

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sofija J. Glamočlija Jekić

**IMUNOMODULATORNI EFEKAT
EKSTRACELULARNIH VEZIKULA L1 LARVI
TRICHINELLA SPIRALIS NA MODELU
RESPIRATORNE ALERGIJE KOD BALB/C
MIŠEVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sofija J. Glamočlija Jekić

**THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF
EXTRACELLULAR VESICLES FROM L1
LARVAE OF TRICHINELLA SPIRALIS ON A
RESPIRATORY ALLERGY MODEL IN BALB/C
MICE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

MENTORI

dr Maja Kosanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za primenu nuklearne energije – INEP

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

KOMISIJA

dr Marija Rakić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

dr Nataša Radulović, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

dr Alisa Gruden-Movsesijan, naučni savetnik

Institut za primenu nuklearne energije - INEP

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovan je u okviru Odeljenja za imunologiju i imunoparazitologiju na Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu, kao i u Institutu za specifičnu profilaksu i tropsku medicinu na Medicinskom Univerzitetu u Beču (Institute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine Medical University of Vienna) u Austriji. Istraživački rad sproveden je u okviru istraživačke teme pod nazivom „Izučavanje mehanizama imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti” (projekat br. 173047) pod rukovodstvom dr Alise Gruden-Movsesijan, finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, u okviru bilateralnog projekta „*Trichinella spiralis* oslobađa ekstracelularne vezikule: Da li se njima može modulisati imunski odgovor domaćina?“ naučne saradnje sa Austrijom (projekat br. 337-00-577/2021-09/41) i u okviru projekta „Razvoj antialergijskih intranazalnih kapi EVTRIS baziranih na ekstraćelijskim vezikulama iz *Trichinella spiralis*“ programa Dokaz koncepta Fonda za inovacionu delatnost Republike Srbije (projekat br. 5906) pod rukovodstvom dr Maje Kosanović.

ZAHVALNICA

Na ovom putu imala sam sreću da budem okružena prijateljima i kolegama koji su mi nesebično pružali podršku i učinili svaki korak lakšim. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Mentorki dr Maji Kosanović, na tome što me je uvela u svet ekstracelularnih vezikula, ali i na neiscrpnim idejama, posvećenosti, strpljenju i podršci tokom celokupnog istraživačkog i teorijskog rada. Majo, hvala ti što si mi otvorila vrata jednog novog naučnog univerzuma i bila mi vetar u leđa do samog kraja.

Mentorki dr Biljani Božić Nedeljković, zahvaljujem se na tome što me je još tokom osnovnih i master studija uvela u osnove imunologije, na ažurnosti, pomoći oko dokumentacije, kao i na dragocenim sugestijama koje su doprinele izradi disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Alisi Gruden-Movsesijan, na tome što je uvek nalazila vremena da me saslušava, ukazivala mi na važne aspekte istraživačkog rada, verovala u moj potencijal i pružala nesebičnu podršku kroz brojne savete i ideje koje su ovom radu dale oblik.

Dr Nataši Radulović zahvaljujem što me je naučila da eksperimente posmatram šire, analitičnije kao i da rezultate tumačim jasno i precizno, ističući njihov značaj u kontekstu celokupnog istraživanja. Njena podrška i saveti tokom pisanja publikacija i disertacije za mene su bili od neprocenjive vrednosti. Takođe se zahvaljujem dr Sergeju Tomiću, na stručnim savetima, podršci i konstruktivnim diskusijama koje su me motivisale da svaku temu sagledam dublje i temeljnije, kao što si uvek i naglašavao. Zahvaljujem se dr Jeleni Đokić na izuzetnoj pomoći tokom izvođenja eksperimenata, kao i na temeljnoj i efikasnoj obradi rezultata, bez koje moj prvi rad u okviru doktorske teze ne bi bio moguć.

Dr Liljani Sofronić-Milosavljević zahvaljujem se što mi je pružila priliku da radim u imunoparazitološkoj laboratoriji, i što mi je na taj način otvorila vrata ka izradi ove disertacije.

Želim da se zahvalim svojim kolegama i prijateljima iz laboratorije Marini, Ivani, Luki, Sanji, Dubravki, Zoranu, Saši i svim kolegama iz INEP-a, na pomoći, razumevanju i divnoj atmosferi tokom godina. Posebno sam zahvalna Ljilji, sa kojom sam tokom godina delila mnoge izazove i uspehe. Njena energija, entuzijazam i istrajnost u eksperimentalnom radu često su me podsticali da nastavim i kada je bilo najteže.

Zahvaljujem se Lani, Jovanki, Maji, Igoru i Milošu što su još tokom osnovnih studija delili sa mnom snove o velikim istraživanjima i ostavili nezaboravne uspomene.

Posebnu zahvalnost dugujem Borisu, što me je prihvatao sa svim mojim usponima i padovima tokom rada na disertaciji, bio oslonac kada je bilo najpotrebnije i što, uprkos svemu, i dalje želi da deli život sa mnom.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Njihova vera u mene i безусловna podrška i kroz sve godine školovanja činili su svaki moj uspeh potpunim.

Ovaj rad posvećujem svom bratu Vukašinu

Imunomodulatorni efekat ekstracelularnih vezikula L1 larvi *Trichinella spiralis* na modelu respiratorne alergije kod BALB/C miševa

SAŽETAK

Respiratorne alergije predstavljaju rastući zdravstveni problem i posledica su preteranog imunskog odgovora na bezopasne supstance iz spoljne sredine. Istraživanja su pokazala da helminti poput *Trichinelle spiralis* posredstvom ekskretorno sekretornih produkata larvi (ES L1) mogu da usmere imunski odgovor ka anti-inflamatornom i regulatornom i tako ublaže alergijom indukovanu inflamaciju. Nedavno je pokazano da ES L1 produkti sadrže ekstracelularne vezikule (EV), membranom ograničene pakete koje u ekstracelularni prostor oslobađaju sve vrste ćelija, zbog čega se definišu kao jedan od fundamentalnih mehanizama međućelijske komunikacije.

Cilj ove studije je da se ispituju morfološke karakteristike i imunomodulatorna svojstva EV *T. spiralis* (TsEV) u *in vitro* uslovima na humanim ćelijama i u *in vivo* uslovima na eksperimentalnom modelu respiratornih alergija. Rezultati glikokarakterizacije TsEV su potvrdili prisustvo specifičnih gliko-epitopa koji mogu da aktiviraju receptore prisutne na dendritskim ćelijama (DC). U *in vitro* uslovima TsEV su stimulisale diferencijaciju DC tolerogenog fenotipa koji se karakteriše ekspresijom gena uključenih u sazrevanje DC kao i niskom ekspresijom površinskih kostimulatornih molekula a povišenom ekspresijom tolerogenih markera, IDO-1 i ILT3. DC kultivisane u prisustvu TsEV su povećano produkovale IL-10 i TGF- β , regulatornih citokina, dok su u ko-kulturi sa alogenim T limfocitima stimulisale razvoj Th2, Tr1 i inducibilnih regulatornih FoxP3⁺ T ćelija. Opisana tolerogena svojstva DC ostala su očuvana čak i nakon izlaganja inflamatornom stimulusu.

U cilju ispitivanja terapijskog potencijala TsEV *in vivo* uslovima sprovedeno je istraživanje na BALB/c miševima sa respiratornom alergijom izazvanom ovalbuminom (OVA). Tretman ovih miševa je podrazumevao intranazalnu primenu TsEV i to u vidu ko-aplikacione primene (davanje TsEV u toku indukcije alergije) i vidu terapijske primene (davanje TsEV nakon indukcije alergije i pre ponovnog susreta sa OVA). Intranazalna primena TsEV značajno je smanjila prisustvo makrofaga, neutrofila i eozinofila i smanjila zastupljenost mukusa u disajnim putevima. Terapijski pristup davanja TsEV doveo je do smanjenja Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-13) i IgE specifičnih za OVA, i uticao na povećanu produkciju IL-10 na lokalnom ali i na sistemskom nivou. Pored toga, zabeležena je ekspanzija regulatornih T ćelija, FoxP3⁺ i Tr1, u plućima i slezini, što je dodatno doprinelo uspostavljanju anti-inflamatornog profila. Ova studija je po prvi put pokazala da TsEV ispoljavaju imunomodulatorni potencijal koji se može iskoristiti za snižavanje inflamacije u respiratornim alergijama te bi se mogle koristiti kao osnova za razvoj inovativnih platformi za tretman respiratornih alergija.

Ključne reči: *Trichinella spiralis*, ES L1, ekstracelularne vezikule, TsEV, respiratorne alergije, dendritske ćelije, regulatorni T limfociti

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj:

The immunomodulatory effect of extracellular vesicles from L1 larvae of *Trichinella spiralis* on a respiratory allergy model in BALB/C mice

ABSTRACT

Respiratory allergies represent a growing health concern, stemming from an exaggerated immune response to otherwise harmless environmental substances. Research has shown that helminths such as *Trichinella spiralis* can direct immune responses toward the anti-inflammatory and regulatory profile through their excretory-secretory (ES L1) products, thus reducing allergic inflammation. Recently, it has been demonstrated that ES L1 products contain extracellular vesicles (EV), membrane-bound packages released by all cell types into the extracellular space, hence considered fundamental mediators of intercellular communication.

The aim of this study was to investigate the morphological characteristics and immunomodulatory properties of *T. spiralis*-derived EV (TsEV) under *in vitro* conditions using human cells, as well as *in vivo* using an experimental model of respiratory allergy. Glycan characterization of TsEV confirmed the presence of specific glycoepitopes which are capable of activating receptors expressed on dendritic cells (DCs). *In vitro* experiments showed that TsEV induced the development of a tolerogenic DC phenotype, as evidenced by the expression of genes involved in DC maturation, low expression of costimulatory surface molecules, and increased expression of tolerogenic markers IDO-1 and ILT3. TsEV-treated DCs exhibited increased production of IL-10 and TGF- β cytokines and promoted the differentiation of Th2 cells, FoxP3⁺ inducible regulatory T cells, and Tr1 cells when cocultured with allogeneic T lymphocytes. Importantly, these tolerogenic properties of DCs were preserved even after exposure to an inflammatory stimulus.

To evaluate the therapeutic potential of TsEV *in vivo*, experiments using BALB/c mice with experimental ovalbumin (OVA)-induced respiratory allergy were conducted. Intranasal TsEV treatment was assessed in a co-application model (TsEV applied during allergy induction) as well as in a therapy model (TsEV applied after allergy induction but prior to allergen re-challenge). Intranasal application of TsEV significantly reduced the presence of macrophages, neutrophils, and eosinophils, as well as mucus accumulation in the airways. The therapeutic approach led to decreased levels of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) and OVA-specific IgE, alongside increased IL-10 production at both local and systemic levels. Furthermore, an expansion of regulatory T cells, including FoxP3⁺ and Tr1 subsets, was observed in the lungs and spleen, contributing to the establishment of the anti-inflammatory profile.

This study is the first to demonstrate that TsEV possess immunomodulatory properties capable of reducing inflammation in respiratory allergies, suggesting their potential to serve as a foundation for the development of innovative therapeutic platforms aimed at treating respiratory allergies.

Key words: *Trichinella spiralis*, ES L1, extracellular vesicles, TsEV, respiratory allergies, dendritic cells, regulatory T lymphocytes

Research area: Biology

Area of special interest: Immunobiology

UDC number:

LISTA SKRAĆENICA

7C2C5Ag - 7C2C5 antigen *T. spiralis* izolovan na 7C2C5 koloni

ANOVA - analiza varijanse (engl. Analysis of variance)

APC - antigen prezentujuće ćelije (engl. Antigen Presenting Cells)

BSA - goveđi serum albumin (engl. Bovine Serum Albumin)

CCR - hemokinski receptor (engl. C-C chemokine receptor)

CD - klaster diferencijacije (engl. Cluster of Differentiation)

cDC - konvencionalne dendritske ćelije (engl. Classical Dendritic Cells)

cDNK - komplementarna DNK (engl. Complementary DNK)

ConA - konkanavalin A (engl. Concanavalin A)

DC - dendritske ćelije (engl. Dendritic Cells)

DC-SIGN - (engl. DC-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin)

DMEM – (engl. Dulbeccos Modified Eagles Medium)

DMSO – dimetil sulfoksid

EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

ELISA - enzimski imunotest (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ES L1 - ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi *Trichinella spiralis*

EV- ekstracelularne vezikule

FBS - fetalni goveđi serum (engl. Fetal Bovine Serum)

FCS - fetalni serum teleta (engl. Fetal Calf Serum)

FcεRI - visoko-afinitetni IgE-receptor (engl. High Affinity Receptor for Immunoglobulin E)

FITC - fluorescein izocijanat (engl. Fluorescein isothiocyanate)

Foxp3 – (engl. Forkhead Box P3)

GalNAc - N-acetilgalaktozamin

GlcNAc - N-acetilglukozamin

GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

HEK ćelije - humane embrionalne ćelijske linije bubrega (engl. human embryonic kidney cells – HEK cells)

HLA - humani leukocitni antigen (engl. Human Leucocyte Antigen)

HSP - proteini toplotnog šoka (engl. Heat Shock Proteins)

ICAM – unutarćelijski adhezivni molekul (engl. Intracellular Adhesion Molecule)

IDO - indoleamin 2,3-dezoksigenaza (engl. Indoleamine 2,3-dioxygenase)

IFN - interferon

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

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

ILT - receptor koji se odlikuje po domenu sličnom imunoglobulinima (engl. Immunoglobulin Like Transcript receptor)

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

LPS - lipopolisaharid

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

MS - multipla skleroza

MVB- multivezikularno telo (engl. Multivesicular body)

NF-κB - nuklearni faktor κB (engl. Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells)

NK - urođenoubilačke ćelije (engl. Natural Killer cells)

NLR - receptori slični nukleotid-vezujućem proteinu koji sadrži oligomerizacioni domen (engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing protein (NOD)-Like Receptors)

NO - azot oksid (engl. Nitric Oxide)

OVA -ovalbumin

PAMP - molekulski obrasci patogena (engl. Pathogen-Associated Molecular Patterns)

PBMC - mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS - fosfatni pufer sa dodatkom soli (engl. Phosphate Buffered Saline)

PCR - polimerazna lančana reakcija (engl. Polymerase Chain Reaction)

pDC - plazmocitoidne dendritske ćelije (engl. Plasmacytoid Dendritic Cells)

PD-L1 - ligand proteina 1 programirane ćelijske smrti (engl. Programmed cell Death Ligand 1)

PE – fikoeritrin (engl. Phycoerythrin)

PerCP - peridinin-hlorofil protein (engl. Peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5)

RNK - ribonukleinska kiselina

RPMI - engl. Roswell Park Memorial Institute 1640

RT-PCR - reakcije polimerizacije lanaca u realnom vremenu (engl. Real-Time Polymerase Chain Reaction)

TCR - T-ćelijski receptor (engl. T-Cell Antigen Receptor)

TGF- β - transformišući faktor rasta-beta (engl. Transforming Growth Factor- β)

Th - pomoćničke T ćelije (engl. T helper cells)

TLR - receptori slični Toll-u (engl. Toll-Like Receptors)

TNF- α - faktor nekroze tumora (engl. Tumour Necrosis Factor)

tolDC - tolerogene dendritske ćelije (engl. Tolerogenic Dendritic Cells)

Treg - regulatorni T limfociti (engl. Regulatory T cells)

T.spiralis – *Trichinella spiralis*

TSLP - limfopoetin strome timusa (engl. Thymic Stromal Lymphopoietin)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Globalna zastupljenost alergija	2
1.2. Nastanak respiratornih alergija.....	4
1.3. Imunski odgovor u osnovi respiratornih alergija.....	5
1.3.1. Dendritske ćelije.....	11
1.3.2. Regulatorni imunski odgovor	15
1.4. Terapije	17
1.4.1. Terapije farmakološkim lekovima	17
1.4.2. Anti-IgE antitela	21
1.4.3. Alergen-specifične imunoterapije.....	21
1.5. Terapije parazitima i parazitskim antigenima	22
1.5.1. Higijenska hipoteza	22
1.5.2. Imunski odgovor na helmintske parazite	23
1.6. <i>Trichinella spiralis</i>	24
1.6.1. Životni ciklus.....	24
1.6.2. Antigeni parazita <i>T.spirallis</i>	27
1.7. Ekstracelularne vezikule	29
1.7.1. Biogeneza i podela.....	29
1.7.2. Fizičko-hemijske karakteristike i sastav EV	31
1.7.3. Interakcija EV i ciljnih ćelija.....	33
1.7.4. Uloga EV u međućelijskoj komunikaciji između različitih organizama	35
1.7.4.1. Imunomodulatorna uloga EV parazitskih helminata.....	36
2. CILJEVI.....	38
3. MATERIJALI I METODE	40
3.1. Eksperimentalne životinje	41
3.2. Održavanje soja <i>T. spiralis</i>	41
3.3. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) <i>T. spiralis</i>	41
3.4. Priprema ES produkata L1 larvi <i>T. spiralis</i>	42
3.6. Izolovanje i karakterizacija TsEV	42
3.6.1. Izolovanje TsEV	42
3.6.2. Analiza praćenja nanočestica	42
3.6.3. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)	43

3.6.4.	Glikokarakterizacija TsEV	43
3.7.	<i>In vitro</i> diferencijacija monocita periferne krvi u DC	45
3.7.1.	Izolacija humanih ćelija	45
3.7.2.	Kultivacija i stimulacija DC.....	46
3.7.3.	Ko-kultivacija DC sa naivnim T limfocitima	46
3.7.4.	Izolovanje RNK.....	47
3.7.5.	Reverzna transkripcija (RT) i polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qPCR).....	48
3.8.	Ispitivanje potencijala TsEV da smanje respiratornu alergiju <i>in vivo</i>	49
3.8.1.	Aplikacija TsEV zdravim miševima	49
3.8.2.	Indukcija respiratorne alergije kod BALB/c miševa i tretman sa TsEV.....	50
3.8.3.	Ispitivanje potencijala TsEV da smanje respiratornu alergiju	50
3.8.4.	Karakterizacija ćelija prisutnih u bronhoalveolarnom lavažu.....	51
3.8.5.	Priprema tkiva pluća za histološku analizu	52
3.8.6.	Određivanje prisustva inflamatornih ćelija i mukusa u plućima.....	52
3.8.7.	Izolovanje i gajenje ćelija iz pluća.....	53
3.8.8.	Izolovanje i gajenje ćelija iz slezine.....	54
3.8.9.	Određivanje nivoa OVA specifičnih antitela u serumu.....	55
3.9.	Fenotipska karakterizacija ćelija protočnom citometrijom.....	55
3.10.	Određivanje koncentracije citokina ELISA testa	57
3.11.	Statistička obrada podataka.....	57
4.	REZULTATI	58
4.1.	Karakterizacija TsEV	59
4.1.1.	Morfologija, veličina i koncentracija TsEV.....	59
4.1.2.	Glikozilacija TsEV.....	59
4.2.	TsEV pokazuju imunomodulatorne efekte u modelu humanih DC <i>in vitro</i>	62
4.2.1.	TsEV utiču na diferencijaciju i sazrevanje DC	62
4.2.2.	TsEV utiču na promenu ekspresije gena za maturaciju DC.....	66
4.2.3.	DC tretirane sa TsEV ograničavaju proliferaciju alogernih T ćelja	68
4.2.4.	DC tretirane sa TsEV utiču na produkciju anti-inflamatornih citokina u ko-kulturi sa alogernim T ćelijama	69
4.2.5.	DC tretirane sa TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija	72
4.3.	TsEV smanjuju inflamaciju u <i>in vivo</i> modelu respiratorne alergije kod miševa	75
4.3.1.	TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija u plućima zdravih miševa	75
4.3.2.	TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija u slezinama zdravih miševa	80

4.4. TsEV tretman utiče na smanjenje prisustva inflamatornih ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom	81
4.4.1. TsEV tretman smanjuje ekspresiju inflamatornih citokina i povećava ekspresiju anti-inflamatornih citokina i regulatornih T ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom	85
4.5. TsEV menjaju citokinski profil ćelija pluća i ćelija slezine kod miševa sa indukovanom respiratornom alergijom	87
4.6. TsEV tretman smanjuje nivo OVA-specifičnih antitela u serumu miševa sa indukovanom respiratornom alergijom	90
5. DISKUSIJA	92
6. ZAKLJUČCI	103
7. LITERATURA	106

1. UVOD

1.1. Globalna zastupljenost alergija

Alergije su poremećaji imunskog odgovora koji dovode do povećane osetljivosti organizma na određene nepatogene strane supstance, poznate kao alergeni. Svaka nepatogena strana supstanca koja izaziva povećan odgovor imunskog sistema i podstiče proizvodnju antitela specifičnih za nju naziva se alergenom. Najčešći izvori alergena su: grinje u kućnoj prašini, polen, životinjska dlaka, mikrogljive, hrana (posebno mleko, jaja, pšenica, soja, morski plodovi, voće i orašasti plodovi), ubodi osa i pčela, određeni lekovi, lateks, hemikalije za domaćinstvo [1]. Alergija podrazumeva reakciju rane preosetljivosti tj. tip 1. Ovaj tip preosetljivosti započinje jako brzo, u roku od nekoliko minuta nakon ponovnog kontakta sa alergenom kod osoba koje su prethodno bile izložene istom alergenu (rana) i prouzrokuje patološke posledice po sopstveno tkivo tih osoba (preosetljivost) [2]. Nakon prvobitne reakcije dolazi do nastanka niza drugih inflamatornih komponenti koje učestvuju u drugoj fazi koja se naziva kasnom reakcijom. Ove reakcije se nazivaju alergije ili atopije a bolesti do kojih dovode se nazivaju alergijske, atopijske ili bolesti rane preosetljivosti. Alergije uključuju različite simptome kao što su kijanje, osip, oticanje, respiratorne smetnje, gastrointestinalne probleme ili čak ozbiljan anafilaktički šok u težim slučajevima [3,4].

Prema targetiranim tkivima alergije se mogu se klasifikovati u nekoliko osnovnih vrsta [5]:

1. Respiratorne alergije: uključuju alergijski rinitis (alergiju na prašinu, polen, kućnu prašinu itd.) i astmu izazvanu alergenima (poput prašine, grinje, dlaka kućnih ljubimaca).
2. Dermatološke alergije: obuhvataju reakcije na koži poput ekcema, kontaktnog dermatitisa ili urtikarije/koprivnjače koje se javljaju usled dodira s alergenima kao što su određeni materijali (lateks, metal itd.), sapuni ili biljke.
3. Očne alergije: uključuju alergijski konjunktivitis koji može izazvati svrab, crvenilo i suženje očiju, obično usled reakcije na alergene kao što su polen, prašina ili dlake kućnih ljubimaca.
4. Ostale alergije:
 - 4.1. Alergije na određene vrste hrane poput alergije na proizvode životinjskog porekla, kao i orašaste plodove, što može izazvati gastrointestinalne simptome poput dijareje, povraćanja ili bolova u stomaku
 - 4.2. Alergije na ujede insekata mogu izazvati lokalni svrab i otok. U nekim slučajevima, ove alergije mogu dovesti do anafilaktičkog šoka, koji može izazvati reakcije širom tela, kao što su otežano disanje, oticanje lica i usana, pad krvnog pritiska i gubitak svesti.

Osoba može istovremeno imati više vrsta alergija i ozbiljnost simptoma može varirati od blagih iritacija do po život opasnog anafilaktičkog šoka [6].

Alergije pogađaju od 30 do 40% svetske populacije, pri čemu zastupljenost i kompleksnost alergijskih bolesti nastavlja da raste [7]. Svake godine broj ljudi koji pati alergije se povećava, pri čemu su istraživanja pokazala da je između 1926-2017 došlo do porasta zastupljenosti atopijskog dermatitisa kod muškaraca od 0,15% 1926. do 2,9% u 2017. godini [8]. Na osnovu istraživanja Svetske organizacije za alergije 5,12% svetske populacije ima alergijski rinitis, 3,8% ljudi pati od astme i 2,88 – 3,2% ima alergiju na supstance u hrani [9,10].

Respiratorne alergije, poput astme i alergijskog rinitisa, predstavljaju najčešći oblik alergija, čija zastupljenost stalno raste, posebno u zemljama s razvijenom industrijom. Učestalost alergijskog rinitisa u ekonomski razvijenim zemljama se povećala za 2-3% u poslednje tri decenije, kod dece čak 15-30%, dok je kod odraslih ljudi 2-10% [11]. Respiratorne alergije predstavljaju globalni zdravstveni problem koji ugrožava normalan način života tako što otežavaju disanje, remete san, ometaju obavljanje osnovnih dnevnih aktivnosti i smanjuju sposobnost za fizičku aktivnost i rad [12].

1.2. Nastanak respiratornih alergija

Mehanizam nastanka respiratornih alergija još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali dosadašnja istraživanja ukazuju na to da su one rezultat kombinacije genetske predispozicije i izloženosti raznim faktorima sredine. Ovi faktori mogu ometati pravilan razvoj tokom detinjstva i oblikuju imunski odgovor na način koji vodi nastanku alergija [13]. Istraživanja su pokazala da zastupljenost nastanka alergija zavisi od više različitih gena (Tabela 1.) [2].

Tabela 1. Geni odgovorni za razvoj alergija

Geni i molekuli koji utiču na razvoj alergija	Uloga u imunskom odgovoru kod alergija
Genski klaster citokina (IL-4, IL-5, IL-13), CD14, β 2-adrenergički receptor	IL-4 i IL-13 omogućavaju promenu klase u IgE, IL-5 stimuliše aktivaciju i povećano stvaranje eozinofila, CD14 je deo LPS receptora koji kroz interakciju sa TLR4 utiču na ostvarivanje balansa između Th1 i Th2 imunskog odgovora na antigene; β 2-adrenergički receptor reguliše kontrakciju glatkih mišića bronhija
MHC molekuli II klase	Određeni aleli mogu da regulišu T ćelijski odgovor na alergene
Fc ϵ RI β lanac	Reguliše aktivaciju mast ćelija
Faktor stem ćelija, IFN- γ , STAT6	Faktor stem ćelija utiče na rast i diferencijaciju mast ćelija, IFN- γ modulira dejstvo IL-4 citokina, STAT6 omogućava signalnu transdukciju IL-4
α lanac receptora za IL-4 citokin	Deo subjedinice receptora za citokine IL-4 i IL-13
ADAM33	Metaloproteinaza koja učestvuje u remodelovanju respiratornih puteva
Citokin IL-33 i njegov receptor	IL-33 indukuje otpuštanje Th2 citokina kod T limfocita, mast ćelija, eozinofila i urođenih limfoidnih ćelija (engl. Innate lymphoid cells, ILC)
Fosfodiesteraza 4D	Reguliše kontrakciju glatkih mišića disajnih puteva
TSLP	Aktivacija kožnih dendritskih ćelija (Langerhansovih ćelija)

Izloženost sredinskim uticajima može da deluje sinergistički sa različitim genetskim predispozicijama i na taj način sredinski faktori značajno utiču na nastanak alergija. Pod uticajem sredine spadaju izloženost alergenima, infektivnim agensima i drugim faktorima koji utiču na mukoznu barijeru kao što su npr. različite čestice zagađivača u vazduhu [14]. Istraživanja pokazuju da su deca koja odrastaju u urbanim sredinama, gde su često izložena zagađivačima poput izduvnih gasova i duvanskog dima, sklonija razvoju respiratornih alergija. S druge strane, deca koja odrastaju u ruralnim područjima imaju nižu stopu nastanka respiratornih alergija, što može biti povezano s manjim izlaganjima urbanim zagađivačima i životu u drugačijem imunskom okruženju [15,16]. Jedno od mogućih objašnjenja za povećanu učestalost astme i drugih atopijskih bolesti u ekonomski razvijenim zemljama leži u nižem nivou izloženosti infektivnim agensima, što je osnova tzv. higijenske hipoteze. Ova hipoteza sugerira da nedostatak ranih infekcija tokom detinjstva može ometati normalno

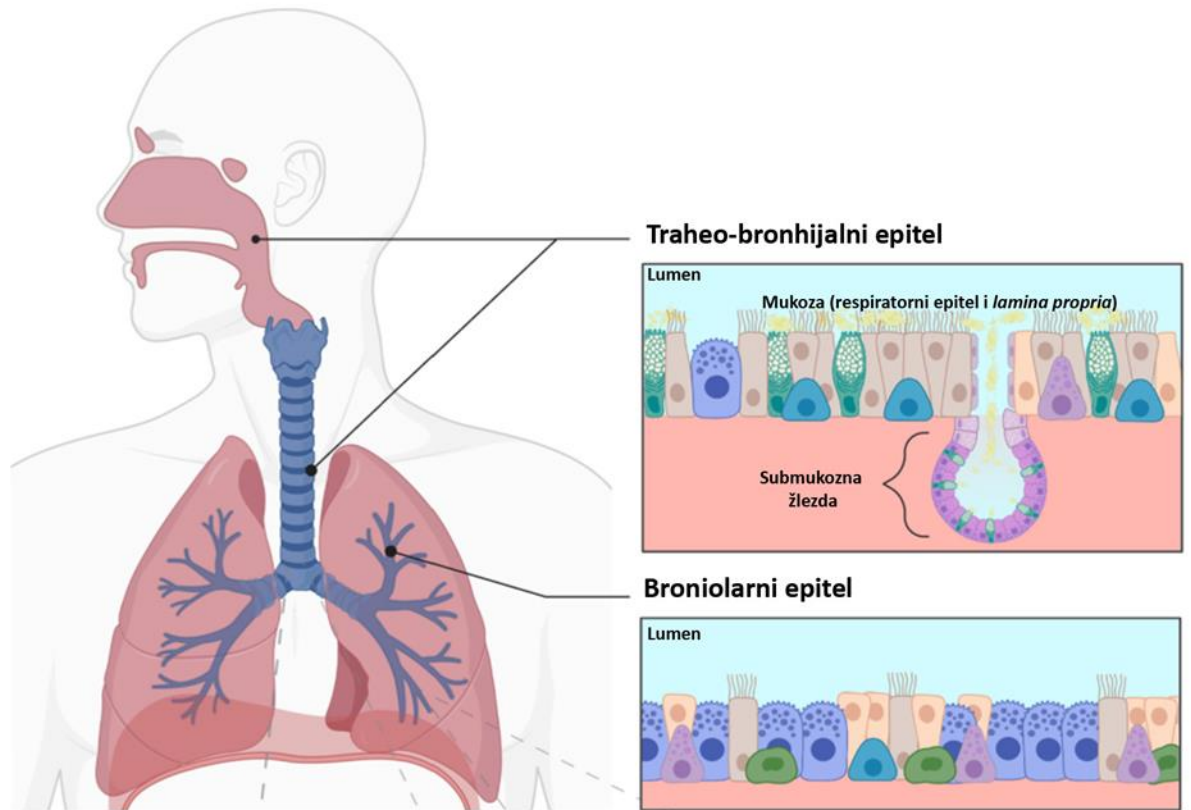
sazrevanje imunskog sistema, što povećava rizik od razvoja alergijskih bolesti. Higijenska hipoteza će biti detaljnije razmatrana kasnije.

1.3. Imunski odgovor u osnovi respiratornih alergija

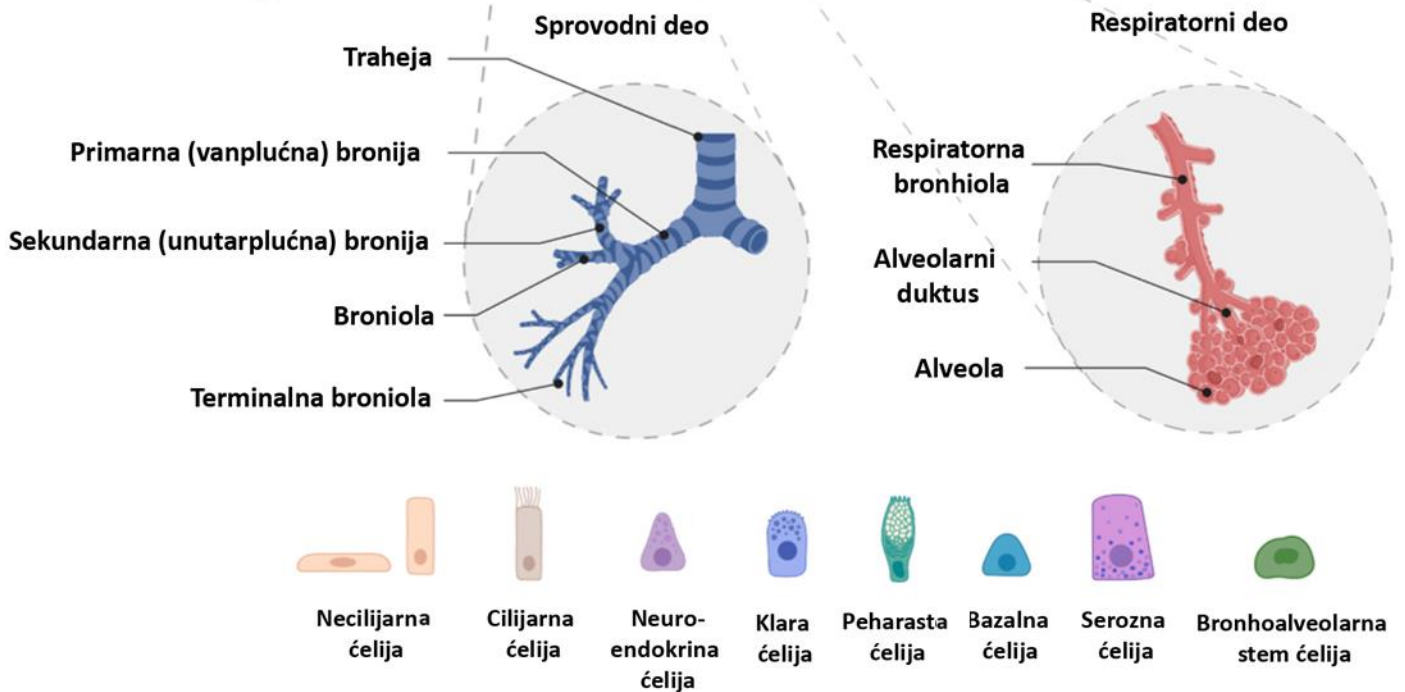
Imunski sistem je složena mreža organa, tkiva, ćelija i molekula koja štiti telo od infekcija, održava tkivnu homeostazu i sprečava nastanak bolesti putem mehanizama urođenog i adaptivnog imuniteta. Ipak, imunski sistem je podložan poremećajima kao što su autoimunost, imunodeficijencija i preosetljivost. Reakcija preosetljivosti podrazumeva patološku reakciju imunskog sistema pri ponovnom susretu sa datim antigenom. Kada je takva reakcija usmerena protiv sopstvenih antigena zbog prekida autotolerancije, nastaju autoimunske bolesti, dok prekomeran imunski odgovor na nepatogene antigene iz spoljašnje sredine može izazvati oštećenje tkiva, pogotovo ukoliko se ove reakcije ponavljaju i ako su slabo kontrolisane pa postaju hronične [2].

