencija pojave simptoma (mlitav rep ≥ 1 , pareza ≥ 2 , paraliza ≥ 3) koja je predstavljena *log-rank* krivom. Slično tome, prikazana je i incidencija pojave relapsa nakon 22 dana. * $p < 0,05$ Long-Rank (Mantel-Cox) test u odnosu na EAE grupu.

5.3.1. Ispitivanje preuzimanja ESL1-FITC od strane mijeloidnih antigen-prezentujućih ćelija

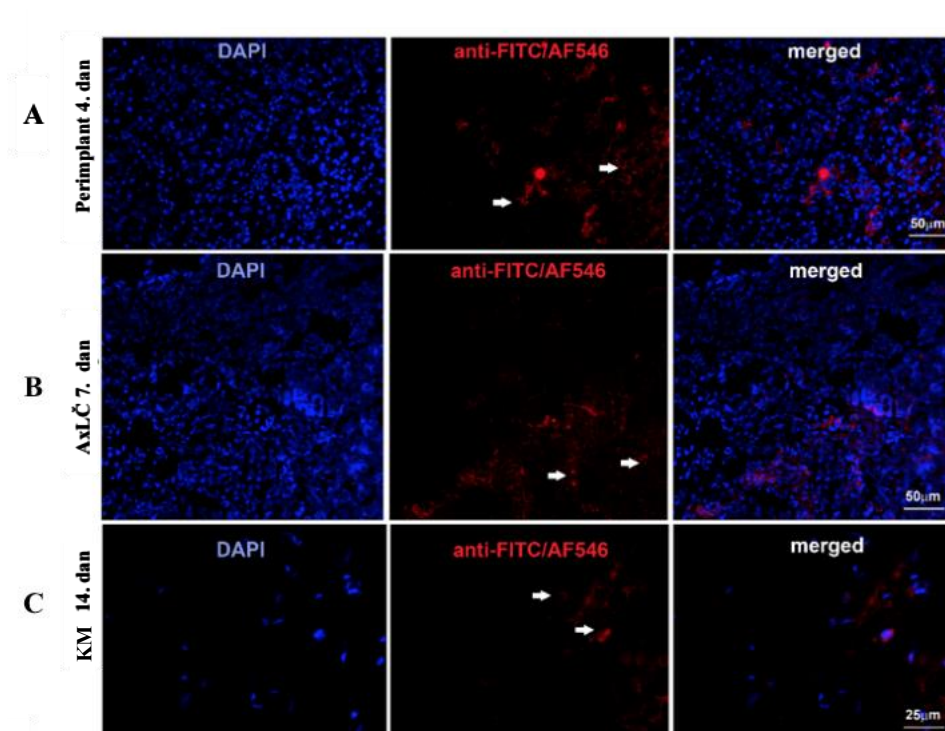
Za pokretanje imunskog odgovora ključna je interakcija sa mijeloidnim antigen-prezentujućim ćelijama (APC) – dendritskim ćelijama i makrofagima, koje dalje pokreću adaptivni imunski odgovor. Kultura splenocita DA pacova tretirana je 24 sata sa 50 $\mu\text{g/ml}$ ESL1-FITC. Žive ćelije (7AAD⁻) analizirane su na ekspresiju markera mijeloidnih APC (CD11b i MHCII) protočnom citometrijom. Pokazano je da je najveće preuzimanje ESL1-FITC (~75%) i najjača fluorescencija FITC-pozitivnih ćelija zabeležena u mijeloidnim APC (CD11b⁺ MHC-II⁺ ćelijama) (Slika 9).



Slika 9. Preuzimanje ESL1-FITC od strane dendritskih ćelija.

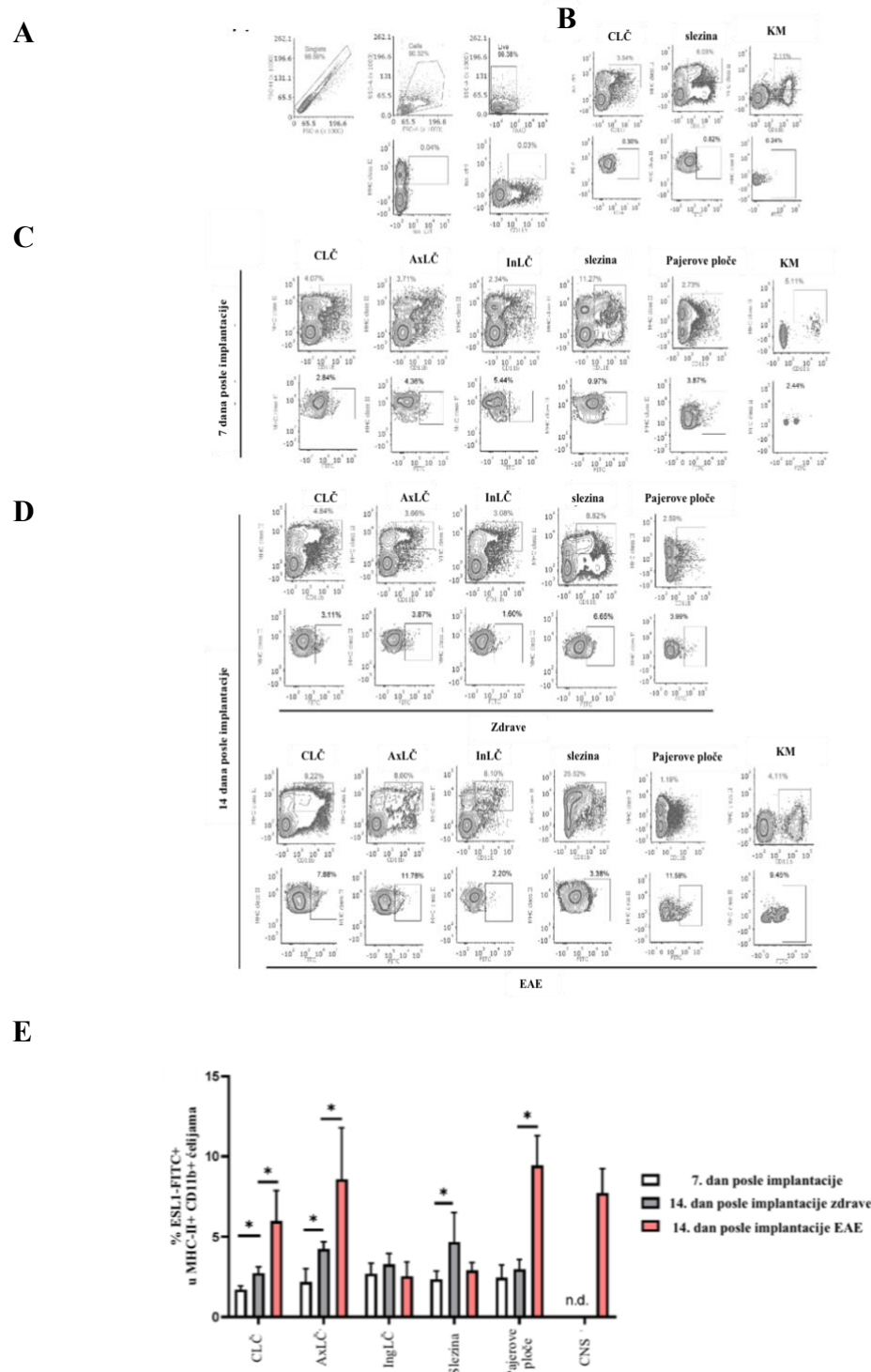
5.3.2. Distribucija ESL1-FITC oslobođenih iz PLGA nanovlakana *in vivo*

Kako bi se istražila migracija i distribucija ESL1 oslobođenog iz PLGA vlakana *in vivo*, životinjama su potkožno postavljeni PLGA/ESL1-FITC implantati ili kontrolni neobeleženi PLGA/ESL1 implantati. Kod 4 životinje iz obe grupe indukovao je EAE 7 dana posle implantacije. Potom su ciljna tkiva prikupljena 4., 7. i 14. dana nakon implantacije. Epifluorescentna mikroskopska analiza periimplantacione regije 4 dana nakon implantacije ukazuju da je ESL1-FITC oslobođen u okolno područje i prisutan unutar lokalnih infiltrirajućih ćelija (Slika 10A). U aksilarnim limfnim čvorovima (AxLC), koji dreniraju supraskapularnu regiju, ćelije su bile pozitivno obojene u medularnim sinusima i korteksu 7 dana nakon implantacije PLGA/ESL1-FITC, za razliku od kontrolnih uzoraka životinja kojima je postavljen PLGA/ESL1 implantat (Slika 10B).



Slika 10. Dinamika distribucije ESL1-FITC oslobođenog iz PLGA nanovlakana *in vivo*. Na slikama epifluorescentne mikroskopije je prikazana A) periimplantaciona regija uzorkovana 4. dana implantacije PLGA/ESL1-FITC; B) aksilarni limfni čvorovi (AxLČ) sakupljeni 7. dana implantacije; C) kičmene moždine (KM) sakupljene 14. dana implantacije i 7 dana posle indukcije EAE.

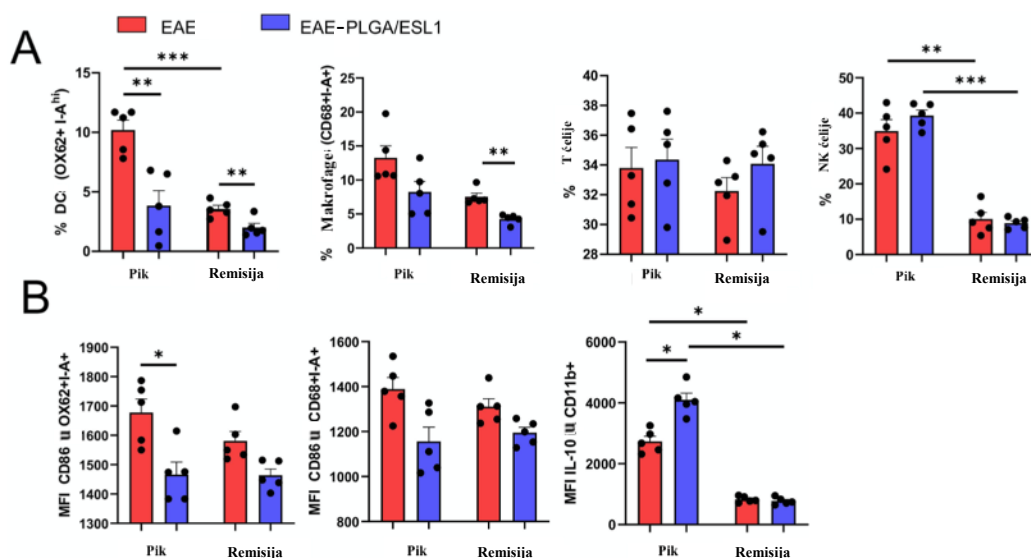
Sedam i 14 dana nakon implantacije ESL1-FITC/PLGA kod neimunizovanih (zdravih) životinja i 14 dana nakon implantacije kod imunizovanih (EAE) životinja, analiziran je procenat ESL1-FITC⁺ mijeloidnih ćelija (CD11b⁺MHCII⁺) iz cervikalnih, aksilarnih i ingvinalnih limfnih čvorova, slezine, Pajerovih ploča i kičmene moždine (CNS) (Slika 11). Procenat pozitivno obojenih CD11b⁺ MHC-II⁺ ćelija u cervikalnim (CLČ), aksilarnim i ingvinalnim (IngLČ) limfnim čvorovima, slezini i Pajerovim pločama (identifikovan na osnovu FMO kontrola) varirao je od 0,7–5,5% (Slika 11D). Nalazi ukazuju na to da je ESL1-FITC nastavio da se akumulira u regionalnim limfnim čvorovima i slezini 14. dana posle implantacije, u imunizovanim i neimunizovanim (zdravim) životinjama (Slika 11D). Međutim, uočeno je da se kod imunizovanih životinja ESL1-FITC značajno više nagomilava u CLČ i AxLČ, kao i u Pejerovim pločama. Ispitivanje ciljnog tkiva, kičmene moždine, sprovedeno je 14. dana nakon implantacije kod imunizovanih i neimunizovanih životinja. Broj mononuklearnih ćelija u kičmenoj moždini neimunizovanih životinja bio je previše nizak da bi se pratila distribucija ESL1 produkata. Kod imunizovanih životinja nađeno je 9,5% mijeloidnih APC koje su bile pozitivne na ESL1-FITC.