Respiratorne alergije nastaju usled preteranog imunskog odgovora na supstance u vazduhu koje nisu infektivne prirode. Respiratorni epitel je prvi koji stupa u kontakt sa infektivnim i neinfektivnim supstancama iz vazduha. Epitel gornjeg respiratornog trakta ima više funkcija u koje spadaju sprečavanje prolaza mikroorganizama, dopremanje imunskih ćelija i otpuštanje inflamatornih komponenti urođenog imunskog sistema. Barijera respiratornog epitela se sastoji od cilijarnih ćelija, neuroendokrinih ćelija, peharastih ćelija koje ispuštaju mukus, bazalnih ćelija (stem ćelije epitela traheja i bronhija) i Klara ćelija koje otpuštaju anti-inflamatorni protein uteroglobin (Slika 1.) [17]. Alergeni prolaze kroz respiratorni epitel putem više različitih mehanizama koji mogu zavistiti od prirode alergena i stanja imunskog sistema domaćina. Različiti poremećaji respiratornog epitela mogu takođe biti uzrok veće osetljivosti prema alergenima pa tako ljudi koji boluju od alergijskog rinitisa imaju smanjenu ekspresiju surfaktantskog proteina A koji može da vezuje alergene i da ublaži inflamaciju u toku imunskog odgovora indukovano njima [18]. Pokazano je i da disbioza mikrobioma epitela može da dovede do poremećaja funkcionisanja ove barijere i da povećano prisustvo bakterije *Staphylococcus aureus* direktno remeti mukoznu barijeru i pokreće Tip 2 humoralnog odgovora [19]. Duvanski dim može da remeti proteine međućelijskih veza respiratornog epitela i da utiče na remodelovanja epitela [20].

A



B



Slika 1. Anatomija ljudskog respiratornog trakta i zastupljenost ćelija u različitim delovima epitela disajnih puteva.
A) Mukoza epitela nosa i traheje čine cilijarne ćelije, peharaste ćelije, bazalne ćelije, Klara ćelija, neuroendokrine i serozne ćelija, dok se u submukozi protežu seromukozne žlezde. Broniolarni epitel sastoji se i od bronhoalveolarnih stem ćelija i Klara ćelija, koje su najzastupljeniji tip ćelija u tom epitelu. **B)** Sprovodni deo disajnih puteva obuhvata nosnu šupljinu, ždrelo i grkljan, u kojem se nalaze epiglotis, glasne žice i glotis. Grkljan se nastavlja u traheju, koja se račva u primarne

bronhije, a one se dalje granaju na sekundarne bronhije, broniole i terminalne i respiratorne bronhiole (koje sadrže alveole). Respiratorni deo disajnih puteva omogućava razmenu gasova i započinje respiratornim bronhiolama. Svaka bronhiola vodi ka alveolarnim duktusima, a zatim ka alveolarnim kesicama koje sadrže alveole. Preuzeto iz [21].

Ćelije koje među prvima reaguju na promene u disajnim putevima su epitelne ćelije respiratornog trakta koje mogu da produkuju citokine kao što su timusni stromalni limfopoetin (engl. thymic stromal lymphopoietin, TSLP), interleukin-25 (IL-25), IL-33 i hemokine za dopremanje pomoćničkih T limfocita (Slika 2.). Pored njih na promenu reaguju i limfociti urođene imunosti tipa 2 (engl. innate lymphoid cells, ILC2) koji su aktivirani citokinima epitelnih ćelija i koji produkuju citokine IL-5 i IL-13 karakteristične za Tip 2 imunskog odgovora kod alergija. Alergene detektuju rezidentne antigen-prezentujuće ćelije (engl. antigen presenting cells, APC) kao što su dendritske ćelije i makrofagi koje mogu da ih detektuju putem receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca (engl. pattern recognition receptors, PRR) i koje su dodatno aktivirane citokinima TSLP i IL-13 [22]. APC su specijalizovane ćelije koje sakupljaju antigene, obrađuju ih, transportuju do perifernih limfnih tkiva i tamo prikazuju (prezentuju) limfocitima. Da bi nastao antigen specifičan odgovor T ćelija neophodna su tri signala u toku interakcije APC i T ćelija [23]. **Prvi signal** je interakcija molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) sa T-ćelijskim receptorom (engl. T cell receptor, TCR) pored kojeg se nalaze i CD4 ili CD8 koreceptori. Postoje dva tipa MHC molekula: MHC molekuli klase I koji se nalaze na svim ćelijama sa jedrom, koji prepoznaju CD8⁺ T ćelije; MHC molekuli klase II se nalaze na APC i prepoznaju ih CD4⁺ T ćelije. CD4⁺ T ćelije se nazivaju pomoćničke T ćelije (engl. T helper cells, Th), koje prepoznaju peptide prezentovane na MHC molekulima klase II koji vode poreklo od obrađenih antigena ekstracelularnih mikroorganizama. CD8⁺T ćelije se nazivaju citotoksične T ćelije i one prepoznaju peptide prezentovane na MHC molekulima klase I poreklom od antigena intracelularnih mikroorganizama i antigena tumorskih ćelija.

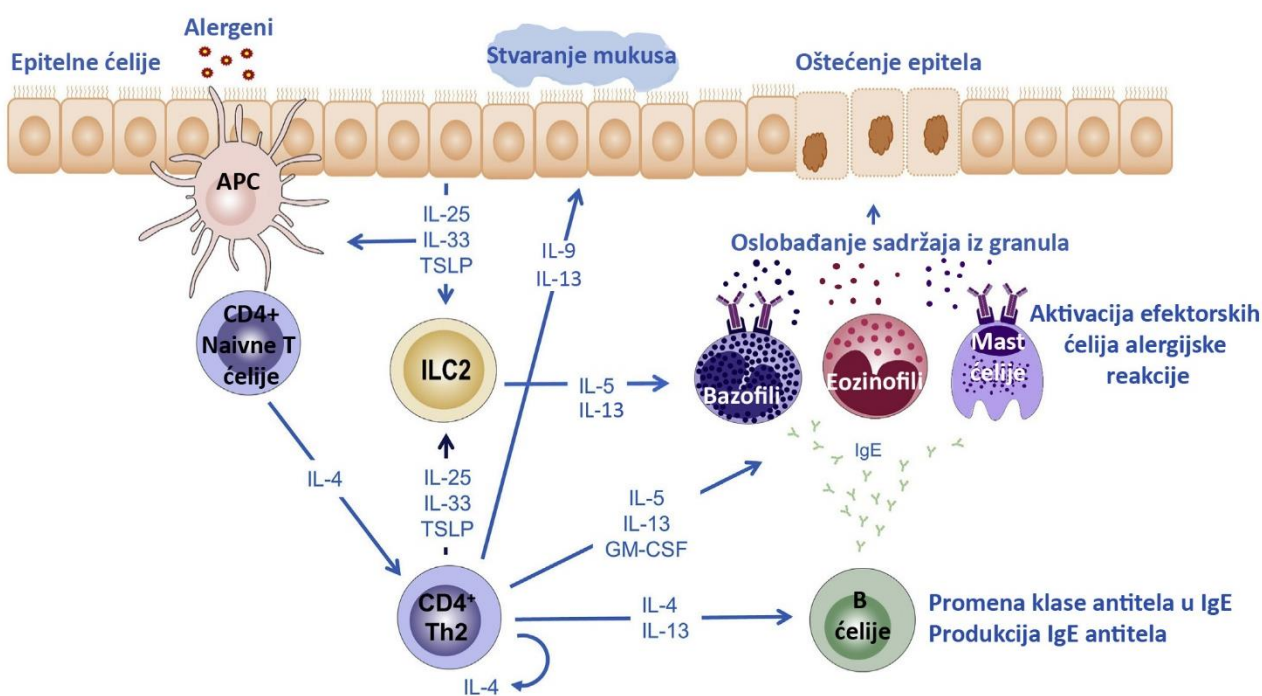
Drugi signal je interakcija kostimulatornih molekula

- CD80 i CD86 se vezuju za CD28 na T ćelijama i ključni su za njihovu aktivaciju
- protein inducibilni kostimulator (engl. inducible costimulator, ICOS) koji se vezuje za ICOS ligand na T ćelijama
- CD40 koji se vezuje za CD40 ligand na T limfocitima i stimuliše dodatnu ekspresiju kostimulatora na APC i koji stimuliše ekspresiju IL-12 citokina koji reguliše diferencijaciju T ćelija u Th1 ili Th2

Treći signal su citokini koje luče APC i koji utiču na polarizaciju T ćelija. U slučaju kada je polarizacija CD4⁺ T limfocita u pravcu Th1, citokini koje APC oslobađaju su IL-12 i IL-23, a u slučaju Th17 polarizacije neophodno je prisustvo faktora transformacije rasta β (engl. transforming growth

factor, TGF- β), IL-6 i IL-23. T limfociti se mogu diferencirati i u regulatorne T ćelije, primarno pod uticajem tolerogenih dendritskih ćelija i anti-inflamatornih citokina, poput IL-10 i TGF- β . O ulozi tolerogenih DC i mehanizmima indukcije Treg ćelija biće reči u poglavljima 1.3.1 i 1.3.2.

U toku alergijskih reakcija i infekcija sa helmintima, APC i okolne imunske ćelije otpuštaju TSLP, IL-6, IL-10, IL-33 koji utiču na blokiranje Th1 i Th17 polarizacije i stimulišu diferencijaciju i aktivaciju Th2 ćelija [24]. Aktivirane Th2 ćelije dolaze do respiratornog epitela usled dejstva hemokina i tu proizvode IL-4, IL-5 i IL-13 citokine [25]. IL-4 citokin utiče na promenu klase antitela u IgE kod B limfocita.



Slika 2. Pokretanje imunskog odgovora u alergijama. Epitelne ćelije disajnog trakta reaguju na promene prouzrokovane prisustvom alergena produkcijom IL-25, IL-33 i TSLP koji utiču na aktivaciju limfocita urođene imunosti tipa 2 (ILC2), aktivaciju rezidentnih antigen-prezentujućih ćelija (APC) i stimulišu dopremanje naivnih CD4⁺ T limfocita. APC unose alergen i obrađene antigene alergena prezentuju naivnim CD4⁺ T ćelijama, koje se u prisustvu IL-4 diferenciraju u Th2 ćelije. Ove ćelije luče Th2 citokine: IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13. B ćelije zatim proizvode IgE antitela, koja se vezuju za specifične Fc ϵ RI receptore na bazofilima i mast ćelijama, efektorskim ćelijama inflamacije izazvane alergijom. Ovaj proces se naziva senzibilizacija. Prilikom ponovljenog kontakta sa istim alergenom dolazi do brze degranulacije ovih efektorskih ćelija, što dovodi do otpuštanja granula i oslobađanja medijatora inflamacije alergijskih reakcija (histamin, leukotrijeni itd.) koji izazivaju reakcije rane preosetljivosti. IL-4 dodatno deluje autokirno i stimuliše razvoj Th2 ćelija, IL-5 učestvuje u aktivaciji, regrutaciji i preživljavanju eozinofila, IL-9 i IL-13 povećavaju produkciju mukusa, dok produkti eozinofila izazivaju oštećenje epitela. Th2 ćelije proizvode citokine kao što su IL-25, IL-33 i TSLP koji dodatno stimulišu ILC2 ćelije čime se pojačava alergijska reakcija. Preuzeto iz [26].

B limfociti su jedan od podtipova APC i jedina su vrsta ćelija koja može da produkuje antitela. B limfociti produkuju antitela kada su aktivirani folikularnim pomoćničkim T ćelijama (engl. T follicular helper cells, Thf) u sekundarnim limfnim organima. Kao odgovor na CD40 ligand i citokine IL-4 i IL-13 koje produkuju Thf ćelije, B ćelije podležu promeni teškog lanca imunoglobulina i počinju da produkuju imunoglobulin E (IgE antitelo) [27]. Terminalno diferencirani B limfociti ulaze u cirkulaciju i nazivaju se plazma ćelije, koje produkuju alergen specifična IgE antitela. IgE cirkuliše kao bivalentno antitelo i obično je prisutno u koncentraciji manjoj do 100 IU/mL kod zdravih ljudi dok u patološkim stanjima kao što su atopijski ekcem, alergijska bronhopulmonalna aspergiloza i infekcije helmintima koncentracija IgE u krvi može da poraste i preko 1000 IU/mL [28]. Alergične osobe u odgovoru na prisustvo alergena produkuju visoke nivoe IgE antitela, dok zdrave osobe produkuju druge izotipove imunoglobulina, kao što su IgM i IgG i samo malu količinu IgE antitela [29]. IgE se vezuje za Fc receptor (FcεRI) na mast ćelijama i bazofilima i aktivira ih. Proces vezivanja IgE antitela za mast ćelije naziva se senzibilizacija zato što oblaganje IgE antitelom specifičnim za antigen čini mast ćelije osetljivim na aktivaciju pri sledećem kontaktu sa tim antigenom. Iako je koncentracija IgE antitela u serumu niska u poređenju sa drugim izotipovima, zbog visokog afiniteta FcεRI receptora za IgE, ovi receptori su uvek obloženi IgE antitelima čak i kod zdravih osoba. Međutim, prisustvo samog IgE nije dovoljno za aktivaciju ovih ćelija već je neophodno unakrsno vezivanje receptora posredstvom antigena, što se dešava prilikom alergijske reakcije [30]. Kod zdravih ljudi **mast ćelije** su obložene IgE antitelima raznih specifičnosti zato što mnogi antigeni mogu da pokrenu slab IgE odgovor pa je broj IgE antitela specifičnih za bilo koji antigen prisutan na mast ćelijama nedovoljan da pokrene aktivaciju mast ćelija. Mast ćelije koje su obložene velikom količinom istih IgE antitela, specifičnim za određen alergen, će biti aktivirane kada stupe u kontakt sa tim alergenom [31]. Aktivacija mast ćelija dovodi do otpuštanja sadržaja njihovih granula, tj. medijatora inflamacije alergijskih reakcija. U njih spadaju histamin, koji utiče na kontrakciju glatkih mišića, proteaze koje mogu da oštete okolno tkivo, lipidni medijatori poreklom od arahidonske kiseline (prostaglandini i leukotrieni), faktor nekroze tumora α (engl. tumor necrosis factor α , TNF- α), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 i hemokini [32]. **Bazofili** se aktiviraju sličnim mehanizmom, preko FcεRI receptora i njihova aktivacija utiče na otpuštanje medijatora kao što su histamin i citokini IL-4 i IL-13. IL-4, koji luče mast ćelije, bazofili i Th2 ćelije, podstiče endotelske ćelije da proizvode hemokine koji privlače eozinofile na mesto upale [33]. Na mestu inflamacije **eozinofile** aktivira IL-5 citokin, koji ih stimuliše da otpuštaju sadržaj iz svojih granula, tj. reaktivne oblike kiseonika, enzime koji mogu da oštete

okolno tkivo i citokine IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9 i IL-13 [34]. Citokin IL-13 dodatno stimuliše povećano otpuštanje mukusa unutar tkiva respiratornog epitela.

Alergijske reakcije se sastoje iz rane i kasne faze, u zavisnosti od vremena pojave simptoma nakon izlaganja alergenu i njihovog intenziteta [35]. **Rana faza alergijske reakcije** nastaje nekoliko minuta nakon ponovnog izlaganja alergenu i obuhvata aktivaciju mast ćelija i bazofila koji oslobađaju medijatore od kojih histamin, prostaglandini i leukotrieni dovode do vazodilatacije, konstrikcije glatkih mišića i inflamacije okolnog tkiva. Posledice ovih reakcija mogu biti slaba lokalna zapaljenja koja se povlače u roku od sat vremena ili mogu dovesti do najtežeg oblika reakcije rane faze što je anafilaksija. Anafilaksija je sistemska reakcija koju karakteriše edem u larinksu, bronhokonstrikcija, povećana produkcija mukusa u bronhijama i nagli pad krvnog pritiska zbog čega anafilaktički šok može biti i smrtonosan [33]. Uzrok ove reakcije je širenje antigena kroz krvne sudove, što može biti posledica injekcije sa određenim terapeutikom, uboda insekta ili apsorpcije kroz epitelnu površinu kao što je mukoza creva. Alergeni koji mogu da uzrokuju anafilaksiju su antibiotici iz porodice penicilina, proteini iz kikirikija, orašastog voća, riba, morskih plodova, mleka, jaja, pčelinjeg otrova, ali ima i drugih izvora u hrani i u spoljašnjoj sredini. Najčešći tretman za anafilaksiju je epinefrin koji brzo ublažava bronhokonstrikciju, vazodilataciju i omogućava normalan protok vazduha kroz respiratorne puteve. **Reakcija kasne faze alergije** nastaje nakon 4-6 sati od kontakta sa alergenom. Medijatori koji su ispušteni u toku rane faze kao što su hemokini i citokini utiču na regrutovanje i aktivaciju eozinofila, neutrofila i Th2 limfocita. Eozinofili i neutrofilni oslobađaju medijatore koji oštećuju tkiva dok Th2 ćelije mogu da pogoršaju inflamaciju dodatnim lučenjem citokina. Inflamacija kasne faze traje najduže 24 sata a zatim postepeno opada i posledice su opstrukcija disajnih puteva, kašalj i fibroza disajnih puteva usled hronične inflamacije i remodelovanja tkiva [36].

APC su ključne u razvijanju i modulisanju imunskog odgovora. U alergijama to su makrofagi i dendritske ćelije i one se aktiviraju kada se za njihove PRR receptore za prepoznavanje molekularnih obrazaca vežu antigeni [37]. PRR receptori mogu biti: solubilni, kao što su komponente komplekta, kolektini (npr. surfaktant A) i pentraksini (npr. C reaktivni protein, CRP); membranski, u koje spadaju receptori slični Toll proteinu (engl. Toll-like receptors, TLRs), lektinski receptori C tipa (engl. C-type lectin receptors - CLR), receptori čistači (engl. scavenger receptors - SRs) i N-formilpeptid receptori (engl. N-formyl peptide receptors - FPRs); i citoplazmatski, kao što su: receptori slični NOD-u, (engl. Nucleotide-binding Oligomerization Domain- NOD-like receptors, NLRs) i receptori slični RIG-u (engl. Retinoic acid-inducible gene-I - RIG-like receptors, RLRs).

Makrofagi imaju nekoliko važnih uloga u razvijanju imunskog odgovora: fagocituju i uništavaju patogene mikroorganizme, uklanjaju ćelije mrtvih tkiva, pokreću proces reparacije tkiva i produkuju citokine koji pokreću i regulišu inflamaciju [2]. Na makrofagima su eksprimirani PRR receptori koji prepoznaju patogene mikroorganizme i oštećene ćelije i zatim aktiviraju makrofage. Osim preko PRR receptora, makrofagi mogu da se aktiviraju i u interakciji sa Th1 ćelijama. Ove ćelije, pomoću CD40 liganda na svojoj površini i IFN- γ koji luče, stimulišu sposobnost makrofaga da unište fagocitovane mikroorganizme. Ovaj vid aktivacije makrofaga naziva se klasična aktivacija makrofaga i dovodi do nastanka M1 makrofaga koji uništavaju patogene i pokreću inflamatorni odgovor. Sa druge strane, kada nema jakih signala sa PRR i stimulacija se vrši putem IL-4, IL-5 i IL-13 (Th2 citokinima), dolazi do alternativne aktivacije makrofaga. Ovako aktivirani makrofagi se označavaju kao M2 i svoju ulogu ostvaruju u reparaciji tkiva i kontroli inflamacije tj. anti-inflamatornom odgovoru. Th2 citokini stimulišu makrofage da otpuštaju faktore rasta koji deluju na fibroblaste tako što povećavaju sintezu kolagena i izazivaju fibrozu [38]. Pored podele po fenotipu makrofagi se mogu deliti u zavisnosti od rasprostranjenosti po tkivima. Tkivno rezidentni makrofagi obuhvataju osteoklaste u kostima, mikrogliju u moždanom tkivu, histiocite u intersticijalnom vezivnom tkivu, slezinske makrofage, Kupferove ćelije u jetri i crevima i alveolarne makrofage u plućima [39].

Alveolarni makrofagi (AM) su najbrojnije ćelije urođenog imunskog odgovora koje se nalaze u distalnim delovima pluća i zahvataju luminalne površine alveolarnih prostora. Njihova glavna uloga je, kao tkivno rezidentnih APC, da odreaguju na prisustvo patogena i zagađivača iz vazduha ali takođe učestvuju u održavanju homeostaze uklanjanjem apoptotskih ćelija i podsticanjem zarastanja rana. Međutim, pod određenim stimulusima, mogu da imaju i pro-inflamatornu ulogu [40]. Nakon prvog izlaganja alergenu dolazi do brzog regrutovanja monocita do respiratornog epitela, koji zatim stimulišu inflamaciju. AM u tom slučaju ublažavaju tu inflamaciju u cilju održavanja homeostaze. Nakon ponovnog izlaganje alergenu, inflamacija može postati hronična i karakteriše se povećanim prisustvom imunskih ćelija i Th2 citokina u tkivu pluća. U tom slučaju AM gube supresivnu funkciju i učestvuju u širenju Th2 imunskog odgovora u respiratornom epitelu [41].

1.3.1. Dendritske ćelije

Dendritske ćelije (engl. dendritic cell, DC) su najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije koje stimulišu imunski sistem i vrše aktivaciju, ali i kontrolu urođenog i adaptivnog imunskog odgovora. Pod uticajem različitih stimulusa DC mogu zadobiti različit funkcionalni fenotip, koji potom omogućava pokretanje odgovarajućeg imunskog odgovora. DC utiču na polarizaciju humoralnog

imunskog odgovora i, pod uticajem različitih antigena, igraju ključnu ulogu u indukciji imunske tolerancije i u regulaciji imunskog odgovora posredovanog T ćelijama [42]. DC su ćelije koje mogu biti tkivno rezidentne ili cirkulišuće, a njihova uloga je da detektuju patogene mikroorganizme, pokreću mehanizme urođenog imunskog odgovora i obrađuju antigene kako bi ih prezentovale T ćelijama, čime započinju adaptivni imunski odgovor.

DC nastaju iz hematopoetskih stem ćelija (engl. hematopoietic stem cells, HSC) u kompleksnim procesima koji počinju u koštanoj srži. Na ovom mestu se nalaze i nehematopoetske ćelije koje usmeravaju sazrevanje HSC putem kontaktno zavisnih signala i faktora sazrevanja hematopoetskih ćelija. Sledeći korak u sazrevanju HSC mogu biti:

- zajedničke limfoidne progenitorske ćelije iz kojih nastaju T limfociti, B limfociti, urođenoubilačke ćelije (engl. natural killer, NK) i ILC ćelije
- zajednički mijeloid-megakariocitno-eritrocitni prekursori kao što je prekursor monocita i dendritskih ćelija.

Stadijumi sazrevanja zajedničkih progenitorskih ćelija mijeloidne loze do subpopulacija DC obuhvataju četiri stadijuma: stadijum progenitorskih ćelija koštane srži, stadijum prekursora DC, stadijum nezrelih DC i stadijum zrelih DC. Nezrele DC prolaze cirkulacijom u potrazi za patogenim mikroorganizmima ili mrtvim ćelijama čije antigene prepoznaju putem PRR receptora. DC preuzimaju antigene i usled dejstva različitih medijatora one podležu morfološkim i funkcionalnim promenama u zrele DC koje mogu da prezentuju obrađene antigene naivnim T ćelijama. U zavisnosti od prirode stimulusa koji je uticao na nezrele DC zavisice u kom pravcu će biti usmeren adaptivni imunski odgovor koji obuhvata diferencijaciju i proliferaciju Th1, Th2, Th17 ili regulatornih T ćelija. U toku sazrevanja DC dolazi do povećane ekspresije MHC molekula, kostimulatornih molekula CD40, CD80 i CD86, adhezivnih molekula iz familije β -integrina i unutarćelijskih adhezivnih molekula (engl. Intracellular Adhesion Molecule, ICAM). Zrele DC putuju do limfoidnih organa gde prezentuju deo obrađenog antigena naivnim T ćelijama i utiču na njihovu proliferaciju i diferencijaciju.

1.3.1.1. Podvrste dendritskih ćelija i njihova uloga u imunskom odgovoru

DC su heterogena grupa APC koja se razlikuje po funkciji i fenotipu, pri čemu se podvrste dendritskih ćelija mogu okarakterisati na osnovu prisustva površinskih markera, transkripcionih faktora, razvoja iz različitih prekursorskih ćelija, prisustva u tkivima i funkcija [2]. Iako većina DC potiče iz mijeloidne loze, postoje podtipovi koji imaju drugačije poreklo kao što su Langerhansove

ćelije koje nastaju od monocita poreklom iz jetre fetusa koje rano u toku razvoja organizma nastanjuju kožu ili folikulske dendritske ćelije koje nastaju iz migratornih mezenhimskih matičnih ćelija iz koštane srži [43]. Sve DC eksprimiraju MHC I i II molekule koji su ključni u prezentovanju antigena CD8⁺ i CD4⁺ T ćelijama. MHC I molekul poseduju sve ćelije sa jedrom dok MHC II molekul poseduju sve APC ćelije. Humani MHC molekuli su kompleksi humanih leukocitnih antigena (HLA). MHC I čine antigeni klase I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) dok MHC II čine antigeni klase II (HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR) [2]. HLA-DP i HLA-DQ se ne koriste kao glavni markeri za detekciju MHC klase II jer su slabije izraženi, imaju specifična biohemijiska svojstva i ređe su prisutni na površini ćelija. S druge strane, HLA-DR je najizraženiji molekul MHC klase II na antigen-prezentujućim ćelijama, zbog čega se smatra najpouzdanijim i najpraktičnijim markerom za njihovu identifikaciju [44].

Među glavnim podvrstama izdvajaju se klasične (konvencionalne) dendritske ćelije, plazmocitne dendritske ćelije i dendritske ćelije poreklom od monocita [45]. **Klasične ili konvencionalne DC** (engl. classical dendritic cells, cDC) su glavni tip DC zadužen za obradu proteinskih antigena koji prođu kroz epitelnu barijeru nakon čega ih prezentuju T ćelijama. One predstavljaju najbrojniju podvrstu DC u epitelu i limfnim organima. Površinski markeri prisutni na svim cDC su CD11c, HLA-DR i CD45. U koštanoj srži, zajednički prekursor DC diferencira se u prekursore cDC, koji dalje mogu postati pre-cDC1 ili pre-cDC2 u zavisnosti od ekspresije transkripcionih faktora. Nakon što migriraju u periferna tkiva i limfne organe, pre-cDC1 sazrevaju u naivne cDC1, dok pre-cDC2 sazrevaju u naivne cDC2. Naivne **cDC1** su diferencirane cDC koje mogu da obrađuju i prezentuju antigene ali nisu u potpunosti aktivirane, imaju slabu ekspresiju površinskih markera MHC i slabo aktiviraju T ćelije. U toku infekcija sa intracelularnim patogenima dolazi do otpuštanja inflamatornih signala koji aktiviraju maturaciju naivnih u zrele cDC1, kao što su molekulski obrasci patogena (engl. pathogen associated molecular patterns, PAMP), interferoni tipa 1 (IFN- α , IFN- β) i IFN- γ , IL-1 β , TNF- α [46]. Zrele cDC1 mogu efikasno da prezentuju antigene T ćelijama i da započnu jaku aktivaciju T limfocita u pravcu Th1. cDC1 putem IL-12 citokina i površinskih kostimulatornih molekula CD40, CD80, CD86, HLA-DR omogućavaju aktivaciju Th1 ćelija i produkciju IFN- γ u cilju odbrane od infekcija. cDC1 su ključne i u aktivaciji ILC1 ćelija i NK ćelija. Markeri zrelih cDC1 su CD141, CLEC9A, HLA-DR, CD40, CD86, hemokinski receptor 7 (engl. C-C chemokine receptor, CCR7) [42]. Naivne **cDC2** ćelije, za razliku od cDC1, mogu nastati i od prekursora monocita, a njihova aktivacija je podstaknuta signalnim molekulima koji se oslobađaju tokom alergijskih reakcija i infekcija izazvanih ekstracelularnim patogenima. Ovi signalni molekuli uključuju PAMP molekule, kao i citokine poput GM-CSF i prostaglandina E2, koji stimulišu

sazrevanje cDC2 ćelija. Zrele cDC2 ćelije putem kostimulatornih molekula na površini, poput OX40L, i produkcijom citokina IL-2, IL-10 i TSLP, podstiču diferencijaciju i aktivaciju Th2 ćelija. Pored toga, cDC2 mogu indukovati i Th17 polarizaciju putem površinskih molekula CD40, CD80, CD86 i HLA-DR; i citokina IL-6, IL-23 i TGF- β [47]. Osim uloga u imunskom odgovoru, cDC2 ćelije su ključne i za održavanje imunske tolerancije, jer podstiču diferencijaciju regulatornih T ćelija [48]. Markeri zrelih cDC2 su CD1c, CD11b, CD127 α , HLA-DR, CD40, CD86, CCR7.

Plazmocitne DC (pDC) sazrevaju od zajedničkog prekursora DC u koštanoj srži u kojoj potpuno sazrevaju i odakle odlaze u krvotok i periferne limfne organe. pDC produkuju interferone tip 1 i tip 3 kao i TNF- α i IL-6 usled signalnih molekula oslobođenih u toku infekcija sa intracelularnim patogenima. pDC utiču na aktivaciju Th1 imunskog odgovora i stimulišu aktivaciju NK ćelija. Markeri pDC su CD123, CD303, CD304 [49].

Od HSC nastaje i zajednički monocitni progenitor koji se kasnije, preko monocita, diferencira u dendritske ćelije (engl. Monocyte derived DC, moDC). Monociti koji su CD14⁺ mogu sazrevati u moDC pod uticajem citokina GM-CSF i IL-4, kao i inflamatornih signala koji pokreću njihovo sazrevanje [50,51]. U zavisnosti od prisutnih signala, moDC mogu poprimiti fenotip cDC, koje dalje usmeravaju diferencijaciju Th1, Th2 ili Th17 ćelija. Pored toga, moDC se mogu diferencirati i u indukovane tolerogene dendritske ćelije, koje podstiču razvoj regulatornih T ćelija, o čemu će biti detaljnije reči u nastavku teksta.

U plućima i drenirajućim limfnim čvorovima DC koje su najviše zastupljene CD11c⁺DC koje vode poreklo od prekursora cDC. Mogu se podeliti u dve podgrupe u zavisnosti od nivoa ekspresije CD11b i CD103 markera. U toku homeostaze, plućne CD11b^{high} DC utiču na nastanak Th2 imunskog odgovora dok CD103⁺DC utiču na nastanak Th1 i Th17 imunskog odgovora. Sa druge strane, pokazano je da su u toku alergijom izazvana inflamacije obe vrste ćelija neophodne za uklanjanje inflamacije, pa tako CD103⁺DC su bitne u toku primarne senzitivacije na antigen dok su CD11b^{high}DC bitne u ponovnom kontaktu na alergen [52] i da i CD11b⁺DC i CD103⁺DC mogu da utiču na povećanje prisustva regulatornih T ćelija u toku alergijske reakcije [53].

DC su takođe bitne za ostvarivanje imunske tolerancije i sprečavanje produkcije efektorskih T ćelija protiv sopstvenih antigena. U odsustvu infekcije, DC kontinuirano preuzimaju i procesuiraju sopstvene antigene i nepatogene antigene prisutne u ekstracelularnom prostoru i migriraju u regionalna limfoidna tkiva, pri čemu ne sazrevaju u potpunosti. Ovakve delimično sazrele DC favorizuju produkciju imunosupresivnih regulatornih T ćelija (Treg), značajnih za održavanje periferne tolerancije, zbog čega se nazivaju **tolerogene dendritske ćelije (tolDC)** [54]. Pored njih, u

konvencionalne tolDC spadaju i diferencirane dendritske ćelije, poput cDC2 i pDC, koje mogu steći tolerogeni kapacitet pod uticajem specifičnih stimulusa kao što su retinoična kiselina i citokina IL-10 i TGF- β . Indukovane tolDC potiču od monocita i mogu biti generisane u eksperimentalnim uslovima, što im daje značajan terapijski potencijal. Citokini IL-10 i TGF- β igraju ključnu ulogu u njihovoj indukciji tako što inhibiraju sazrevanje monocita, smanjuju ekspresiju inflamatornih citokina IL-6 i IL-12, dok istovremeno povećavaju ekspresiju inhibitornih molekula poput imunoglobulina nalik transkriptu 3 (engl. Immunoglobulin-like transcript 3, ILT3) i ILT4 [55], kao i enzima indolamin 2,3-dioksigenaza (IDO), koji je ključan za diferencijaciju regulatornih T ćelija [56]. Pored citokina indukovane tolDC mogu nastati i pod uticajem farmakoloških agenasa kao što su vitamin D3, rapamicin i deksametazon. Indukovane tolDC mogu nastati od monocita i pod dejstvom stimulusa poreklom od parazitskih antigena, o čemu će biti reči kasnije u tekstu. tolDC slabo ekspimiraju HLA-DR i imaju nizak ili srednji nivo ekspresije kostimulatornih molekula CD80 i CD86. Međutim, tolDC imaju povećanu ekspresiju inhibitornih molekula, uključujući ILT3, ILT4 i ligande za programiranu ćelijsku smrt (engl. Programmed cell death ligand 1, PD-L1). Jedan od ključnih markera za indukciju i stabilizaciju fenotipa tolDC je neintegrinski receptor specifičan za dendritske ćelije (engl. Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin, DC-SIGN). Ovaj receptor se vezuje za glikane koji sadrže manozu ili fukožu, i moduliše signalizaciju TLR receptora, čime omogućava održavanje tolerogenog profila DC. tolDC imaju smanjenu produkciju inflamatornih citokina poput IL-12, i povećanu produkciju anti-inflamatornih citokina poput IL-10 i TGF- β putem kojih omogućavaju razvoj regulatornog imunskog odgovora.

1.3.2. Regulatorni imunski odgovor

Na periferiji CD4⁺T ćelije mogu da se diferenciraju u inducibilne Treg koje ograničavaju inflamaciju i uspostavljaju imunsku toleranciju. U zavisnosti od mesta nastajanja i ekspresije površinskih markera i efektorskih mehanizama razlikuju se dve populacije Treg. Urođene Treg (engl. natural Treg, nTreg) nastaju i diferenciraju se u timusu, tako da poseduju CD4, CD25 i FoxP3 markere pre odlaska na periferiju. Svoje regulatorne funkcije stiču i ispoljavaju u timusu i ne menjaju ih na periferiji. Inducibilne Treg (engl. inducible Treg, iTreg), nastaju od naivnih T limfocita *in vivo* ili *in vitro* uslovima kao što su organizirano izlaganje antigenima i/ili kostimulacija delovanjem tolerogenih dendritskih ćelija. Za razliku od nTreg one su manje stabilne u inflamatornim uslovima. U iTreg spadaju i Tr1 ćelije koje ne poseduju FoxP3 marker ali ekspimiraju visoku količinu IL-10 citokina [57]. tolDC imaju nižu ekspresiju kostimulatornih molekula CD80 i CD86 što rezultira slabijom

aktivacijom naivnih T limfocita putem CD28 receptora. Slaba aktivacija CD28 receptora je ključna u diferencijaciji naivnih T limfocita u Treg. tolDC utiču na nastanak Treg i preko prisustva inhibitornih molekula kao što su ILT3, ILT4 i receptor za programiranu ćelijsku smrt. tolDC eksprimirajuIDO enzim koji katalizuje triptofan u neposrednoj okolini ćelije. Naivni T limfociti detektuju nedostatak triptofana što stimuliše signalnu transdukciju u naivnim T limfocitima da se diferenciraju u Treg [58]. tolDC proizvode citokine IL-10 i TGF- β koji utiču na smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, blokiraju diferencijaciju u Th1, Th2 i Th17 dok stimulišu ekspresiju FoxP3 markera na Treg. Iako TGF- β može da utiče na diferencijaciju Th17 ćelija, visoka koncentracija TGF- β utiče na diferencijaciju Treg dok IL-10 utiče na stabilizaciju Treg fenotipa. Retinoična kiselina koju ispuštaju tolDC utiče na TGF- β zavisnu indukciju Treg iz naivnih T limfocita [59].

Treg indukuju toleranciju otpuštanjem citokina i putem površinskih markera. Treg visoko eksprimiraju receptor za citokin IL-2 (CD25) putem kojeg smanjuju količinu IL-2 u neposrednoj okolini i na taj način smanjuju proliferaciju efektornih T ćelija. Treg remete i protok kalcijuma do efektornih T ćelija koji je neophodan za počenu aktivaciju putem TCR receptora. Preko ICOS receptora Treg smanjuju diferencijaciju T ćelija u Th2 [60], dok putem CD85k receptora suprimiraju dejstvo Th1 tako što blokiraju njihovu proliferaciju i otpuštanje IFN- γ [61]. Preko TIGIT receptora, Treg blokiraju efektorske funkcije Th1 i Th17 ćelija i deluju i na CD155 marker na DC čime se pokreće signalna transdukcija koja stimuliše produkciju IL-10 citokina [62][63]. Treg proizvode citokine IL-10, TGF- β i IL-35 koji suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T i B limfocita, podstiču razvoj iTreg i doprinose tolerogenim funkcijama tolDC [64][65]. Treg ćelije, putem inhibitornih signala, izazivaju anergiju u efektornim T ćelijama, što je stanje u kojem one ne reaguju na antigensku stimulaciju, čime se održava imunska tolerancija [66]. tolDC i Treg imaju međusobno zavistan odnos koji podržava imunosupresivno i tolerogeno mikrokruženje. Njihova interakcija je ključna za održavanje imunske homeostaze i sprečavanje autoimunskih i alergijskih reakcija. tolDC stimulišu Treg ćelije, a one zauzvrat dodatno potiskuju aktivaciju cDC i održavaju tolerogen fenotip tolDC. Ova povratna sprega je ključna za dugoročno suzbijanje inflamatornih reakcija i održavanje tolerancije, što je važno u kontekstu autoimunskih bolesti i alergija.

Regulacija imunskog odgovora predstavlja ključni mehanizam u očuvanju homeostaze organizma u toku koje tolDC i Treg igraju centralnu ulogu u održavanju tolerancije prema sopstvenim antigenima i u kontroli prekomernih reakcija na antigene iz spoljašnje sredine. Kada ovaj mehanizam zakaže, dolazi do preterane aktivacije imunskog sistema, što može dovesti do inflamacije tkiva i razvoja sistemskih autoimunskih bolesti ali i do nastanka alergijskih reakcija. Istraživanja pokazuju da

pacijenti sa astmom imaju smanjen broj FoxP3⁺ Treg ćelija u bronhoalveolarnoj tečnosti, kao i smanjenu cirkulaciju i migraciju ovih ćelija ka plućnom epitelu u poređenju sa zdravim osobama [67]. Takođe, uočena je povezanost između smanjene funkcionalnosti pluća i nedovoljno efikasnih supresivnih mehanizama Treg ćelija. Ove ćelije u astmi često ispoljavaju povišenu ekspresiju CRTH2 receptora, koji je karakterističan za humane Th2 ćelije, što ukazuje na fenotipsku sličnost sa Th2 populacijom [68]. Smanjena imunosupresivna funkcija Treg ćelija kod osoba sa astmom dodatno se ogleda u sniženoj produkciji IL-10, što utiče na smanjenu indukciju tolDC ali i na smanjenje svih drugih anti-inflamatornih efekata indukovanih ovim citokinom [69]. Eksperimentalni modeli astme dodatno potvrđuju ulogu Treg ćelija u regulaciji Th2 odgovora izazvanog alergenima. Pokazano je da ove ćelije mogu da suzbiju produkciju Th2 citokina, redukuju infiltraciju eozinofila i smanje prekomerno lučenje mukusa u disajnim putevima [70]. Ova istraživanja ukazuju da bi terapije, koje koje bi potencijalno stimulisale tolDC i poboljšale funkciju Treg, mogle da se koriste u ublažavanju simptoma alergija, smanjenjem preteranog Th2 odgovora [71].

1.4. Terapije

Lečenje respiratornih alergija usmereno je na olakšavanje simptoma i kontrolisanje preterane aktivnosti imunskog odgovora. Osnovne strategije lečenja respiratornih alergija uključuju izbegavanje alergena, upotrebu farmakoloških lekova kao i imunoterapiju koja postepeno povećava toleranciju organizma na određene alergene [72]. Prilagođavanje terapije težini simptoma, vrsti alergena i drugim relevantnim faktorima igra ključnu ulogu u postizanju efikasne kontrole alergijskih simptoma. U većini slučajeva delotovorna terapija za lečenje ovih alergija obuhvata kombinovanu upotrebu farmakoloških preparata i personalizovanu imunoterapiju prilagođenu potrebama svakog pacijenta [7]. Trenutno dostupni tretmani se mogu podeliti u tri grupe, pri čemu farmakološki lekovi koji služe za smanjivanje inflamacije pripadaju prvoj, dok tretmani koji imaju za cilj smanjenje prekomerne aktivnosti pojedinih komponenti imunskog sistema čine druge dve grupe tretmana (anti-IgE terapije i alergen-specifične imunoterapije) [73].

1.4.1. Terapije farmakološkim lekovima

Osnovni ciljevi terapije respiratornih alergija farmakološkim lekovima su kontrola simptoma, prevencija pojave novih simptoma i poboljšanje kvaliteta života pacijenta. Trenutne strategije lečenja imaju za cilj ili smanjenje efekta lokalnog otpuštanja medijatora iz aktiviranih ćelija ili smanjenje efekata tih medijatora na ciljne organe. S obzirom na interakciju više medijatora i raznolikost

inflamatornih ćelija u respiratornim alergijama, terapije usmerene samo na jedan medijator nisu dovoljno efikasne u ublažavanju svih simptoma respiratornih alergija [74]. Stoga, kombinacija lekova sa različitim mehanizmima delovanja može pružiti najveće olakšanje. Trenutno, različite glavne klase lekova dostupne za lečenje respiratornih alergija su: β 2-agonisti, muskarinski agonisti, antihistaminici, kortikosteroidi, stabilizatori mast ćelija, antileukotrieni i dekongestivi. Detaljan opis mehanizama delovanja ovih lekova i njihovih neželjenih dejstava se nalazi u Tabeli 2. Terapije farmakološkim lekovima su neophodne za smanjenje i prevenciju simptoma i izuzetno su važne u akutnim, kritičnim slučajevima. Međutim, farmakološke terapije nisu dovoljno delotvorne u sprečavanju nastanka respiratornih alergija i malo je verovatno da mogu da utiču na uobičajeni tok bolesti, koja može postati i hronična [75].

Tabela 2. Farmakološki lekovi za respiratorne alergije

Farmakološki lek	Način delovanja	Nuspojave
β2-agonisti	Vezuju za β2-adrenergičke receptore glatko-mišićnih ćelija, epitelnih ćelija, ćelija submukoznih žlezdi, ali za receptore imunskih ćelija kao mast ćelija, makrofaga i eozinofila [76]	Unakrsna aktivacija sa β1-adrenergičkim receptorima što dovodi do anksioznosti, tahikardije, drhtanja i znojenja [77]
*Brzodelujući β2-agonisti (engl. short-acting β2-agonists, SABA)	Vreme delovanja je nekoliko minuta a dužina trajanja 4-6 sati, preporučuju se kao terapija za astmu [78]	Povećana oralna primena može pogoršati simptome, stoga se preporučuje inhalatorna upotreba [79,80]
*Dugodelujući β2-agonisti (engl. long-acting β2-agonists, LABA)	Dužina trajanja 12-24 sata, preporučuju se kao terapija za astmu i hroničnu obstruktivnu bolest pluća [81]	Prepisuje se upotreba samo uz inhalatorne kortikosteroide zato što ne smanjuju inflamaciju disajnih puteva [82,83]
Muskarinski agonisti	Blokiraju vezivanje acetilholina na muskarinske receptore glatkih mišića i submukoznih žlezdi, čime omogućava bronhodilataciju; sprečavaju inflamatorno dejstvo acetilholina, koje utiče na preživljavanje i migraciju inflamatornih ćelija [84]	Pacijenti koji boluju od glikozidne insuficijencije, prostaticke hipertrofije ili obstrukcije mokraćnog mehurca ne smeju da ih uzimaju posebno ukoliko se primenjuje i terapija sa drugim antiholinergičnim agensom [85,86]
*Brodeldujući muskarinski agonisti (engl. short-acting muscarinic antagonist, SAMA)	Vreme delovanja 6-9 sati, preporučuju se kao terapija za astmu i hroničnu obstruktivnu bolest pluća	Privremeno poboljšava funkciju pluća, ali ne uklanja simptome; spada među najmanje efikasne tretmane [74,87]
*Dugodelujući muskarinski agonisti (engl. long-acting muscarinic antagonist, LAMA)	Vreme delovanja 12-24 sata, preporučuju se kao terapija za dugotrajnu astmu	Mogu da izazivaju gastrointestinalne probleme i srčane aritmije [88,89]
Antihistaminici	Vezuju se za H1 histaminske receptore na glatko-mišićnim i endotelnim ćelijama, sprečavajući vezivanje histamina i tako smanjuju oticanje tkiva, crvenilo i produkciju mukusa. Često se koriste u kombinaciji s drugim lekovima, kao što su stabilizatori mast ćelija i dekongestivi. Najčešće se primenjuju u lečenju alergijskog rinokonjunktivitisa i astme. [90]	Antihistaminici prve generacije imaju manje selektivno dejstvo, tako da pored na H1 receptore, deluju i na muskarinske, serotoninске, α-adrenergičke receptore, kao i na kalijumove kanale na srčanim ćelijama, što može dovesti do brojnih neželjenih efekata. Ovi lekovi lako prolaze krvno-moždanu barijeru, utičući na centralni nervni sistem, pa se često koriste i kao sedativi. [91]
Kortikosteroidi	Vezuju se za glukokortikosteroidne receptore i indukuju transkripciju gena anti-inflamatornih medijatora kao što su annexin 1, IκB i CD163, dok istovremeno blokiraju ekspresiju gena koji kodiraju inflamatorne medijatore. Na ćelijskom nivou, smanjuju dotok inflamatornih ćelija do sluzokože nosa i inhibiraju sazrevanje ćelija, kao i produkciju Th2 citokina, ekspresiju FcεRI i oslobađanje medijatora iz mast ćelija. Takođe sprečavaju promenu klase antitela u IgE. Osim toga, utiču na okolne ćelije smanjujući ekspresiju ICAM-1 molekula. Zajedničko dejstvo ovih efekata uključuje anti-inflamatorno, anti-proliferativno, imunomodulatorno i vazokonstriktivno delovanje. Ovi lekovi se koriste u lečenju astme, alergijskog rinitisa i hronične opstruktivne bolesti pluća [92]	Zbog širokog spektra delovanja, glukokortikosteroidi mogu izazvati brojne neželjene efekte. Inhalaciona (lokalna) primena često dovodi do iritacije sluzokože disajnih puteva i razvoja kandidijaze. S druge strane, sistemska i dugotrajna primena može prouzrokovati ozbiljnije komplikacije poput poremećaja funkcije nadbubrežnih žlezda, osteoporoze, hiperglikemije, katarakte i glaukoma, kao i povećanog rizika od infekcija usled immunosupresivnog dejstva na sistemskom nivou.[93,94]
Stabilizatori mast ćelija (kormoni)	Inhibiraju degranulaciju mast ćelija, a njihovo anti-inflamatorno dejstvo obuhvata inhibiciju aktivacije i migracije leukocita, sprečavanje aktivacije makrofaga i smanjenje regrutovanja neutrofila u vaskularni endotel.	Mogu izazvati iritaciju sluzokože disajnih puteva i bronhospazam, a takođe su povezani sa glavoboljom i gastrointestinalnim problemima. Njihovo delovanje je slabije u poređenju sa antihistaminicima.
Inhibitori leukotriena	Cys-leukotriene proizvode različite inflamatorne ćelije kao što su eozinofili,	Mogu biti hepatotoksični ali i izazvati gastrointestinalne

	<p>bazofili, alveolarni makrofagi, monociti i mast ćelije. Leukotrieni učestvuju u patogenezi bronhijalne astme i alergijskog rinitisa. Učestvuju u kontrakciji glatko-mišićnog tkiva, remete mukocilijarni protok, povećavaju otpuštanje mukusa i dovode eozinofile do disajnih puteva. Agonisti leuotriena se koriste ne samo za rane simptome astme i alergijskog rinitisa već i za kasnije faze alergije zbog svog anti-inflamatornog dejstva. Agonisti leukotriena mogu ublažiti simptome alergije smanjenjem vazodilatacije, blokiranjem lučenja sluzi i hemoaktanata koji dovode eozinofile na mesto upale[95].</p>	<p>probleme i neuropsihijatrijske nuspojave [75,96]</p>
Dekongestivi	<p>Oni izazivaju indirektnu aktivaciju α-adrenergičkih receptora koji se nalaze u mišićima oko krvnih sudova sluzokože nosa. Kada su ovi receptori aktivirani, dolazi do vazokonstrukcije krvnih sudova, što rezultira smanjenim protokom krvi. Ovo smanjenje protoka dovodi do smanjenja edema i produkcije mukusa, čime se poboljšava protok vazduha. Na taj način, ublažavaju otok i zapušenje disajnih puteva. Često se koriste u kombinaciji sa kortikosteroidima ili antihistaminicima [97].</p>	<p>Imaju neselektivno i sistemsko delovanje, što može izazvati nuspojave poput hipertenzije, pospanosti, nervoze i nesvestice. Ređe se javljaju efekti poput tahikardije, halucinacija i epileptičnih napada [98].</p>

1.4.2. Anti-IgE antitela

Anti-IgE terapije imaju potencijal da blokiraju kaskadu inflamacije koja se javlja kod respiratornih alergija, čime smanjuju štetne promene u disajnim putevima tokom ovih stanja. Ovaj lek se može primenjivati subkutano ili intravenski, a podrazumeva unos monoklonskih antitela protiv IgE antitela prisutnih u krvi [99]. Ova monoklonska antitela se vezuju za slobodna IgE antitela, sprečavajući njihovu interakciju sa FcεRI receptorom na mast ćelijama i bazofilima, čime se onemogućava njihova degranulacija. Takođe, sprečavaju i vezivanje IgE antitela za FcεRIII receptor na B limfocitima, čime se onemogućava prezentacija antigena na tim ćelijama i oslobađanje Th2 citokina. Kao rezultat, dolazi do smanjenog otpuštanja citokina IL-2, IL-4, IL-5 i IL-13 što utiče i na smanjenu zastupljenost eozinofila [100]. Trenutno je omalizumab jedino monoklonsko anti-IgE antitelo koje je odobrila uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. food and drug administration, FDA, SAD). Omalizumab ima visoko selektivan mehanizam delovanja i dobar profil bezbednosti. Međutim, on je trenutno jedini odobren lek ovog tipa na tržištu i nije finansijski dostupan svim pacijentim [101]. Osim toga, efekat terapije je ograničen, jer deluje isključivo na IgE antitela, koja nisu jedini uzročnici alergijskih reakcija.

1.4.3. Alergen-specifične imunoterapije

Alergen-specifična imunoterapija (engl. allergen-specific immunotherapy, AIT) podrazumeva postepeno davanje sve većih doza ekstrakata alergena tokom dužeg perioda, često i nekoliko godina. Za razliku od farmakoloških lekova koji se fokusiraju samo na simptome, a ne na uzrok bolesti, ova terapija može pružiti trajno rešenje [102]. AIT terapije mogu biti posebno korisne za pacijente koji ne reaguju na farmakološke lekove ili imaju ozbiljne neželjene efekte od njih. Mehanizam delovanja još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da sukcesivno davanje alergena u povećanim dozama smanjuje aktivaciju i degranulaciju mast ćelija i bazofila. Tokom AIT terapije, utvrđeno je da dolazi do oslobađanja histamina i leukotriena, medijatora anafilakse, ali to ne izaziva sistemski anafilaktički odgovor. Ovo delimično oslobađanje medijatora rezultira smanjenjem praga aktivacije mast ćelija i bazofila [103]. Takođe je utvrđeno da AIT omogućava nastanak tolDC i na taj način se smanjuje preterani imunski odgovor na alergene. Pretpostavlja se da postepena stimulacija imunskog sistema sa malim dozama alergena dovodi do nastanka tolDC i Treg koje zatim i utiču na anergiju T limfocita, omogućavaju širenje anti-inflamatornih citokina i ekspresiju inhibitornih molekula koji omogućavaju ublažen imunski odgovor nakon sledećeg kontakta sa alergenom [104]. Glavne prednosti AIT tretmana u odnosu na ostale dostupne terapije su dugotrajna zaštita od teških simptoma i prevencija progresije alergije u ozbiljnije stadijume. AIT terapije se mogu primenjivati subkutano i sublingvalno, što

predstavlja efikasan i praktičan način davanja. Upotreba AIT može smanjiti intenzitet simptoma respiratornih alergija za 20-40%, a efekat terapije može trajati i do osam godina nakon njenog završetka [105]. Međutim, široka primena AIT-a ograničena je pretežno tehničkim pitanjima kao što su kvalitet alergenskih supstanci, dostupnost ekstrakata alergena za imunizaciju za mnoge alergene, kao i rizik od pojave neželjenih efekata [106]. AIT terapija se razmatra individualno za svakog pacijenta, posebno kod osoba sa astmom. Preporučuje se isključivo za pacijente sa umerenim simptomima astme, dok se kod pacijenata sa teškom astmom ne preporučuje zbog povećanog rizika od anafilaktičkih reakcija. Takođe, AIT se i dalje preporučuje primarno kao dodatni tretman koji se može započeti samo kada su simptomi astme uveliko pod kontrolom uz pomoć drugih terapija. AIT terapija je razvijena za ograničen broj alergena, a njena dostupnost u velikoj meri zavisi od zemlje. U Evropi postoje AIT za veliki asortiman alergena, u Kanadi je AIT registrovana samo za polen trave, dok je u brojnim drugim državama još uvek nedostupna ili se primenjuje u vrlo ograničenoj meri [107,108].

1.5. Terapije parazitima i parazitskim antigenima

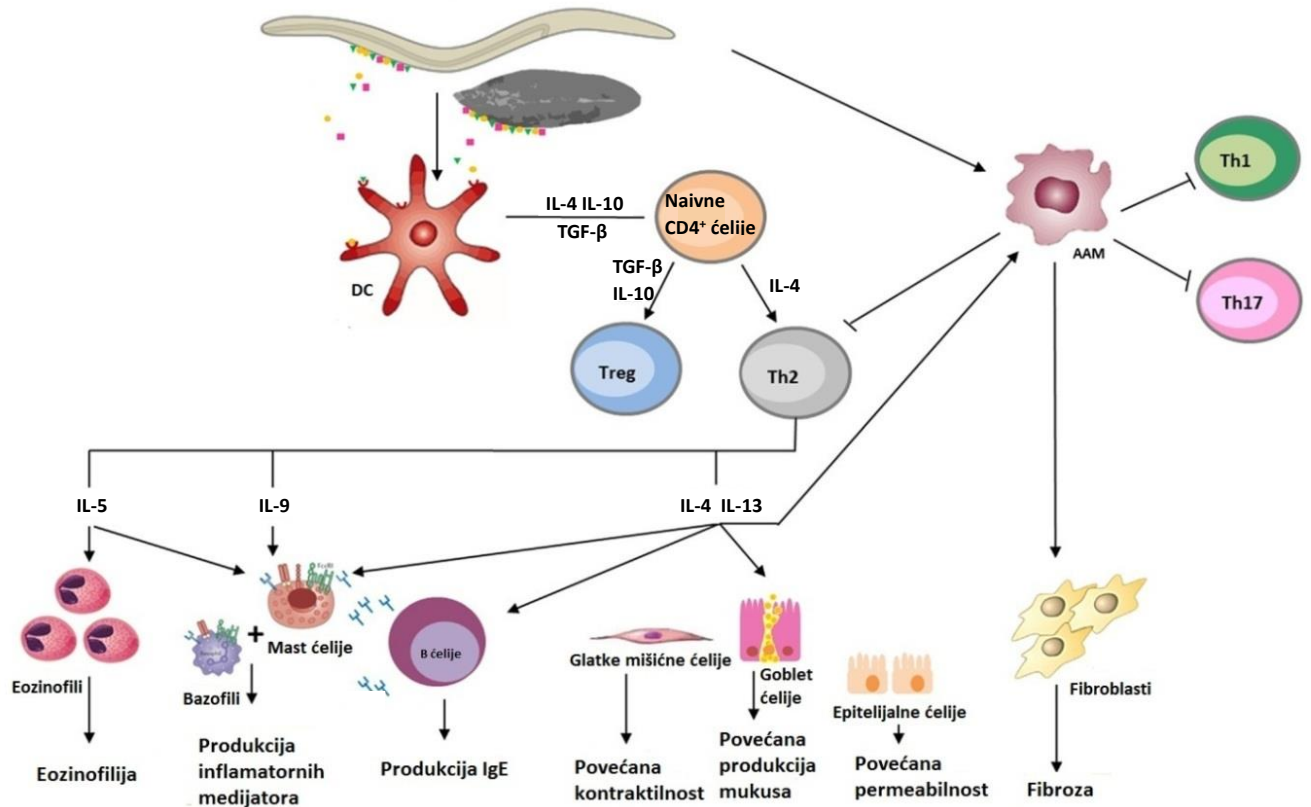
1.5.1. Higijenska hipoteza

Veliki broj epidemioloških istraživanja su pokazala da u područjima sa visokim stopama infekcija crevnim parazitima, oboljenja poput astme i drugih alergijskih bolesti, nisu toliko zastupljene kao u razvijenim zemljama [109–113]. Naime, visoko industrijalizovane zemlje, zahvaljujući dobrim sanitarnim uslovima i visokom nivou zdravstvene zaštite, sveli su kontakte ljudi sa infektivnim agensima na minimum [114]. Negativna korelacija između učestalosti alergijskih bolesti i infekcija helmintima istražena je još šezdesetih godina prošlog veka, što je dovelo do formulisanja "higijenske hipoteze". Ova hipoteza sugerise da smanjena izloženost infektivnim agensima u detinjstvu može ometati pravilan razvoj imunskog sistema, čineći ga sklonim preteranom odgovoru na autoantigene (što vodi ka razvoju autoimunskih bolesti) ili na strane, nepatogene antigene, poput alergena (što vodi ka alergijskim bolestima) [115,116]. Adekvatno sazrevanje imunskog sistema u velikoj meri zavisi i od mehanizama koji se aktiviraju tokom imunskog odgovora na infekciju parazitima, kao što su infekcije sa helmintima.

1.5.2. Imunski odgovor na helmintske parazite

Helminti predstavljaju široku grupu višćelijskih organizama, unutar koje se posebno izdvajaju brojne parazitske vrste adaptirane na život unutar tela domaćina, bilo da su to ljudi ili životinje. Parazitske helminte karakteriše složen životni ciklus sa više razvojnih stadijuma, koji se često odvijaju u različitim domaćinima, uključujući kičmenjake i bezkičmenjake. Tokom dugog procesa ko-evolucije, oni su razvili različite mehanizme kojima uspešno izbegavaju ili ograničavaju imunski odgovor domaćina, što im omogućava da godinama prežive u organizmu domaćina [117]. Imunski odgovor na helminte, koji služi da efikasno ukloni parazite, ograniči njihovo širenje i smanji štetu uzrokovanu infekcijom parazitima, ima brojne sličnosti sa imunskim reakcijama u alergijama (Th2 citokinski profil, povećano prisustvo IgE antitela, aktivacija eozinofila i mast ćelija). Međutim, zbog specifičnih odbrambenih mehanizama, neki helminti indukuju kombinaciju modifikovanog Th2 i regulatornog odgovora što omogućava parazitima da opstanu u domaćinu (Slika 3.) [118]. Kliničke studije su pokazale da infekcije helmintima podstiču i razvoj toIDC, putem kojih stimulišu regulatorni imunski odgovor [119–122]. Zbog ovih saznanja sproveden je značajan broj eksperimentalnih studija koje se fokusiraju na ispitivanje supresije autoimunskih i alergijskih bolesti primenom infekcija različitih helminata, kao i proizvoda ovih parazita ili primenom rekombinantnih komponenti parazitskih proizvoda.

Na mišjem modelu respiratornih alergija indukovanih sa ovalbuminom (OVA) pokazano je da infekcije različitim vrstama helminata smanjuju simptome. Infekcija helmintom *Heligmosomoides polygyrus* snižava nivo eozinofila indukovanih alergijom i smanjuje nivo inflamacije u bronhoalveolarnim putevima [123–125]. Takođe, infekcija miševa helmintom *Schistosoma mansoni* smanjuje inflamaciju u toku alergijske reakcije, što je posledica smanjene ekspresije IL-5 citokina i povećane ekspresije IL-10 u ćelijama pluća [126]. OVA indukovana alergija je ispitivana i kod miševa koji su inficirani helmintom *Trichinella spiralis*, kod koje je pokazano da i u toku hronične i u toku akutne faze infekcije dolazi do snižavanja simptoma alergije [127]. Mnoge studije ukazuju da je *Trichinella spiralis*, zahvaljujući svom jedinstvenom životnom ciklusu i sposobnosti da izazove imunomodulaciju, izuzetno pogodan kandidat za ublažavanje simptoma autoimunskih i alergijskih bolesti.



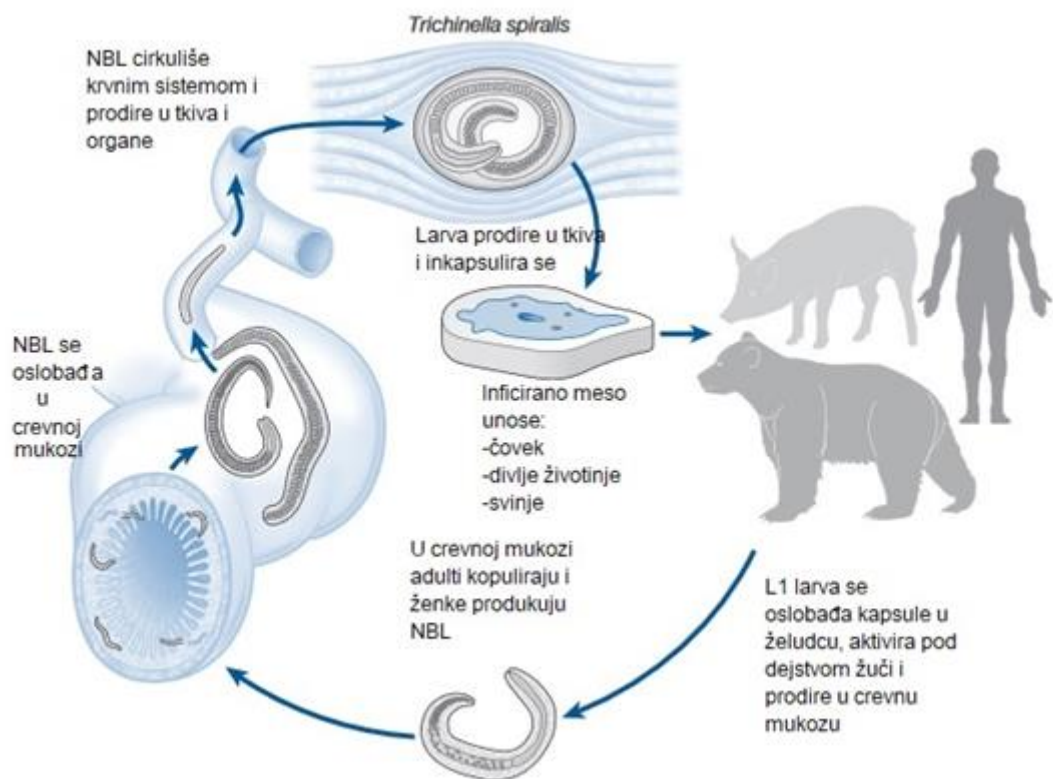
Slika 3. Imunski odgovor na helminte. Infekcija helmintima dovodi do širenja modifikovanog Th2 imunskog odgovora. Antigeni parazita prepoznaju dendritske ćelije (DC), koje prezentuju antigene parazita naivnim T ćelijama. Diferencijacija Th2 ćelija utiče na produkciju citokina IL-5 (koji pospešuje eozinofiliju), IL-4, IL-9, IL-13, kao produkciju IgE antitela, koji se vezuju za FcεRI receptore na bazofilima i mast ćelijama što utiče na oslobađanje inflamatornih medijatora. IL-4 i IL-13 povećavaju pokretljivost ćelija glatkih mišića, stimulišu intestinalnu permeabilnost i povećavaju lučenje mukusa. Ovi citokini takođe podstiču diferencijaciju alternativno aktiviranih makrofaga (AAM), koji mogu inaktivirati diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija, a u nekim slučajevima mogu da indukuju fibrozu u tkivima. Infekcije sa helmintima usled svojih odbrambenih mehanizama izbegavanja imunskog odgovora utiču i na diferencijaciju regulatornih T ćelija usled kojih dolazi do širenja anti-inflamatornih citokina. Preuzeto iz [128].

1.6. *Trichinella spiralis*

1.6.1. Životni ciklus

T. spiralis je parazitski helmint razreda Nematoda koji je zastupljen kako kod domaćih životinja, najčešće svinja, tako i kod divljih životinja kao što su divlja svinja, medved, lisica i dr. Kod ljudi *T. spiralis* izaziva trihinelozu, oboljenje koje najčešće ima blagu kliničku sliku i često prolazi bez izraženih simptoma, dok u retkim slučajevima može doći do ugrožavanja vitalnih funkcija i smrti domaćina. *T. spiralis* je jedinstvena nematoda po tome što se sva tri stadijuma životnog ciklusa – adultni oblik, novorođena larva (engl. new born larvae, NBL) i infektivna mišićna larva (L1) razvijaju unutar jednog domaćina [129]. Takođe, za razliku od drugih intracelularnih parazita, *T. spiralis* ne uništava mišićne ćelije koje naseljava, što je čini jednom od najuspešnijih simbiotskih parazita [130,131].

Infekcija domaćina nastaje usled konzumiranja mesa koje u sebi sadrži inkapsulirane infektivne larve L1 (Slika 4.). U želudcu dolazi do razlaganja kapsule usled dejstva hlorovodonične kiseline i gastrointestinalnih enzima što omogućava oslobađanje infektivnih larvi. Oslobođene larve se aktiviraju pomoću uticaja žučnih sokova i prodiru u mukoza tankog creva, nakon čega se presvlače četiri puta tokom prvih 30 sati (stadijumi sazrevanja L2-L4) i sazrevaju u adulte. Adulti kopuliraju i 5. - 6. dana nakon infekcije ženke mogu da produkuju novorođene larve (engl. newly borne larvae, NBL), u crevnoj mukozi. NBL zatim prodiru u krvotok i limfotok putem kojih dospevaju u razna tkiva i organe. Međutim, samo larve koje prodiru u poprečno-prugaste mišiće mogu da nastave svoj razvoj [132]. Larve probijaju sarkolemu mišićnih ćelija i ulaze u citoplazmu ćelija. Mišićna ćelija zatim gubi organizaciju mišićne ćelije, dolazi do njenog remodelovanja i transformacije u novu strukturu koja se naziva "ćelija negovateljica". Ove ćelije nastaju fuzijom inficirane mišićne ćelije i satelitske ćelije, prekursora mišićne ćelije [133]. Potvrđeno je da se ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi (ES L1) nalaze u citosolu i nukleusima inficiranih mišićnih ćelija i zbog čega se smatra ovi produkti mogu imati važnu ulogu u reorganizaciji ćelija domaćina. Tokom reorganizacije mišićne ćelije dolazi do smanjene ekspresije strukturnih i regulatornih gena, uključujući gene za kontraktilne proteine poput aktina i miozina, dok se istovremeno indukuje ekspresija novih transkripata, kao što su kisela fosfataza, kolagen, solubilni faktor i vaskularni endotelijalni faktor rasta [134–136]. Usled ovih promena oko ćelije negovateljice počinje da se stvara kapsula koja se sastoji od dva sloja, unutrašnji sloj je izgrađen od kolagena tipa IV i njega stvara ćelija negovateljica, dok se spoljašnji sloj sastoji od kolagena tipa VI, koji stvaraju okolni fibroblasti [137]. Kapsula predstavlja polupropustljivu membranu okruženu novoformiranim krvnim sudovima, koja omogućava prolazak hranljivih materija male molekulske mase ka parazitu, kao i transport ES L1 iz parazita ka domaćinu. Istovremeno, kapsula onemogućava prolaz specifičnih antitela i imunskih ćelija usmerenih protiv parazitskih komponenti, čime se parazitu omogućava da ostane neprimećen u organizmu domaćina i po nekoliko godina [138,139].



Slika 4. Životni ciklus *Trichinella spiralis*. Infekcija počinje konzumiranjem mesa inficiranog sa L1 larvama *T. spiralis*. U želudcu L1 larve se oslobađaju kapsule nakon čega prodiru u crevnu mukozu gde sazrevavaju u adultne forme. Adulti komuliraju i ženke proizvode novorođene larve (NBL) koje cirkuliraju krvnim sistemom i prodiru u tkiva i organe. Samo larve koje prodiru u poprečno-prugaste mišiće nastavljaju razvoj. U mišićima, larve probijaju sarkolemu mišićnih ćelija, prodiru u citoplazmu i formiraju ćeliju negovateljicu unutar koje se inkapsuliraju, čime nastaje L1 stadijum larve *T. spiralis*. Preuzeto iz [140].

S druge strane, *T. spiralis* svojim ES L1 produktima utiče na modulaciju imunskog odgovora domaćina, i to ne samo usmerenog prema helmintskim antigenima, već i prema drugim, irelevantnim antigenima kao što se autoantigeni ili alergeni, što može dovesti do ublažavanja prekomernog imunskog odgovora povezanog sa stanjima kao što su alergije i autoimunske bolesti i doprineti opštem balansu imunskog sistema.

Efekat infekcije *T. spiralis* na ublažavanje inflamatornih bolesti pokazan je u brojnim životinjskim modelima, uključujući modele ulcerativnog kolitisa [141][142,143], dijabetesa tipa 1 [144], reumatoidnog artritisa [145], multiple skleroze [146,147] i respiratorne alergije [148,149].