Slika 11. Analiza ESL1-FITC pozitivnih mijeloidnih ćelija. A) Prikaz standardne strategije analize mijeloidnih ćelija ($CD11b^+ MHCII^+$) protočnom citometrijom. B) Reprezentativni plotovi cervikalnih limfnih čvorova (CLČ), slezina i kičmenih moždina izolovanih iz životinja kojima je implantiran PLGA/ESL1-FITC i indukovao EAE. Reprezentativni plotovi ćelija izolovanih iz organa prikupljenih 7 (C) i 14 dana (D) posle implantacije od zdravih i EAE životinja. E) Procenat ESL1-FITC⁺ mijeloidnih ćelija ($CD11b^+ MHCII^+$) iz cervikalnih, aksilarnih i ingvinalnih limfnih čvorova, slezine, Pajerovih ploča i kičmene moždine (CNS). Podaci su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM ($n=4$ životinje po grupi). n.d. – nije detektovano; * $p < 0,05$, označeno kao statistički značajna razlika (Kruskal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

5.4. Uticaj PLGA/ESL1 na imunski odgovor ćelija slezine tokom EAE

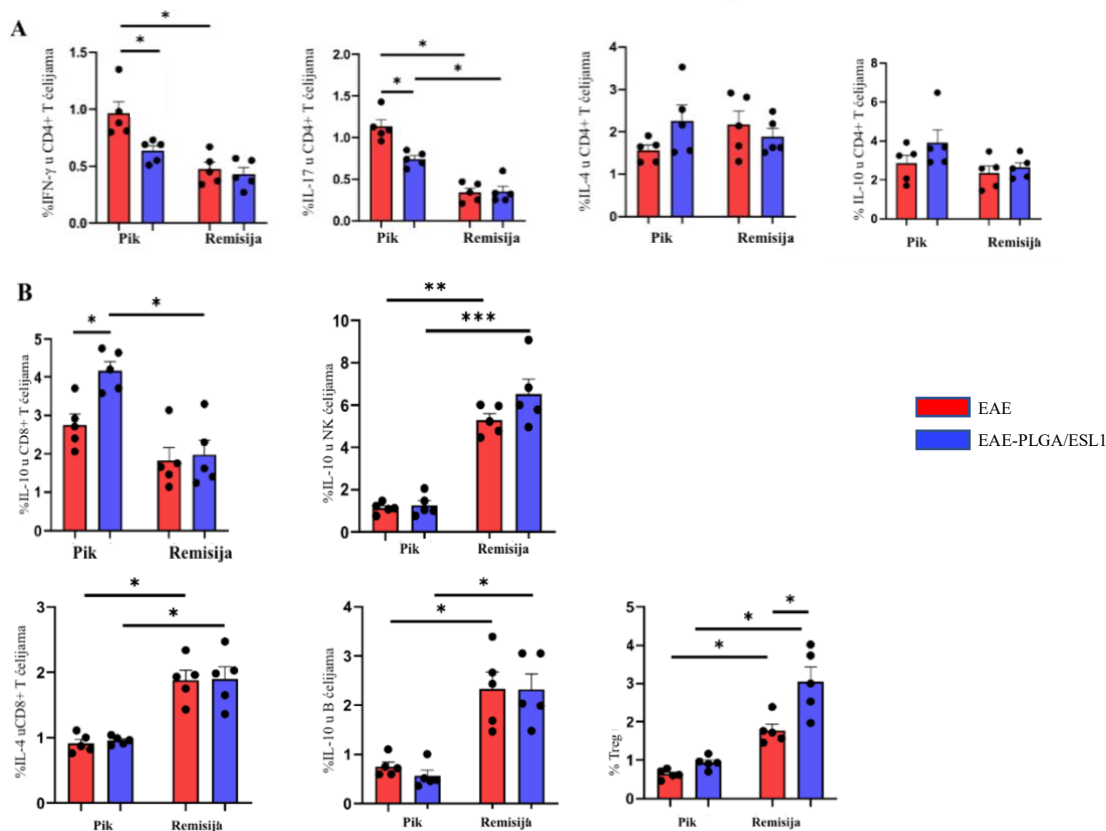
Značajno poboljšanje simptoma kod EAE zapaženo je isključivo u EAE-PLGA/ESL1 grupi, dok samostalna primena PLGA ili ESL1 produkata nije dovela do promene kliničke slike. S obzirom na ove podatke u daljim eksperimentima analizirane su isključivo EAE-PLGA/ESL1 i EAE grupe. Sistemski imunski odgovor tokom EAE analiziran je na ćelijama slezine. Protočnom citometrijom okarakterisane su ćelijske populacije tokom pika bolesti (14. dan) i u fazi remisije (20. dan). Ispitivanja su otkrila da je tokom pika i remisije bolesti procenat $OX62^{+}MHC-II^{hi}$ dendritskih ćelija i makrofaga ($CD68^{+}MHC-II^{+}$) niži kod životinja kojima je implantiran PLGA/ESL1 (Slika 12A). Mijeloidne ćelije grupe EAE-PLGA/ESL1 imale su nižu ekspresiju CD86 i povećanu ekspresiju IL-10 u poređenju sa životinjama iz EAE kontrolne grupe (Slika 12B). Tokom bolesti zapažen je niži udeo NK ćelija u fazi remisije u odnosu na fazu pika, dok je udeo T ćelija ostao nepromenjen tokom bolesti.



Slika 12. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na imunski odgovor slezinskih ćelija tokom EAE. A) Prikaz udela DC ($OX62^{+}MHC II^{hi}$), makrofaga ($CD68^{+}MHC II^{+}$), T ćelija ($CD3^{+} CD161^{-}$) i NK ćelija ($CD3^{+} CD161^{+}$) u okviru kontrolne EAE grupe i EAE-PLGA/ESL1 grupe B) Prikaz ekspresije markera CD86 u okviru DC i makrofaga; ekspresija IL10 u okviru ukupnih mijeloidnih ćelija ($CD 11b^{+}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,005$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

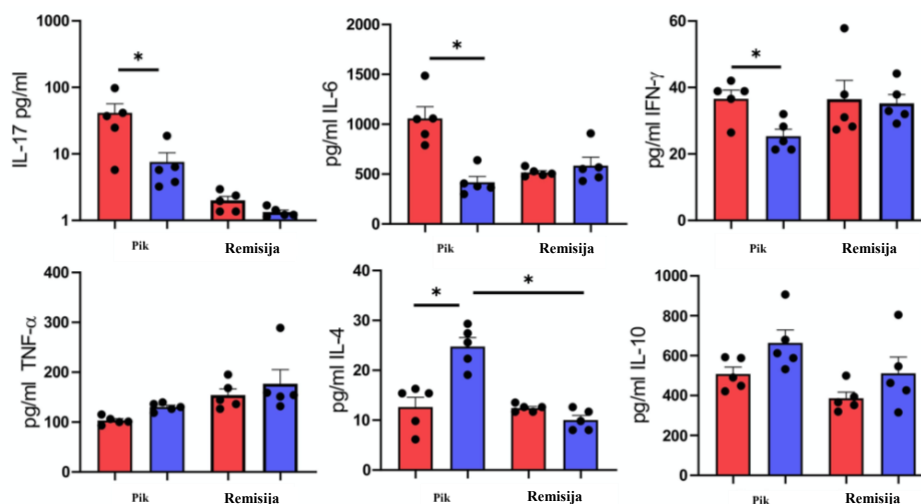
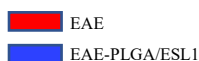
Iako je odnos T ćelija bio nepromenjen u odnosu na EAE životinje, funkcionalna svojstva T ćelija su bila značajno izmenjena tretmanom PLGA/ESL1. Naime, kod tretiranih životinja zabeležen je smanjen udeo $IFN-\gamma$ produkujućih $CD4^{+}$ (Th1) i IL-17 produkujućih $CD4^{+}$ T ćelija (Th17) u fazi pika EAE, u poređenju sa kontrolnim EAE životinjama (Slika 13). Pored smanjenog udela $CD4^{+}$ T ćelija koje produkuju proinflamatorne citokine u slezinama PLGA/ES L1 tretiranih životinja, zabeležen je i smanjen udeo $IFN-\gamma$ produkujućih NK ćelija. Sa druge strane uočen je povećan udeo IL-10 produkujućih $CD8^{+}$ T ćelija u piku bolesti (Slika 13B). Tokom faze remisije generalno je smanjen procenat $IFN-\gamma$ i IL-17 produkujućih $CD4^{+}$ T ćelija, a povećan procenat $CD4^{+}CD25^{hi}FOXP3^{+}$ regulatornih T ćelija (Treg) u obe ispitivane grupe. Međutim, kod životinja tretiranih PLGA/ESL1 zabeležen je značajno veći udeo Treg ćelija tokom faze remisije u poređenju sa kontrolnom EAE grupom (Slika 13B). Tokom remisije je zabeležen povećan udeo IL-4

produkujućih CD8⁺ T ćelija, kao i IL-10 produkujućih NK i B ćelija, iako nije bilo statistički značajnih razlika između grupa (Slika 13).



Slika 13. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na imunski odgovor slezinskih ćelija tokom EAE. A) Prikaz udela IFN- γ ⁺, IL-17⁺, IL-4⁺ i IL-10⁺ ćelija u okviru CD4⁺ T ćelijske populacije; B) Prikaz udela IL-10⁺ i IL-4⁺ ćelija u okviru CD8⁺ T ćelijske populacije, udela IL-10⁺ NK ćelija i B ćelija, kao i udela CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg ćelija. Podaci su dobijeni analizom slezinskih ćelija (izolovanih u piku bolesti i u fazi remisije) protočnom citometrijom. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,005$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

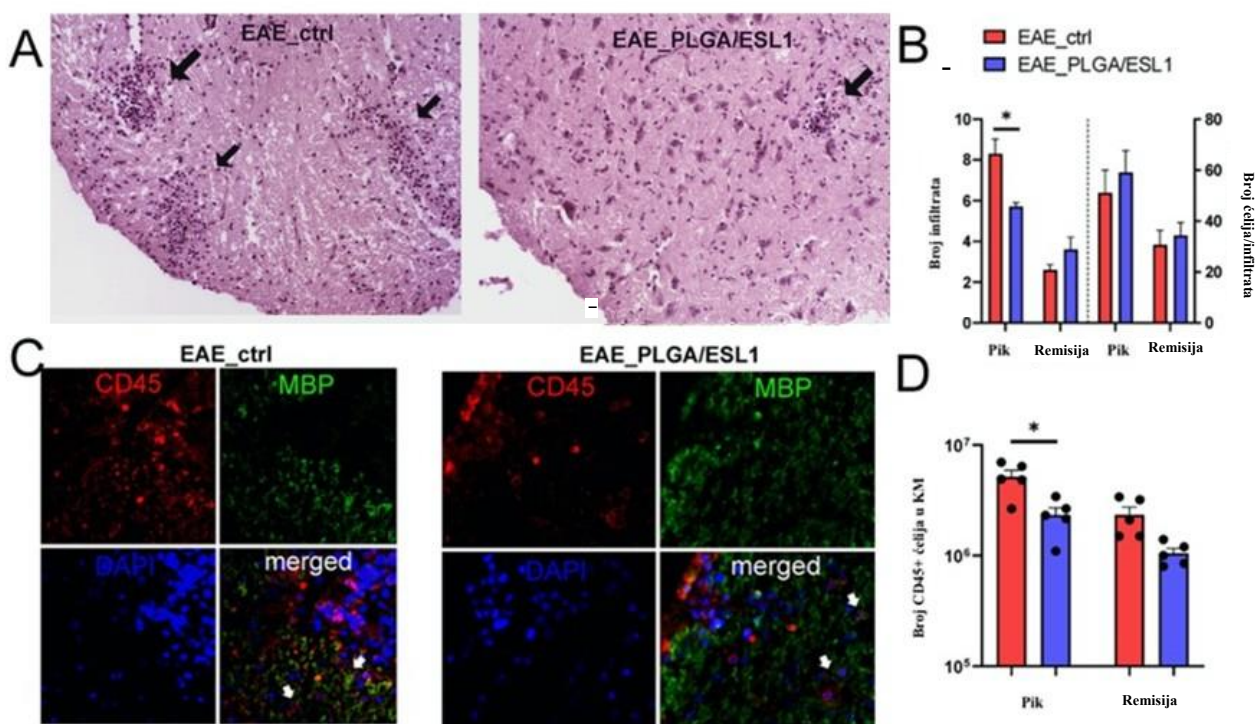
Ex vivo kultivacija splenocita izolovanih iz životinja kojima je implantiran PLGA/ESL1 rezultirala je značajno smanjenim nivoima produkcije IL-17, IL-6 i IFN- γ u fazi pika bolesti, dok je nivo IL-4 bio značajno povišen (Slika 14).



Slika 14. Produkcija citokina u kulturi slezinskih ćelija. Ćelije slezina izolovane su tokom pika bolesti i faze remisije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od dva izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,005$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

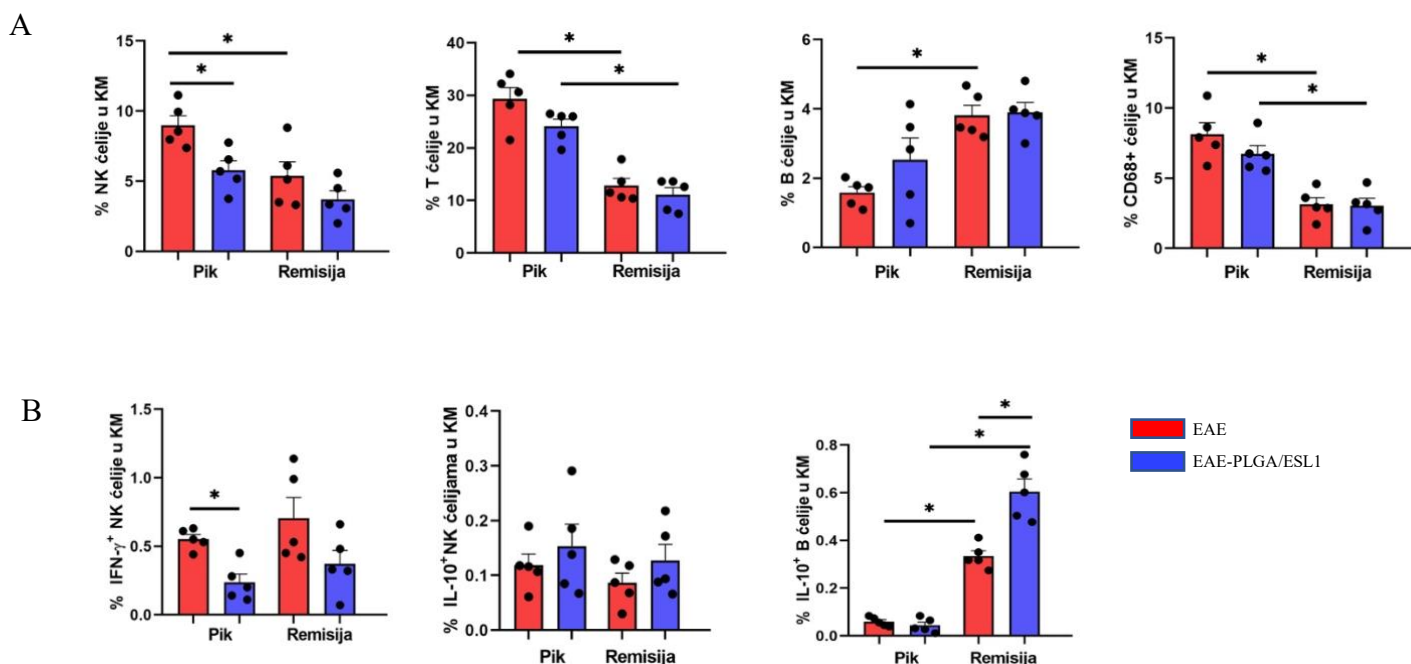
5.5. Uticaj PLGA/ESL1 implantata na inflamaciju i udeo imunskih ćelija u CNS tokom EAE

S obzirom na to da se najveće promene dešavaju na nivou kičmene moždine, tkivo kičmenih moždina obolelih i PLGA/ESL1 tretiranih životinja analizirano je u piku i fazi remisije EAE (Slika 15). Histološke analize isečaka kičmene moždine obojene hematoksilin-eozinom pokazale su značajno veći broj infiltrata tokom pika u EAE kontrolnoj grupi nego u EAE-PLGA/ESL1 grupi (Slika 15A). Infiltrati su predominantno bili u beloj masi kičmene moždine u ventralnim, dorzalnim i lateralnim rogovima i njihov broj se smanjio tokom faze oporavka (Slika 15B). Epifluorescentna mikroskopska analiza bojenja korišćenjem anti-CD45 i anti-mijelin bazni protein (MBP) antitela potvrdila je da su infiltrati u kičmenim moždinama poreklom od leukocita (Slika 15C), kao i da infiltrirana područja imaju smanjenu ekspresiju MBP na mestima infiltracije (Slika 15C). Imunske ćelije kičmene moždine analizirane su uz pomoć protočne citometrije. Rezultati su potvrdili da kontrolna grupa životinja (EAE) ima značajno veći broj CD45⁺ ćelija u kičmenoj moždini nego grupa kojoj je implantiran PLGA/ESL1 (Slika 15D).



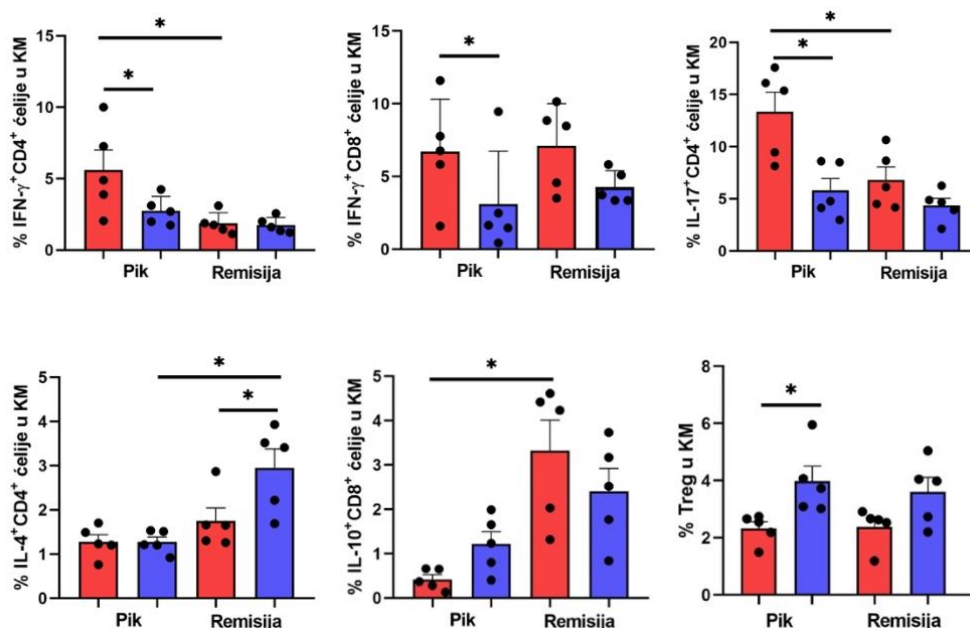
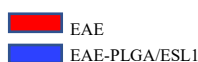
Slika 15. Ispitivanje uticaja PLGA/ESL1 na ćelijske infiltrate u kičmenoj moždini. A) Reprezentativne slike (uveličanje 10×) isečaka lumbalnog dela kičmene moždine obojenih hematoksilin-eozinom, kod kontrolne (EAE) i tretirane grupe (EAE-PLGA/ESL1). Kičmene moždine izolovane su tokom pika EAE. Crne strelice označavaju prisustvo ćelijskih infiltrata. B) Grafički prikaz prosečnog broja ćelijskih infiltrata izbrojanih na isečcima kičmene moždine. C) Reprezentativne slike (uvećanje 20×) preseka kičmenih moždina obojenih anti-CD45-Alexa Fluor 546 (crveno), anti-MBP-Alexa Fluor 488 (zeleno), dok su jedarca obojena sa DAPI bojom. D) Grafički prikaz ukupnog broja CD45+ ćelija u kičmenoj moždini tokom pika i faze oporavke. * $p < 0,05$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

U kičmenoj moždini životinja iz grupe EAE-PLGA/ESL1 na vrhuncu bolesti identifikovan je značajno manji broj NK, T ćelija i CD68⁺ makrofaga, ali ne i B ćelija, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 16A). U fazi remisije, primećen je manji broj NK, T ćelija i makrofaga u infiltratima kičmene moždine u obe grupe (Slika 16A). Iako broj B ćelija nije bio promenjen u grupi EAE-PLGA/ESL1 na vrhuncu bolesti, funkcija tih ćelija je bila izmenjena što se ogleda u većem broju B ćelija koje proizvode IL-10, u poređenju sa kontrolama (Slika 16B). Udeo NK ćelija koje proizvode IFN- γ bio je značajno niži i u piku i u remisiji bolesti u grupi EAE-PLGA/ESL1 u odnosu na EAE kontrolu, dok se udeo NK ćelija koje proizvode IL-10 nije razlikovao između grupa (Slika 16B).



Slika 16. Populacije imunskih ćelija u kičmenoj moždini tokom EAE. A) Udeo NK, T, B ćelija i makrofaga u ćelijskim infiltratima kičmenih moždina u fazi pika bolesti i remisiji. B) Udeo IFN- γ ⁺ i IL-10⁺ NK ćelija (CD161⁺ CD3⁻), kao i IL-10⁺ B ćelija u ćelijskim infiltratima kičmenih moždina u fazi pika bolesti i remisiji. * $p < 0,05$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

S obzirom na to da su T ćelije glavni regulatori neuroinflamacije detaljno su analizirane podgrupe T ćelija merenjem intracelularne ekspresije IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10 i FoxP3, metodom protočne citometrije (Slika 17). U grupi tretiranoj PLGA/ESL1 implantatima, udeo encefalitogenih CD4⁺ T ćelija koje proizvode IFN- γ i IL-17, kao i CD8⁺ T ćelija koje proizvode IFN- γ bio značajno smanjen u kičmenoj moždini u poređenju sa životinjama kontrolne grupe u piku bolesti (Slika 17), dok je registrovan značajno veći udeo Treg. Tretirana grupa životinja pokazala je tendenciju povećanog udela CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija koje proizvode IL-10 u kičmenoj moždini, ali nije primećena statistički značajna razlika između grupa (Slika 17). U fazi remisije nije primećena razlika u udelu T ćelija koje proizvode proinflatorne citokine, ali je u grupi EAE-PLGA/ESL1 uočen značajno uvećan udeo CD4⁺IL-4⁺ T ćelija (Th2) u poređenju sa kontrolnom EAE grupom.



Slika 17. Grafički prikaz ispitivanja uticaja PLGA/ ESL1 na različite T ćelijske populacije u infiltratima kičmenih moždina. * $p < 0,05$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruskal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

5.6. Testiranje uticaja raspadnih produkata PLGA nanovlakana na ćelije slezine *Dark Agouti* pacova *in vitro*

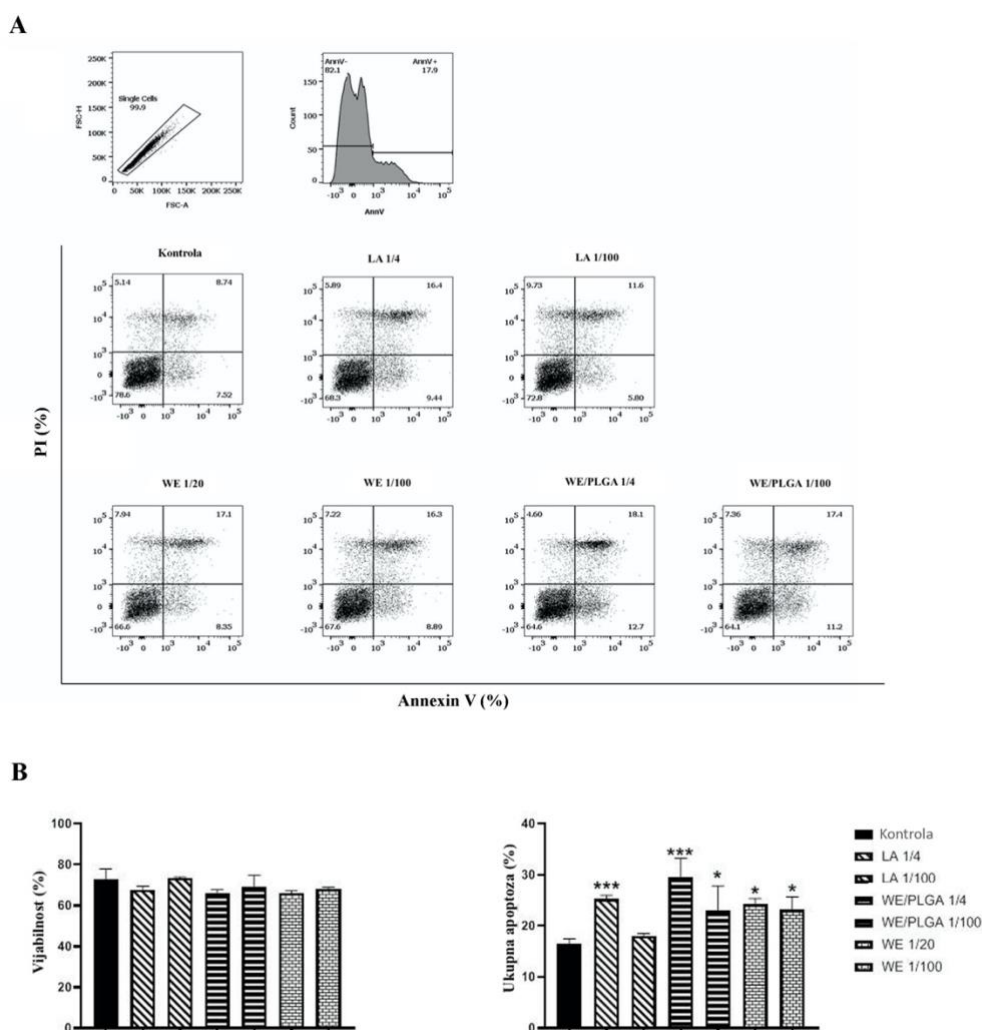
5.6.1. Mlečnokiselinski test

Krajnji metabolit razgradnje PLGA je mlečna kiselina. Njena izmerena koncentracija u samom sterilnom eksudatu iz rane (WE) iznosila je 4 mg/dl, dok je u PLGA kondicioniranom sterilnom eksudatu (WE/PLGA) izmereno 22 mg/dl mlečne kiseline.

5.6.2. Test apoptoze korišćenjem *Annexin-V* kita

Ćelije slezine DA pacova su kultivisane 24 sata u pločama sa 96 mesta u prisustvu tretmana: mlečne kiseline (LA) iste početne koncentracije kao WE/PLGA, u razblaženjima 1:4 i 1:100, PLGA kondicioniranog sterilnog eksudata (WE/PLGA) u razblaženjima 1:4 i 1:100, kao i samog sterilnog eksudata (WE) u razblaženjima 1:20 i 1:100, dok su ćelije slezine kultivisane samo u medijumu bile kontrola. Za određivanje vijabilnosti ćelija slezine, tj. određivanje broja apoptotičnih, nekrotičnih i mrtvih ćelija, korišćen je Annexin V-FITC komplet, a analiza ćelija vršena je protočnom citometrijom (Slika 18A – gejting strategija). Vijabilnost ćelija (procenat preživljavanja) se nije značajno razlikovala između tretiranih i kontrolnih ćelija (Slika 18B) i bila je približno 80%. Uočen je značajno viši procenat ukupne apoptoze u kulturama slezinskih ćelija koje su tretirane mlečnom kiselinom (LA) u razblaženju 1:4, kao i WE/PLGA u razblaženju 1:4 i 1:100 u poređenju sa kontrolnim,

netretiranim ćelijama slezine (Slika 18B). Povećanje ukupne apoptoze primećeno je i kod ćelija koje su tretirane sterilnim eksudatom iz rane (WE) u razblaženjima 1:20 i 1:100 (Slika 18B). Uzimajući u obzir ove rezultate u daljim eksperimentima dendritske ćelije su tretirane sa WE/PLGA i WE u razblaženju 1:200.



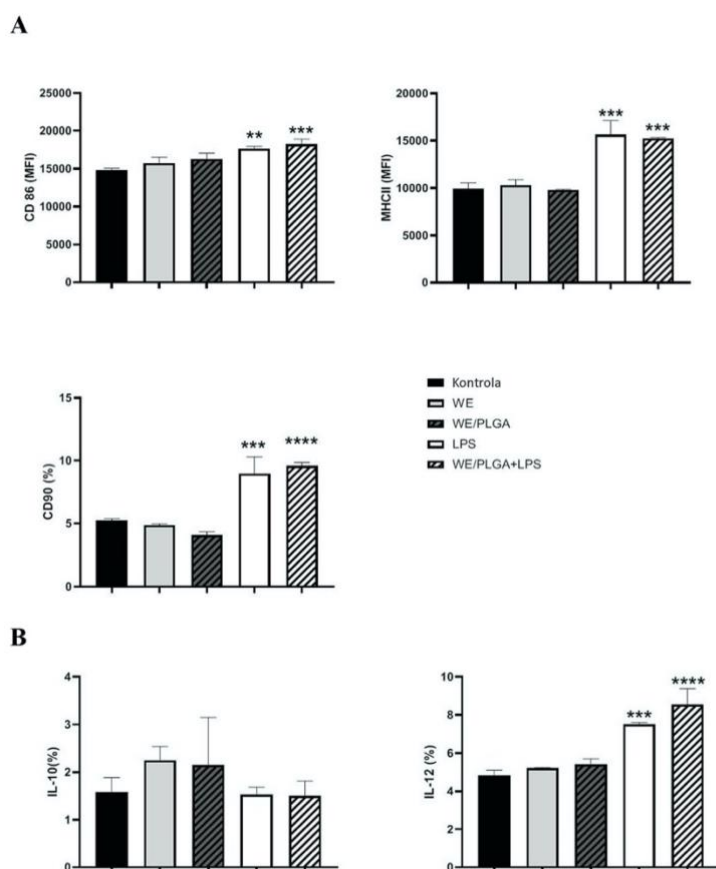
Slika 18. Procentualna zastupljenost vijabilnih ćelija i ukupne apoptoze u kulturi ćelija slezine DA pacova. A) Reprezentativni prikaz plotova kontrolnih i tretiranih ćelija dobijenih iz jednog od dva eksperimenta. Procenat vijabilnosti određen je prema procentu ćelija smeštenih u donjem levom kvadrantu, dok je procenat ukupne apoptoze izračunat kao zbir procenata ćelija u donjem i gornjem desnom kvadrantu. B) Prikaz procenata vijabilnosti i ukupne apoptoze u kulturi kontrolnih i tretiranih ćelija slezine. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ SD. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruskal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

5.6.3. Uticaj WE i WE/PLGA na sazrevanje dendritskih ćelija

Dendritske ćelije dobijene iz koštane srži DA pacova gajene su u kulturi u prisustvu i odsustvu stimulusa: WE (1:200), WE/PLGA (1:200), LPS (lipopolisaharid) i WE/PLGA+LPS. Uticaj WE/PLGA na sazrevanje DC procenjen je praćenjem ekspresije markera sazrevanja, MHCII i kostimulatornih molekula CD86 i CD90, i produkcije citokina IL-12 i IL-10, metodom protočne

citometrije (Slika 19). Primećena je značajno viša ekspresija MHCII, CD86 i CD90 na DC koje su stimulisane LPS-om, inflamatornim stimulusom koji dovodi do sazrevanja DC (pozitivna kontrola), kao i na DC tretiranim WE/PLGA + LPS u poređenju sa kontrolnim DC gajenim u medijumu bez stimulusa. Sam WE/PLGA tretman nije doveo do značajne ekspresije markera sazrevanja DC u odnosu na kontrolne DC ili DC gajene u prisustvu WE (Slika 19A).