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna, demijelinizirajuća i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Imunopatologija MS-a posredovana je aktivacijom Th1 i Th17 ćelija, koje infiltriraju CNS i reaguju na sopstveni mijelin kao antigen. Ove ćelije proizvode inflamatorne citokine, pre svega IFN- γ i IL-17, koji doprinose oštećenju mijelina i aksona, što je povezano sa progresivnom neurodegeneracijom i razvojem invaliditeta. Istraživanja na životinjskom

modelu MS, eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu (engl. experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), pokazala su da infekcija sa *T. spiralis* utiče na ublažavanje kliničke slike EAE-a [146]. Infekcija sa *T. spiralis* ublažava simptome EAE-a tako što usmerava imunski odgovor ka anti-inflamatornom profilu i ekspanziji Treg, što utiče na povećanu produkciju IL-4, TGF- β i IL-10, smanjenu produkcije IFN- γ i IL-17 [147,150]. Kako se infekcija ne može primenjivati u terapijske svrhe, proučavani su i efekti produkata mišićnih larvi *T. spiralis* i pokazano je da primena ES L1 produkata dovodi takođe do ublažavanja simptoma u EAE modelu, kao i da mehanizmi delovanja uključuju antiinflamatorni i regulatorni tip imunskog odgovora. ES L1 produkti dovode i do smanjene ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP) koje su uključene u mehanizme za indukciju neuroinflamacije, demijelinizacije i oštećenja aksona, kao što je MMP-9 [151].

Slično kao u modelu MS, u eksperimentalnom modelu respiratornih alergija indukovanih sa OVA, pokazano je da infekcija sa *T. spiralis* dovodi do smanjenja inflamacije u bronhoalveolarnim putevima i do povećanog prisustva Treg u drenirajućim limfnim čvorovima, gde dolazi i do povećane ekspresije IL-10 i TGF- β [148]. Takođe je pokazano da se značajno povećanje Treg događa u hroničnoj fazi infekcije, u kojoj mišićna larva *T. spiralis* proizvodi ES L1 [127]. Istraživanja u kojima su korišćene adultne forme *T. spiralis* su pokazala da i adultne forme mogu da utiču na smanjenje IFN- γ , IL-4, OVA specifičnih IgE i eozinofila ali i na povećanje nivoa IL-10 [149].

Primena antigena *T. spiralis* može smanjiti nivo inflamacije prisutne u alergijskim i autoimunskim bolestima, što ukazuje na potencijalnu terapijsku upotrebu istovremeno rešavajući problem upotrebe živih parazita u terapijskim pristupima.

1.6.2. Antigeni parazita *T. spiralis*

Antigeni *T. spiralis* igraju ključnu ulogu u imunskom odgovoru domaćina na infekciju i u samom preživljavanju parazita. U zavisnosti od lokalizacije, oni mogu biti površinski, koji se nalaze na kutikuli parazita, ekskretorno-sekretorni, koje parazit izlučuje i somatski koji se nalaze unutar struktura parazita i postaju dostupni u toku promena stadijuma parazita ili ukoliko dođe do uništavanja parazita [152]. Antigeni *T. spiralis* mogu biti specifični za određene životne stadijume, kao što je ES L1 koji oslobađa mišićna larva, ili prisutni u svim fazama razvoja [153]. Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum parazita dolazi do promena u ekspresiji antigenskih molekula, kako površinskih tako i ekskretorno-sekretornih što predstavlja jednu od mogućih strategija izbegavanja imunskog odgovora domaćina. Mnogi od ovih antigena su imunogeni i utiču na razvoj imunskog odgovora kod domaćina koji se sastoji iz dve faze koje se razlikuju po tome da li se proizvode antitela na antigene u toku prve faze infekcije (antigene karakteristične za unutrašnje strukture parazita) koja traje dve nedelje nakon

infekcije, ili proizvode antitela na antigene koji se proizvode u toku druge kasnije faze infekcije koja počinje 4-5 nedelja nakon infekcija. Drugu fazu indukuju antigeni prisutni na površini parazita i u ES proizvodima L1 larvi [154] koji su označeni kao TSL antigeni. Primenom monoklonskih antitela antigeni mišićnih larvi *T. spiralis* su klasifikovani u 8 grupa (TSL1-TSL8) [155]. TSL-1 antigeni su glikoproteini koji su zastupljeni kako u ES L1 produktima tako i na površini kutikule parazita [156].

ES L1 produkti koje mišićna larva proizvodi nakon inkapsulacije su do sada samo delom okarakterisani. Pokazano je da sadrže proteine toplotnog šoka, endonukleaze, proteinaze, protein-kinaze, inhibitore proteinaza, superoksid-dismutaze, glikozidaze itd. [157]. Najzastupljeniji proteini u sastavu ES L1 jesu TSL-1 glikoproteini molekulskih masa 43, 45 i 53 kDa koje prepoznaje 7C2C5Ag antitelo [158]. TSL-1 glikoproteini poseduju u svom sastavu N-glikane sa tri- i tetra-antenarnom strukturom, koja sadrži grane (tzv. antene) GalNAc β 1–4 GlcNAc β , na čijim terminalnim delovima se nalazi šećer tivoza (3,6-dideoksi-D-arabinoheksosa, Tyv), šećer karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog genusa *Trichinella* [159,160]. Veliki broj ovih grana je fukozilovan na GlcNAc reziduama [161]. Gruden-Movsesijan i saradnici (2002) su opisali da N-glikani mišićne larve *T. spiralis* poseduju strukture sa terminalno postavljenom manozom i trimanoznim jezgrom, pri čemu je jezgro uglavnom fukozilovano. Tivoza formira epitope na glikanskom antigenima koji stimulišu stvaranje antitela specifična za stadijum mišićne larve koja mogu da štite od reinfekcije [162,163]. Manozu u ES L1 produktima prepoznaje C tip lektinskih receptora (kao što je DC-SIGN prisutan na tolDC). Ovi receptori su ključni za prepoznavanje antigena, njihovu internalizaciju i prezentaciju od strane dendritskih ćelija T limfocitima što stimuliše njihovu diferencijaciju i proliferaciju.

Infekcija *T. spiralis* ima dugotrajan uticaj na imunski sistem domaćina zahvaljujući ES L1 produktima. Osim što pokreću Th2 imunski odgovor, koji tokom infekcije nadjačava Th1 odgovor, ES L1 proizvodi takođe aktiviraju regulatorne mehanizme koji ne samo da omogućavaju parazitu da izbegne imunski odgovor domaćina, već i ublažavaju preterane i neželjene imunske reakcije, poput onih usmerenih na autoantigene. Ova složena interakcija između parazita i imunskog sistema domaćina predstavlja bogat izvor potencijalnih imunomodulatornih mehanizama koji bi mogli biti iskorišćeni za kontrolu autoimunskih i alergijskih bolesti.

Imunomodulatorna svojstva produkata *T. spiralis* potvrđena su u animalnim modelima bolesti kao što je EAE, kako prilikom direktne primene, tako i putem DC koje su prethodno tretirane ovim produktima. Pokazano je da primena ekstrakata ukupnih solubilnih proteina mišićnih larvi smanjuje produkciju Th1 citokina (TNF- α i IL-12) kod DC aktiviranih sa inflamatornim stimulansom, dok istovremeno povećava ekspresiju molekula OX40L, koji ima ključnu ulogu u polarizaciji imunskog odgovora ka Th2 i regulatornom tipu [164]. Smatra se da profilaktička primena ES L1 produkata

putem ovih efekata ublažava simptome EAE kod miševa. Istraživanja Sofronić-Milosavljević i saradnika (2013) su pokazala da ES L1 indukuje razvoj poluzrelih DC sa smanjenom produkcijom IL-12, ali povećanom produkcijom IL-10, što se pokazalo efikasnim u prevenciji i ublažavanju EAE kod Dark Agouti pacova. U ovom modelu, pacovi tretirani DC, koje su prethodno stimulisane sa ES L1, su imali smanjenu produkciju IL-17 i IFN- γ , i povećanu produkciju IL-4, IL-10 i TGF- β , kako na lokalnom nivou CNS-a tako i na sistemskom nivou. Povećanje broja CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatornih T ćelija, zajedno sa povišenim nivoima IL-10 i TGF- β , ukazuje na ključnu ulogu ovih mehanizama u supresiji inflamacije u modelu EAE.

U *in vitro* istraživanjima na humanim DC, pokazano je da ES L1 indukuje razvoj tolerogenih DC putem aktivacije receptora TLR2, TLR4 i DC-SIGN. ES L1 produkti su stimulisali ekspresiju CD40 i CCR7 markera na DC putem aktivacije DC-SIGN receptora. S druge strane, rezultati ovih istraživanja su pokazali da je neophodna aktivacija TLR2, TLR4 i DC-SIGN da bi se stimulisala diferencijacija Th2 i Treg ćelija u ko-kulturi [165,166].

Pored solubilnih molekula, *T. spiralis* proizvode ekstraselularne vezikule i u adultnim i u mišićnim stadijumima. Pokazano je da ES L1 produkti sadrže i ekstraselularne vezikule koje imaju imunomodulatorne sposobnosti slične onim koje su pokazane sa primenom ES L1 produkata.

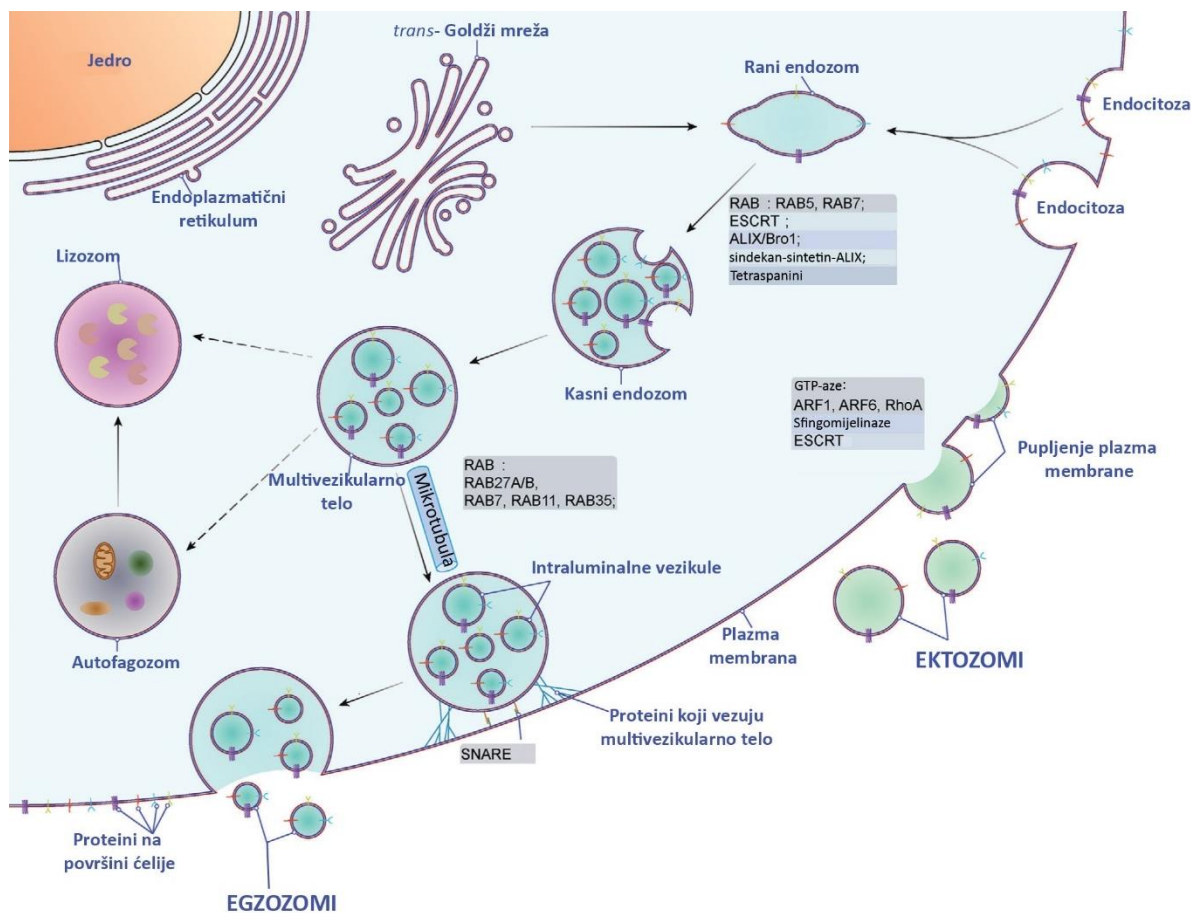
1.7. Ekstraselularne vezikule

Ekstraselularne vezikule (EV) su biološkom membranom ograničene vezikule, koje sve vrste ćelija oslobađaju u ekstraselularni prostor. One predstavljaju pakete biomolekula koje ćelije razmenjuju u svim fiziološkim i patofiziološkim stanjima u organizmu i stoga su definisane kao jedan od fundamentalnih načina međućelijske komunikacije [167,168]. U zavisnosti od biogeneze i veličine razlikuju se dve vrste vezikula i to egzozomi i ektozomi [169]. U širem smislu tu spadaju i apoptotska tela koja se mogu klasifikovati kao EV ali je njihova uloga u međućelijskoj komunikaciji manje istražena.

1.7.1. Biogeneza i podela

Proces biogeneze vezikula obuhvata selektovanje i pakovanje molekulskog sadržaja ćelije u vezikule i njihovo oslobađanje, bilo iz multivezikularnih tela, kao u slučaju egzozoma, ili direktno sa plazma membrane, kao u slučaju ektozoma (Slika 5.) [170]. Biogeneza egzozoma započinje formiranjem ranog endozoma, koji može nastati endocitozom plazma membrane ili odvajanjem sa trans strane Goldžijevog kompleksa [171]. Rani endozomi sazrevaju u kasne endozome tj. multivezikularna tela (engl. multivesicular body, MVB), invaginacijom njihove membrane koja vodi

formiranju intraluminalnih vezikula (ILV), unutar MVB. Opisana su dva mehanizma nastanka ILV, jedan koji uključuje endozomalni kompleks za sortiranje (engl. endosome sorting complexes required for transport, ESCRT) i jedan nezavisan od ESCRT. U prvom mehanizmu se sortiraju ubikvitovani proteini sukcesivnim smenjivanjem ESCRT 0, I, II i III kompleksa proteina u okviru kojeg dolazi do invaginacije membrane i formiranja ILV [172]. U **ESCRT nezavisne mehanizme** ubrajaju se sindekan-sintetin ALIX signalna transdukcija [173], ceramidni put [174] i put koji uključuje tetraspanin CD63 [175]. U oba tipa mehanizama su uključeni i tetraspanini, proteini slični proteinima toplotnog šoka 70 kDa (engl. heat-shock cognate, Hsc) i sfingozin-1-fosfat kao i komponente lipidnih ostrvaca. Nakon formiranja ILV, MVB se prenose do plazma membrane putem Rab proteina koji pripadaju porodici enzima koji hidrolizuju guanozin trifosfat u guanozin difosfat (GTP-aze) i putem mikrotubula [176]. Fuzija MVB sa plazmamembranom i konačno oslobađanje egzozoma iz ćelije je omogućeno putem receptora za vezivanje solubilnih proteina osetljivih na N-etilmaleimid (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE) [177]. Međutim, umesto da se uputi ka plazma membrani, MVB može da se spoji i sa lizozomom, u kom slučaju dolazi do razgradnje njegovog sadržaja. Još uvek nije u potpunosti poznato šta određuje da li će MVB biti selektovan za oslobađanje vezikula u spoljašnju sredinu ili za razgradnju ali se smatra da to zavisi od posttranslacionih modifikacija proteina gena 101 povezanog za predispozicijom na tumore (engl. tumor susceptibility gene 101, TSG101) i tetraspanina 6.



Slika 5. Biogeneza i oslobađanje ekstracelularnih vezikula (EV). Proces oslobađanja egzozoma u ekstracelularnu sredinu uključuje tri ključna: biogenezu egzozoma, intracelularni transport multivezikularnih tela i njihovo spajanje sa plazma membranom. Rani endozomi nastaju endocitozom plazma membrane ili od trans-Goldži mreže. Rani endozomi sazrevaju u kasne endosome, koji potom formiraju multivezikularna tela (MVB) kroz proces unutrašnjeg uvlačenja membrane endozoma, čime se stvaraju intraluminalne vezikule. Multivezikularna tela se mogu spojiti sa plazma membranom, što dovodi do oslobađanja egzozoma u ekstracelularni prostor, ili njihovo spajanje sa lizozomima ili autofagozomima, gde se razgrađuju. U biogenezi egzozoma, njihovom transportu i fuziji sa plazma membranom učestvuje više molekula kao što su RAB proteini, ESCRT kompleksi, sindekan, tetraspanini, aktin i SNARE proteini. Ektozomi nastaju pupljenjem plazma membrane. Njihova biogeneza i oslobađanje takođe uključuju više molekula, uključujući male GTP-aze, ESCRT komplekse i sfingomijelinaze. Preuzeto iz [170].

Ektozomi nastaju pupljenjem plazma membrane. U zavisnosti od toga šta stimuliše pupljenje plazma mebranu razlikuje se više vrsta ektozoma kao što su mikrovezikule, onkozomi koje oslobađaju tumorske ćelije, migrazomi koje oslobađaju izbočeni delovi membrana migratornih ćelija, egzofere koje sadrže oštećene organele i proteinske agregate itd. [169]. Ovaj proces uključuje proteine ESCRT kompleksa, GTP-aza poput ARF1, ARF6 i RhoA, kao i prisustvo sfingomijelinaze ali ovi mehanizmi nisu još u potpunosti razjašnjeni [178].

1.7.2. Fizičko-hemijske karakteristike i sastav EV

S obzirom na to da se smatra da je srednja veličina dijametra egzozoma manja od srednje veličine ektozoma, njihovi opsezi dijametara se toliko preklapaju da se ne mogu koristiti kao pouzdan

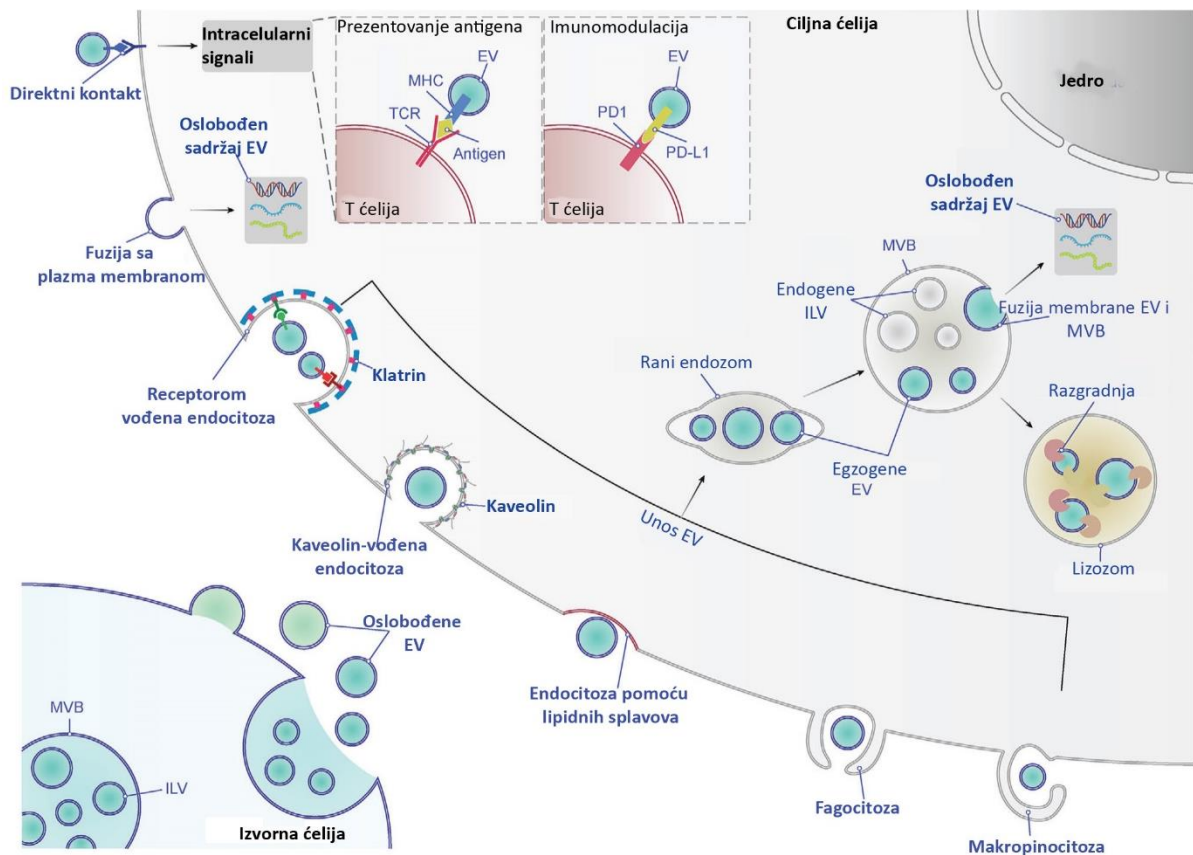
kriterijum za razlikovanje ova dva tipa vezikula [179]. Zbog toga će se u nastavku koristiti termin ekstracelularne vezikule, kao zajednički naziv za oba tipa vezikula.

EV sadrže proteine, nukleinske kiseline, lipide i metabolite. Različiti biomolekuli, a naročito proteini, mogu se nalaziti unutar lumena vezikula, biti ugrađeni u njihovu membranu kao transmembranski proteini, ili biti asocirani za spoljašnju površinu EV. Proteini i drugi molekuli asocirani za spoljašnju površinu EV zajedno čine koronu EV (engl. corona EV). Sastav EV u velikoj meri zavisi od različitih faktora, uključujući fiziološko stanje ćelije, tip i intenzitet stimulusa kojem je ćelija izložena, kao i mehanizme biogeneze specifičnih subpopulacija EV. Jedna ćelija, tako, može u istom trenutku oslobađati EV različitog sastava. Zbog ove visoke heterogenosti EV, do sada nije identifikovan nijedan protein koji se nalazi u svim EV, tj. koji bi mogao poslužiti kao biomarker svih EV. Međutim, neki od često pristutnih proteina u EV se ipak koriste kao markeri, najčešće u kombinaciji. Neki od takvih markera su tetraspanini (CD9, CD63 i CD81) ili proteini ključni za biogenezu vezikula poput ALIX i TSG101. Osim markera, EV takođe mogu prenositi transkripcione faktore, faktore rasta, citokine, hemokine i razne druge proteine, a njihov sadržaj i zastupljenost variraju u zavisnosti od ćelije porekla i njenog stanja [180]. Tako je pokazano da EV poreklom od Treg poseduju CD4 i CD25 markere karakteristične za ove ćelije kao i IL-35, koji ima ulogu u imunosupresiji [181]. Sadržaj lipida, pored proteina, obuhvata i lipide, i to one koju su zastupljeni i u ćelijskim membranama, kao što su sfingomijelin, holesterol, ganglioizid GM3, disaturisani lipidi, fosfatidilserin i ceramid itd. Razlike u lipidnom sastavu različitih tipova EV odražavaju njihove puteve biogeneze jer lipidni profil zavisi od toga da li EV potiču iz plazma membrane ili endozomalnog sistema, što može dalje uticati na mehanizam njihove internalizacije [182]. Lipidi EV mogu imati i regulatornu ulogu pa je tako pokazano da EV poreklom od dendritskih ćelija poseduju lizofosfatidilholin koji utiče na dopremanje T limfocita do limfnih čvorova [183]. U EV se takođe mogu naći fragmentisani delovi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) koja može biti genomska i mitohondrijalna kao i molekuli ribonukleinske kiseline (RNK) kao što su informacione RNK (iRNK) i/ili male RNK [184]. Različite vrste malih RNK su nađene u EV: mikroRNK (miRNK), ribozomalna RNK, kratke ne-kodirajuće RNK, fragmenti transportne RNK, piwi interagujuće RNK i YRNK. Transport RNK u okviru EV ih štiti od digestije RNazom kada su u ekstracelularnom prostoru. Neke RNK su stabilizovane vezivanjem za proteine kao što su ribonukleoproteini, argonaut2 (AGO2), lipoproteini visoke ili niske gustine (engl. High-density lipoproteins, HDL; low-density lipoproteins, LDL). Ovi proteini su nađeni i u EV [185]. miRNK su molekuli nekodirajuće RNK dužine 19-24 nukleotida (nt) koje utiču na translaciju iRNK (gensku ekspresiju) i imaju udela u regulaciji skoro svih bioloških procesa. U mnogim studijama je pokazano da EV prenose miRNK. EV poreklom od Treg

mogu da prenesu miR-150-5p i miR-142-3p dendritskim ćelijama, čime utiču na promenu fenotipa u tolerogeni i stimulišu povećanu ekspresiju IL-10 citokina čak i nakon dodatne stimulacije dendritskih ćelija sa inflamatornim stimulusom, kao što je lipopolisaharid (LPS) [186].

1.7.3. Interakcija EV i ciljnih ćelija

EV oslobođene iz ćelija mogu stići do drugih, prostorno bliskih ili udaljenih ćelija prolaskom kroz ekstracelularni prostor ili putem telesnih tečnosti. EV ciljnim ćelijama prenose bioinformacije putem: direktnog kontakta molekula na površini EV i ciljne ćelije; fuzije EV sa plazma membranom i oslobađanjem sadržaja u citosol ćelije; endocitozom EV u toku koje dolazi do fuzije EV sa membranom endozoma i oslobađanjem sadržaja u citosol (Slika 6.) Direktni kontakt EV sa ćelijom obuhvata interakciju liganda i receptora gde ne dolazi do dopremanja sadržaja vezikula do citoplazme ćelije. Ovaj način komunikacije, prikazan kroz interakciju EV iz B limfocita i DC, koje na površini nose MHC molekule poreklom od tih ćelija i na taj način aktiviraju naivne T limfocite [187]. EV mogu da nose i inhibitorne molekule na površini kao što PD-L1 koji ima imunosupresivno dejstvo i zaustavlja proliferaciju T limfocita [188]. Unos sadržaja vezikula u različite vrste ćelija može biti preko fuzije sa membranom (u toku koje se i deo membrane EV integriše u plazma membranu ciljne ćelije [189]) ili preko različitih mehanizama endocitoze kao što su: receptorom vođena endocitoza, kaveolin-vođena endocitoza, endocitoza pomoću lipidnih splavova, fagocitoza i makropinocitoza. U oba slučaja sadržaj EV dospeva u unutrašnjost ciljne ćelije, pokrećući signalne transdukcije. Ove signalne promene dalje dovode do različitih fizioloških i patoloških promena u organizmu.



Slika 6. Interakcija EV sa ciljnom ćelijom. EV mogu pokrenuti intracelularne signalne transdukcije prijemnih ćelija putem direktnog kontakta liganda i receptora, kao što su prezentacija antigena, imunska modulacija itd. Egzogene EV mogu preneti svoj sadržaj fuzijom sa plazma membranom ili endocitozom (receptorima vođena endocitoza, kaveolin-vođena endocitoza, endocitoza pomoću lipidnih splavova, fagocitoza i makropinoza). Fuzija EV sa plazma membranom može osloboditi njihov sadržaj u citoplazmu ćelije, dok EV internalizovane endocitozom stižu do multivezikularnog tela (MVB) putem endozomalnog puta. Ove EV se mogu razgraditi ukoliko stupe u kontakt sa lizozomom. Takođe EV mogu da oslobode svoj sadržaj u citosol ćelije putem fuzije sa membranom MVB. ILV-intraluminalne vezikule. Preuzeto iz [170].

EV imaju ulogu u skoro u skoro svim fiziološkim procesima i pronađene su u svim telesnim tečnostima kao što su krv, urin, pljuvačka, suze, semena tečnost, cerebro-spinalna tečnost, pleurnarna tečnost itd [190].

Analizom pleuralne i bronhoalveolarne tečnosti (engl. Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) utvrđeno je prisustvo EV koje u zdravim plućima potiču od respiratornog epitela, endotelskih ćelija plućnih krvnih sudova, glatko-mišićnih ćelija i fibroblasta [191,192]. EV mogu da potiču i od imunskih ćelija prisutnih u plućima, kao što su alveolarni makrofagi, eozinofili i neutrofilni i EV mogu da sadrže MHC molekule, kostimulatorne molekule kao što je CD86, kao i CD36, koji je ključan za prepoznavanje bakterijskih antigena [193]. EV poreklom od imunskih ćelija ključne su u regulaciji inflamacije bronhoalveolarnih puteva pa tako EV poreklom od alveolarnih makrofaga prenose miR-223 i miR-10 do ćelija plućnog epitela koje utiču na eksprimiranje anti-inflamatornih citokina i održavanje homeostaze pluća [192].

Zastupljenost ovih EV zavisi od fiziološkog stanja pluća i menja se u različitim patološkim uslovima, zbog čega EV mogu poslužiti kao biomarkeri za različite bolesti. EV su uključene u sve fiziološke procese, a promene u njihovom broju, sastavu ili efikasnosti prenosa informacija odražavaju različita patološka stanja. Istraživanja EV u telesnim tečnostima pokazala su njihovu značajnu ulogu u modulaciji inflamatornih procesa i razvoju brojnih bolesti kao što su respiratorne alergije. Analizom EV iz krvi atopičara utvrđeno je povećano prisustvo EV poreklom iz eozinofila, koje utiču na povećanu produkciju reaktivnih oblika kiseonika, stimulišu hemotaksu eozinofila i njihovu adheziju za površinu ćelija pluća. Ove EV utiču i na strukturno remodelovanje bronhoalveolarnih puteva, povećanu apoptozu eozinofila za ćelije respiratornog epitela i na stvaranje fibroznog tkiva u plućima [194]. EV poreklom od mast ćelija mogu da prenose histamine, prostaglandine i druge inflamatorne medijatore do okolnih ćelija prisutnih u plućnom epitelu i time da utiču na aktivaciju B i T limfocita [195]. Sa druge strane EV poreklom od B limfocita mogu da stimulišu proliferaciju T ćelija i pospešuju njihovo otpuštanje IL-4, IL-5 i IL-13 citokina.

EV poreklom od ovih ćelija mogu da služe i kao biomarkeri ovih bolesti pa je tako primećeno da EV iz plazme i pljuvačke asmaticara poseduju povećan nivo miR-122-5p, u čije target gene spadaju geni za funkcionisanje i aktivaciju APC kao i geni za diferencijaciju Th2 ćelija [196].

Ova istraživanja ukazuju da bolje razumevanje međućelijske komunikacije putem EV u (pato)fiziološkim stanjima može da ukaže na to koji su ključni molekuli koji bi se mogli targetirati novim terapijama.

1.7.4. Uloga EV u međućelijskoj komunikaciji između različitih organizama

EV omogućavaju međućelijsku komunikaciju između ćelija jednog organizma ali i između ćelija različitih organizama. Brojna istraživanja sprovedena su u cilju razumevanja mehanizama pomoću kojih patogeni organizmi kao što su bakterije, gljivice ili paraziti utiču na imunski odgovor pri čemu je pokazano da mnogi od tih mehanizama uključuju EV. Tako EV poreklom od patogenih bakterija *Klebsiella Pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* mogu da aktiviraju otpuštanje inflamatornih citokina iz ćelija pluća ali i omogućavaju homolog prenos gena između bakterija koje su rezistentne na antibiotike [197]. EV poreklom od gljive *Cryptococcus neoformans* modulišu imunski odgovor tako što onemogućavaju otpuštanje inflamatornog citokina IL-12 iz makrofaga i stimulišu otpuštanje anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- β [198].

Kao što je ranije navedeno, parazitski helminti su razvili strategije pomoću kojih manipulišu imunskim sistemom domaćina. Analizom njihovih parazitskih produkata utvrđeno je prisustvo

parazitskih EV koje direktno interaguju sa različitim ćelijama domaćina i prenose bioaktivni sadržaj kojim modulišu njihovu fiziologiju uglavnom u cilju regulacije i kontrole inflamacije.

1.7.4.1. Imunomodulatorna uloga EV parazitskih helminata

Helminti koriste različite odbrambene mehanizme kako bi izbegli imunski odgovor domaćina, među kojima je i oslobađanje ekstracelularnih vezikula [199]. Ove EV imaju ključnu ulogu u interakciji sa imunskim sistemom domaćina, modulišući imunski odgovor i olakšavajući preživljavanje parazita. Okarakterisane su EV koje oslobađaju različite vrste helminata, koje uključuju metilji (*Fasciola hepatica* [200], *Echinostoma caproni* [201], *Dicrocoelium dendriticum* [202], *Opisthorchis viverrini* [203], *Schistosoma mansoni* [204] i *S. japonicum* [205]); pantljičare (*Echinococcus multilocularis* [206], *E. granulosus* [207], *Taenia crassiceps* [208], i *Mesocestoides corti* [209]); nematode (*Heligmosomoides polygyrus* [210], *Trichuris suis* [211], *T. muris* [212], *Trichinella spiralis* [213], *Teladorsagia circumcincta* [214], *Brugia malayi* [215], *Dirofilaria immitis* [216] i *Nippostrongylus brasiliensis* [217]) i drugi helminti.

Efekti helmintskih EV na imunski sistem imaju i svoje prednosti za domaćina, kod koga mogu smanjiti simptome autoimunskih bolesti i alergija. Stoga brojne studije imaju za cilj da pokažu kako primena parazitskih EV u različitim eksperimentalnim modelima autoimunskih bolesti i alergija može dovesti do smanjenja simptoma. Smatra se da bi otkrivanje mehanizama koje pokreću parazitske EV moglo dovesti do nove generacije lekova za ove bolesti.

EV *F. hepatica* sprečavaju pojavu težih simptoma eksperimentalno indukovano ulcerativnog kolitisa tako što utiču na smanjenje ekspresije inflamatornih citokina. Ove EV indukuju kombinovani Th1/Th2 odgovor kod miševa koji se karakteriše specifičnim fenotipom DC (povećavana ekspresija površinskih markera CD80, CD86, CD40 i SIGNR1, i povećana produkcija TNF- α) kao i smanjenim lučenjem IL-2 citokina od strane T limfocita [218]. EV *N. brasiliensis* utiču na smanjenje simptoma kolitisa kod miševa tako što smanjuju ekspresiju citokina IL-6, IL-1 β , IFN- γ i IL-17 u crevima miševa [217].

Međutim samo za EV nekih vrste parazita je pokazano da njihov imunomodulatorni efekat počiva na aktiviraju mehanizama regulatornog imunskog odgovora. Na modelima respiratorne alergije pokazano je da EV *E. granulosus* utiču na smanjenje Th2 i Th17 citokina u BALF, smanjuju zastupljenost CD4⁺IL-4⁺ limfocita, dok povećavaju udeo Treg ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima [207].