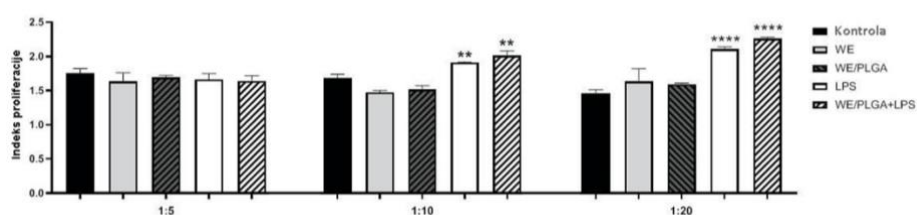
Produkcija citokina IL-10 i IL-12 u tretiranim i netretiranim DC ispitana je metodom protočne citometrije (Slika 19B). Rezultati analize citokina nisu pokazali razliku u ekspresiji IL-10 u tretiranim i netretiranim DC. Stimulacija DC isključivo LPS-om očekivano je indukovala značajnu intracelularnu ekspresiju proinflamatornog citokina IL-12. Značajno viši nivo IL-12 detektovan je i kod DC koje su prvo tretirane WE/PLGA, a potom stimulisane LPS-om, u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom tretiranom samo sa WE/PLGA. Tretman WE/PLGA nije doveo do promene u nivou intracelularne ekspresije IL-12 u poređenju sa kontrolom (Slika 19B).



Slika 19. Uticaj različitih tretmana na sazrevanje DC. A) Ekspresija markera sazrevanja DC MHC II, CD86 i CD90 analizirana metodom protočne citometrije. B) Intracelularna ekspresija citokina IL-10 i IL-12 u tretiranim i netretiranim DC. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

5.6.4. Ispitivanje uticaja dendritiskih ćelija *Dark Agouti* pacova tretiranih sa WE/PLGA na proliferaciju alogenih T ćelija

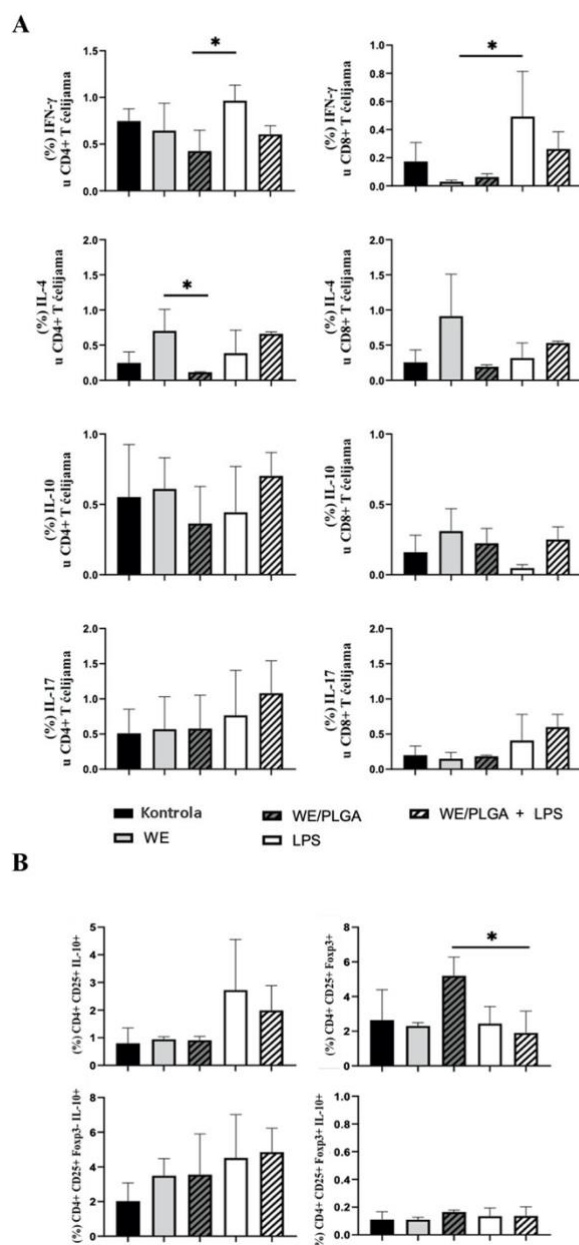
U cilju procenjivanja uticaja WE/PLGA tretmana na sposobnost DC da modulišu proliferaciju T ćelija, sproveden je test kokultivacije koji je uključivao tretirane i/ili stimulisane DC i alogene T ćelije. Proliferacija T ćelija je procenjena na osnovu izmerenog intenziteta obojenosti T ćelija (koja zavisi od nivoa inkorporacije fluorescentne boje CFSE). Indeks proliferacije u kokulturama je određen na osnovu procenta CFSE pozitivnih T ćelija (Slika 20). U poređenju sa kontrolnim, nezrelim DC, jedino su DC stimulisane LPS-om, kao i DC tretirane WE/PLGA i stimulisane LPS-om (WE/PLGA + LPS) pokazale značajno viši indeks proliferacije. Nije uočena značajna razlika između tretmana WE i WE/PLGA u odnosu na nezrele DC.



Slika 20. Proliferacija alogenih T ćelija. DC tretirane WE, WE/PLGA, LPS-om i WE/PLGA+LPS, kokultivisane su sa alogenim T ćelijama u tri odnosa DC:T (1:5, 1:10 i 1:20). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti indeksa proliferacije $\pm$ SD. Statističke značajnosti su utvrđene jednofaktorskom analizom varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$

5.6.5. Ispitivanje uticaja dendritiskih ćelija *Dark Agouti* pacova tretiranih sa WE/PLGA na polarizaciju alogenih T ćelija

Sposobnost DC tretiranih sa WE/PLGA da polarizuju T ćelijski odgovor ispitana je analizom intracelularne ekspresije citokina IFN- γ , IL-17, IL-4 i IL-10 u CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijama iz ko-kultura sa DC. Dendritiske ćelije tretirane sa WE/PLGA u kokulturi sa alogenim T limfocitima izolovanim iz slezina AO pacova nisu pokazale potencijal da indukuju produkciju ispitivanih citokina u CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitima. Dendritiske ćelije stimulisane LPS-om imale su sposobnost da indukuju proizvodnju IFN- γ kako u CD4⁺, tako i u CD8⁺ T limfocitima. Međutim, DC tretirane WE/PLGA i naknadno stimulisane LPS-om nisu značajno uticale na proizvodnju IFN- γ . Nivoi intracelularne ekspresije IL-4, IL-10 i IL-17 pod uticajem različitih tretmana, nisu se značajno razlikovali u odnosu na ekspresiju pod uticajem netretiranih DC (Slika 21A). Kokultura DC i T limfocita nije podstakla ekspanziju regulatornih T ćelija, bez obzira na tretman kojim su bile podvrgnute DC. Uočena je povišena zatupljenost CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T ćelija u ko-kulturi sa WE/PLGA tretiranim DC, ali nije bila statistički značajna u poređenju sa kontrolnim DC (Slika 21B).



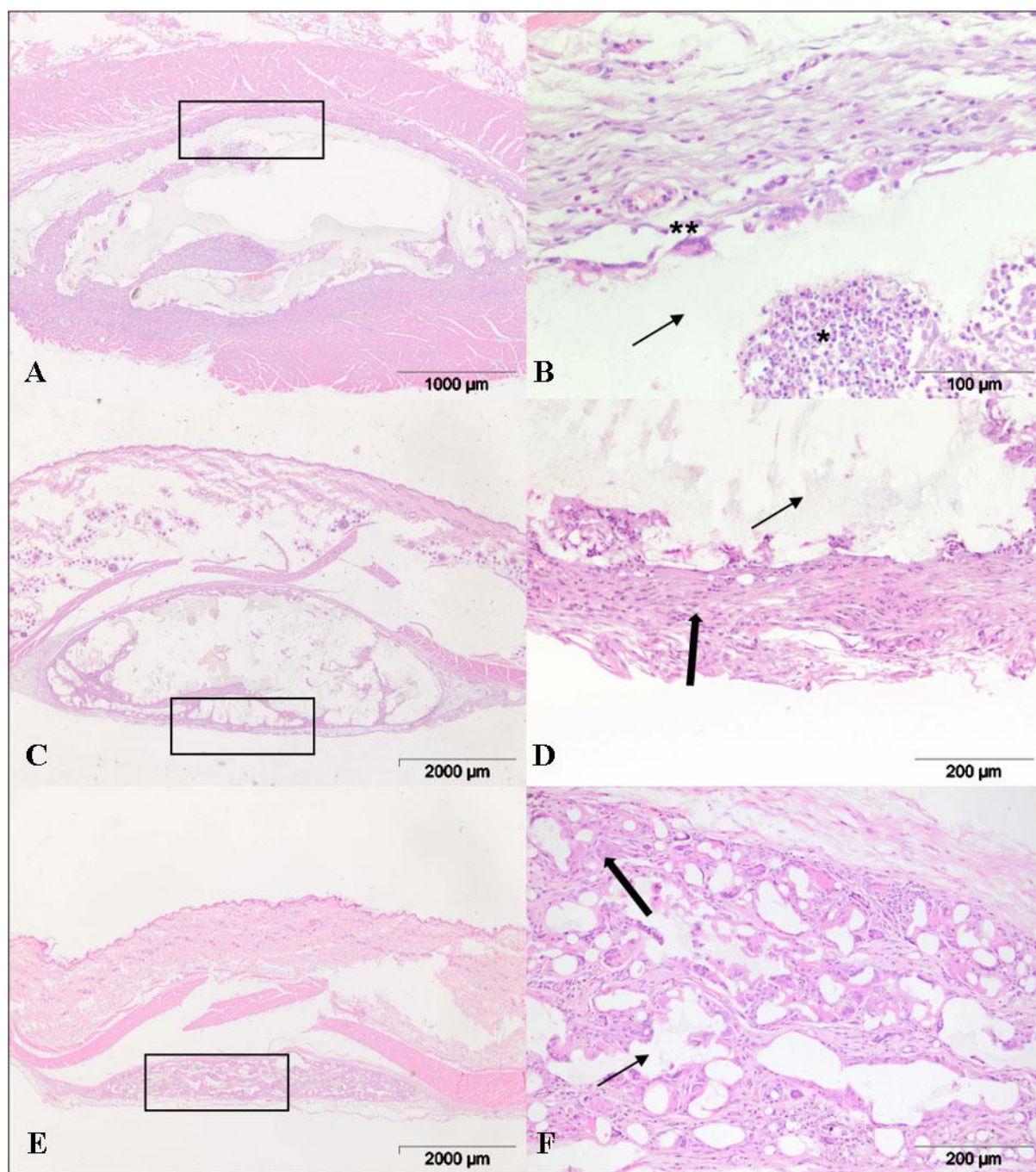
Slika 21. Intracelularna ekspresija citokina u T ćelijama kokultivisanim sa DC. Alogene T ćelije kokultivisane su sa netretiranim DC (kontrola), kao i WE, WE/PLGA, LPS, WE/PLGA + LPS tretiranim DC A) Intracelularna eksperija IFN- γ , IL-17, IL-4 i IL-10 u okviru CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijske populacije. B) Prikaz procentualnog udela CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u kokulturi netretiranih, kao i WE, WE/PLGA, LPS, WE/PLGA + LPS tretiranih DC i alogenih T limfocita. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm$ SD, * $p < 0,05$, označeno kao statistički značajna razlika (Kruškal-Valisov test sa Dunn-ovim testom višestrukog poređenja).

5.7. Ispitivanje uticaja PLGA nanovlakana na imunski sistem *Dark Agouti* pacova *in vivo*

5.7.1. Histološka analiza isečaka kože sa potkožnim tkivom

Isečak kože sa potkožnim tkivom u periimplantacionoj regiji ispitan je kod životinja kojima je samo implantiran nekonjugovan PLGA. Tokom prve nedelje, uočene su inflamatorne ćelije,

uključujući polimorfonuklearne (PMN) i džinovske ćelije (gigantociti). Međutim, do treće nedelje, PMN ćelije više nisu bile vidljive. Fibrozna kapsulacija primećena je oko implantata 7., 21. i 42. dana nakon implantacije. Do 42. dana ostala je manja količina fibroznog tkiva sa primesama PLGA. Tokom sva tri intervala, nije zabeleženo prisustvo eksudata, infekcije i nekroze tkiva (Slika 22).