Kako je pokazano da ES L1 ima imunomodulatorna svojstva i kako je ranije pokazano da mnogi helminti produkuju EV, postavljena je hipoteza da i *T. spiralis* produkuje EV i da su one

odgovorne za deo imunomodulatornih efekata ES L1. Ova hipoteza je potvrđena istraživanjima koja su 2019. godine dovela do otkrića TsEV [213]. Nadjeno je da su TsEV veličine 30-80 nm, da nose glikoproteine sa imunodominantnim epitopom karakterističnim za mišićne larve roda *Trichinella* kao i da indukuju povećanu ekspresiju IL-10 i IL-6 i smanjenu ekspresiju IL-17 od strane perifernih mononuklearnih ćelija čoveka (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Ovaj efekat je bio sličan efektu samog ES L1, što je išlo u prilog hipotezi da EV imaju imunomodulatornu funkciju. Dodatno, Yang i saradnici su 2020. godine pokazali da TsEV imaju veliki potencijal u regulisanju simptoma eksperimentalno indukovano kolitisa, tako što smanjuju ekspresiju Th1 i Th17 citokina dok stimulišu ekspresiju Th2 citokina i regulatornog imunskog odgovora. Takođe, pokazano je i da miševi, koji su primili TsEV tretman pre indukcije kolitisa, imaju smanjen broj M1 makrofaga i povećan broj alternativno aktiviranih M2 makrofaga u crevima [219]. U *in vitro* istraživanjima potvrđeno je da TsEV promovišu polarizaciju makrofaga poreklom iz koštane srži ka M2b tipu a inhibiraju aktivaciju fibroblasta [220]. Grupa iz Japana je pokazala da adultne forme *T. spiralis* takođe otpuštaju EV i da imaju drugačije funkcije u poređenju sa EV iz mišićnih larvi. EV adultnih larvi suprimiraju ekspresiju mucin asociраниh gena, a EV mišićnih larvi indukuju ekspresiju gena koji utiču na diferencijaciju miooblata. Zajedničko im je to da obe vrste EV deluju inhibitorno na ekspresiju IL-6 citokina [221].

Na osnovu ovih istraživanja može se zaključiti da je TsEV aktivna komponenta *T. spiralis* ES L1 produkata koja u *in vitro* i u *in vivo* eksperimentima utiče na snižavanje ekspresije citokina Th1 i Th17 imunskog odgovora i inflamatornih ćelija ali i da utiče na uravnoteženje preteranog Th2 imunskog odgovora prisutnih u alergijskim bolestima putem stimulanja ćelija regulatornog imunskog odgovora i stimulanja ekspresije anti-inflamatornih citokina. Ovi rezultati ukazuju da bi dalje istraživanje TsEV i njihovih imunomodulatornih kapaciteta moglo voditi dizajnu novih terapijskih pristupa u borbi protiv inflamatornih oboljenja kao što su respiratorne alergije.

2.CILJEVI

Infekcija helmintom *Trichinella spiralis* ili primena ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi ovog parazita (ES L1) dovodi do ublažavanja prekomerne inflamacije koja je prisutna kod autoimunskih i alergijskih oboljenja, aktivacijom regulatornih mehanizama koji kontrolišu funkcionisanje imunskog sistema i intenzitet imunskog odgovora. ES L1 produkti sadrže kompleksnu smešu bioaktivnih molekula, uključujući i ekstracelularne vezikule (TsEV). Ekstracelularne vezikule predstavljaju jedan od osnovnih načina komunikacije između ćelija, kako u okviru jednog organizma, tako i između različitih organizama, pa čak i različitih vrsta. Tako se i komunikacija između parazita i organizma domaćina ostvaruje putem EV. Iako su TsEV prepoznate kao komponenta ES L1, njihova uloga u generisanju tolerogenih DC, ključnih za pokretanje i održavanje Th2 i regulatornog imunskog odgovora karakterističnog za *T. spiralis*, kao i njihov uticaj na ublažavanje alergijskih oboljenja, i dalje su slabo istraženi.

Osnovni cilj istraživanja obuhvaćenih ovom studijom je otkrivanje uticaja primene TsEV na aktivaciju humanih DC i posledičnu polarizaciju T ćelijskog odgovora *in vitro*, kao i na modulaciju imunskog odgovora *in vivo* u animalnom modelu respiratorne alergije. U skladu sa osnovnim ciljem postavljeni su sledeći neposredni zadaci:

1. Karakterizacija TsEV, uključujući njihove fizičke osobine i glikobiološka svojstva.
2. Ispitivanje uticaja TsEV na sazrevanje humanih DC poreklom iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, putem analize ekspresije površinskih markera karakterističnih za DC i njihovog citokinskog profila, kao i ekspresije gena povezanih sa tolerogenim statusom DC.
3. Utvrđivanje kapaciteta DC da prezentuju antigene TsEV i izvrše polarizaciju alogernih naivnih T limfocita poreklom iz humane periferne krvi, ispitivanjem proliferacije i citokinskog profila T limfocita nakon ko-kultivacije sa stimulisanim DC, kao i zastupljenosti regulatornih T ćelija u populaciji efektornih ćelija.
4. Ispitivanje uticaja intranazalno aplikovanih TsEV na imunski odgovor zdravih BALB/c miševa karakterizacijom fenotipa ćelija pluća i slezine.
5. Ispitivanje efekata dva različita modaliteta intranazalne primene TsEV na modulaciju OVA indukovane respiratorne alergije kod BALB/c miševa putem histološke analize pluća, karakterizaciju fenotipa ćelija iz pluća i slezine, merenje produkcije citokina i određivanje nivoa antitela specifičnih za OVA-u serumu.
6. Ispitivanje uticaja *ex vivo* TsEV tretmana na funkcionalne karakteristike imunskih ćelija izolovanih iz pluća i slezina.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Sve životinje koje su korišćene u ovoj studiji nabavljene su iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu i smeštene su za vreme trajanja eksperimenata u vivarijumu INEP-a u skladu sa prethodno razvijenim protokolima u kontrolisanim uslovima, sa nesmetanim pristupom vodi i peletiranoj hrani. Za održavanje soja *T. spiralis* korišćeni su Wistar pacovi muškog pola starosti od 5 do 6 nedelja. Za eksperimente indukovanja respiratorne alergije korišćeni su visoko srodni BALB/c miševi ženskog pola starosti od 6 do 8 nedelja.

Sve procedure u radu sa životinjama bile su u skladu sa pravilnikom i odobrenjima Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama i odobrene su od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (Odluka br. 323-07-00758/2021-05, usvojena datuma 05.02.2021. i Odluka br. 323-07-09554/2022-05, usvojena datuma 22.08.2022).

3.2. Održavanje soja *T. spiralis*

Parazitski helmint *T. spiralis* u INEP-u se održava serijskim pasažom na Wistar pacovima. Izoenzimske analize sprovedene u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite u Rimu (European Union Reference Laboratory for Parasites, Institute Superiore di Sanita, Rome, Italy) potvrdile su da ovaj parazit pripada T1 genskom pulu i da je reč o vrsti *T. spiralis* a izolat je označen kao ISS 7564. Za izolaciju mišićnih larvi (L1 stadijum), pacovi su inficirani sa 8500 infektivnih larvi i žrtvovani dva meseca nakon infekcije.

3.3. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) *T. spiralis*

Nakon žrtvovanja inficiranih pacova, koža i unutrašnji organi su uklonjeni, dok je mišićno tkivo usitnjeno električnim aparatom za seckanje Sencor (Okov, Beograd, Srbija) i korišćeno za izolaciju larvi. Infektivne mišićne L1 larve su izdvojene metodom enzimske digestije mesa (1% pepsin u 1% HCl (pH 1,6-1,8), u toku 4 h na 37°C uz konstantno mešanje) u skladu sa direktivom Evropske unije broj 2075/2005. Nakon digestije, sadržaj je propušten kroz mikrobiološko sito prečnika 180 µm, a zatim ostavljen u levku za sedimentaciju da se taloži 30 min. Nakon taloženja, 40 ml sadržaja je ispušteno iz levka, od čega je 30 ml supernatanta uklonjeno a talog sa larvama je ispran sa toplim PBS-om. Sav sadržaj je potom prebačen na petri šolju radi brojanja larvi. Larve su korišćene za sledeću infekciju ili za pripremu ekskretorno-sekretornih (ES L1) produkata mišićnih larvi *T. spiralis*.

3.4. Priprema ES produkata L1 larvi *T. spiralis*

Izolovane larve su kultivisane u kompletnom DMEM medijumu sa 10mM Hepesa (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), 1mM Na-piruvata (Serva, Heidelberg, Germany), 44mM Na-bikarbonata (Sigma-Aldrich) i 50 U/ml antibiotika/antimikotika (Biowest, Nuaille, France) tokom 18-20 h na 37°C, uz prisustvo 5% CO₂. Nakon kultivacije larve su izdvojene spontanim taloženjem, a medijum koji sadrži ES L1 produkte filtriran je kroz 0,22 µm filter za velike volumene (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Medijum je dijalizovan prema PBS-u u zapremini tri puta većoj od zapremine polaznog medijuma i koncentrovan preko Amicon sistema (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) uz korišćenje membrana za ultrafiltraciju od 10 kDa (Merck Millipore). Volumen ES L1 produkata je skoncentrovan na 24 ml nakon čega je profiltriran kroz 0,22 µm filter (Sarstedt) od čega je 2 ml čuvano na -20°C do upotrebe a ostatak korišćen za izolaciju vezikula.

3.6. Izolovanje i karakterizacija TsEV

3.6.1. Izolovanje TsEV

TsEV su izolovane kombinacijom metoda diferencijalnog centrifugiranja i ultrafiltracije. ES L1 produkti su prvo centrifugirani pri 300 g tokom 10 minuta, nakon čega je supernatant podvrgnut daljem centrifugiranju na 3000 g tokom 15 minuta na 18°C. Nakon toga je talog uklonjen a supernatant je centrifugiran na 17,000 g tokom 25 min, a zatim na 110,000 g tokom 2 h (k-faktor = 307.4), (SW 41 T rotor, ultracentrifuga Optima L-90K, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Konačni talog, obogaćen sa TsEV resuspendovan je u 100 µl sterilnog PBS-a i ispran sa šest volumena PBS-a korišćenjem Vivaspin 500 koncentratora sa membranom praga propustljivosti od 100 kDa (100 kDa MWC0 PES; Sartorius Stedim Lab Ltd, Stonehouse, UK). Koncentracija proteina u uzorku određena je bihinonskom reakcijom (engl. bicinchoninic acid, BCA) korišćenjem komercijalnog dostupnog kita (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany), po uputstvu proizvođača.

3.6.2. Analiza praćenja nanočestica

Merenje koncentracije i veličine čestica prisutnih u TsEV uzorku je vršeno pomoću PMX-430 ZetaView QUATT instrumenta za praćenje nanočestica, sa softverom Zetaview verzije 8.05.16 SP3 (Particle Metrix, Inning, Ammersee, Germany), koji se zasniva na principu praćenja nanočestica u stacionarnom rastvoru (engl. Nanoparticle tracking analysis, NTA). Instrument je podešen (poravnavanje kamere/lasera i optimizacija fokusa) korišćenjem polistirenskih standardnih kuglica od 100 nm prema uputstvima proizvođača. Uzorci su razblaženi u PBS puferu da bi se postigao optimalan broj čestica po kadru. Za merenja u režimu raspršivanja svetlosti (engl. scatter mode) korišćen je plavi laser (488 nm). Kamera je bila podešena na: osetljivost 78, brzina zatvarača 100 i brzina kadrova 30

kadrova/s. Parametri posle akvizicije bili su: minimalna površina 10, maksimalna površina 1000 i minimalna osvetljenost 20. Temperatura je tokom svih merenja bila 25 °C.

3.6.3. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Vezikule iz uzorka su adherirane na bakarne mrežice (sa 200 okaca) obložene Formvarom (Ted Pella, Redding, CA, USA) tako što su postavljene na 10 µl uzorka i inkubirane 45 min na sobnoj temperaturi. Višak tečnosti je uklonjen upijanjem filter papirom, a zatim su mrežice fiksirane 10 min na sobnoj temperaturi sa 2% paraformaldehidom. Mrežice su zatim isprane PBS-om, tri puta po 2 minuta i dodatno fiksirane 2,5% glutaraldehidom, 10 min sa na sobnoj temperaturi. Konačno, mrežice su isprane u dH₂O tokom 1 min i osušene na vazduhu. Snimanje je izvršeno korišćenjem Phillips CM12 elektronskog mikroskopa (Philips, Eindhoven, The Netherlands) opremljen digitalnom kamerom SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

3.6.4. Glikokarakterizacija TsEV

Analiza glikozilacije TsEV je rađena po modifikovanoj metodi iz rada Kosanović i saradinci (2014) [222]. TsEV su adherirane na ploče od 96 bunara sa ravnim dnom (NuncMaxisorp, Thermo Fisher Scientific) u prisustvu karbonantnog pufera (35mM NaHCO₃, 15mM Na₂CO₃, pH 9.4) preko noći na 4 °C. Razblaženja TsEV su bila 3 × 10⁷/50 µl, 3 × 10⁶/50 µl, 6 × 10⁵/50 µl i 3 × 10⁵/50 µl. Sledećeg dana ploče su isprane (sva ispiranja su vršena tri puta sa TBS/0,05% Tween-om (TBS-T)), nakon čega su blokirane sa 1% BSA/TBS, 3h na sobnoj temperaturi. Nakon još jednog ispiranja su dodati sledeći biotinizirani lektini (Tabela 4.): biljni lektini Con A, WGA, WFA, HPA, RCA II, PHA-L, UEA I, AAA koncentraciji 0.25 µg/ml; i nekonjugovan animalni lektin DC-SIGN 4 µg/ml. Lektini su inkubirani 1h na sobnoj temperaturi a zatim su ploče isprane. U sledećem koraku je dodat avidin obeležen sa peroksidazom rena (engl. avidin-horse radish peroxidase;avidin-HRP) razblažen u TBS-u 1:250 u bunare sa biljnim lektinima dok je u bunare sa DC-SIGN dodato sekundarno antitelo obeleženo sa biotinom (anti-IgG FC biotin conjugated FAB110B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), u razblaženju 1:150,000. Avidin-HRP i sekundarno antitelo sa biotinom su inkubirani 1h na sobnoj temperaturi, nakon čega su ploče ponovo isprane. U bunare sa sekundarnim antitelom je dodat avidin-HRP i inkubiran 1h. Nakon ispiranja u sve bunare je dodat 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substrat (Thermo Fisher Scientific) i inkubiran do pojave boje. Razvijanje boje je zaustavljeno dodavanjem stop pufera (2M H₂SO₄). Intenzitet boje je meren na 450 nm sa korekcijom na 570 nm pomoću TECAN Spark 10M čitača za ploče (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). Specifičnost vezivanja lektina za TsEV (ispitivanje lektin-glikan interakcije) je testirano inkubiranjem lektina u rastvorima odgovarajućih inhibitornih šećera (Tabela 4.), 30 min pre dodavanja u bunare.

Tabela 3. Koncentracije lektina i inhibitornih šećera

Lektin	Inhibitorni šećer
<i>Concanavalin A (Con A)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories, Newark, CA, USA)	0,2 M Methyl α-D-mannopyranoside (MetMan) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany)
rhDC-SIGN/Fc Chimera (rhDC-SIGN) 4 µg/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)	
<i>Wheat Germ Agglutinin (WGA)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	1 M N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) (Sigma Aldrich)
<i>Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	0,2 M N-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc) (Sigma Aldrich)
<i>Helix Pomatia Agglutinin (HPA)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	
<i>Ricinus Communis Agglutinin II (RCA II)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	0,2 M D-Lactose monohydrate (Lac) (Sigma Aldrich)
<i>Phytohaemagglutinin -L (PHA-L)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	0,2 M D-galactose (Gal) (Sigma Aldrich)
<i>Ulex europaeus agglutinin I (UEA I)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	0,1 M L-Fucose (Fuc) (Sigma Aldrich)
<i>Anguilla anguilla agglutinin (AAA)</i> biotinizovan 0,25 µg/ml (Vector laboratories)	

3.7. *In vitro* diferencijacija monocita periferne krvi u DC

3.7.1. Izolacija humanih ćelija

Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) su izolovane iz leukocitno-trombocitnog sloja pune krvi (engl. Buffy coats) dobrovoljnih davalaca. Krv je razblažena sa 0,02% EDTA/PBS (PBS/EDTA) u odnosu 1/1 na volumen krvi nakon čega je naneta na površinski sloj gradijenta gustine Hystopaque-1077 (Sigma Aldrich) i centrifugirana pri 2200 rpm 20 min. Nakon centrifugiranja sakupljen je središnji sloj u kome su mononuklearne ćelije (sloj između donjeg sloja u kojima su eritrociti i gradijent i gornjeg sloja u kome je plazma sa trombocitima). Ćelije su isprane od gradijenta centrifugiranjem u PBS/EDTA tokom 10 min pri 1800 rpm. Dobijeni talog ćelija je ispran sa RPMI/10% FCS nakon čega je tretiran sa 3 ml rastvora za liziranje eritrocita (hemolizin, 155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA) tokom 5 min. Iz ovako pripremljenih PMBC izolovani su monociti i T ćelije (T ćelije su bile poreklom od alogenih donora).

Monociti su izolovani korišćenjem "Pan Monocyte isolation kit"-a (Miltenyl Biotech, Cologne, Germany), za negativno magnetno sortiranje humanih monocita, po uputstvu proizvođača. Ukratko, u suspenziju 1×10^7 PBMC (30 µl, u hladnom sorting puferu: PBS pH 7,2; 2 mM EDTA, 0,5 % BSA), je dodato 10 µl blokirajućeg reagensa za Fcγ receptor i 10 µl biotinom obeleženih antitela na antigene koji nisu eksprimirani na humanim monocitima a jesu na drugim PBMC. Nakon inkubacije od 5 min na 4°C, dodato je 30 µl pufera i 20 µl magnetnih kuglica obloženih anti-biotin antitelima. Nakon vezivanja ćelija koje nisu monociti za kuglice, tokom 10 min na 4°C, nevezane ćelije tj. monociti su odvojeni na koloni MiniMACS (Miltenuyi Biotech, Cologne, Germany). Kada se kolona, u koju je dodata prethodno pripremljena suspenzija ćelija, prisloni uz magnet, monociti, kao nevezane ćelije, prolaze kroz kolonu tokom elucije puferom i sakupljaju se, dok ostale ćelije ostaju vezane za magnetne kuglice u koloni.

T ćelije alogenih donora su izolovane iz suspenzije PBMC korišćenjem "Pan T Cel Isolation Kit"-a (Miltenyl Biotech, Cologne, Germany), za negativno magnetno sortiranje humanih T ćelija, po uputstvu proizvođača. Ukratko, u suspenziju 1×10^7 PBMC (40 µl, u hladnom sorting puferu: PBS pH 7,2; 2 mM EDTA, 0.5 % BSA) je dodato 10 µl biotinom obeleženih antitela na antigene CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, i CD235a koji nisu eksprimirani na humanim T ćelijama a jesu na drugim PBMC.

Nakon inkubacije od 5 min na 4°C, dodato je 30 µl pufera i 20 µl magnetnih kuglica obloženih anti-biotin antitelima ili sa anti-CD61 antitelom. Nakon vezivanja ćelija koje nisu T ćelije za kuglice, tokom 10 min na 4°C, nevezane ćelije tj. T ćelije su odvojene na koloni MiniMACS (Miltenuyi

Biotech, Cologne, Germany). Kada se kolona, u koju je dodata prethodno pripremljena suspenzija ćelija, prisloni uz magnet, T ćelije, kao nevezane ćelije, prolaze kroz kolonu tokom ispiranja sa puferom i sakupljaju se, dok ostale ćelije ostaju vezane za magnetne kuglice u koloni.

Sortirane ćelije su centrifugirane na 1200 rpm 10 min i resuspendovane u medijumu. Radi određivanja vijabilnosti, ćelije su obojene sa 0,1% Tripan plavim razblaženim u PBS-u, koje boji mrtve ćelije. Broj ćelija je određen korišćenjem Neubauer-ove komore za brojanje ćelija (Beeco, Hamburg, Germany).

3.7.2. Kultivacija i stimulacija DC

Kako bi se dobile nezrele DC vršena je kultivacija $2 \times 10^6/2$ ml monocita (u pločama sa 6 bazena, Sarstedt), u kompletnom DC growth medijumu (CellGenix, Freiburg im Breisgau, Germany) kao i u prisustvu faktora rasta GM-CSF (25 ng/ml, NOVUS biologicals, Centennial, CO, USA) i humani rekombinantni IL-4 (25 ng/ml, R&D Systems), tokom tri dana, na 37°C i u prisustvu 5% CO₂.

Četvrtog dana od početka kultivacije ćelije su tretirane sa antigenima *T. spiralis* ES L1 (50 µg/ml) ili sa 3×10^7 TsEV/ml (2,5 µg/ml TsEV). Ćelije kultivisane samo u medijumu korišćene su kao negativna kontrola.

Petog dan od početka kultivacije, ćelije koje su prethodno tretirane sa ES L1 ili sa TsEV su stimulisane i sa 200 ng/ml LPS poreklom od *Escherichia coli* (Sigma Aldrich) i sa 20 ng/ml humanog rekombinantnog IFN-γ (R&D Systems). Kao pozitivna kontrola korišćene su ćelije koje nisu tretirane četvrtog dana sa ES L1 ili TsEV a petog dana su stimulisane sa LPS/IFN-γ.

Šestog dana od početka kultivacije DC su sakupljene, pri čemu su supernatanti izdvojeni za dalju analizu citokina (poglavlje 3.10.), dok su ćelije podeljene na one koje će biti podvrgnute fenotipskoj karakterizaciji putem protične citometrije (poglavlje 3.9); one koje će biti ko-kultivisane sa T limfocitima alogenih donora (poglavlje 3.7.3.), i one koje će biti odmah resuspendovane u 500 µl TRIzol reagensa (Thermo Fisher Scientific) i zamrznute na -80°C za PCR analizu (poglavlje 3.7.4.).

3.7.3. Ko-kultivacija DC sa naivnim T limfocitima

DC tretirane sa ES L1, TsEV i/ili stimulisane LPS/IFN-γ korišćene su za kultivaciju sa naivnim T limfocitima alogenih donora u cilju ispitivanja takvih DC da prezentuju antigene *T. spiralis* naivnim T limfocitima.

Radi praćenja uticaja tretiranih i/ili stimulisanih DC na proliferaciju T limfocita, T ćelije su obeležene fluorescentnom bojom, ko-kultivisane sa DC i analizirane protočnom citometrijom. Obeležavanje T ćelija je vršeno CellTrace Far red bojom (Invitrogen Thermo Fisher, Dreieich, Germany), po uputstvu proizvođača. Ukratko, 1×10^7 T limfocita resuspendovanih u 750 µl

PBS/EDTA je pomešano sa 750 μ l Cell Trace Far red boje, razblažene 1:750 u PBS/EDTA i inkubirane 20 min na 37°C. Nakon toga je dodato 3 volumena RPMI/FCS, suspenzija ćelija je inkubirana 5 min na 37°C i potom centrifugirana 1800 rpm 10 min. Ćelije izdvojene u talogu su resuspendovane u RPMI/FCS - i zasađene u ploču sa U dnom od 96 bunara sa DC u ukupnom volumenu od 200 μ l po bunaru. DC i T ćelije su zasađene u odnosu 1:10 (1×10^4 DC i 1×10^5 T ćelija) i 1:20 ($0,5 \times 10^4$ DC i 1×10^5 T ćelija). Ćelije su ko-kultivisane pet dana, nakon čega su sakupljene i isprane sa PBS-om. Ćelijama je zatim dodat propidium-jodid, interkalirajući agens koji fluorescira u crvenom delu spektra, čime su obeležene mrtve ćelije. Analiza je vršena protočnom citometrijom (BD LSR II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), a rezultati su obrađeni korišćenjem programa FlowJo VX (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Potencijal tretiranih i/ili stimulisanih DC da aktiviraju T ćelije (alostimulatorni potencijal) je analiziran nakon ko-kultivacije DC i T ćelija fenotipskom karakterizacijom T ćelija kao i određivanjem produkcije citokina. DC (dobijene kako je opisano u poglavlju 3.7.2.) i T ćelije (dobijene kako je opisano u poglavlju 3.7.1.), su isprane sa RPMI/FCS i zasađene u ploče od 96 bunara sa U dnom u odnosu 1:20 ($0,5 \times 10^4$ DC i 1×10^5 T ćelija) u ukupnom volumenu od 200 μ l po bunaru nakon čega su kultivisane šest dana. Trećeg dana je dodat IL-2 (2 ng/ml; R&D Systems). Poslednjeg dana kultivacije, tri sata pre isteka inkubacije, ćelije, u čijim kondicioniranim medijumima je planirano određivanje nivoa produkcije citokina, su aktivirane sa 20 ng/ml forbol 12-miristat 13-acetata (engl. phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), 500 μ g/ml kalcijum jonofora (Ca-I), dok je u one ćelije koje su bile namenjene za analizu protočnom citometrijom, dodat i monenzin (3 μ g/ml), koji sprečava otpuštanje citokina. Sve tri supstance su od proizvođača Sigma-Aldrich. Da bi se utvrdila sposobnost DC da indukuju diferencijaciju regulatornih T ćelija, one su kultivisane sa T ćelijama alogenih donora u odnosu 1:50 ($0,2 \times 10^4$ DC i 1×10^5 T ćelija) i stimulisane sa 2 ng/ml IL-2 trećeg dana (R&D Systems). Šestog dana ćelije su stimulisane sa PMA, Ca-I, i dodat je monenzin tri sata pre sakupljanja ćelija i analize protočnom citometrijom.

3.7.4. Izolovanje RNK

RNK je izolovana iz DC resuspendovanih u 500 μ l TRIzol reagensa (poglavlje 3.7.2.). Uzorci su prvo otopljeni, intenzivno vorteksovani, stavljeni na led i nakon toga je dodato u svaki uzorak po 100 μ l hloroforma (Sigma Aldrich). Uzorci su ponovo vorteksovani, centrifugirani na 12000 rpm u trajanju od 15 min na 4°C čime su se izdvojile tri faze: donja faza (u kojoj su proteini), vodena faza (u kojoj je RNK), i srednja faza (u kojoj je DNK). Vodena faza je izdvojena i u njoj je precipitacija RNK izvršena dodavanjem u svaki uzorak po 600 μ l hladnog 70 % etanola (ZORKA Pharma, Šabac, Srbija)

nakon čega je DNK uklonjena korišćenjem Ambion DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany), po uputstvu proizvođača.

3.7.5. Reverzna transkripcija (RT) i polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu (qPCR)

RNK koja je izolovana prevedena je u komplementarnu DNK (cDNK) pomoću reakcije reverzne transkripcije (RT) korišćenjem komercijalnog kita High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Ukupna RNK izolovana iz DC je korišćena kao matrica za RNK-zavisnu DNK polimerazu (enzim reverzna transkriptaza) da bi se sintetisala cDNK. Prvo je napravljena smeša u kojoj se nalazila određena koncentracija RNK molekula, nasumični heksameri i sterilna voda bez nukleaza, nakon čega je zagrevana 5 min na 65 °C, da bi se uklonile sekundarne strukture RNK i omogućila enzimska reakcija. Zatim su u smešu dodani reakcioni pufer, dNTP smeša, RiboLock inhibitor ribonukleaza i enzim reverzna transkriptaza. Reakcioni ciklus obuhvatao je sledeće temperaturne uslove: 25 °C tokom 10 minuta, 42 °C tokom 60 minuta, 70 °C tokom 10 minuta. Efikasnost reverzne transkripcije proveravana je PCR-om korišćenjem prajmera za konstitutivno eksprimirane gene (tzv. housekeeping genes), pri čemu je za humane uzorke korišćen GAPDH gen. Ekspresija ciljnih gena detektovana je na aparatu za qPCR (7500 real-time PCR system, Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) pomoću FastGene 2X IC Green Universal ROX (Nippon Genetics, Tokio, Japan). Napravljena je smeša za svaki gen koji se ispituje: IC Green, 1 µL Rox low, 1 µL Forward i 1 µL Reverse prajmera. cDNK je dodavana u volumenu od 2 µL po reakciji po bunarčiću. Nakon toga se primenio program u kojem je početna denaturacija podešena na 95 °C tokom 2 minuta, denaturacija na 95 °C tokom 5 sekundi, hibridizacija prajmera i elongacija na 60 °C tokom 30 sekundi. Svaki uzorak je testiran u tehničkom duplikatu ili triplicatu. Relativna ekspresija target gena normalizovana je u odnosu na ekspresiju GAPDH gena, a proračun je urađen korišćenjem 2- $\Delta\Delta C_t$ metode. Upotrebljeni prajmeri navedeni su u Tabeli 4..

Tabela 4. Lista prajmera koji su korišćeni za umnožavanje cDNK

Gene	Oligonukleotidne sekvence 5'–3'	Target	Reference
GAPDH_F	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	NM_001357943.2	[223]
GAPDH_R	TGAGGTCAATGAAGGGGTC	NM_001289745.3 NM_001289746.2 NM_002046.7	

mTOR_F	AGCATCGGATGCTTAGGAGTGG	XM_054335746.1 XM_054335745.1 XM_054335744.1 XM_011541166.3 XM_047416724.1 XM_047416721.1	[224]
mTOR_R	CAGCCAGTCATCTTTGGAGACC	NM_001386500.1 NM_001386501.1 NM_004958.4 XM_017000900.1	
SOCS1_F	TTCGCCCTTAGCGTGAAGATGG		[225]
SOCS1_R	TAGTGCTCCAGCAGCTCGAAGA	NM_003745.2	
SOCS3_F	CATCTCTGTCGGAAGACCGTCA	NM_001378933.1 NM_001378932.1	[226]
SOCS3_R	GCATCGTACTGGTCCAGGAACT	NM_003955.5	
IDO1_F	TGCATCCCAGAACTAGACGTGC		[227]
IDO1_R	GCCTGATCTCATAGAGTCTGGC	NM_002164.6	
Ahr_F	GTCGTCTAAGGTGTCTGCTGGA		[228]
Ahr_R	CGCAAACAAAGCCAAGTGGTG	NM_001621.5	
RELB_F	ATGGCATCGAGAGCAAAC	NM_001411087.1 XM_047439190.1 XM_047439189.1	[229]
RELB_R	AGAGAAGAAGTCAGGGTCTG	XM_005259128.3 NM_006509.4	
NFκB2_F	CCATGACAGCAAATCTCC	NM_001261403.3 NM_002502.6 NM_001322934.2	[230]
NFκB2_R	TAAACTTCATCTCCACCCC	NM_001322935.1 NM_001077494.3 NM_001288724.1	

3.8. Ispitivanje potencijala TsEV da smanje respiratornu alergiju *in vivo*

3.8.1. Aplikacija TsEV zdravim miševima

Da bi se ispitalo kakav efekat TsEV imaju kod zdravih miševa, kao preliminarni eksperiment za aplikaciju TsEV u alergijskom modelu, miševima, kod kojih nije indukovana alergija, TsEV su intranalazno (i.n.) aplicirane u količini $0,5 \times 10^8$ TsEV/30 μ l (istoj koja je kasnije korišćena u terapijskom modelu) u toku šest uzastopnih dana (grupa “TsEV”, Slika 7A).

Kontrolna grupa za ovaj eksperiment su bili miševi kod kojih nije indukovana alergija a koji su i.n. primili PBS umesto TsEV (grupa “PBS”, Slika 7A).

3.8.2. Indukcija respiratorne alergije kod BALB/c miševa i tretman sa TsEV

Respiratorna alergija na ovalbumin (OVA), je indukovana kod BALB/c miševa putem intraperitonealne (i.p.) injekcije suspenzije od 150 μ l koja sadrži 10 μ g (Sigma Aldrich) i 67% (v/v) aluminijum hidroksid gela (alum) (Alu-Gel-S Suspension; Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany), 1. i 14. dana eksperimenta (dani senzitivacije na OVA). Tokom 22. - 24. dana (dani stimulacije alergijskog odgovora) miševima je i.n. aplicirano 100 μ g OVA u 30 μ l PBS po mišu (Slika 7).

Kontrolna grupa (grupa "Kontrola") je primila i.p. PBS sa alumom 1. i 14. dana, dok je od 22. - 24. dana primila i.n. PBS.

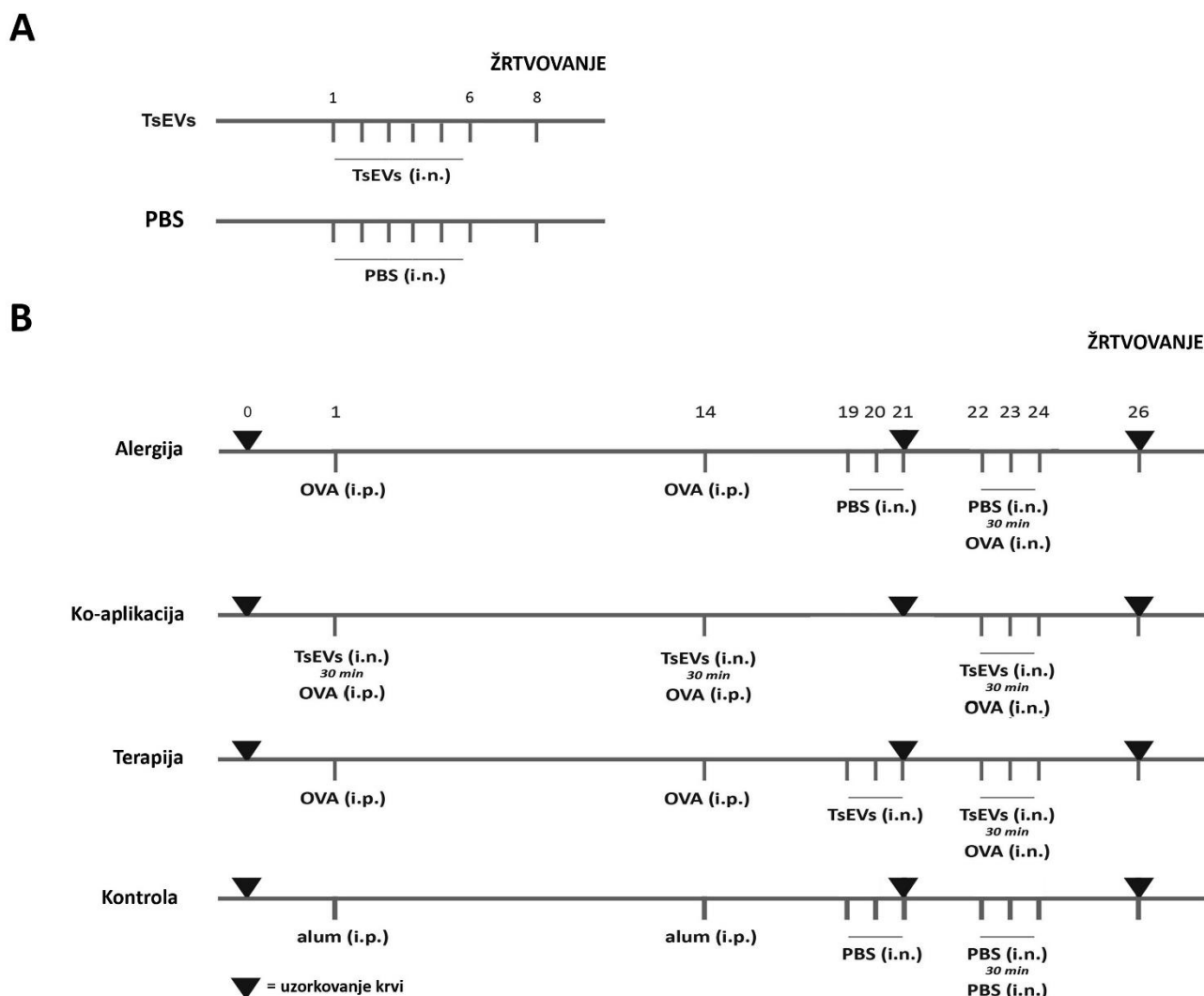
3.8.3. Ispitivanje potencijala TsEV da smanje respiratornu alergiju

Ispitivanje potencijala TsEV da smanje respiratornu alergiju je vršeno u dva modela primene: ko-aplikacionom i terapijskom modelu (Slika 7B).

U ko-aplikacionom modelu (grupa "Ko-aplikacija"), miševima je i.n. aplicirano 0.5×10^8 TsEV u 30 μ l 30 minuta pre senzitivacije OVA-om, 1. i 14. dana, kao i pre svakog intranazalnog davanja OVA tokom dana stimulacije alergijskog odgovora (dani 22.-24.). Ukupna količina TsEV koju je jedan miš primio u ko-aplikacionom modelu iznosila je $2,5 \times 10^8 / 150 \mu$ l.

U terapijskom modelu (grupa "Terapija"), miševima je i.n. dato $0,5 \times 10^8$ TsEV u 30 μ l od 19. - 21. dana, kao i tokom dana stimulacije alergijskog odgovora, 30 min pre i.n. davanja OVA. Ukupna količina TsEV koju je jedan miš primio u terapijskom modelu iznosila je $3 \times 10^8 / 150 \mu$ l.

U svim eksperimentima, pre svakog i.n. davanja miševi su anestetizirani sa 5% (v/v) izofluranom (Vetflurane, gaseous anesthetic, Virbac, Carros, France) uz prisustvo protoka vazduha 3 L/min korišćenjem R650-IE Veterinary Anesthesia Machine (RWD, Guangdong, China). Svi miševi u svim eksperimentima su žrtvovani dva dana nakon poslednjeg i.n davanja nakon čega su prikupljeni krv, bronhoalveolarni lavaž i izolovani pluća i slezina.



Slika 7. Shema dizajna eksperimenata indukcije respiratorne alergije kod miševa i primene različitih tretmana TsEV. (A) TsEV tretman na zdravim miševima: Miševi su šest uzastopnih dana primali i.n. $0,5 \times 10^8$ TsEV (TsEV grupa) ili samo PBS (PBS grupa). (B) Miševi su senzitivizovani i.p. aplikacijom sa 100 ug OVA 1. i 14. dana i zatim su primili i.n. OVA od 22. do 24. dana (Alergije grupa). Kontrolna grupa je umesto OVA primila PBS. Miševi na kojima su testirana dva modela tretmana TsEV su imali isti način indukcije alergije samo što je grupa miševa na kojoj je praćen ko-aplikacioni model 1. i 14. dana dobila $0,5 \times 10^8$ TsEV i.n. pre aplikacije OVA i.p. i zatim od 22. do 24. dana dobila $0,5 \times 10^8$ TsEV i.n. pre aplikacije OVA i.n. Grupa miševa na kojima je praćen terapijski model je dobila $0,5 \times 10^8$ TsEV i.n. od 19. do 21. dana i 30 minuta pre aplikacije OVA i.n. od 22. do 24. dana.

3.8.4. Karakterizacija ćelija prisutnih u bronhoalveolarnom lavažu

Za prikupljanje bronhoalveolarnog lavaža (BAL), pluća miševa su dva puta isprana sa po 500 μ l hladnog PBS-a. Sakupljena tečnost je centrifugirana na $300 \times g$, 5 minuta, pri $4^\circ C$, nakon čega su talozi resuspendovani u PBS-u. Iz suspenzije je izdvojeno 5×10^4 ćelija koje su postavljene na mikroskopske pločice centrifugiranjem pri $800 \times g$, 5 minuta. Pločice su zatim ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi i obojene hematoksilin-eozinom (H&E), što će biti detaljno opisano u poglavlju 3.8.6. Ćelije su analizirane korišćenjem Tissue FAXSi Plus sistema, a brojanje je obavljeno u Tissue

FAXS viewer softveru (oba TissueGnostics, Vienna, Austria). Na svakoj pločici je izbrojano najmanje 150 ćelija, uključujući makrofage, eozinofile, limfocite i neutrofile.

3.8.5. Priprema tkiva pluća za histološku analizu

Plućno tkivo je izolovano iz donjeg režnja pluća miša i fiksirano u 7,5% formaldehidu (SAV Liquid Production, Flintsbach, Germany). Nakon 24 sata tkivo je isprano u PBS-u, a zatim podvrgnuto procesu dehidracije kroz seriju rastvora alkohola rastuće koncentracije: 70% alkohol (2 h), 96% alkohol (24 h, ponovljeno dva puta), 99,8% alkohol (24 h, ponovljeno tri puta). Nakon toga, tkivo je inkubirano u rastvorima ksilola i alkohola u sledećim odnosima: 2/3 99,8% alkohola i 1/3 ksilola (20 min), 1/3 99,8% alkohola i 2/3 ksilola (20 min) (svi Zorka Pharma, Šabac, Srbija), te u čistom ksilolu tri puta po 10 minuta. Nakon završene dehidracije, tkivo je parafinizovano inkubacijom u parafinu približno 12 sati, a zatim je izvršeno kalupljenje. Kalupi su postavljeni na hladnu ploču (temperatura između -10°C i -12°C) kako bi se parafin očvrstnuo i mogao biti uklonjen iz kalupa. Tkivo je sečeno mikrotomom BioBase BK-2218 BK-2268 (Biobase, Shandong, China) na preseke debljine 3 µm, pri čemu su obuhvaćene četiri različite dubljine tkiva, s razmakom od 60 µm između prvog i poslednjeg isečka. Tako pripremljeni uzorci korišćeni su za bojenje hematoksilin-eozinom i perjodatnom kiselinom i Šifovim reagensom (engl. Periodic Acid-Schiff, PAS) (oba Sigma-Aldrich). Pre bojenja, tkivo je deparafinizovano inkubacijom u ksilolu (15 min), a zatim rehidrirano kroz seriju rastvora alkohola opadajuće koncentracije (99,8%, 96% i 70%, po 5 min svaki), nakon čega je isprano u dH₂O.

3.8.6. Određivanje prisustva inflamatornih ćelija i mukusa u plućima

Preparati sa presecima pluća bojeni su sa H&E ili sa PAS. Hematoksilin boji jedra ćelija, dok eozin boji citoplazmu, a PAS metodom se prikazuje prisustvo mukusa u i oko peharastih ćelija.

Svi koraci vršeni su uranjanjem pločica u odgovarajuće pufere u plastičnim posudama za histološka bojenja (LabSphere, New Hampshire, USA). Za bojenje sa H&E pločice su prvo isprane sa dH₂O 5 min, nakon čega su inkubirane sa hematoksilinom 3 min. Ispiranje pločica je vršeno potapanjem 10-15x u vodi iz česme nakon čega su isprane i potapanjem dH₂O 2 min. Pločice su zatim inkubirane u eozinu 5 min nakon čega je ponovljen proces ispiranja pločica sa vodom iz česme i sa dH₂O. Pločice su zatim dehidrirane u procesu potapanja u 96% alohol 40 sekundi nakon čega su potopljene u ksilol 15 min.

Za bojenje sa PAS pločice su ispranje u dH₂O 5 min nakon čega su potopljene u perjodatnu kiselinu 10 min. Pločice su isprane potapanjem u dH₂O nakon čega su inkubirane u Šifovom reagensu 30 min. Pločice su isprane potapanjem u vodu iz česme 10 min nakon čega su isprane još i sa dH₂O 5 min. Nakon toga na pločice je naneto 10 µl/preseku hematoksilina razblaženog u dH₂O u odnosu ¼ koji

je stajao na pločicama 10 sekundi. Pločice su na kraju dehidrirane potapanjem u 96% alkohol 20 sekundi nakon čega su potopljene u ksilol 15 min. Sve pločice su nakon H&E ili PAS bojenja montirane nanošenjem 10 µl/preseku Canada balzama (Sigma-Aldrich) i stavljanjem pokrovnog stakla na pločicu čime su pripremljene za mikroskopsko posmatranje.

Preseci tkiva analizirani su svetlosnim mikroskopom Olympus IX73 (Olympus Optical Co., GmbH, Germany) i fotografisani pri uvećanjima od 20× i 40×. Procena prisustva inflamatornih ćelija i mukusa vršena je prema kriterijumima definisanim u radu Zeiss et al. (2015). Za procenu inflamacije u peribronhijalnim i perivaskularnim regijama korišćeni su sledeći parametri:

- 0 – nema inflamacije
- 1 – mali broj inflamatornih ćelija
- 2 – sloj od 1–4 inflamatorne ćelije
- 3 – sloj od 4–10 inflamatornih ćelija
- 4 – sloj od više od 10 inflamatornih ćelija

Za PAS bojenje primenjen je sledeći kriterijum za procenu količine mukusa i prisustva peharastih ćelija u epitelu:

- 0 – nema izraženih peharastih ćelija
- 1 – mala količina mukusa, do 1/3 epitela sadrži peharaste ćelije
- 2 – umerena količina mukusa, 1/3–2/3 epitela sadrži peharaste ćelije
- 3 – visoka količina mukusa, više od 2/3 epitela sadrži peharaste ćelije

3.8.7. Izolovanje i gajenje ćelija iz pluća

Miševi su žrtvovani mešavinom ketamina 80-100 mg/kg i ksilazina 5-10 mg/kg intraperitonealnom injekcijom 100 µl po životinji, 48 sati nakon poslednjeg intranazalnog davanja. Nakon prikupljanja BAL, pluća su aseptično uklonjena, usitnjena skalpelom i inkubirana 1 h na 37°C 5% CO₂ u 2 ml RPMI 1640, uz dodatak 100 µg/ml gentamicina (Carl Roth, Lauterbourg, France) i enzima 50 µg/ml Liberase TL (Roche, Mannheim, Germany) i 500 µg/ml DNaze (Sigma-Aldrich). Nakon inkubacije, tkivo je protisnuto kroz mrežicu sa porama promera 70 µm. Eritrociti su uklonjeni iz taloga inkubiranjem u 3 ml hemolizina 5 min. Reakcija hemolize je zaustavljena dodavanjem i centrifugiranjem u RPMI/10%FCS sa 100 µg/ml gentamicina.

Jedan deo ćelija ($4 \times 10^6/\text{ml}$) resuspendovan je u RPMI/10%FCS sa gentamicinom i izdvojen je za površinsko i unutarćelijsko bojenje i stimulisan sa 20 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ca-I i $2 \mu\text{M}$ monenzina tokom 4 sata na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 .

Drugi deo ćelija resuspendovan je u RPMI sa 10% FCS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina, 2 mM merkaptotetanola i 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), nakon čega su zasađene u koncentraciji $5 \times 10^6/\text{ml}$ u ploče za ćelijsku kulturu sa 96 bunara i U-dnom (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Ove ćelije su gajene u prisustvu specifičnog stimulusa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA) ili samo u medijumu na 37°C sa 5% CO_2 .

Dodatno su izdvojene plućne ćelije iz grupe miševa kod kojih je indukovana alergija i kultivisane 1h uz stimulaciju sa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA nakon čega su tretirane sa 3×10^7 TsEV/ml. Nakon 72 sata, svi supernatanti su sakupljeni i sačuvani za određivanje koncentracije citokina.

3.8.8. Izolovanje i gajenje ćelija iz slezine

Slezine miševa su aseptično uklonjene, zatim protisnute kroz metalnu mrežicu sa porama promera 100 μm , a dobijena suspenzija ćelija je filtrirana kroz mrežicu od 70 μm u RPMI sa 10% FCS. Suspenzija je nanešena na 4 ml površinskog sloja gradijenta Hystopaque-1077 nakon čega su uzorci centrifugirani na 4000 rpm 30 min. Sakupljen je srednji sloj mononuklearnih ćelija koje su zatim isprane sa RPMI/10% FCS centrifugiranjem 1800 rpm 10 min. Eritrociti su uklonjeni iz taloga inkubiranjem u 3 ml hemolizina 5 min. Reakcija hemolize je zaustavljena dodavanjem i centrifugiranjem u RPMI/10%FCS.

Splenociti su gajeni pod istim uslovima kao plućne ćelije. Kultivisano je 5×10^6 ćelija/ml u pločama sa 96 bunara, uz dodatnu stimulaciju sa OVA ili bez (gajene samo u medijumu).

Splenociti namenjeni za površinsko i unutarćelijsko bojenje resuspendovani su u RPMI/10%FCS sa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina (4×10^6 ćelija/ml) i stimulisani sa PMA, Ca-I i monenzinom (u koncentracijama navedenim kao u poglavlju 3.8.7) tokom 4 h na 37°C sa 5% CO_2 .

Drugi deo splenocita resuspendovan je u RPMI sa 10% FCS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina, 2 mM merkaptotetanola i 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), nakon čega su ćelije zasađene u koncentraciji $5 \times 10^6/\text{ml}$ u ploče za ćelijsku kulturu sa 96 bunara i U-dnom (Sarstedt). Ove ćelije su gajene u prisustvu specifičnog stimulusa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA) ili samo u medijumu na 37°C sa 5% CO_2 .

Dodatno su izdvojene plućne ćelije iz grupe miševa kod kojih je indukovana alergija i kultivisane 1h uz stimulaciju sa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA nakon čega su tretirane sa 3×10^7 TsEV/ml. Nakon 72 sata, svi supernatanti su sakupljeni i sačuvani za određivanje koncentracije citokina.

3.8.9. Određivanje nivoa OVA specifičnih antitela u serumu

Krv je sakupljena iz vene na obrazu miševa u tri različita vremena: na početku eksperimenata (0. dan), pre dana stimulacije alergijskog odgovora (21. dan) i na dan žrtvovanja (26. dan). Serum je izolovan centrifugiranjem krvi u Microtainer SST epruvetama (BD Biosciences) pri 10,000 x g tokom 5 minuta, zatim je sakupljen i čuvan na -20°C do određivanja koncentracija OVA-specifičnih IgE, IgA, IgG1 i IgG2a antitela. Za detekciju antitela, 5 $\mu\text{g/ml}$ OVA u volumenu 100 μl /bunaru je nanoseno na ploče sa 96 bunara i inkubirano preko noći na 4°C . Sledećeg dana ploče su isprane 3 puta sa PBS/0.05% Tween-om (PBS-T) i blokirane sa 1% BSA/PBS-T, 2 sata na 37°C . Nakon blokiranja, BSA je uklonjen, a dodato je 100 μl /bunaru seruma razblaženih u 0,5% BSA/PBS-T (1:10 za određivanje IgE, 1:10 za IgA, 1:2000 za IgG1, i 1:500 za IgG2a) i inkubirano 2 sata na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane 3 puta sa PBS-T, i dodata su prečišćena pacovska anti-miš antitela [anti-IgE (R35-72), anti-IgA (C10-1), anti-IgG1 (A85-1), anti-IgG2a (R19-15)] (BD Biosciences), razblažena 1:500 u 0,5% BSA/PBS-T i inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ploče su ponovo isprane sa PBS-T i inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa HRP-konjugovanim mišjim anti-pacovskim IgG antitelima (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, Ely, UK), razblaženim 1:2000 u 0,5% BSA/PBS-T. Nakon još jednog ispiranja sa PBS-T, dodat je TMB substrat. Reakcija je zaustavljena nakon razvijanja boje dodavanjem 0,18 M H_2SO_4 , a optička gustina (engl. optical density, O.D.) je merena na talasnoj dužini od 405 nm pomoću TECAN Spark 10M čitača za ploče (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

3.9. Fenotipska karakterizacija ćelija protočnom citometrijom

Analiza ekspresije površinskih i intracelularnih markera na humanim i mišjim ćelijama sprovedena je primenom protočne citometrije (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS), nakon vezivanja fluorescentno obeleženih antitela na specifične antigene za njih.

U prvom koraku ćelije (2×10^5 humanih i 4×10^5 mišjih po uzorku) su isprane u puferu za FACS (PBS sa 1% BSA i 0,01 % NaN_3), centrifugiranjem na 1500 rpm, 10 minuta na 4°C . Za blokiranje Fc γ receptora na humanim ćelijama je korišćen Fc blokator (BD Biosciences), specifičan za humani Fc γ receptor. Mišje ćelije inkubirane sa 2 % rastvorom normalnog seruma miša u PBS-u, u trajanju od 30 min na 4°C . Nakon ovog koraka, sledilo je još jedno ispiranje u puferu za FACS. Ćelije su potom inkubirane sa antitelima protiv površinskih markera 30 minuta na 4°C .

Korišćena su sledeća direktno konjugovana antitela za karakterizaciju humanih DC: anti-CD40-Alexa Fluor 488 (AF488) (5C3); anti-CCR7-Phycoerythrin (PE) (G043H7); anti-CD86-Peridinin Chlorophyll Protein/Cyanine5.5 (PerCP/Cy5.5) (BU63); anti-Ig-like transcript (ILT)3-Peridinin

Cyanine 7 (PerCy7) (ZM4.1); anti-CD83-Alexa Fluor 700 (AF700) (HB15e) i anti-HLA-DR-Allophycocyanin/Cyanine7 (APC-Cy7) (L243) (BioLegend).

Fenotip T ćelija iz ko-kulture je utvrđen korišćenjem sledećih antitela na površinske markere: anti-CD127-PE (A019D5); anti-CD25-PerCP/Cy5.5 (BC96); anti-CD8-PECy7 (SK1); anti-CD4-AF700 (A161A1) (BioLegend).

Za karakterizaciju mišjih ćelija korišćena su sledeća antitela na površinske markere: anti-Ly6G-AF488 (RB-68C5) (Invitrogen Thermo Fisher Dreieich, Germany); anti-CD3- Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (17A2) (BioLegend); anti-CD4-FITC (GK1.5) (Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA); anti-MHC class II (I-A)-PE (NIMR-4) (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD19-PE (QA17A27); anti-CD45-PE-Dazzle 594 (30-F11); anti-Ly6C-PerCP/Cy5.5 (BioLegend); anti-CD8a-Peridinin Cyanine 5 (PerCy5) (53-6.7); anti-CD11b-PerCy7 (M1/70) (Invitrogen); anti-TCR β -PerCy7 (H57-597) (BioLegend); anti-CD103-Allophycocyanin (APC) (2E7) (BioLegend); anti-CD49b-APC (DX5) (MACS Miltenyi Biotec, Cologne, Germany); anti-CD107 (SiglecF)-AF700 (1RNM44N) (Invitrogen) i anti-CD11c- APC-Cy7 (N418) (BioLegend).

Pre intracelularnog bojenja, ćelije su inkubirane u puferu za fiksaciju ćelija, 80 μ l/uzorku (BioLegend), 15 min uz vorteksovanje, nakon čega su isprane sa puferom za permabelizaciju ćelija 400 μ l/uzorku (BioLegend) u kojem je rađen ceo postupak intracelularnog bojenja.

Antitela za intacelularno bojenje humanih ćelija obuhvataju: anti-IL-10-PE (JES3-13F1); anti-TGF- β -PeCy7 (S20006A) (BioLegend); anti-IL-12p40/p70-PE (20C2) (BD Biosciences) i anti-indolamine 2,3 dioxygenase (IDO)-1-APC (700838) (R&D systems).

Za intracelularno bojenje humanih T ćelija korišćena su: anti-IFN- γ -FITC (L243) (Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA); anti-Foxp3-FITC (236A/E7) (Thermo Fisher Scientific); anti-IL-4-PE (8D4-8) (eBioscience); anti-TGF- β -PeCy7 (S20006A) (BioLegend) i anti-IL-10-PE (JES3-19F1) (BioLegend).

Za ćelije pluća i slezine miševa korišćena su sledeća antitela za intracelularno bojenje: anti-IL-17-PE (eBio17B7) (eBioscience); anti-IL-4-Biotin (BVD6-24G2) (eBioscience); anti-IL-10-Biotin (JES5-2A5) (eBioscience); anti-LAP (TGF- β)-PE (TW7-16B4) (BioLegend), anti-IFN- γ -APC (XMG1.2) (BioLegend) i anti-Foxp3-PE-Cy5 (376209) (R&D systems).

Kako bi se detektovale ćelije za koja su vezana biotinizirana antitela, mišje ćelije su dodatno inkubirane sa APC-Cy Streptavidin-om 1:400 (BioLegend), 30 min na 4°C.

Da bi se utvrdilo nespecifično bojenje korišćene su sledeće izotipske kontrole: IgG1 negativna kontrola-FITC (P3.6.2.8.1), IgG1 negativna kontrola I-PE (P3.6.2.8.1), IgG1 κ negativna kontrola - PerCP (MOPC-31C), IgG1 negativna kontrola -PECy7 (P3.6.2.8.1), IgG1 negative control-APC

(P3.6.2.8.1) (sve eBioscience), IgG1 κ negative control-AF700 (MOPC-21) (BioLegend) i IgG1 negativna kontrola-APCCy7 (MOPC-21) (Abcam, Cambridge, UK).

Utvrđivanje vijabilnosti ćelija, odnosno isključivanje mrtvih ćelija tokom FACS analize, je vršeno na osnovu obeležavanja humanih ćelija bojom Fixable Viability Stain 620 (FVS) (BD Bioscience) a mišjih ćelija GloCell Fixable Viability Dye Red 780 (GloCell)

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).

3.10. Određivanje koncentracije citokina ELISA testa

Supernatanti humanih DC analizirani su na prisustvo citokina IL-10, IL-12p40/p70 i TGF- β , dok su supernatanti humanih T ćelija testirani na IL-4, IL-10, IFN- γ i TGF- β . Detekcija je izvršena korišćenjem komercijalnih DuoSet sandwich ELISA testova u skladu sa uputstvima proizvođača (R&D Systems).

Citokinski profili mišjih ćelija pluća i slezine, uključujući IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i IFN- γ , određeni su iz supernatanata kultura ovih ćelija, primenom komercijalnih Ready-SET-Go! ELISA testova (eBioscience), prema uputstvima proizvođača.

3.11. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) duplikata kultura, četiri nezavisna eksperimenta sa humanim ćelijama i tri nezavisna eksperimenta sa mišjim ćelijama.

Statistička obrada je rađena na programu GraphPad Prism 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Shapiro-Wilk test je korišćen za određivanje normalnosti distribucije na osnovu koje je odabran parametarski ili neparametarski test. Za analizu razlike između različitih tretmana kultura humanih ćelija i za analizu fenotipskih karakteristika ćelija miševa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (engl. analysis of variance, ANOVA) praćena Tukey testom za višestruka poređenja. U slučaju da raspodela podataka nije imala normalnu distribuciju korišćen je Kruskal-Wallis test. Za poređenje fenotipa ćelija miševa tretiranih sa TsEV i netretiranih kontrola korišćen je Student T test kao i za poređenje fenotipa mišjih ćelija stimulisanih sa OVA i ćelija stimulisanih sa OVA+TsEV. U analizi supernatanata ćelija miševa i u analizi seruma miševa iz više vremenskih tačaka korišćena je dvofaktorska analiza varijanse praćena Tukey testom za višestruka poređenja. Vrednost parametara p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4.REZULTATI

4.1. Karakterizacija TsEV

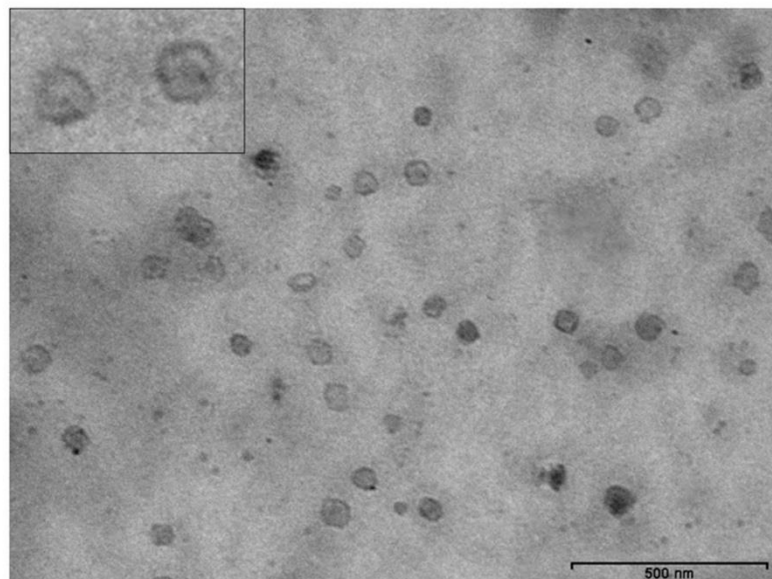
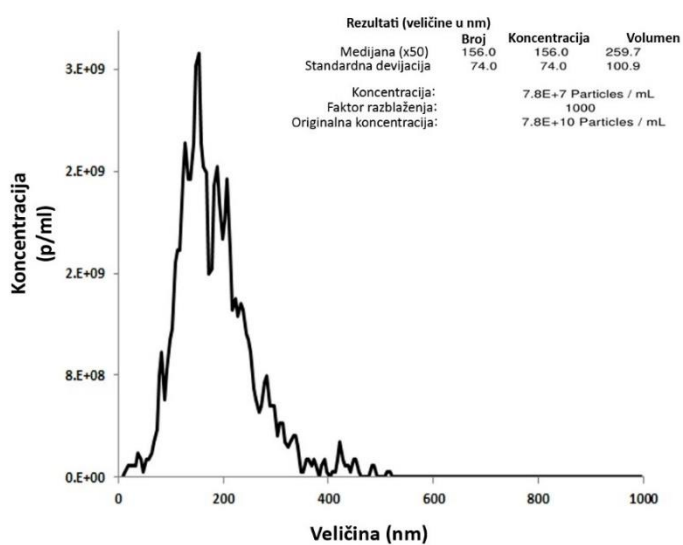
4.1.1. Morfologija, veličina i koncentracija TsEV

Kako bi se ispitala veličina i morfološke karakteristike ekstracelularnih vezikula, TsEV izolovane iz ES L1 produkata analizirane su transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM). Ova analiza je potvrdila prisustvo čestica nalik EV (Slika 8A). Partikule su okruglog, konkavnog oblika i visoke propustljivosti za elektrone, što je u skladu s prethodnim istraživanjima [213].

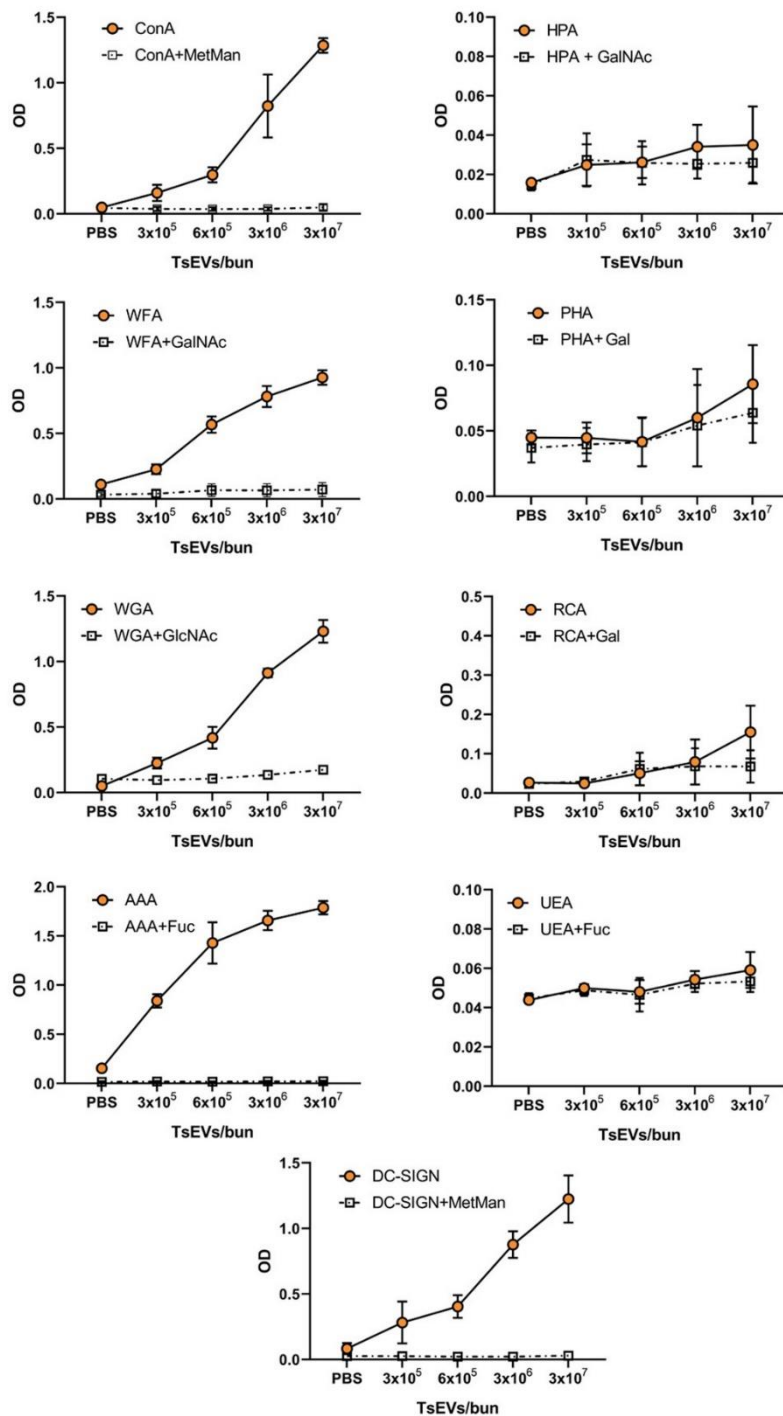
Analiza praćenja nanočestica (NTA) pokazala je da je koncentracija TsEV $7,8 \times 10^{10}$ partikula/ml (ukupan broj $7,8 \times 10^9$ u 100 μ l), dok je njihova prosečna veličina iznosila 156 ± 74 nm. Profil raspodele broja čestica po njihovoj veličini ukazuje na heterogenost populacije vezikula tj. prisustvo subpopulacija vezikula različitih veličina (Slika 8B).

4.1.2. Glikozilacija TsEV

Glikozilacija TsEV analizirana je korišćenjem biljnih lektina, koji specifično prepoznaju i vezuju određene gliko-epitope. Ova analiza je pokazala reaktivnost sledećih lektina sa TsEV: ConA (koji primarno vezuje trimanozilno jezgro glikana visoko-manoznog tipa), WGA (koji primarno vezuje ponovke N-acetil glukozamina (N-acetyl glucosamine, GlcNAc) a može prepoznavati i N-acetil neuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) na neredukujućem kraju glikana), WFA (koji vezuje GalNAc vezane β 1-4 vezom za GlcNAc ili terminalne β -GalNAc), AAA (koji se primarno vezuje za fukoze vezanu α 1-6 za GlcNAc u jezgru kompleksnih glikana) kao i vezivanje za receptor DC-SIGN (koji se specifično vezuje za visoko-manozni tip glikana). Vezivanje ovih lektina je bilo dozno zavisno, što govori o specifičnosti vezivanja. Takođe, ovo vezivanje je bilo onemogućeno u prisustvu inhibitornih šećera, što govori o lektin-glikan interakcijama. S druge strane, lektini PHA (koji vezuje bianterne glikane sa bisektnim GlcNAc i kao i tri- i tetra-antenne strukture), HPA (koji vezuje terminalne GlcNAc i GalNAc, karakteristične za O-glikanske lance), RCA (koji vezuje terminalni N-acetil laktozamin tipa 2, tj. terminalnu galaktozu vezanu β 1-4 vezom za GlcNAc) i UEA (koji vezuje fukozilovane lance glikana, u kojima je fukoza vezana α 1-2 vezom), nisu pokazali reaktivnost prema TsEV (Grafik 1.).

A**B**

Slika 8. Određivanje morfoloških karakteristika TsEV i njihove veličine. (A) Rezultati merenja sa elektronskim mikroskopom ukazuju da su TsEV konkavnog oblika i da su velike propustljivosti za elektrone. (B) Analiza nanočestica ukazuje da su TsEV imaju prosečnu veličinu od 156 ± 74 nm i koncentraciju od $7,8 \times 10^{10}$ p/ml.



Grafik 1. Glikanski profil TsEV. TsEV su imobilisane na čvrstoj fazi u rastućim koncentracijama (3×10^5 TsEV/bun, 6×10^5 /bun, 3×10^6 /bun i 3×10^7 /bun) nakon čega su inkubirane sa konjugovanim lektinima (ConA, WFA, WGA, AAA, DC-SIGN, HPA, PHA, RCA i UEA) sa ili bez prisustva odgovarajućih inhibitornih šećera (ConA+MetMan, WFA+GalNAc, WGA+GlcNAc, AAA+Fuc, DC-SIGN+MetMan, HPA+GalNAc, PHA+Gal, RCA+Gal i UEA+Fuc). Vrednosti su kvantifikovane merenjem absorbance na 450 nm sa korekcijom na 570 nm (engl. optical density, OD). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta.