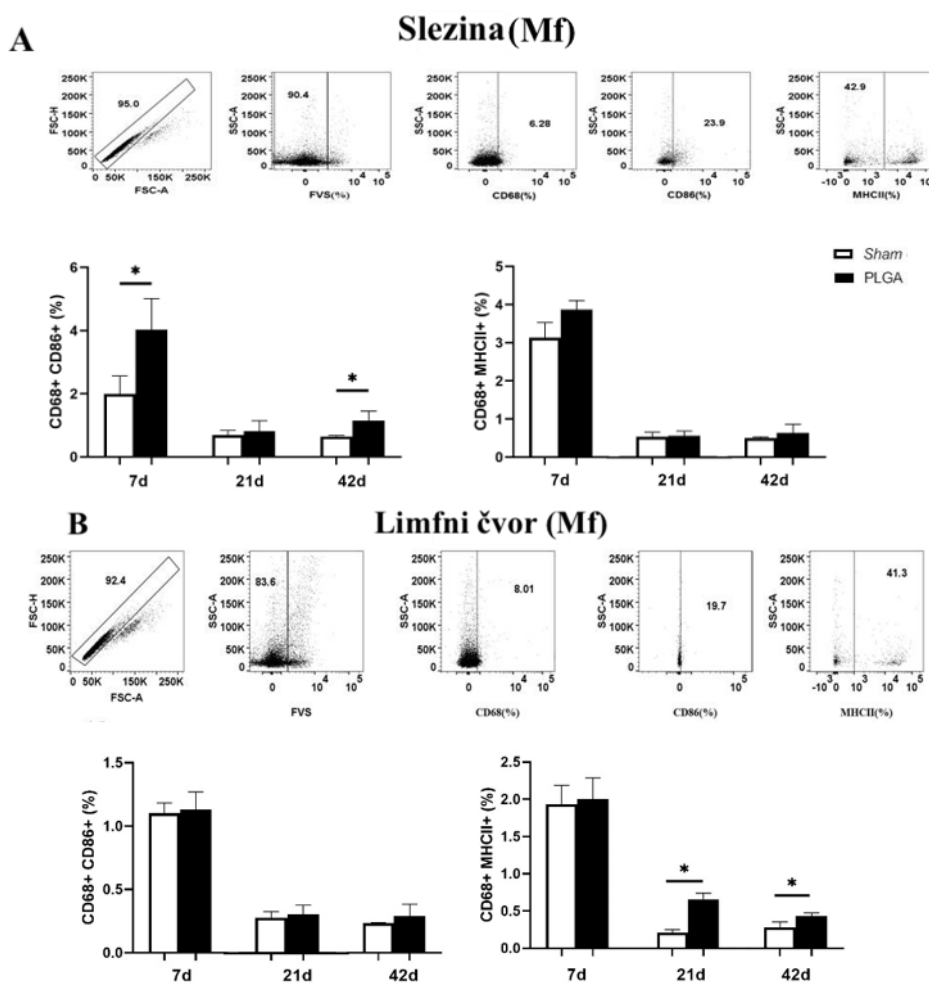


Slika 22. Isečci potkožnog tkiva sa PLGA implantatom obojeni hematoksilin eozinom. A, B) 7. dan; C, D) 21. dan; E, F) 42. dan. Deblje strelice obeležavaju vezivno tkivo, dok tanje označavaju prostore ispunjene PLGA nanomaterijalom. Na slici B inflamatorne ćelije obeležene su jednom zvezdicom, dok su gigantociti obeleženi sa dve.

5.7.2. Odgovor makrofaga slezine i limfnih čvorova *Dark Agouti* pacova nakon potkožne implantacije PLGA nanovlakana

Na nivou makrofaga slezine ($CD68^+$ ćelije) zapažena je značajna razlika u ekspresiji $CD86$ ko-stimulatornog molekula, 7. i 42. dana posle implantacije PLGA u odnosu na *sham* kontrole, dok se među grupama ne uočavaju značajne razlike u ekspresiji MHCII molekula na makrofagima (Slika 23A).

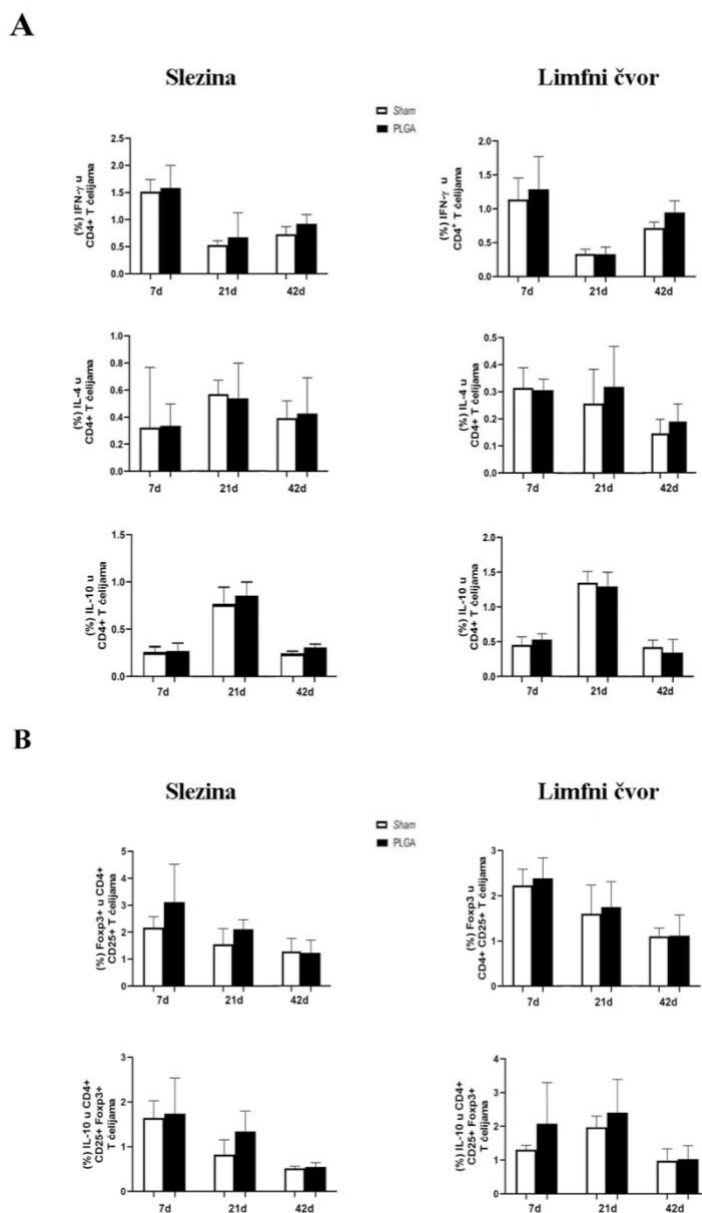
Analizom $CD68^+$ ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima utvrđeno je da makrofagi limfnih čvorova imaju značajno veću ekspresiju MHCII molekula 21. i 42. dana od implantacije PLGA u poređenju sa *sham* kontrolom, za razliku od ekspresije $CD86$ ko-stimulatornog molekula kod koje nije bilo razlike među grupama (Slika 23B).



Slika 23. Populacije makrofaga ($CD68^+$) u okviru ćelija slezina i limfnih čvorova kontrolne (*sham*) i tretirane grupe (PLGA) 7., 21., 42. dana nakon implantacije. A) Prikaz standardne strategije analize populacije makrofaga u okviru ćelija slezine; B) Ekspresija markera aktivacije makrofaga (MHCII i $CD86$) u okviru ćelija slezine; C) Prikaz standardne strategije analize populacije makrofaga u okviru ćelija limfnih čvorova; D) Ekspresija markera aktivacije makrofaga (MHCII i $CD86$) u okviru ćelija limfnih čvorova. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm$ SD; * $p < 0,05$, označeno kao statistički značajna razlika (one-way ANOVA korišćena kao statistički test).

5.7.3. Uticaj PLGA implantata na odgovor T ćelija slezina i limfnih čvorova kod *Dark Agouti* pacova

Analiza T ćelija slezina i limfnih čvorova nakon potkožne implantacije PLGA vršena je metodom protočne citometrije. Dobijeni rezultati ukazuju da ne postoji značajna razlika u produkciji citokina IFN- γ , IL-4 i IL-10 u okviru CD4⁺ i CD8⁺ populacije T ćelija slezina i limfnih čvorova između kontrolne i tretirane grupe, 7., 21., 42. dana posle implantacije PLGA. (Slika 24A). Analizom CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija nisu uočene razlike između *sham* i PLGA grupa. Takođe između grupa nije bilo razlike u intracelularnoj ekspresiji IL-10 u populaciji Treg u sva tri vremenska intervala (Slika 24B).



Slika 24. Analiza odgovora T ćelija slezina i limfnih čvorova, 7., 21., 42 dana nakon implantacije PLGA. A) Intracelularna ekspresija IFN- γ , IL-4 i IL-10 u CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijama slezina i limfnih čvorova, merena metodom protočne citometrije. B) Udeo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg i intracelularna ekspresija IL-10 u okviru te populacije ćelija.

6. DISKUSIJA

Efikasnost nekog terapeutika, pored njegovih karakteristika, zavisi i od raspoloživosti i trajanja dejstva na ciljnom mestu delovanja. Biomaterijali koji se koriste za dostavu terapeutika, kao što su u sprovednim istraživanjima PLGA nanovlakna, mogu da obezbede produženo oslobađanje terapeutika i njihovo zadržavanje u perifernim tkivima, a samim tim i mnogo veću mogućnost interakcije sa ciljnim ćelijama u tkivu (*Schudel* i sar., 2019). U ovom istraživanju ispitivana je efikasnost dostave imunomodulatornih komponenti *T. spiralis* – ESL1 produkata, putem PLGA nanovlakana na animalnom modelu multiple skleroze. Jedan od najčešće primenjivanih biorazgradivih polimera je PLGA, koji odlikuju izuzetne fizičko-hemijske osobine i mogućnost kontrolisanog oslobađanja leka (*Milošević* i sar., 2018; *Cappellano* i sar., 2019). Dobijeni rezultati ukazuju da PLGA nanovlakna predstavljaju efikasan sistem za produženo i kontrolisano oslobađanje ESL1. U prvoj fazi otpuštanje je difuziono kontrolisano, nakon čega sledi sporije otpuštanje povezano sa postepenom razgradnjom polimernog matriksa. Slični načini oslobađanja opisani su i za druge bioaktivne molekule inkorporirane u PLGA nanovlakna, gde kombinacija difuzije kroz polimer i njegove hidrolitičke degradacije omogućava dugotrajnu isporuku aktivne supstance (*Chou* i sar., 2015). Brzina oslobađanja ESL1 u ovom ispitivanju bila je nešto viša u poređenju sa prethodno posmatranim oslobađanjem model-leka, rodamina B (RhB) u PBS rastvoru (*Milošević* i sar., 2018). Produženo lokalno oslobađanje ESL1 može omogućiti održavanje stabilne koncentracije imunomodulatornog molekula tokom dužeg vremenskog perioda, čime se smanjuje potreba za ponovljenom primenom i potencijalno povećava terapijska efikasnost. Pokazano je da ESL1 produkti dostavljeni putem PLGA nanovlakana značajno ublažavaju kliničke manifestacije eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa, i to u manjoj koncentraciji nego što je postignuto višestrukom profilaktičkom intraperitonealnom administracijom ESL1 (*Radović* i sar., 2015). Profilaktička implantacija PLGA nanovlakana napunjenih ESL1 produktima dovela je do značajnog smanjenja incidencije bolesti, kao i pojave relapsa, dok su parametri koji govore o težini bolesti, kod životinja koje su razvile bolest, bili značajno niži u odnosu na kontrolne, EAE životinje.

Ključan preduslov za ostvarivanje imunomodulatornog dejstva ESL1 produkata jeste njihova interakcija sa mijeloidnim APC koje imaju centralnu ulogu u inicijaciji i regulaciji adaptivnog imunskog odgovora. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da mijeloidne APC (CD11b+MHC-II+ ćelije) predstavljaju dominantnu populaciju ćelija koja preuzima ESL1, a ranija istraživanja su pokazala da ESL1 poseduje potencijal da indukuje tolerogena svojstva DC (*Gruden-Movsesijan* i sar., 2011; *Ilić* i sar. 2018), kao i da moduliše postojeći fenotip DC (*Radović* i sar., 2015). Produkti ESL1 utiču na sposobnost prezentacije encefalitogenih antigena od strane APC i posledičnu polarizaciju imunskog odgovora, menjajući ekspresiju MHC II i kostimulatornih molekula, kao i i produkciju citokina. Takve promene mogu da dovedu do snižene aktivacije autoreaktivnih T limfocita, što rezultira ublažavanjem simptoma bolesti.

Analiza distribucije ESL1 produkata *in vivo* bila je omogućena obeležavanjem ESL1 fluorescentnom bojom. Pokazano je da se ESL1-FITC efikasno oslobađa iz PLGA nanovlakana i da se pri tome ne zadržava isključivo na mestu implantacije, već dospeva u regionalne limfne čvorove, gde je prisutan u mijeloidnim ćelijama. To je dokaz da lokalne mijeloidne ćelije preuzimaju ESL1 na mestu implantacije i migriraju u regionalne – cervikalne i aksilarne limfne čvorove, kao i u udaljene organe – Pejerove ploče, slezinu i CNS. Akumulacija ESL1-FITC⁺ mijeloidnih ćelija u cervikalnim limfnim čvorovima nakon indukcije EAE je od posebno značaja, s obzirom na ulogu ovih limfnih čvorova u aktivaciji T ćelija u EAE i MS (*Zwam* i sar., 2009a, 2009b; *Podkowa* i sar., 2016). Nagomilavanje ESL1-FITC⁺ mijeloidnih ćelija u Pajerovim pločama nakon indukcije EAE, odgovara rezultatima *Radojević* i sar. (2022), koji su pokazali da se prisustvo regulatornih mijeloidnih ćelija u Pejerovim pločama može dovesti u vezu sa ublažavanjem simptoma EAE i očuvanjem crevne barijere. Migracija ESL1⁺ mijeloidnih ćelija u Pajerove ploče sugerise da bi povoljno dejstvo ESL1 na ishod EAE moglo biti posledica suprimiranja inflamacije u crevima, očuvanja crevne barijere i

crevnog mikrobioma. Sve je više podataka koji ukazuju na ključnu ulogu ose crevo–mozak za regulaciju imunskog odgovora u MS i EAE (*Parodi i Kerlero de Rosbo*, 2021).

Prisustvo ESL1-FITC u infiltrirajućim CD11b+MHC-II+ mijeloidnim ćelijama kičmene moždine, ukazuje na njihovo moguće učešće u smirivanju inflamacije u ciljnom tkivu. Povećana migracija ESL1-FITC+ mijeloidnih ćelija ka drenažnim limfnim čvorovima nakon indukcije EAE mogla bi se objasniti EAE-indukovanom, kao i ESL1-indukovanom ekspresijom receptora CCR7 na mijeloidnim ćelijama (*Zhan i sar.*, 2013; *Worbs i sar.*, 2017; *Ilić i sar.*, 2018; *Brandum i sar.*, 2021). Biodistribucija dobijena u ovoj studiji može se objasniti kontinuiranim sistemom dostave ESL1 putem PLGA nanovlakana, jer potkožna aplikacija solubilnih ESL1 produkata dovodi do njihove brze eliminacije i ograničene dostupnosti imunskim ćelijama.