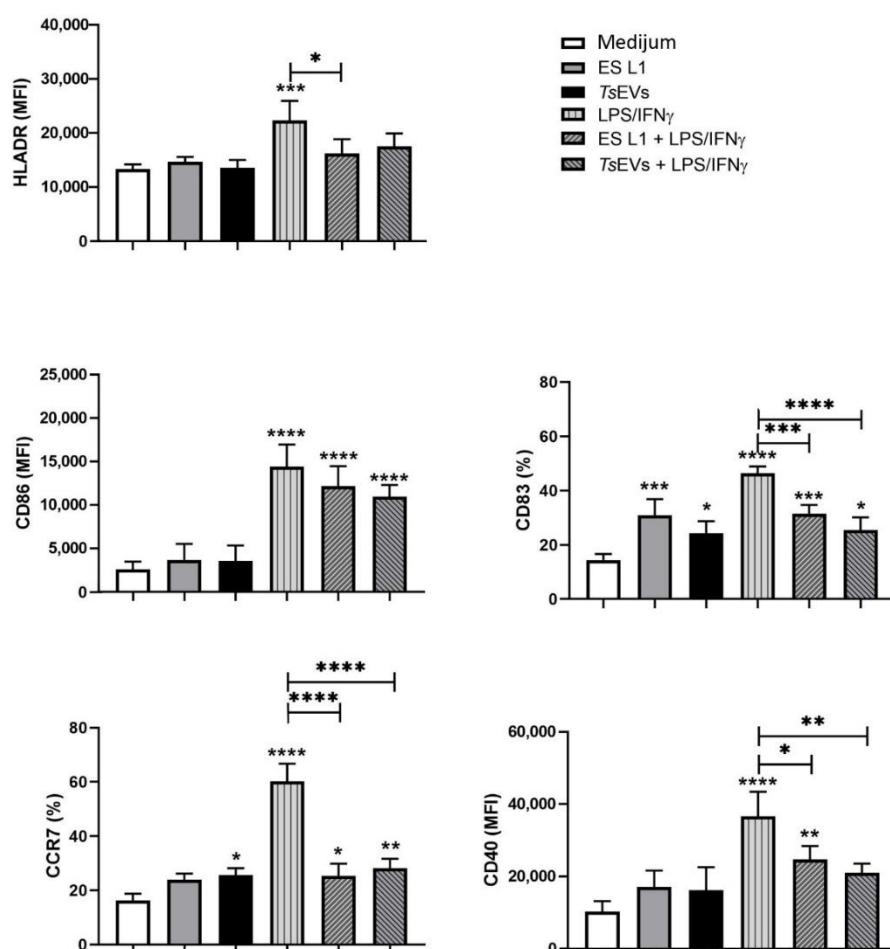
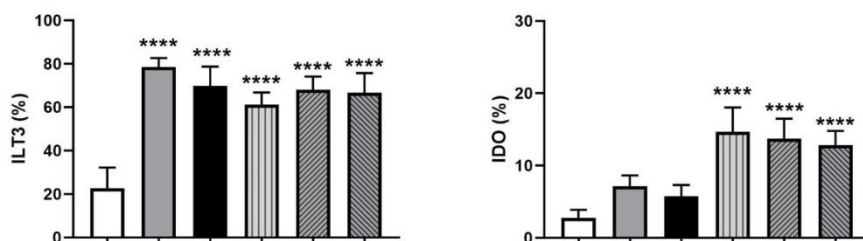
4.2. TsEV pokazuju imunomodulatorne efekte u modelu humanih DC *in vitro*

4.2.1. TsEV utiču na diferencijaciju i sazrevanje DC

Diferencijacija ćelija praćena je analizom ekspresije površinskih markera sazrevanja, citokinskog profila i promenom funkcionalnih karakteristika, odnosno sposobnosti tretiranih DC da polarizuju alogene CD4 T limfocite. Kako bismo ispitali uticaj TsEV na sazrevanje DC, ćelije su tretirane sa TsEV četvrtog dana kulture, a zatim su petog dana stimulisane inflamatornim koktelom LPS/IFN- γ (koji dovodi do potpunog sazrevanja DC) tokom 24h ili je ovaj inflamatorni tretman izostavljen. Kao pozitivna kontrola za diferencijaciju tolerogenog fenotipa DC korišćene su ćelije tretirane sa ES L1. Analiza ekspresije markera sazrevanja na DC nakon tretmana sa TsEV nije pokazala značajne promene u ekspresiji HLA-DR, CD86 i CD40 molekula (Grafik 2A), slično kao i kod DC tretiranih sa ES L1. Sa druge strane oba tretmana su uticala na značajno povećanje ekspresije CD83, dok je tretman sa TsEV uticao i na značajno povećanje ekspresije CCR7 na DC. Ovi rezultati ukazuju da tretman sa TsEV slično kao i tretman sa ES L1, indukuje nastanak DC delimično zrelog fenotipa.

DC stimulisane samo sa LPS/IFN- γ ispoljavale su povećanu ekspresiju svih površinskih markera (HLA-DR, CD83, CD86, CD40 i CCR7), što je očekivano za zreli fenotip DC nakon izlaganja inflamatornom stimulusu (Grafik 2A). Nasuprot tome, DC prethodno tretirane TsEV ili ES L1 produktima pokazale su slabiju ekspresiju markera sazrevanja čak i nakon stimulacije LPS/IFN- γ , pri čemu je ovaj efekat bio naročito izražen kod markera CD83, CD40 i CCR7. Ovi rezultati potvrđuju da TsEV, slično ES L1 produktima, utiču na sposobnost maturacije DC.

Tolerogeni potencijal DC analiziran je praćenjem ekspresije tolerogenih markera IDO-1 i ILT3 [231,232]. Pod uticajem TsEV kao i ES L1 produkata, zabeležen je i značajan porast ekspresije ILT3 u poređenju sa kontrolnim netretiranim DC, dok je kod IDO-1 markera primećen samo trend porasta ekspresije iako bez statističke značajnosti (Grafik 2B). Stimulacija nezrelih DC pomoću LPS/IFN- γ dovela je do značajnog porasta ekspresije ILT3. Međutim, kod DC prethodno tretiranih sa TsEV ili ES L1 produktima, a zatim stimulisanih sa LPS/IFN- γ , ekspresija ILT3 ostala je nepromenjena u poređenju sa ćelijama tretiranim samo sa LPS/IFN- γ . I ekspresija IDO-1 je značajno porasla nakon stimulacije LPS/IFN- γ kod DC tretiranih TsEV i ES L1 produktima u odnosu na netretirane ćelije (Medijum), pri čemu nije primećena statistički značajna razlika između ova dva tretmana.

A**B**

Grafik 2. Uticaj TsEV na ekspresiju površinskih markera dendritskih ćelija. Naivne DC su tretirane sa ES L1 produktima (50 $\mu\text{g/ml}$) ili sa TsEV (2.5 $\mu\text{g/ml}$ tj. 3×10^7 p/ml) četvrta dan nakon sađenja ćelija. Nakon 24h, ove ćelije su dodatno tretirane sa LPS/IFN- γ nakon čega su sakupljene i analizirane protočnom citometrijom. Netretirane ćelije kultivisane samo u medijumu su korišćene kao negativna kontrola (Medijum). Rezultati markera HLA-DR, CD86 i CD40 su prikazani kao medijana fluorescentnog intenziteta (MFI) dok su rezultati markera CD83, CCR7 (A), ILT3 i IDO (B) prikazani kao procenat ekspresije (%). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz četiri nezavisno izvedena eksperimenta. Statistička značajnosti je predstavljena kao * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$ kada se vrednosti porede sa kontrolom (Medijum) ili kada se vrednosti tretmana uporede međusobno što je utvrđeno primenom jednofaktorske analize varijanse praćenom sa Tukey testom za višestruka poređenja.

Funkcionalna karakterizacija DC praćena je intracelularnim bojenjem IL-12, IL-23, IL-10 i TGF- β citokina i određivanjem njihove koncentracije u supernatantima DC (Grafik 3.). Rezultati obe

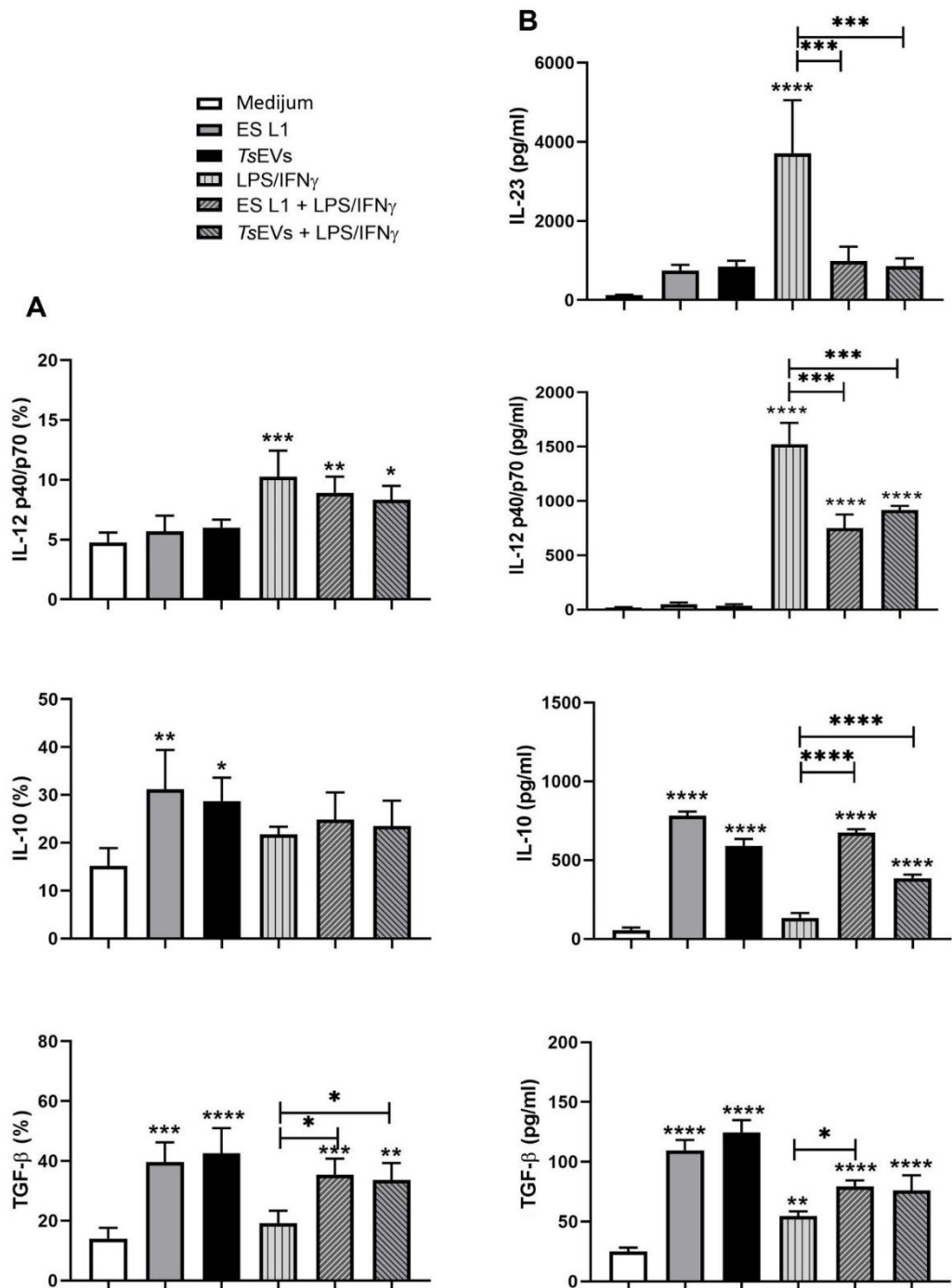
analize pokazali su da stimulacija DC sa TsEV ne utiče na otpuštanje citokina IL-12, koji podstiče diferencijaciju IFN- γ -produkujućih Th1 ćelija [2], niti IL-23, koji stimuliše ekspanziju Th17 ćelija [233] u poređenju sa kontrolnim netretiranim DC. Antitelo koje se koristi za merenje intracelularne ekspresije IL-12p40/p70 prepoznaje p40 subjedinicu prisutnu u oba citokina, IL-12 i IL-23 [234] zbog čega je grafik koji prikazuje intracelularnu ekspresiju IL-12p40/p70 (Grafik 3A) korišćen za interpretaciju intracelularne ekspresije IL-12 i IL-23 citokina. Ovi rezultati ukazuju da TsEV, kao i ES L1, ne podstiču otpuštanje IL-12 i IL-23 citokina iz DC (Grafik 3A i B). Nasuprot tome, TsEV i ES L1 produkti su značajno povećali procenat TGF- β^+ i IL-10 $^+$ DC (Grafik 3A) i podigli nivo koncentracije IL-10 i TGF- β citokina u supernatantima DC kultura, u odnosu na netretirane kontrolne DC (Grafik 3B).

DC prethodno stimulisane sa TsEV ili ES L1 produkti zadržale su funkcionalnu stabilnost uprkos prisustvu inflamatornog stimulusa (izlaganje LPS/IFN- γ). Pored uticaja na markere maturacije, tretman TsEV, kao i tretman ES L1 produktima, uticao je da se održi niska intracelularna ekspresija i produkcija inflamatornih citokina IL-12 i IL-23, čak i nakon LPS/IFN- γ stimulacije. Nasuprot tome, stimulacija netretiranih DC pomoću LPS/IFN- γ uticala je na značajno povećanje ekspresije i produkcije ovih citokina, što je očekivano za DC koje sazrevaju pod uticajem inflamatornog stimulusa (Grafik 3B).

U neinflamatornim uslovima, DC tretirane sa TsEV su imale značajno više nivoe intracelularnog IL-10 u odnosu na netretirane DC, dok u inflamatornim uslovima to povećanje nije uočeno. Međutim, koncentracija IL-10 je bila značajno viša kod tretiranih DC bez obzira na uslove. Slični rezultati su dobijeni i kod DC tretiranih sa ES L1.

DC su na tretman sa TsEV reagovalе povišenom produkcijom TGF- β citokina, na sličan način kao i IL-10, s tim da je nivo intracelularnog TGF- β i u inflamatornim uslovima bio takođe statistički značajno povišen. TsEV su stimulisale produkciju TGF- β u DC u sličnoj meri kao i ES L1.

Zajedno, ovi rezultati pokazuju da TsEV izazivaju povišenu produkciju anti-inflamatornih citokina, čak i u inflamatornim uslovima.

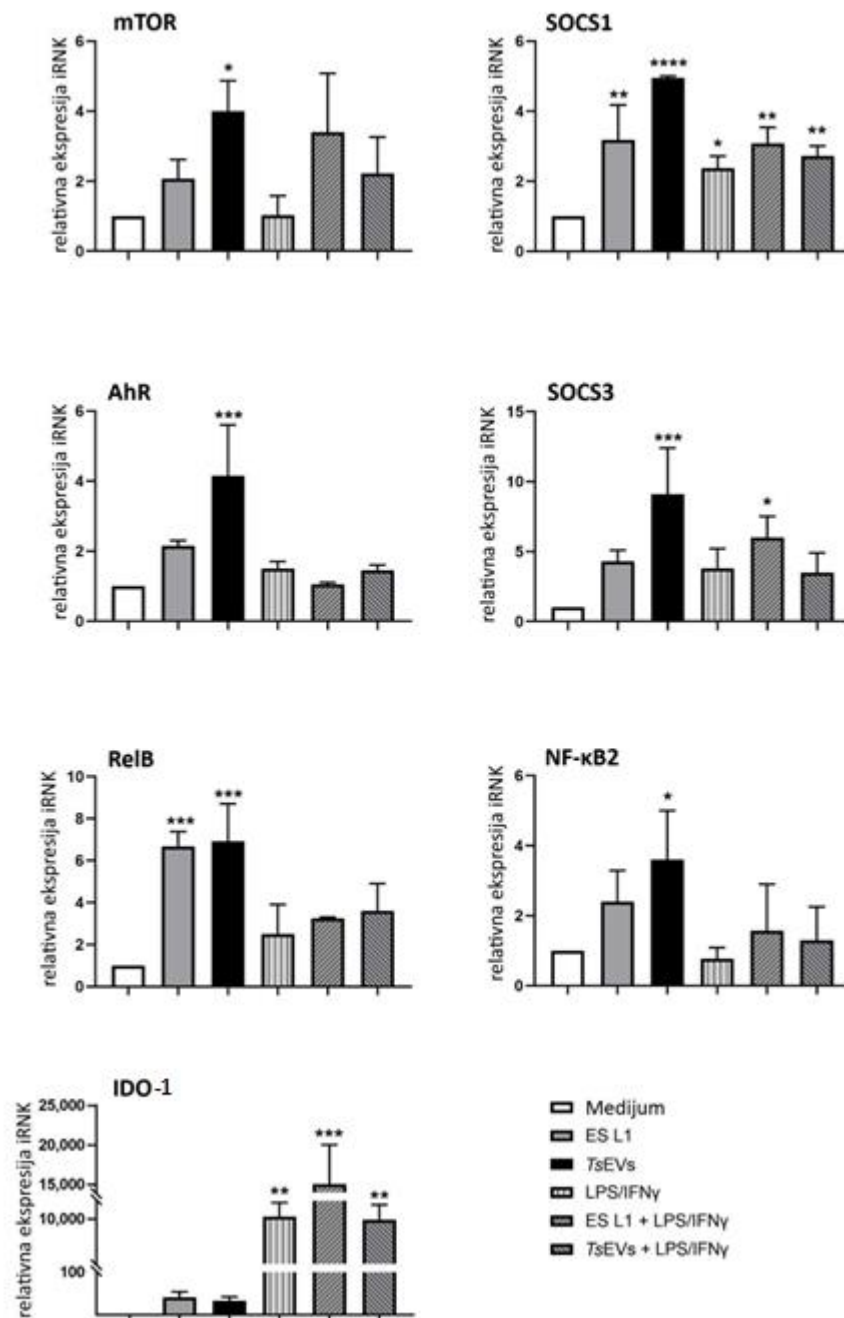


Grafik 3. Uticaj TsEV na produkciju citokina od strane dendritskih ćelija. (A) Rezultati analize ekspresije citokina IL-10, IL-12p40/p70 i TGF- β DC su utvrđeni intracelularnim bojenjem DC i merenjem na protočnom citometru. Rezultati su prikazani kao procenat ekspresije citokina \pm S.D. donijeni iz četiri različita eksperimenta. (B) Koncentracija citokina IL-23, IL-10, IL-12p70, i TGF- β (pg/mL) iz supernatata DC je utvrđena ELISA testovima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.D. iz četiri različita eksperimenta. Statistička značajnost je utvrđena primenom jednofaktorske jednofaktorske analize varijanse praćenom Tukey testom za višestruka poređenja, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$.

4.2.2. TsEV utiču na promenu ekspresije gena za maturaciju DC

Kako bi se istražili molekularni mehanizmi koji stoje iza indukcije tolerogenih DC putem TsEV, analizirana je ekspresiju gena uključenih u signalne puteve: molekulske mete rapamicina kod sisara (engl. mammalian target of rapamycin, mTOR), supresora citokinskog signalizovanja 1 (engl. Suppressor of cytokine signaling, SOCS1), SOCS3, aril-hidrokarbonskog receptor (AhR),IDO-1, nuklearnog faktora κ B (engl. Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells, NF- κ B2) i transkripcionog faktora RelB. Prethodna istraživanja istakla su ove signalne puteve kao ključne u procesu maturacije DC [235,236]. Tretirane DC su sakupljene i zamrznute na -80°C da bi kasnije bile iz njih izolovana RNK i analizirana ekspresija navedenih gena.

Kao što je prikazano na Grafiku 4., DC tretirane sa TsEV statistički značajno više eksprimirale mTOR, AhR, NF- κ B2, RelB, SOCS1 i SOCS3 u poređenju sa kontrolnim, netretiranim DC. Slično tome, DC tretirane ES L1 antigenima značajno povećale ekspresiju RelB i SOCS1, dok je ekspresija SOCS3, AhR i NF- κ B2 imala samo tendenciju ka povećanju. Ekspresija IDO-1 u ćelijama tretiranim sa TsEV i ES L1 bila je vrlo niska. Međutim, nakon izlaganja inflamatornom stimulusu (LPS/IFN- γ), netretirane kontrolne DC, kao i DC tretirane TsEV i ES L1 antigenima, pokazale su značajan porast ekspresije IDO-1. Ovi rezultati ukazuju da tretman sa TsEV utiče na promenu ekspresije gena uključenih u signalne puteve koji vode ka razvoju tolerogenih DC, i to je slično efektima tretmana sa ES L1.

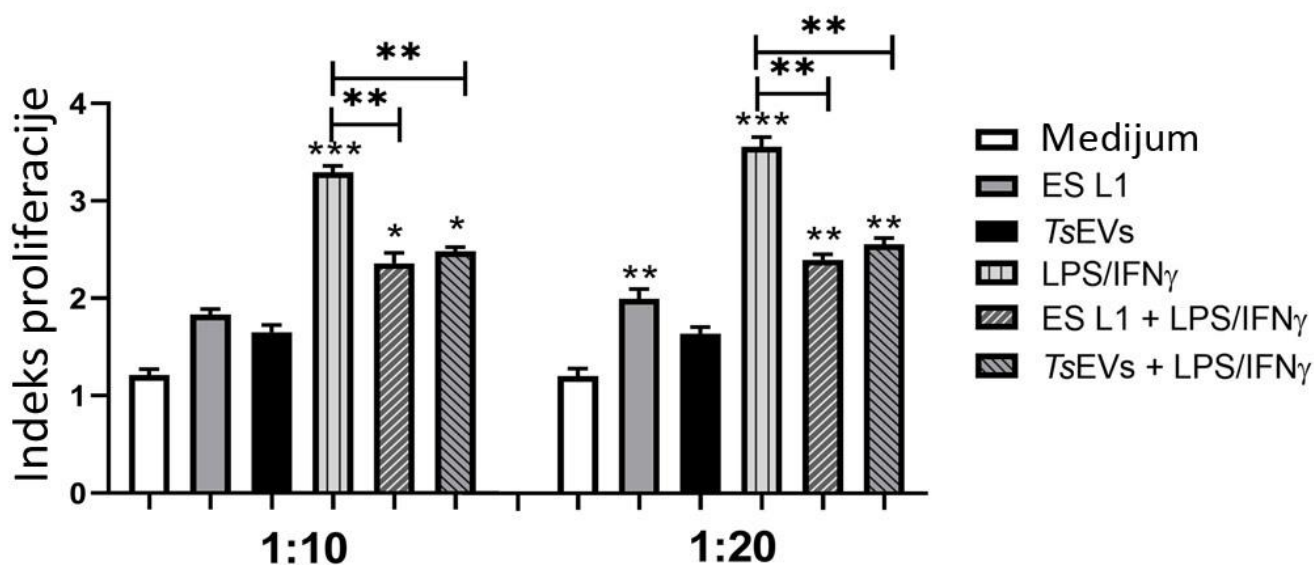


Grafik 4. Uticaj TsEV na ekspresiju gena u dendritskim ćelijama. Relativni nivoi ekspresije iRNK za mTOR, AhR, RelB, NF-κB2 i IDO u DC izraženi u odnosu na vrednosti za GAPDH a rezultati su prikazani kao relativna zastupljenost ciljnog gena korišćenjem 2-ΔΔCt metode. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D iz tri različita eksperimenta. Statistička značajnost je utvrđena primenom jednofaktorske analize varijanse praćenom Tukey testom za višestruka poređenja, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.0001.

4.2.3. DC tretirane sa TsEV ograničavaju proliferaciju alogenih T ćelija

Kako bi se ispitaio uticaj tretmana sa TsEV na sposobnost humanih DC da modulišu proliferaciju T ćelija, tretirane DC su kultivisane sa alogenim CD3⁺ T limfocitima. Proliferacija T ćelija praćena je smanjenjem intenziteta obojenosti T ćelija nakon njihove deobe što se kvantifikuje kao indeks proliferacije (Grafik 5.). DC tretirane sa TsEV ili ES L1 produktima su pokazale smanjenu sposobnost stimulacije proliferacije T ćelija u poređenju sa zrelim DC koje su stimulisane LPS/IFN- γ . Ovaj efekat zadržan je i nakon izlaganja inflamatornom stimulusu.

Rezultati ukazuju da tretman humanih DC sa TsEV ili ES L1 produktima dovodi do smanjene sposobnosti ovih ćelija da indukuju proliferaciju alogenih T limfocita, što se održava i nakon inflamatorne stimulacije. Ovi nalazi potvrđuju imunomodulatorni potencijal TsEV, koji doprinosi razvoju tolerogenog fenotipa DC sa ograničenom alostimulatornom funkcijom.



Grafik 5. Proliferacija T limfocita nakon ko-kultivacije sa DC stimulisanim sa TsEV. DC tretirane sa ES L1 produktima ili sa TsEV i/ili sa LPS/IFN- γ su pre stavljanja u ko-kulturu isprane od tretmana i zatim kultivisane pet dana sa alogenim T limfocitima (1×10^5 ćelija/bunaru) pri čemu su odnosi DC:T ćelija bili 1:10 i 1:20. Proliferacija je merena kao procenat CellTrace Far Red⁺ T ćelija i rezultati su prikazani kao srednje vrednosti indeksa proliferacije \pm S.D. iz tri različita eksperimenta. 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.

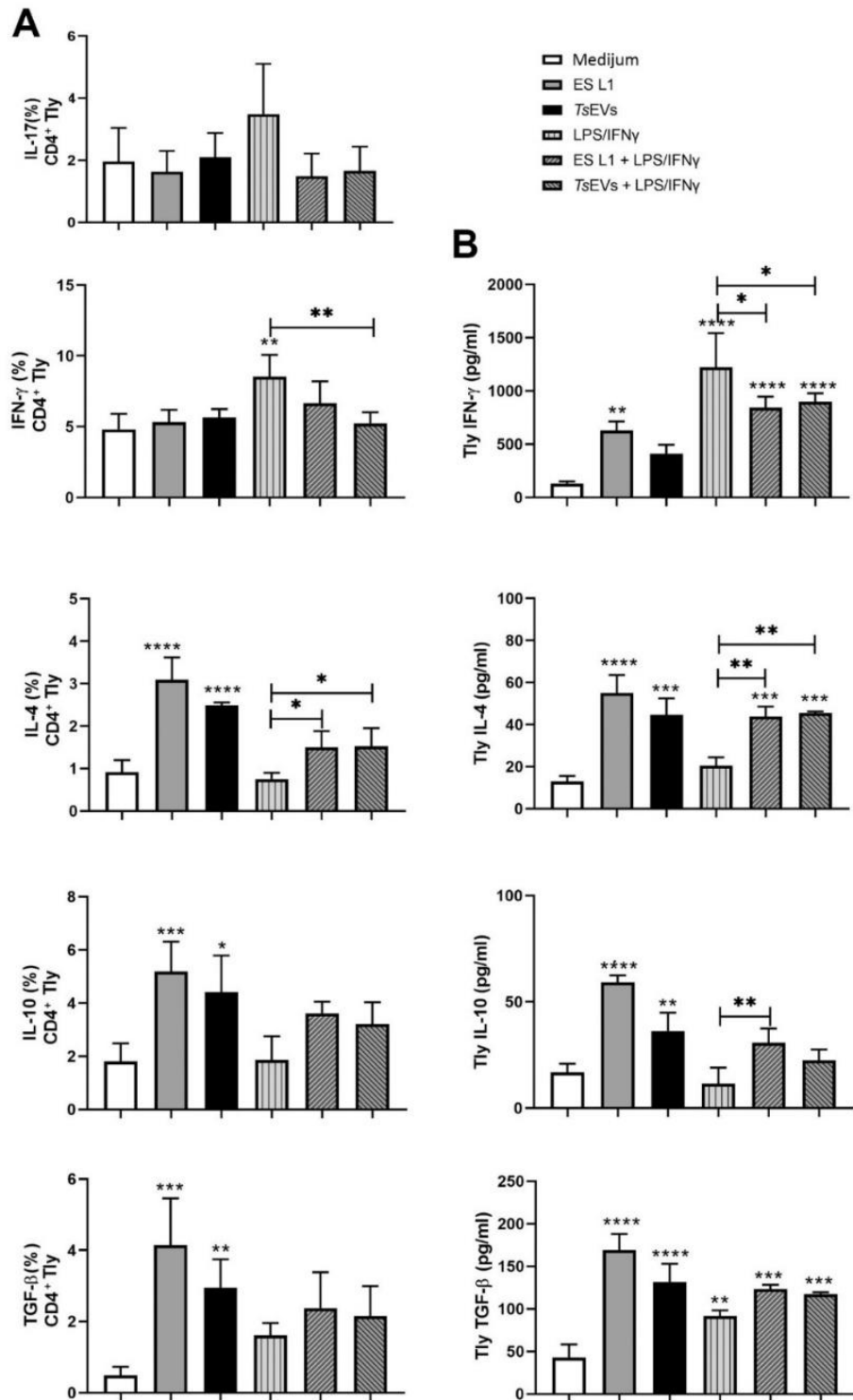
4.2.4. DC tretirane sa TsEV utiču na produkciju anti-inflamatornih citokina u ko-kulturi sa alogenim T ćelijama

Sposobnost DC tretiranih sa TsEV i ES L1 produktima da polarizuju Th odgovor ispitana je analizom intracelularne ekspresije citokina IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-10 i TGF- β u CD4⁺ T ćelijama iz ko-kultura sa DC (Grafik 6A i Grafik 7.) kao i merenjem koncentracije ovih citokina u supernatantima ko-kultura (Grafik 6B).

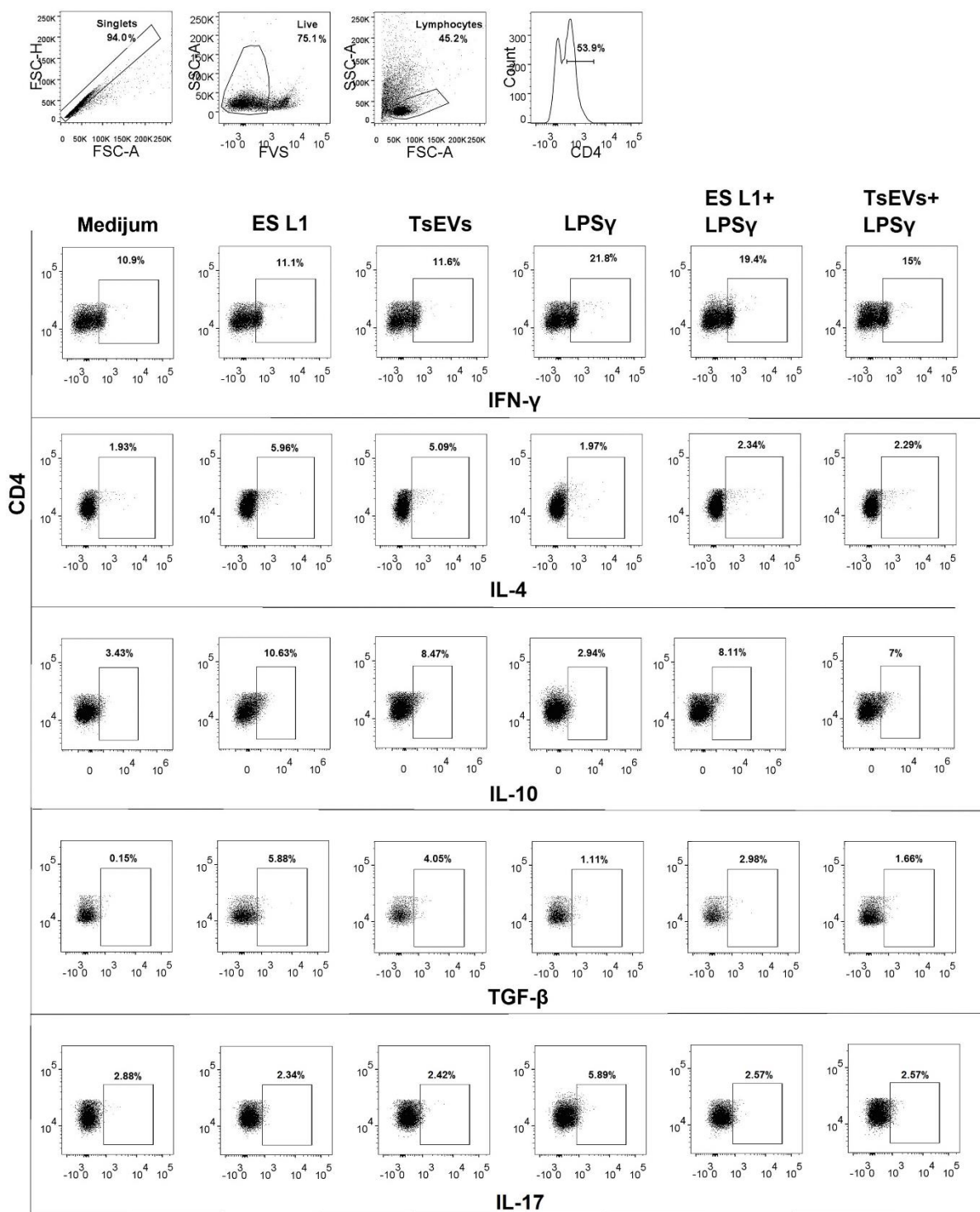
Rezultati su pokazali da DC tretirane sa TsEV nisu indukovale polarizaciju Th1 odgovora, budući da ekspresija inflamatornog citokina IFN- γ ni u T ćelijama, ni u supernatantima, nije pokazala značajne promene u poređenju sa kontrolnim uzorcima (Medijum) (Grafik 6A, B). S druge strane, DC tretirane ES L1 produktima imale su sposobnost indukcije IFN- γ , ali značajno manju u poređenju sa LPS/IFN- γ stimulisanim ćelijama. T ćelije koje su bile u ko-kulturi sa DC tretiranim sa TsEV i ES L1 produktima, a zatim stimulisane LPS/IFN- γ , pokazale su i značajno smanjenu intracelularnu ekspresiju IFN- γ (Grafik 6A) i smanjen nivo produkcije ovog citokina u supernatantima (Grafik 6B).

Što se tiče analize citokina Th17, procenat IL-17⁺CD4⁺ T ćelija u ko-kulturama sa DC tretiranim sa TsEV bio je na nivou netretiranih kontrola i nije se menjao ni nakon tretmana inflamatornim stimulusom LPS/IFN- γ , što je takođe uočeno i kod DC tretiranih ES L1 produktima.

Analiza citokina Th2 i regulatornog imunskog odgovora pokazala je da su, TsEV, slično ES L1 produktima, podstakle DC-posredovanu ekspanziju CD4⁺T ćelija koje eksprimiraju IL-4, IL-10 i TGF- β , kao i povećanu produkciju ovih citokina u supernatantima ko-kultura, u poređenju sa netretiranim DC kontrolama. Nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ , DC tretirane sa TsEV i ES L1 produktima su zadržale sposobnost da produkuju IL-4, IL-10 i TGF- β citokine, što potvrđuje njihov imunomodulatorni potencijal tj. da dovode do razvoja stabilnog tolerogenog fenotipa DC.



Grafik 6. Citokinski profil T limfocita nakon ko-kultivacije sa DC stimulisanim sa TsEV. DC tretirane sa ES L1 produktima ili sa TsEV i/ili sa LPS/IFN- γ su pre stavljanja u ko-kulturu isprane od tretmana i zatim kultivisane šest dana sa alogenim T limfocitima (Tly) (1×10^5 ćelija/bunaru) pri čemu su odnosi DC:T ćelija bili 1:20. (A) Procenat CD4⁺ T ćelija koje ekspiriraju cytokine. T ćelije su kultivisane sa DC nakon čega su tretirane sa PMA/kalcijum jonoforom/monenzinom poslednja četiri sata pre podizanja ćelija za analizu protočnom citometrijom. Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Grafiku 7. (B) Koncentracija citokina u supernatantima DC:T kultura nakon tretmana sa PMA/kacijum jonoforom su utvrđene ELISA testom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednsoti \pm S.D. rezultata iz četiri različita eksperimenta. Statističke značajnosti su utvrđene sa jednofaktorskom analizom varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.0001



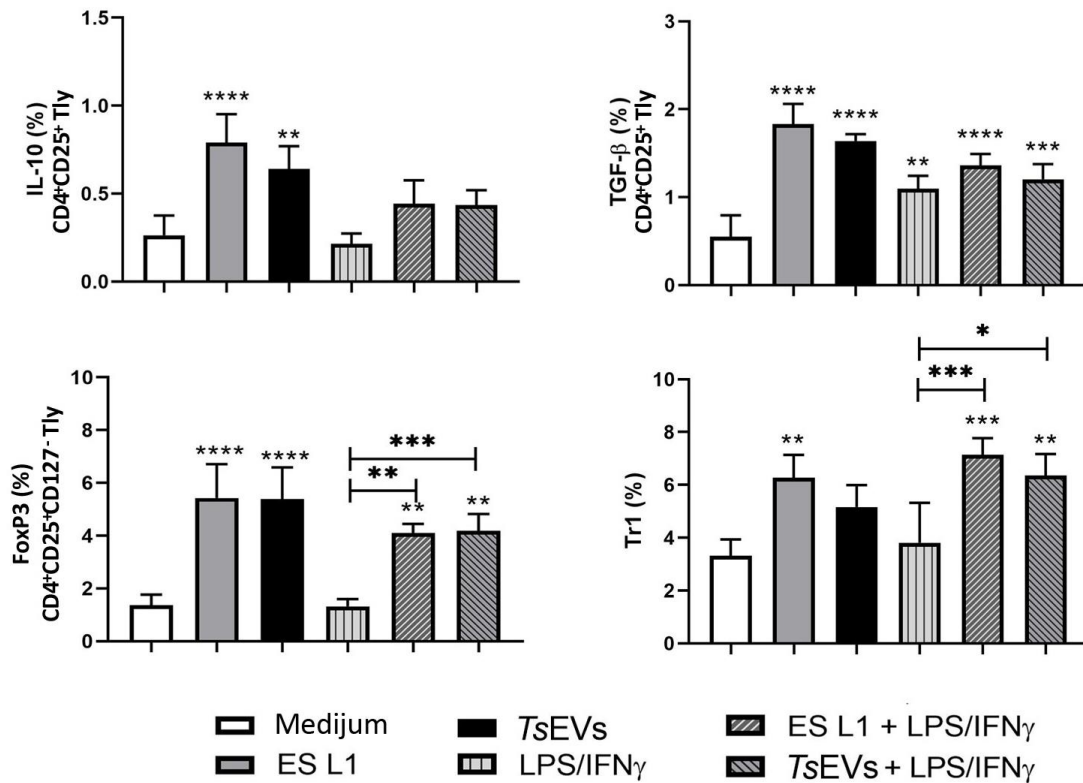
Grafik 7. Strategija analize intracelularne ekspresije T limfocita nakon ko-kulture sa tretiranim DC. Prikazani su reprezentivni dijagrami sa strategijama formiranja graničnika koje su korišćene za analizu intracelularne ekspresije citokina IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β i IL-17 unutar CD4⁺ T limfocita (Rezultat u okviru Grafika 6A). Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za ispitivani citokin.