Tretman PLGA/ESL1 doveo je do značajnog sniženja produkcije citokina značajnih za patogenezu bolesti, kao što su IL-17 i IFN- γ , na sistemskom nivou, tj. na nivou slezinskih ćelija, u poređenju sa kontrolnom EAE grupom. Istovremeno dolazi do aktivacije antiinflamatornih i regulatornih mehanizama, koji se ogledaju u povećanoj produkciji IL-10 i ekspanziji Treg ćelija. ESL1 produkti imaju sposobnost da indukuju tolerogene humane DC, sa ograničenim kostimulatornim potencijalom i smanjenom sposobnošću da pokrenu Th1 i Th17 ćelijske odgovore, i istovremeno visokim potencijalom da indukuju povećanje broja i funkcionalnosti regulatornih T ćelija (Treg) (*Ilić i sar.*, 2018, 2021; *Cvetković i sar.*, 2020). Takođe je pokazano da *in vivo* aplikacija ESL1 tretiranih DC, poreklom od koštane srži DA pacova, dovodi do ekspanzije Treg u recipijentnim životinjama (*Gruden-Movsesijan i sar.*, 2011).

Pored toga, kod PLGA/ESL1 tretiranih DA pacova uočen je smanjen nivo IL-6, što dodatno ukazuje na supresiju inflamatornih procesa. Interleukin 6 ima centralnu ulogu u diferencijaciji Th17 ćelija i održavanju hronične inflamacije, a povećana ekspresija ovog citokina povezana je sa težinom bolesti u EAE i multiploj sklerozi. Povećana produkcija IL-4, citokina karakterističnog za Th2 odgovor, takođe može da suprimira oslobađanje Th1 citokina, kao što je IFN- γ . ESL1 produkti dovode do značajnog povećanja udela regulatornih i IL-10-produkujućih ćelija, što rezultira kreiranjem sredine u kojoj dominiraju antiinflamatorni i regulatorni mehanizmi koji obuzdavaju prekomernu inflamaciju. Takva promena citokinskog sastava verovatno predstavlja jedan od ključnih mehanizama odgovornih za smanjenje intenziteta bolesti i ublažavanje kliničkih manifestacija EAE kod životinja tretiranih PLGA/ESL1 implantatima.

Kliničko poboljšanje EAE kod životinja tretiranih PLGA/ESL1 implantatima bilo je praćeno značajnim promenama u intenzitetu inflamacije centralnog nervnog sistema, što je pokazano značajno manjim brojem infiltrata i infiltrirajućih imunskih ćelija u tkivu kičmene moždine EAE-PLGA/ESL1 grupe, u piku bolesti. Tretirane životinje su takođe imale manji stepen oštećenja mijelina što ukazuje na očuvanje integriteta mijelinskog omotača. Ovakav nalaz je u skladu sa već opisanim poboljšanjem kliničkog toka bolesti i podržava pretpostavku da ESL1 ograničava mehanizme odgovorne za nastanak oštećenja nerava.

Detaljnija analiza infiltrirajućih ćelija pokazala je da je tretman PLGA/ESL1 posebno uticao na populacije ćelija koje imaju ključnu ulogu u patogenezi EAE. Tokom pika bolesti zabeležen je značajno manji broj T limfocita, NK ćelija i CD68+ makrofaga u kičmenoj moždini tretiranih životinja. Aktivirani makrofagi i infiltrirajuće NK ćelije proizvode brojne proinflamatorne medijatore koji doprinose oštećenju tkiva, dok encefalitogene T ćelije predstavljaju centralne pokretače autoimunskog procesa. Stoga smanjena akumulacija ovih populacija u centralnom nervnom sistemu ukazuje na to da PLGA/ESL1 ograničava migraciju ili lokalnu ekspanziju inflamatornih ćelija u ciljnom organu. Naime, u prethodnim istraživanjima pokazano je da ESL1 produkti, primenjeni profilaktički u višestrukim dozama (500 μ g/po životinji), imaju sposobnost da umanje težinu kliničke slike EAE, indukujući antiinflamatorne i regulatorne mehanizme koji sprečavaju diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija u toku bolesti (*Radović i sar.*, 2015). Isti efekat bilo je moguće ponoviti i transferom DC tretiranih ESL1 produktima u prethodno imunizovane životinje (*Sofronić-Milosavljević i sar.*, 2013), što ukazuje na to da bi modulacija mijeloidnih ćelija, kao što su DC i makrofagi, mogla biti ključni mehanizam koji doprinosi tolerogenom potencijalu ESL1 u EAE modelu. *Zhan i sar.* (2013) su

pokazali da tretman miševa sa all-trans retinoičnom kiselinom moduliše funkciju DC *in vivo*, unutar drenažnih limfnih čvorova i slezine, što je bilo praćeno ublažavanjem simptoma EAE.

Analiza infiltrata kičmenih moždina DA pacova tretiranih PLGA/ESL1 implantatima ukazala je na značajno manji udeo IFN- γ i IL-17 produkujućih CD4⁺ T ćelija, kao i IFN- γ produkujućih CD8⁺ T ćelija, u piku bolesti. Ovi nalazi su u skladu sa promenama prethodno uočenim u slezini i ukazuju da tretman ne utiče samo na imunski odgovor na sistemskom nivou, već i na sastav efektorskih ćelija koje dospevaju u CNS. S obzirom na to da IFN- γ i IL-17 predstavljaju ključne medijatore neuroinflamacije i demijelinizacije u EAE, smanjenje njihove produkcije u kičmenoj moždini može značajno doprineti smanjenju oštećenja nervnog tkiva. Nasuprot tome, u kičmenoj moždini životinja tretiranih PLGA/ESL1 zabeležen je povećan udeo Treg ćelija tokom pika bolesti, kao i povećan udeo Th2 ćelija tokom faze remisije. Poznato je da Treg i Th2 ćelije imaju važnu ulogu u kontroli inflamatornih procesa putem produkcije imunoregulatornih citokina i inhibicije efektorskih Th1 i Th17 odgovora. Povećano prisustvo ovih ćelijskih populacija ukazuje da PLGA/ESL1 stvara okruženje koje doprinosi rezoluciji inflamacije.

Interesantno je da broj B ćelija u kičmenoj moždini nije bio promenjen, ali je njihova funkcija bila značajno izmenjena, što se ogleda u povećanom udelu IL-10-produkujućih B ćelija. Ovaj nalaz sugerise da terapijski efekat PLGA/ESL1 nije nužno povezan sa promenama u brojnosti svih imunskih populacija, već pre svega sa promenama njihovog funkcionalnog fenotipa. Naime, *Okada i sar.* (2018) su pokazali da ko-stimulacija TLR4 i CD40 sinergistički, povećava broj IL-10 produkujućih B ćelija kod pacijenata sa MS. S druge strane, angažovanje TLR2 na prečišćenim Treg ćelijama pokazalo se kao efikasan mehanizam za indukciju njihove proliferacije i funkcionalnosti (*Sutmuller*, 2006). Studija *Ilić i sar.* (2018) je pokazala da ESL1 reaguje sa TLR4 i TLR2 receptorima i da aktivira TLR4 i TLR2 signalne puteve, uz istovremeno povećanje ekspresije CD40.

Recirkulacija inflamatornih mijeloidnih ćelija u CNS ima presudnu ulogu u restimulaciji infiltriranih encefalitogenih T ćelija (*Sagar i sar.*, 2012), dok migracija regulatornih mijeloidnih ćelija u CNS korelira sa supresijom EAE (*Owens i sar.*, 2020; *Radojević i sar.*, 2022). Naime, pokazano je da regulatorne mijeloidne ćelije indukuju različite subpopulacije regulatornih B (*Knier i sar.*, 2018) i T ćelija u CNS-u (*Radojević i sar.*, 2022), kao i da suzbijaju proinflamatorne efekte NK i T ćelija (*Veglia i sar.*, 2021; *Bekić i Tomić*, 2023), čime doprinose rezoluciji bolesti.

Na osnovu svega navedenog, moguće je da aktivacija više imunomodulatornih mehanizama posredstvom ESL1 produkata doprinosi ublažavanju simptoma EAE nakon njihovog oslobađanja iz PLGA nanovlakana. Produženo otpuštanje ESL1 antigena iz PLGA implantata indukuje snažan tolerogeni odgovor, koji karakteriše smanjenje neuroinflamacije i povećanje regulatornih ćelijskih populacija. Ovaj dvostruki mehanizam – periferno usmeravanje imunskog odgovora i lokalna CNS zaštita – čini PLGA/ESL1 implantate obećavajućom strategijom za intervenciju kod relapsno-remitentne multiple skleroze, s tim što buduća istraživanja treba usmeriti na ispitivanje efikasnosti nakon početka bolesti, kao i njegove dugoročne efekte na neuroprotekciju i remijelinizaciju.

Ono što mora da prethodi korišćenju sistema isporuke lekova u tretmanu ljudi je ispitivanje interakcije biomaterijala, kao što su PLGA nanovlakna, sa biološkim sistemima. To podrazumeva, pored klasičnih testova toksičnosti, uticaj na imunske ćelije i imunski odgovor. Idealno, biomaterijali i njihovi raspadni produkti ne bi smeli da pokreću imunski odgovor. Za razliku od PLGA nanočestica, imunološka svojstva PLGA nanovlakana su znatno manje istražena, a prema trenutno dostupnim podacima, ne postoje studije koje bi opisale njihovu potencijalnu primenu u terapiji autoimunskih bolesti. Ipak, prethodna istraživanja ukazuju na to da PLGA nanovlakna poseduju visok potencijal u podsticanju ćelijskog rasta i procesu zarastanja rana, zahvaljujući svojim izraženim biomimetičkim osobinama koje oponašaju strukturu i funkciju ekstracelularnog matriksa (*Liu i sar.*, 2010; *Milošević i sar.*, 2020).

Hidrolizom, PLGA se razlaže do monomernih komponenti, glikolne i mlečne kiseline, koje se metabolišu u organizmu putem Krebsovog ciklusa, tako da je sistemski toksični uticaj raspadnih produkata minimalan. Iako je PLGA netoksična, akumulacijom raspadnih produkata polimera dolazi do promene pH vrednosti u okolini implantacije kao i mehaničke iritacije tkiva (*Zhao i sar.*, 2016). Pokazano je da mlečna kiselina koja nastaje u tumorima može da inhibira razvoj inflamatornih DC

(Gottfried i sar. 2006), a njena imunosupresivna svojstva su pokazana i u drugima studijama (Chereddy i sar., 2016; Baecher-Allan i sar., 2018). Pokazano je da mlečna kiselina egzogenog ili endogenog porekla modulira funkciju različitih populacija imunskih ćelija, uključujući dendritske ćelije, makrofage i limfocite (Caslin i sar., 2021).

Zbog toga su u ovoj disertaciji sprovedena ispitivanja uticaja raspadnih produkata PLGA na vijabilnost i funkcionalna svojstva imunskih ćelija *in vitro* i imunski odgovor *in vivo* na nivou slezina i limfnih čvorova. Raspadni produkti PLGA koji se nalaze u PLGA kondicioniranom sterilnom eksudatu (WE/PLGA) nisu ispoljili izražen citotoksični efekat na ćelije slezine, tj. ne utiču na vijabilnost i ukupnu apoptozu, u koncentracijama koje se mogu očekivati tokom razgradnje implantata *in vivo*.

Uticaj proizvoda razgradnje PLGA na imunske ćelije analiziran je u kulturi DC poreklom od ćelija dobijenih iz koštane srži DA pacova *in vitro* i kokulturi tako dobijenih DC sa alogenim T ćelijama. Rezultati su pokazali da tretman WE/PLGA ne dovodi do potpunog sazrevanja DC, što se ogleda u ekspresiji markera sazrevanja (MHCII, CD86 i CD90) i citokina (IL-12 i IL-10) koja je bila slična kontrolnim DC, i značajno niža u odnosu na zrele DC dobijene pod uticajem LPS-a. Ovaj nalaz sugerira da produkti razgradnje PLGA ne modulišu fenotip DC. Dobijeni rezultat dodatno podržava zaključak da imunomodulatorni efekti PLGA/ESL1 implantata u EAE modelu nisu posledica aktivacije DC od strane PLGA, već su posledica specifične interakcije ESL1 sa imunoskim sistemom. Dendritske ćelije tretirane WE/PLGA ne indukuju značajne promene u proliferaciji T ćelija, kao i produkciji citokina od strane T ćelija u ko-kulturi, u poređenju sa nezrelim kontrolnim DC, što ukazuje da produkti razgradnje PLGA sami po sebi ne pojačavaju njihov imunostimulatorni kapacitet.

Histološka analiza periimplantne regije kod životinja kojima je implantiran PLGA pokazala je tipičnu reakciju na strano telo, koju karakteriše prolazna akutna inflamatorna faza praćena formiranjem fibrozne kapsule u hroničnom toku procesa koja je perzistirala tokom svih vremenskih tačaka (7., 21. i 42. dan). Prisustvo fibrozne kapsule predstavlja tipičan odgovor tkiva na implantaciju biorazgradivih polimera kao što je PLGA i odražava proces izolacije inertnog stranog materijala od okolnog tkiva. Tokom čitavog perioda nisu zabeleženi znaci eksudacije, infekcije ili nekroze tkiva, što ukazuje na dobru biorazgradivost i biokompatibilnost PLGA nanovlakana u potkožnom tkivu. U ranoj fazi, tokom prve nedelje nakon implantacije, zabeleženo je prisustvo inflamatornih ćelija, uključujući polimorfonuklearne leukocite i multinuklearne gigantske ćelije, što predstavlja očekivanu reakciju tkiva na strano telo. Do treće nedelje nakon implantacije, uočen je nestanak neutrofilnih granulocita, što ukazuje na rezoluciju akutne inflamacije i prelazak u fazu hronične reparacije tkiva. Na kraju perioda posmatranja (42. dana) zabeleženo je samo prisustvo minimalnih ostataka fibroznog tkiva sa fragmentima PLGA, što je u skladu sa postepenom degradacijom materijala. Chor i sar. (2022) su opisali granulomatoznu reakciju nakon implantacije PLGA nanovlakana, koja je tokom vremena nestala. Ova reakcija bila je praćena infiltracijom epitelioidnih ćelija, limfocita, Langhansovih ćelija i multinuklearnih džinovskih ćelija, ali bez formiranja fibrozne kapsule.

Uticaj PLGA implantata na imunski sistem DA pacova ispitan je na nivou slezine i limfnih čvorova. Ustanovljeno je da se stanje populacije mijeloidnih ćelija (DC i makrofaga) u slezinama i limfnim čvorovima ne menja u različitim vremenima posmatranja u odnosu na *sham* kontrolu. Takođe je uočeno da ne dolazi do promene u intracelularnoj ekspresiji citokina IFN- γ , IL-4 i IL-10 u okviru CD4⁺ i CD8⁺ populacija T ćelija u slezinama i limfnim čvorovima pod uticajem PLGA, u odnosu na *sham* kontrolu. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da PLGA implantati nisu doveli do promena fenotipskih i funkcionalnih karakteristika imunskih ćelija slezine i limfnih čvorova u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na imunološku inertnost primenjenog nanomaterijala.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put pokazali da PLGA nanovlakna predstavljaju dobar sistem za kontrolisanu dostavu imunomodulatornih ESL1 produkata *in vivo*, koji imaju potencijal da spreče razvoj ili ublaže tok EAE. Sistem dostave ESL1 na bazi PLGA nanovlakana bio je u stanju da reguliše neuroinflamaciju, aktiviranjem regulatornih mehanizama koji modulišu funkciju patogenih populacija imunskih ćelija u slezinama i CNS-u. Iako je u ovoj studiji praćen profilaktički efekat PLGA/ESL1 implantata, dobijeni rezultati mogu biti osnov za razvoj novih

strategija za terapiju autoimunskih bolesti. U tu svrhu, dalja istraživanja biće orijentisana ka njihovoj terapijskoj primeni.

7. ZAKLJUČCI

1. Ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi soja ISS 161 *T. spiralis* uspešno su konjugovani sa PLGA nanovlaknima.
2. Praćenjem dinamike oslobađanja ESL1-FITC *in vitro* uočeno je da je približno 90% ESL1-FITC oslobođeno iz PLGA nanovlakana u sterilni eksudat tokom 42 dana praćenja, pri čemu je najintenzivnije oslobađanje zabeleženo u prvih 27 dana. Dugotrajno oslobađanje uočeno u ovom radu potvrđuje da PLGA nanovlakna predstavljaju pogodnu platformu za kontrolisanu isporuku ESL1.
3. Oslobođen ESL1-FITC iz PLGA nanovlakna lokalno preuzimaju mijeloidne APC, koje migriraju i distribuiraju ESL1 u regionalne limfne čvorove, slezinu, Pejerove ploče i kičmenu moždinu.
4. Implantati PLGA/ESL1 pokazali su protektivan efekat u modelu relapsno-remitentnog EAE. Primena PLGA/ESL1 implantata doprinela je manjem gubitku telesne mase i dovela je do značajnog ublažavanja kliničke slike EAE, koje se ogleda u značajno sniženim parametrima težine bolesti: kumulativni indeks, prosečna maksimalna vrednost težine bolesti, početak i trajanje bolesti. Incidencija EAE, kao i učestalost težih neuroloških manifestacija (pareza i paraliza), bila je snižena, dok je učestalost relapsa značajno redukovana u eksperimentalnoj grupi kojoj je aplikovan PLGA/ESL1.
5. Implantati PLGA/ESL1 poseduju imunomodulatorni potencijal na sistemskom nivou, ispitivanom na ćelijama slezine. Uočeno je da dolazi do ublažavanja inflamacije i usmeravanja imunskog odgovora ka antiinflamatornom i regulatornom tipu kod životinja kojima je implantiran PLGA/ESL1 i indukovani EAE, u poređenju sa EAE grupom. Zabeleženo je smanjenje produkcije citokina IFN- γ i IL-17, koji učestvuju u patogenezi bolesti, u CD4⁺ T ćelijama i NK ćelijama, kao i povećanje produkcije IL-10 u CD8⁺ T ćelijama, u piku bolesti. U fazi remisije značajan je porast udela CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg ćelija kod EAE-PLGA/ESL1 grupe.
6. Tretman PLGA/ESL1 smanjuje nivo IL-6 i inflamatorni odgovor na nivou slezinskih ćelija, uz povećanje IL-4 i IL-10, čime se imunski odgovor pomera ka antiinflamatornom i regulatornom profilu, što verovatno doprinosi blažem toku EAE.
7. Životinje tretirane PLGA/ESL1 pre indukcije EAE, poseduju značajno manji broj infiltrata i infiltrirajućih imunskih ćelija u ciljnom tkivu u piku bolesti u odnosu na EAE grupu, što sugeriše da implantati PLGA/ESL1 poseduju imunomodulatorni potencijal na nivou ciljnog organa – kičmene moždine.
8. Implantati PLGA/ESL1, na nivou ciljnog organa, u piku bolesti smanjuju infiltraciju CD4⁺ T ćelija koje proizvode IFN- γ i IL-17, kao i CD8⁺ T ćelija koje proizvode IFN- γ , a povećavaju udeo CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg ćelija. U fazi remisije značajno je uvećan udeo B ćelija koje proizvode IL-10, kao i CD4⁺ T ćelija koje proizvode IL-4.
9. Raspadni produkti PLGA nanovlakana ne ispoljavaju značajan citotoksični efekat i ne narušavaju vijabilnost ćelija slezine *in vitro*, u uslovima koji donekle oponašaju njihovu razgradnju *in vivo*. Takođe ne dovode do sazrevanja DC niti do promene u produkciji IL-12 i IL-10 u odnosu na kontrolne, nezrele DC. Ovako tretirane DC ne poseduju alostimulatorni kapacitet u ko-kulturi sa T ćelijama.
10. Kliničko poboljšanje toka i jačine EAE i izražena imunomodulacija, koja se ogleda u pomeranju imunskog odgovora sa proinflamatornog ka antiinflamatornom profilu na sistemskom i lokalnom nivou, zabeleženi su isključivo kod životinja tretiranih PLGA/ESL1 implantatima, dok primena samih PLGA nanovlakana nije dovela do ublažavanja bolesti, što ukazuje da je terapijski efekat posledica delovanja ESL1 produkata, a ne PLGA nosača.
11. Implantati PLGA, sami po sebi, nisu indukovali eksudaciju, inflamaciju i nekrozu tkiva na mestu implantacije, što ukazuje na njihovu dobru biorazgradivost i biokompatibilnost.

12. Implantati PLGA nisu doveli do promena fenotipskih i funkcionalnih karakteristika imunskih ćelija slezina i limfnih čvorova u poređenju sa *sham* kontrolom, što ukazuje na imunološku inertnost primenjenog nanomaterijala.
13. Nanovlakna PLGA su se pokazala kao dobar sistem za distribuciju imunomodulatornih ESL1 produkata u tretmanu EAE, što može biti osnov za razvoj novih strategija u terapiji autoimunskih bolesti.

8. LITERATURA

1. Anderton SM, Wraith DC. Immunological mechanisms underlying the therapeutic potential of tolerance induction in autoimmune disease. *Immunology* 2008, 123: 177–184.
2. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple sclerosis: Mechanisms and immunotherapy. *Neuron* 2018, 97: 742–768.
3. Bai X, Wang XL, Tang B, Shi HN, Boireau P, Rosenthal B, Wu XP, Liu MY, Liu XL. The roles of supernatant of macrophage treated by excretory-secretory products from muscle larvae of *Trichinella spiralis* on the differentiation of C2C12 myoblasts. *Veterinary Parasitology* 2016, 231: 83–91.
4. Bartunkova J, Kayserová J, Shoenfeld Y. Allergy and autoimmunity: Parallels and dissimilarity. The yin and yang of immunopathology. *Autoimmunity Reviews* 2009, 8: 302–308.
5. Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. *Journal of Immunology* 2007, 178: 1039–1047.
6. Bekić M, Tomić S. Myeloid-derived suppressor cells in the therapy of autoimmune diseases. *European Journal of Immunology* 2023, 53: e2250345.
7. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Storm TB, Oukka M, Weiner H, Kuchroo V. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006, 441: 235–238.
8. Bien J, Cabaj W, Moskwa B. Recognition of antigens of three different stages of the *Trichinella spiralis* by antibodies from pigs infected with *T. spiralis*. *Experimental Parasitology* 2013, 134: 129–137.
9. Bien J, Cabaj W, Moskwa B. Proteomic analysis of potential immunoreactive proteins from muscle larvae and adult worms of *Trichinella spiralis* in experimentally infected pigs. *Folia Parasitologica* 2015, 62: 1–8.
10. Bolás-Fernandez F, Del Corral Bezara L. TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science* 2006, 81: 297–303.
11. Brandum EP, Jørgensen AS, Rosenkilde MM, Hjortø GM. Dendritic cells and CCR7 expression: an important factor for autoimmune diseases, chronic inflammation, and cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22: 8340.
12. Bruschi F, Carulli G, Azzarà A, Homan W, Minnucci S, Rizzuti-Gullaci A, Sbrana S, Angiolini C. Inhibitory effects of human neutrophil functions by the 45-kD glycoprotein derived from the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *International Archives of Allergy and Immunology* 2000, 122: 58–65.
13. Bruschi F, Murrell KD. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgraduate Medical Journal* 2002, 78: 15–22.
14. Bruschi F, Ashour DS, Othman AA. *Trichinella*-induced immunomodulation: Another tale of helminth success. *Food and Waterborne Parasitology* 2022, 27: e00164.
15. Cappellano G, Comi C, Chiochetti A, Dianzani U. Exploiting PLGA-based biocompatible nanoparticles for next-generation tolerogenic vaccines against autoimmune disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20: 204.
16. Caslin HL, Ababayehu D, Pinette JA, Ryan JJ. Lactate is a metabolic mediator that shapes immune cell fate and function. *Frontiers in Physiology* 2021, 12: 688485.
17. Chereddy KK, Vandermeulen G, Pr  at V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair and Regeneration* 2016, 24: 223–236.

18. Chor A, Takiya CM, Dias ML, Gonçalves RP, Petithory T, Cypriano J, de Andrade LR, Farina M, Anselme K. In vitro and in vivo cell-interactions with electrospun poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA): Morphological and immune response analysis. *Polymers* 2022, 14: 4460.
19. Chou SF, Carson D, Woodrow KA. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. *Journal of Controlled Release* 2015, 220: 584–591.
20. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology* 2011, 164: 1079–1106.
21. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet* 2008, 372: 1502–1517.
22. Cvetković J, Ilić N, Gruden-Movsesijan A, Tomić S, Mitić N, Pinelli E, Sofronić-Milosavljević L. DC-SIGN signalling induced by *Trichinella spiralis* products contributes to the tolerogenic signatures of human dendritic cells. *Scientific Reports* 2020, 10:20283.
23. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 2012, 161: 505–522.
24. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, De Courten M, Matsoukas J, Apostolopoulos V. Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. *Brain Sciences* 2017, 7: 78.
25. Denkers EY, Wassom DL, Hayes CE. Characterization of *Trichinella spiralis* antigens sharing an immunodominant, carbohydrate-associated determinant distinct from phosphorylcholine. In *Molecular and Biochemical Parasitology* 1990, 41: 241–249.
26. Dijkstra CD, De Groot CJA, Huitinga I. The role of macrophages in demyelination. *Journal of Neuroimmunology* 1992, 40: 183–188.
27. Ding T, Sun J, Zhang P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alpha and IL-1beta at mRNA level. *Journal of Material Science. Material in Medicine* 2007, 18: 2233–2236.
28. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology* 2019, 26: 27–40.
29. Duong TT, Finkelman FD, Singh B, Strejan GH. Effect of anti-interferon-gamma monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. *Journal of Neuroimmunology* 1994, 53: 101–107.
30. Emanuel MB. Hay fever, a post-industrial revolution epidemic: a history of its growth during the 19th century. *Clinical & Experimental Allergy* 1988, 18: 295–304.
31. Fabre M, Beiting D, Bliss S, Appleton J. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Veterinary Parasitology* 2009, 159: 245–248.
32. Farber A, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with disrupted IFN γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of Immunology* 1996, 156: 5–7.
33. Fleming J, Isaak A, Lee J, Luzzio C, Carrithers M, Cook T, Field A, Boland J, Fabry Z. Probiotic helminth administration in relapsing–remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Multiple Sclerosis Journal* 2011, 17: 743–754.
34. Furlan R, Brambilla E, Ruffini F, Poliani PL, Bergami A, Marconi PC, Franciotta DM, Penna G, Comi G, Adorini L, Martino G. Intrathecal delivery of IFN- γ protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2001, 167: 1821–1829.
35. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, 15: 3640–3659.
36. Glamočlija S, Sabljčić L, Tomić S, Đokić J, Radulović N, Gruden-Movsesijan A, Kosanović M. *Trichinella spiralis* extracellular vesicles induce anti-inflammatory and regulatory immune responses in vitro. *International Journal for Parasitology* 2025, 55: 299–315.
37. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurologica Scandinavica* 2011, 124: 75–84.

38. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006, 107: 2013–2021.
39. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2009, 22: 127–145.
40. Grigoriadis N, van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European Journal of Neurology* 2015, 22: 3–13.
41. Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Mostarica-Stojković M, Stošić-Grujičić S, Milić M, Sofronić-Milosavljević L. *Trichinella spiralis*: Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Experimental Parasitology* 2008, 118: 641–647.
42. Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Colić M, Majstorović I, Vasilev S, Radović I, Sofronić-Milosavljević LJ. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2011, 34: 429–439.
43. Guiliano DB, Oksov Y, Lustigman S, Gounaris K, Selkirk ME. Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology* 2009, 39: 515–524.
44. Hara K, Tsujimoto H, Huang CC, Kawashima Y, Ando R, Kusuoka O, Tamura K, Tsutsumi M. Ultrastructural and Immunohistochemical studies on uptake and distribution of FITC-conjugated PLGA nanoparticles administered intratracheally in rats. *Journal of Toxicologic Pathology* 2012, 25: 19–26.
45. Holan V, Chudickova M, Trosan P, Svobodova E, Krulova M, Kubinova S, Sykova E, Sirc J, Michalek J, Juklickova M, Munzarova M, Zajicova A. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release* 2011, 156: 406–412.
46. Huang J, Zhou X, Shen Y, Li H, Zhou G, Zhang W, Zhang Y, Liu W. Asiaticoside loading into polylactic-co-glycolic acid electrospun nanofibers attenuates host inflammatory response and promotes M2 macrophage polarization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2020, 108: 69–80.
47. Ilić N, Gruden-Movsesijan A, Cvetković J, Tomić S, Vučević DB, Aranzamendi C, Colić M, Pinelli E, Sofronić-Milosavljević L. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products induce tolerogenic properties in human dendritic cells via toll-Like receptors 2 and 4. *Frontiers in Immunology* 2018, 9: 11.
48. Ilić N, Kosanović M, Gruden-Movsesijan A, Glamočlija S, Sofronić-Milosavljević L, Čolić M, Tomić S. Harnessing immunomodulatory mechanisms of *Trichinella spiralis* to design novel nanomedical approaches for restoring self-tolerance in autoimmunity. *Immunology Letters* 2021, 238: 57–67.
49. Ilić N, Bojić-Trbojević Z, Lundström-Stadelmann B, Cuić D, Mitić I, Gruden-Movsesijan A. Immunomodulatory components of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products with lactose-binding specificity. *EXCLI Journal* 2022, 21: 793–813.
50. Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 2009, 126: 18–27.
51. Kawakami N, Odoardi F, Ziemssen T, Bradl M, Ritter T, Neuhaus O, Lassmann H, Wekerle H, Flügel A. Autoimmune CD4+ T cell memory: Lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. *The Journal of Immunology* 2005, 175: 69–81.
52. Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infection and Immunity* 2002, 70: 5931–5937.
53. Knier B, Hiltensperger M, Sie C, Aly L, Lepennetier G, Engleitner T, Garg G, Muschaweckh A, Mitsdörffer M, Koedel U, Höchst B, Knolle P, Gunzer M, Hemmer B, Rad R, Merkler D, Korn T. Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity. *Nature Immunology* 2018, 19: 1341–1351.

54. Kosanović M, Cvetković J, Gruden-Movsesijan A, Vasilev S, Milanović S, Ilić N, Sofronić-Milosavljević L. *Trichinella spiralis* muscle larvae release extracellular vesicles with immunomodulatory properties. *Parasite Immunology* 2019, 41: e12665.
55. Lanzillo R, Bonavita S. Risk management in multiple sclerosis treatment. *Current Opinion in Neurology* 2016, 29: 269–275.
56. Liu SJ, Kau YC, Chou CY, Chen JK, Wu RC, Yeh WL. Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. *Journal of Membrane Science* 2010, 355: 53–59.
57. Lee Y, Kwon J, Khang G, Lee D. Reduction of inflammatory responses and enhancement of extracellular matrix formation by vanillin-incorporated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Engineering. Part A* 2012, 18: 967–1978.
58. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine* 2002, 8: 500–508.
59. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, Chen C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2009, 9: 325–341.
60. Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan CC, Caspi RR. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine* 2008, 205: 799–810.
61. Ma S, Feng X, Liu F, Wang B, Zhang H, Niu X. The pro-inflammatory response of macrophages regulated by acid degradation products of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Engineering in Life Sciences* 2021, 21: 709–720.
62. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 2003, 3: 733–744.
63. Maizels RM, Smith KA. Regulatory T cells in infection. *Advances in Immunology* 2011, 112: 73–136.
64. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016, 138: 666–675.
65. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011, 3: 1377–1397.
66. Matsuzaka Y, Yashiro R. Unraveling the immunopathogenesis of multiple sclerosis: the dynamic dance of plasmablasts and pathogenic T cells. *Biologics* 2023, 3: 232–252.
67. McKay DM. The therapeutic helminth? *Trends in Parasitology* 2009, 25: 109–114.
68. Milošević M, Stojanović D, Simić V, Miličević B, Radisavljević A, Uskoković P, Kojić M. A computational model for drug release from PLGA implant. *Materials* 2018, 11: 2416.
69. Milošević M, Stojanović DB, Simić V, Grković M, Bjelović M, Uskoković PS, Kojić M. Preparation and modeling of three-layered PCL/PLGA/PCL fibrous scaffolds for prolonged drug release. *Scientific Reports* 2020, 10: 11126.
70. Motomura Y, Wang H, Deng Y, El-Sharkawy RT, Verdu EF, Khan WI. Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clinical and Experimental Immunology* 2009, 155: 88–95.
71. Mostarica-Stojković M, Petrović M, Lukić ML. Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clinical and Experimental Immunology* 1982, 50: 311–317.
72. Okada Y, Ochi H, Fujii C, Hashi Y, Hamatani M, Ashida S, Kawamura K, Kusaka H, Matsumoto S, Nakagawa M, Mizuno T, Takahashi R, Kondo T. Signaling via toll-like receptor 4 and CD40 in B cells plays a regulatory role in the pathogenesis of multiple sclerosis through interleukin-10 production. *Journal of Autoimmunity* 2018, 88: 103–113.

73. Owens T, Benmamar-Badel A, Wlodarczyk A, Marczyńska J, Mørch MT, Dubik M, Arengoth DS, Asgari N, Webster G, Khorrooshi R. Protective roles for myeloid cells in neuroinflammation. *Scandinavian Journal of Immunology* 2020, 92: 12963.
74. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, 55: 329–347.
75. Parodi B, Kerlero de Rosbo N. The gut-brain axis in multiple sclerosis. Is its dysfunction a pathological trigger or a consequence of the disease? *Frontiers in Immunology* 2021, 12: 718220.
76. Patterson CC, Carson DJ, Hadden DR. Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989–1994: Low incidence in areas with highest population density and most household crowding. *Diabetologia* 1996, 39: 1063–1069.
77. Pender M. *Experimental autoimmune encephalomyelitis. Autoimmune Neurological Disease*. Edited by Pender MP, McCombe, Pamela A. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1995, pp. 26–88.
78. Peón AN, Ledesma-Soto Y, Olguín JE, Bautista-Donis M, Sciutto E, Terrazas LI. Helminth products potentially modulate experimental autoimmune encephalomyelitis by downregulating neuroinflammation and promoting a suppressive microenvironment. *Mediators of Inflammation* 2017, 2017: 8494572.
79. Podkowa A, Miller RJ, Motl RW, Fish R, Oelze ML. Focused ultrasound treatment of cervical lymph nodes in rats with EAE: A pilot study. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2016, 42: 2957–2964.
80. Radojević D, Bekić M, Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Dinić M, Bisenić A, Golić N, Vučević D, Đokić J, Tomić S. Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gut Microbes* 2022, 14: 2127455..
81. Radović I, Gruden-Movsesijan A, Ilić N, Cvetković J, Mojsilović S, Dević M, Sofronić-Milosavljević L. Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory–secretory antigens. *Immunologic Research* 2015, 61: 312–325.
82. Robinson MW, Connolly B. Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics* 2005, 5: 4525–4532.
83. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. In: *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 122, Elsevier 2014, pp. 173–189.
84. Rook GAW. The old friends hypothesis: evolution, immunoregulation and essential microbial inputs. *Frontiers in Allergy* 2023, 4: 1220481.
85. Sabljic L, Radulović N, Đokić J, Stojanović D, Radojević D, Glamočlija S, Dinić M, Golić N, Vasilev S, Uskoković P, Sofronić-Milosavljević L, Gruden-Movsesijan A, Tomić S. Biodegradable electrospun PLGA nanofibers-encapsulated *Trichinella spiralis* antigens protect from relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis and related gut microbiota dysbiosis. *International Journal of Nanomedicine* 2025, 20: 1921–1948.
86. Sadat SMA, Jahan ST, Haddadi A. Effects of size and surface charge of polymeric nanoparticles on in vitro and in vivo applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2016, 7: 91–108.
87. Saferding V, Blüml S. Innate immunity as a trigger of systemic autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 2020, 110: 102382.
88. Sagar D, Lamontagne A, Foss CA, Khan ZK, Pomper MG, Jain P. Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood-brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. *Journal of Neuroinflammation* 2012, 9: 245.

89. Saito E, Kuo R, Kramer KR, Gohel N, Giles DA, Moore BB, Miller SD, Shea LD. Design of biodegradable nanoparticles to modulate phenotypes of antigen-presenting cells for antigen-specific treatment of autoimmune disease. *Biomaterials* 2019, 222:119432.
90. Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and Immunity* 2007, 75: 397–407.
91. Schudel A, Francis DM, Thomas SN. Material design for lymph node drug delivery. *Nature Reviews Materials* 2019, 4: 415–428.
92. Sewell D, Qing Z, Reinke E, Eliot D, Winstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology* 2003, 15: 59–69.
93. Sharma R, Thompson PC, Hoberg EP, Scandrett WB, Konecsni K, Harms NJ, Kukka PM, Jung TS, Elkin B, Mulders R, Larter NC, Branigan M, Pongracz J, Wagner B, Kafle P, Lobanov VA, Rosenthal BM, Jenkins EJ. Hiding in plain sight: Discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *International Journal for Parasitology* 2020, 50: 277–287.
94. Sharp F, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan TD, Petrilli V, Tschopp J, O'Neill LAJ, Lavelle CE. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2009, 106: 870–875.
95. Sofronić-Milosavljević L, Radović I, Ilić N, Majstorović I, Cvetković J, Gruden-Movsesijan A. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Medical Microbiology and Immunology* 2013, 202: 239–249.
96. Sofronić-Milosavljević L, Ilić N, Pinelli E, Gruden-Movsesijan A. Secretory products of *Trichinella spiralis* muscle larvae and immunomodulation: Implication for autoimmune diseases, allergies, and malignancies. *Journal of Immunology Research* 2015, 2015: 523875.
97. Stošić-Grujičić S, Ramić Z, Bumbaširević V, Harhaji L, Mostarica-Stojković M. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clinical and Experimental Immunology* 2004, 136: 49–55.
98. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax* 2000, 55 Suppl 1(Suppl 1): S2–10.
99. Summers RW, Elliot DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005a, 54: 87–90.
100. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005b, 128: 825–832.
101. Suttmüller RPM. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation* 2006, 116: 485–494.
102. Takahashi Y, Mingyuan L, Komiya Y, Maruyama H, Nawa Y. *Trichinella spiralis*: antigenic substances associated with the stichocyte granules of the muscle larva. *Experimental Parasitology* 1989, 69: 408–414.
103. Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology Today* 1997, 13: 104–106.
104. Takahashi Y. In: Illustrated *Trichinella*. Gifu University Japan, 2023, p.16.
105. Van Epps HL. Thomas Rivers and the EAE model. *Journal of Experimental Medicine* 2005, 202: 4.
106. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology* 2021, 21: 485–498.
107. Ventola CL. The nanomedicine revolution: Part 2: Current and future clinical Applications. *P&T (Pharmacy and Therapeutics)* 2012, 37: 582–591.
108. Versini M, Jeandel PY, Bashir T, Bizzaro G, Blank M, Shoenfeld Y. Unraveling the hygiene hypothesis of helminthes and autoimmunity: Origins, pathophysiology, and clinical applications. *BMC Medicine* 2015, 13: 81.

109. Wagner RD, Johnson SJ, Danielsen ZY, Lim JH, Mudalige T, Linder S. Polyethylene glycol-functionalized poly (lactic acid-co-glycolic acid) and graphene oxide nanoparticles induce pro-inflammatory and apoptotic responses in *Candida albicans* infected vaginal epithelial cells. *PLoS ONE* 2017, 12: e0175250
110. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Annals of Neurology* 1994, 36: S47-53.
111. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008, 67 Suppl 3: iii56–60.
112. Willenborg DO, Staykova M, Fordham S, O'Brien N, Linares D. The contribution of nitric oxide and interferon gamma to the regulation of the neuro-inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 2007, 191: 16–25.
113. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2017, 17: 30–48.
114. Wu Z, Matsuo A, Nakada T, Nagano I, Takahashi Y. Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology* 2001, 123: 85–94.
115. Wu Z, Sofronić-Milosavljević L, Nagano I, Takahashi Y. *Trichinella spiralis*: Nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasites and Vectors* 2008, 1: 27.
116. Yang Y, Liu L, Liu X, Zhang YY, Shi H, Jia W, Zhu HF, Jia H, Liu M, Bai X. Extracellular vesicles derived from *Trichinella spiralis* muscle larvae ameliorate TNBS-induced colitis in mice. *Frontiers in Immunology* 2020, 11:1174.
117. Yoshida M, Babensee JE. Poly(lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2004, 71: 45–54.
118. Zacccone P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology* 2006, 28: 515–523.
119. Zhan X, Liu Y, Yang J, Wang G, Mu L, Zhang T, Xie X, Wang J, Liu Y, Kong Q, Li H, Sun B. All-trans-retinoic acid ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by affecting dendritic cell and monocyte development. *Immunology* 2013, 138: 333–345.
120. Zhao Y, Liu MY, Wang XL, Liu XL, Yang Y, Zou HB, Sun SM, Yu L, Rosenthal B, Shi HN, Boireau P, Wu XP. Modulation of inflammatory bowel disease in a mouse model following infection with *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology* 2013, 194: 211–216.
121. Zhao W, Li J, Jin K, Liu W, Qiu X, Li C. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C* 2016, 59: 1181–1194.
122. Zwam M, Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, Van Meurs M, Voerman JS, Biber KPH, Boddeke HWGM, Höpken UE, Meisel C, Meisel A, Bechmann I, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Laman JD, Boven LA. Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *Journal of Molecular Medicine* 2009a, 87: 273–286.
123. Zwam M, Huizinga R, Heijmans N, van Meurs M, Wierenga-Wolf AF, Melief M, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Boven LA, Laman JD. Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Pathology* 2009b, 217: 543–551.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Љиљана Сабљић

Број уписа 2018/5011

Изјављујем

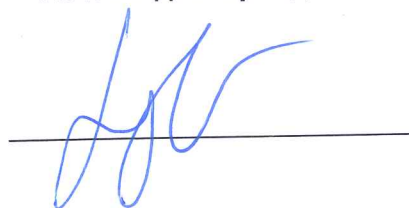
да је докторска дисертација под насловом

Испитивање новог начина апликације екскреторно-секреторних продуката мишићне ларве *Trichinella spiralis* у третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код *Dark Agouti* пацова

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

У Београду, 17.09.2026.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Љиљана Сабљић

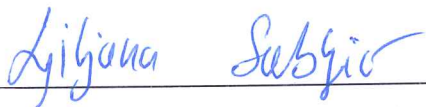
Број уписа 2018/5011

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада Испитивање новог начина апликације екскреторно-секреторних продуката мишићне ларве *Trichinella spiralis* у третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код *Dark Agouti* пацова

Ментор др Даница Богуновић, вандредни професор; др Алиса Груден-Мовсесијан-научни саветник

Потписани



изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.09.2026.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање новог начина апликације екскреторно-секреторних продуката мишићне ларве *Trichinella spiralis* у третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса код *Dark Agouti* пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.09.2026.



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

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

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

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

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

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