4.2.5. DC tretirane sa TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija

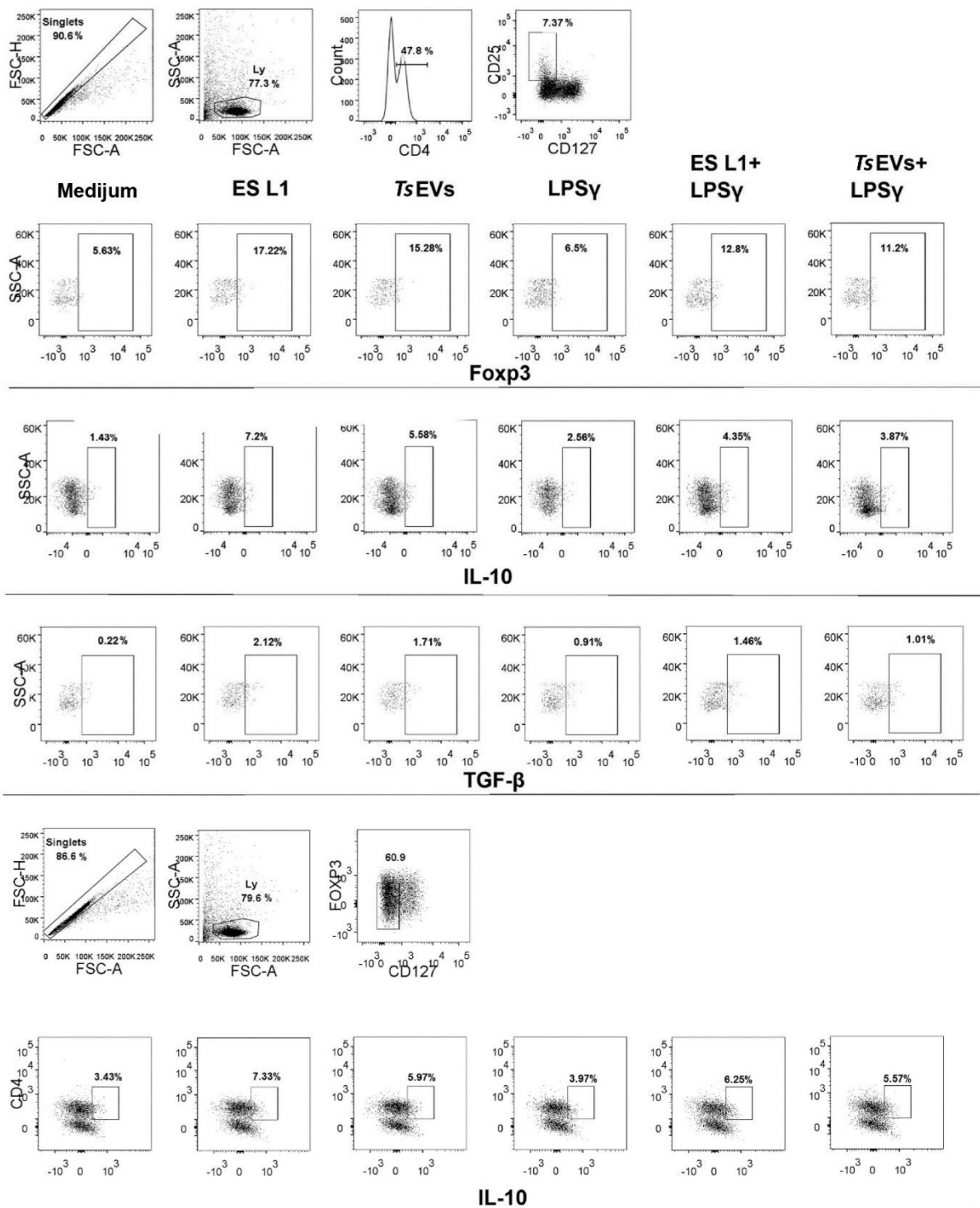
Procenat inducibilnih FoxP3⁺ Treg ćelija u ko-kulturi DC/T ćelija određen je na osnovu praćenja ekspresije FoxP3 markera unutar populacije CD4⁺CD127⁻CD25⁺ T ćelija (Grafici 8 i 9). DC tretirane sa TsEV indukovale su značajno povećanje procenta CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija u poređenju sa ko-kulturama sa kontrolnim netretiranim DC. Ovo je bilo slično efektu koji je primećen kod DC tretiranih sa ES L1 produktima. Ova sposobnost indukcije Treg ćelija zadržana je i nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ tj. u inflamatornim uslovima (Grafik 8), ukazujući na stabilnost tolerogenog fenotipa DC generisanog pod uticajem TsEV ili ES L1 produkata. Sve CD4⁺CD25⁺ T ćelije su imale povećanu intracelularnu ekspresiju TGF- β , ali su DC tretirane sa TsEV ili ES L1 produktima uticale na statistički značajno povećanje ekspresije TGF- β unutar CD4⁺CD25⁺ T ćelijske subpopulacije, u poređenju sa T ćelijama u ko-kulturi sa kontrolnim DC. Isti efekat je uočen i nakon dodatne stimulacije sa LPS/IFN- γ (Grafik 8). Pored toga, kultivacija T ćelija sa DC tretiranim sa TsEV ili ES L1 produktima dovela je i do veće ekspresije IL-10 unutar CD4⁺CD25⁺T ćelijske populacije u poređenju sa kontrolnim DC. Međutim, ovo povećanje nije bilo statistički značajno nakon dodatnog stimulusa sa LPS/IFN- γ .

Pored FoxP3⁺ Treg ćelija, analizirano je i prisustvo drugog tipa inducibilnih regulatornih T ćelija, Tr1 ćelija (Grafik 8). Ovaj tip regulatornih T ćelija karakteriše visoka produkcija IL-10 i nedostatak ekspresije FoxP3 markera [237]. DC tretirane sa TsEV ili ES L1 produktima su indukovale razvoj Tr1 ćelija u većem procentu u poređenju sa netretiranim DC. Kapacitet DC tretiranih sa TsEV ili ES L1 produktima da indukuju Tr1 ćelije nije bio umanjen nakon stimulacije sa LPS/IFN- γ , što dodatno potvrđuje kapacitet TsEV da preko DC da indukuju regulatorni odgovor i u inflamatornim uslovima.

Prethodno navedeni rezultati ukazuju da TsEV indukuju razvoj tolerogenih DC, koje proizvode anti-inflamatorne i regulatorne citokine ali ne i one vezane za Th1 i Th17 odgovor, imaju smanjenu LPS/IFN- γ -indukovanu sposobnost alo-stimulatorne proliferacije T ćelija dok polarizuju T ćelijski odgovor ka razvoju Th2 i T regulatornih ćelija.



Grafik 8. Kapacitet DCs tretiranih sa TseV da polarizuju regulatorne T ćelije. Nakon tretmana sa ES L1 produktima ili sa TseV i/ili sa LPS/IFN- γ , DC su isprane od tretmana i kultivisane šest dana sa alogenim T limfocitima (Tly) u odnosu DC:T 1:50. Nakon toga culture su tretirane sa PMA/kacijum jonoforom/monenzinom četiri sata nakon čega su ćelije sakupljene i analizirane na protočnom citometru. Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Grafiku 9. Rezultati su prikazani kao srednje vresnosti procenata ekspresije \pm S.D. rezultata iz četiri različita eksperimenta. Statističke značajnosti su utvrđene korišćenjem jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, i ****P < 0.0001.



Grafik 9. Strategija analize Treg ćelija nakon ko-kulture sa tretiranim DC. Reprezentativne strategije analize Treg (analizirane su kao limfocitne ćelije koje su CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺), T ćelija koje ekspimiraju IL-10 i TGF-β (analizirane unutar CD4⁺CD25⁺) i Tr1 ćelija (analizirane kao CD4⁺FoxP3⁺IL-10⁺) izolovanih nakon ko-kulture sa tretiranim DC (Rezultat u okviru Grafika 8). Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.

4.3. TsEV smanjuju inflamaciju u *in vivo* modelu respiratorne alergije kod miševa

Prethodno navedeni rezultati *in vitro* ispitivanja su pokazali da TsEV utiču na diferencijaciju fenotipa DC u tolerogeni, tj. DC koje proizvode anti-inflamatorne citokine i dovode do razvoja regulatornih T ćelija.

Kako bi se ustanovilo da li je ovaj efekat dovoljan da bi se TsEV u perspektivi mogle iskoristiti kao osnova za dizajniranje novih imunomodulirajućih terapeutika za inflamatorna oboljenja, njihov efekat je ispitan na *in vivo* modelu respiratorne alergije kod miševa.

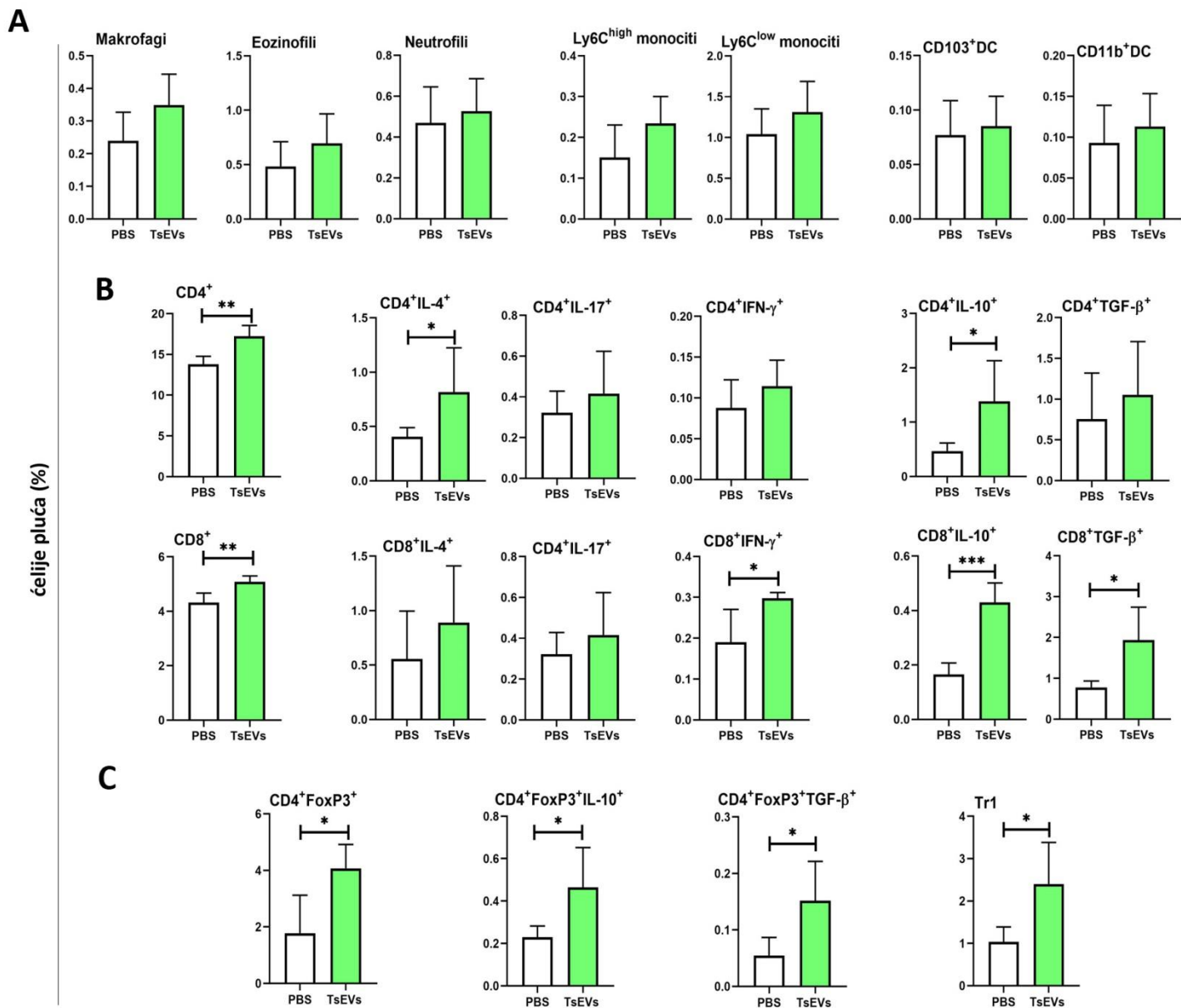
4.3.1. TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija u plućima zdravih miševa

Kako bi se utvrdilo da li TsEV utiču na promenu zastupljenosti populacija imunskih ćelija u plućima, nezavisno od respiratorne alergije, nakon *i.n.* davanja TsEV zdravim miševima, analizirane su populacije imunskih ćelija uključenih u urođeni i adaptivni imunski odgovor (Slika 7A, grupa TsEV). Kontrolna grupa je umesto TsEV primila PBS (Slika 7A, grupa PBS).

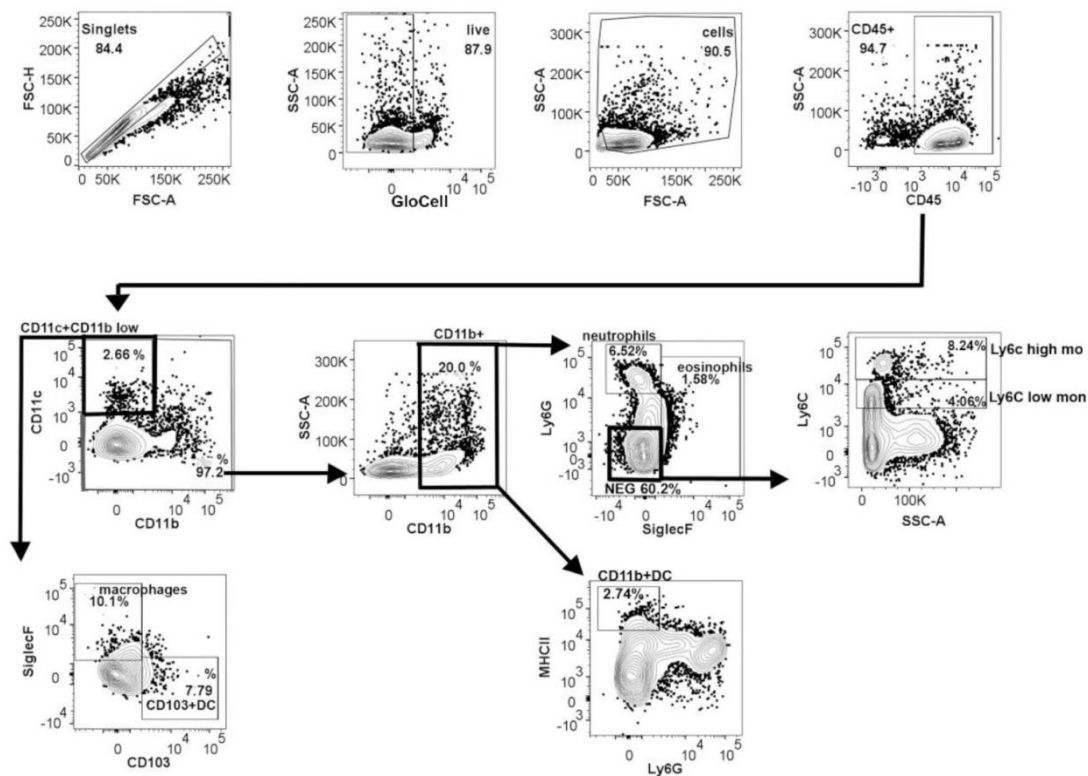
Ova analiza je pokazala da tretman TsEV nije doveo do značajnih promena u zastupljenosti makrofaga, eozinofila, neutrofila, monocita ili DC unutar populacije mijeloidnih ćelija (Grafici 10A i 11). Međutim, uočeno je povećanje procenta limfoidnih ćelija ($CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija), (Grafici 10B i 12). Analiza ekspresije citokina dodatno je pokazala značajno povećanje $CD4^+IL-4^+$ i $CD4^+IL-10^+$ ćelija, kao i $CD8^+IFN-\gamma^+$, $CD8^+IL-10^+$ i $CD8^+TGF-\beta^+$ T ćelija (Grafik 10B).

Pluća TsEV-tretiranih miševa imala su i povišen procenat regulatornih T ćelija, u okviru kojih je zapažena statistički značajna razlika u procentima $CD4^+Foxp3^+$ Treg ćelije i $CD4^+Foxp3^+IL-10^+$ (Tr1) ćelija, u poređenju sa PBS-tretiranim kontrolama (Grafici 10C i 13). Pored toga, Treg ćelije u plućima TsEV-tretiranih miševa pokazale su povećanu intracelularnu ekspresiju anti-inflamatornih citokina, gde je detektovano značajno povećanje procentualne zastupljenosti populacija $CD4^+Foxp3^+IL-10^+$ i $CD4^+Foxp3^+TGF-\beta^+$ ćelija.

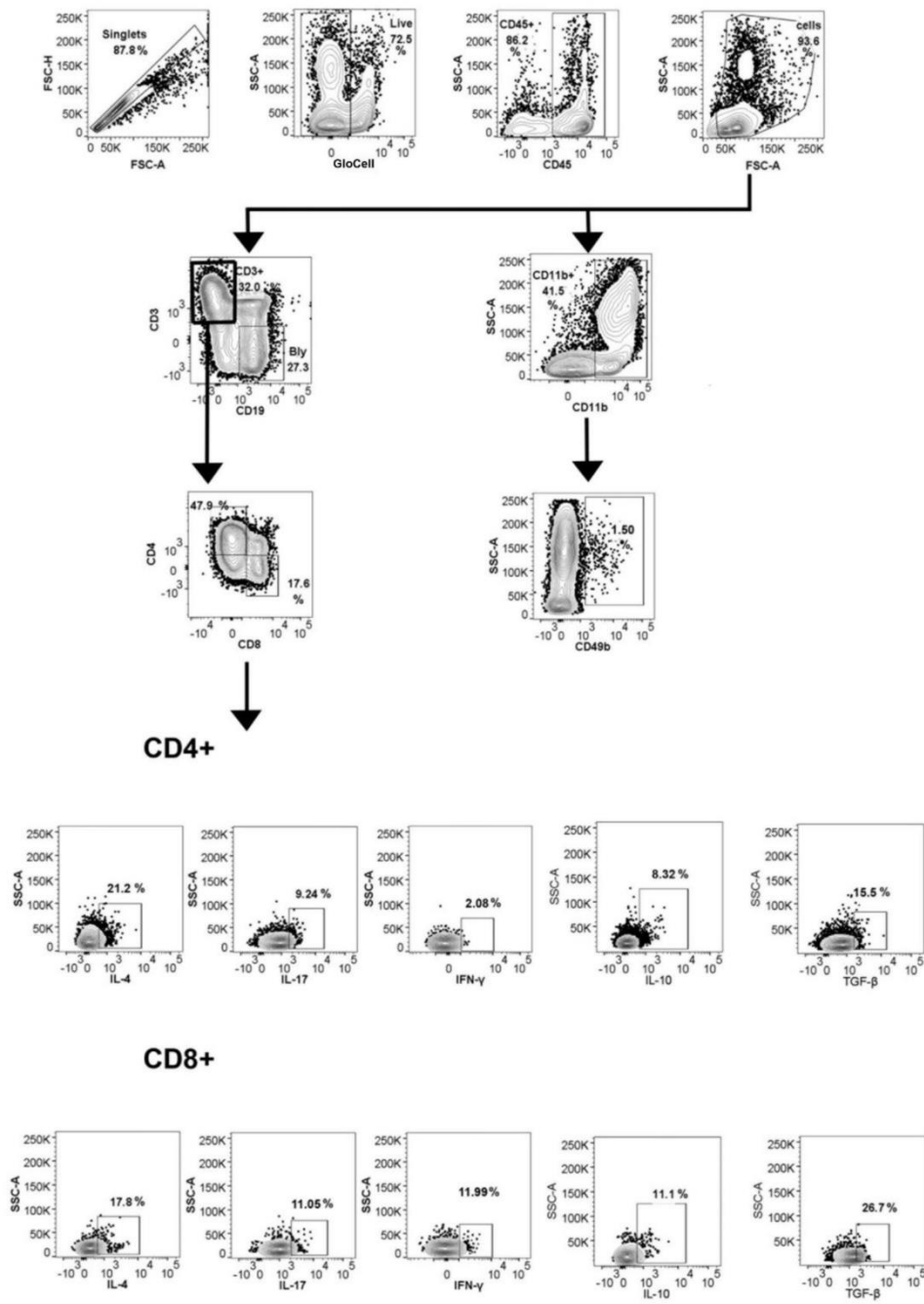
Ovi rezultati ukazuju da *i.n.* tretman TsEV ne remeti značajno populaciju mijeloidnih i limfoidnih ćelija u plućima ali utiče na povećanje intracelularne ekspresije anti-inflamatornih citokina ($IL-10$ i $TGF-\beta$) i utiče na povećanje procenta regulatornih T ćelija.



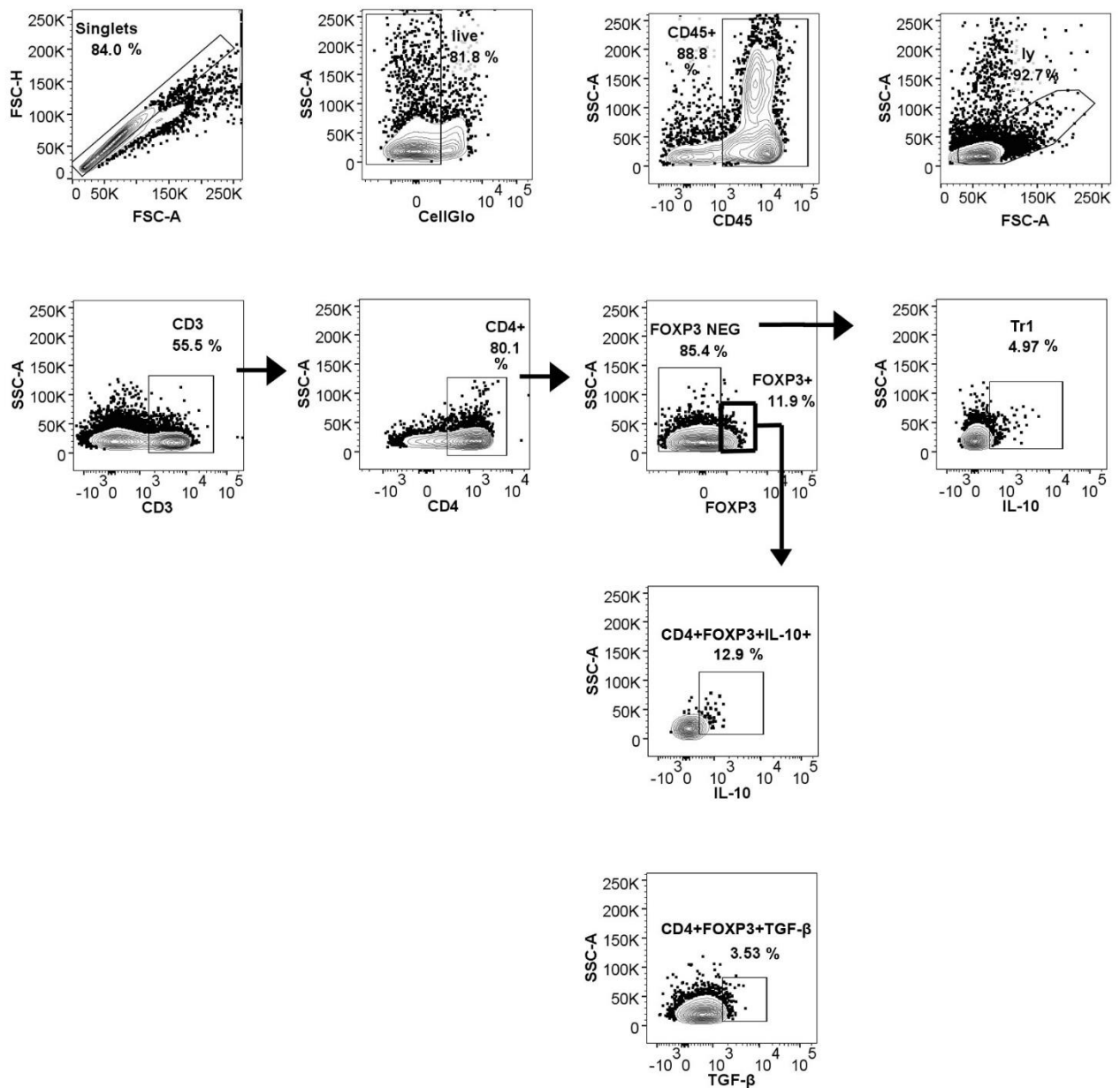
Grafik 10. Uticaj TsEV i.n. tretmana na ćelije pluća zdravih miševa. Miševi su primili TsEV kao što je prikazano u Slici 7A. Ćelije pluća su sakupljene i analizirane protočnom citometrijom. (A) Procent mijeloidnih ćelija u okviru kojih su analizirani makrofagi, eozinofili, neutrofil, Ly6C^{high} monociti, Ly6C^{low} monociti, CD103⁺DC i CD11b⁺DC. (B) Procenti pomoćničkih (CD4⁺) T limfocita i citotoksičnih (CD8⁺) T limfocita u plućima kao i procenti intracelularne ekspresije citokina IL-4, IL-17, IFN- γ , IL-10 i TGF- β u okviru tih populacija ćelija. (C) Procenti regulatornih T ćelija u okviru kojih su analizirane Treg (CD4⁺FoxP3⁺) i Tr1 (CD4⁺FoxP3⁺IL-10⁺) kao i procenti intracelularne ekspresije citokina IL-10 i TGF- β u okviru tih populacija ćelija. Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Graficima 11,12 i 13. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm S.D. Statističke značajnosti su utvrđene sa Student T testom i prikazane kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005.



Grafik 11. Strategija analize mijeloidnih ćelija izolovanih iz pluća miševa. Nakon žrtvovanja, pluća su sakupljena i vršena je enzimaska digestija radi izolacije ćelija. Imunske ćelije su na protočnom citometru identifikovane kao CD45⁺ nakon čega su analizirane različite populacije mijeloidnih ćelija prisutnih u plućima u zavisnosti od zastupljenosti fenotipskih markera: makrofagi (CD11c⁺CD11b^{low}SiglecF⁺CD103⁻), eozinofili (CD11b⁺SiglecF⁺), neutrofilni (CD11b⁺Ly6G⁺SiglecF⁻), Ly6C^{high} monociti (CD11b⁺Ly6G⁺SiglecF⁻Ly6C^{high}), Ly6C^{low} monociti (CD11b⁺Ly6G⁺SiglecF⁻Ly6C^{low}), CD103⁺DC (CD11c⁺CD11b^{low}SiglecF⁻CD103⁺) i CD11b⁺DC (CD11b⁺MHC⁺Ly6G⁻). Rezultati su prikazani u okviru Grafika 10A. Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.



Grafik 12. Strategija analize limfoidnih ćelija izolovanih iz pluća miševa. Imunske ćelije su identifikovane kao CD45⁺ nakon čega su analizirane različite populacije limfoidnih ćelija prisutnih u plućima u zavisnosti od zastupljenosti fenotipskih markera. Unutar CD3⁺CD4⁺ i CD3⁺CD8⁺ T limfocita analizirana je intracelularna ekspresija citokina IL-4, IL-17, IFN- γ , IL-10 i TGF- β . B limfociti su analizirani kao CD3⁺CD19⁺ i urođenoubilačke ćelije (NK) su analizirane kao CD11b⁺CD49b⁺ ćelije. Rezultati su prikazani u okviru Grafika 10B. Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.



Grafik 13. Strategija analize regulatornih T ćelija izolovanih iz pluća miševa. Imunske ćelije su identifikovane kao CD45⁺ nakon čega su analizirane različite populacije limfoidnih ćelija prisutnih u plućima u zavisnosti od zastupljenosti fenotipskih markera. Treg ćelije su analizirane kao CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ i unutar njih je analizirana i intracelularna ekspresija IL-10 i TGF-β. Tr1 ćelije su identifikovane kao CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻IL-10⁺. Rezultati su prikazani u okviru Grafika 10C. Iznad odgovarajućih histograma navedeni su procenti pozitivnih ćelija (%) za svaki ispitivani molekul.

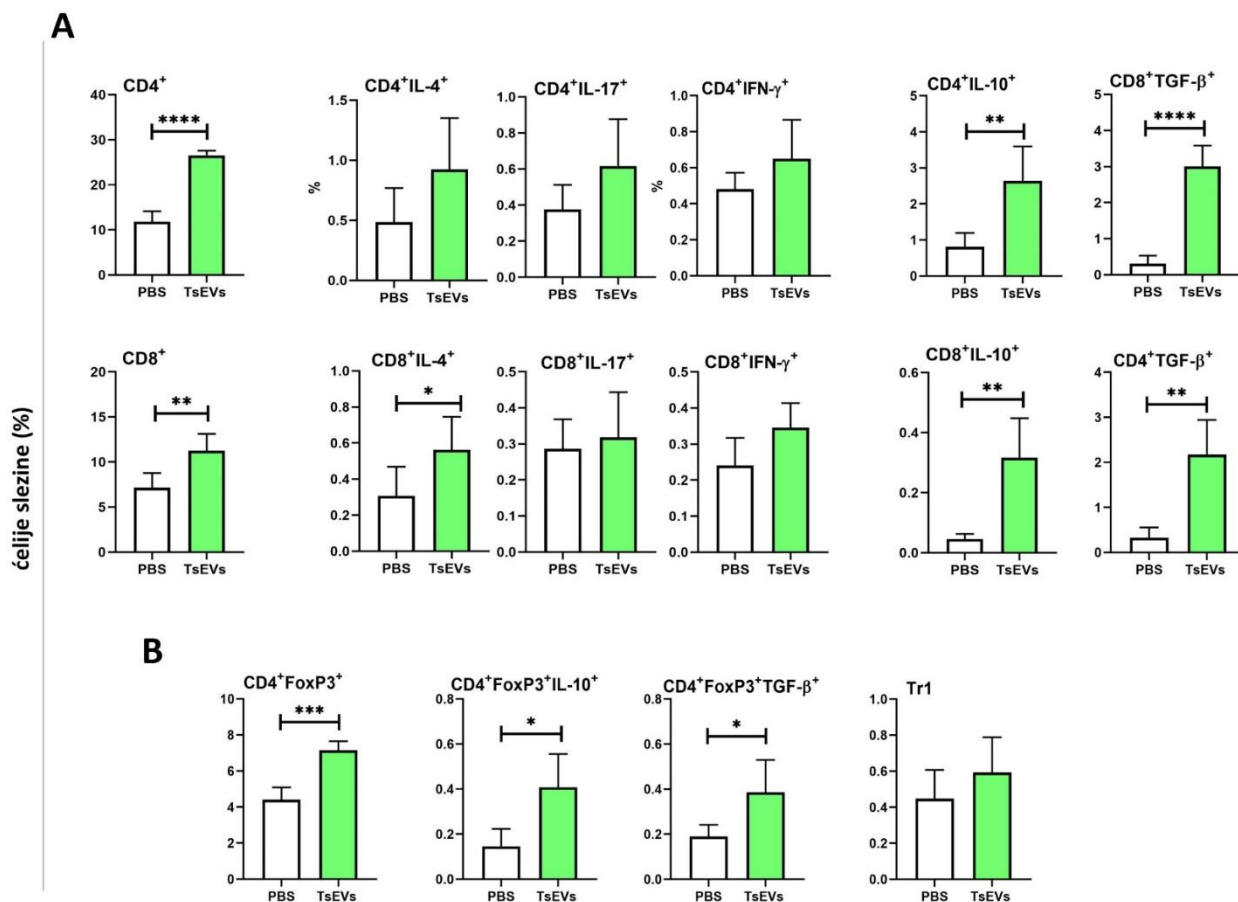
4.3.2. TsEV utiču na diferencijaciju regulatornih T ćelija u slezinama zdravih miševa

Sistemske efekte tretmana sa TsEV su praćeni analizom limfoidnih populacija u slezini i praćenjem ekspresije citokina unutar tih populacija. Rezultati su pokazali da je tretman sa TsEV doveo do povećanja procenta CD4⁺ T ćelija u slezinama tretiranih miševa u poređenju sa kontrolnim grupama (Grafik 12 i 14A). S druge strane, nije zabeležena promena u procentu CD4⁺ T ćelija koje ekspresiraju intracelularne citokine IL-4, IL-17 i IFN- γ , dok je istovremeno zabeležen značajan porast procenta CD4⁺ T ćelija koje ekspresiraju anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- β u odnosu na miševе tretirane samo sa PBS-om (Kontrola).

Tretman TsEV doveo je i do povećanja ukupnog procenta CD8⁺ T ćelija u slezinama u poređenju sa kontrolnim miševima. Unutar ove populacije, zabeležen je značajan porast CD8⁺IL-4⁺ ćelija. Nasuprot tome, procenat CD8⁺ T ćelija koje intracelularno ekspresiraju inflamatorne citokine, poput IL-17 i IFN- γ , ostao je nepromenjen. Istovremeno, tretman TsEV je značajno povećao procenat CD8⁺ T ćelija koje ekspresiraju regulatorne citokine IL-10 i TGF- β , što ukazuje na to da je TsEV tretman značajno stimulisao razvoj regulatornih i anti-inflamatornih CD8⁺ T ćelija (Grafik 14A).

Analizom populacije regulatornih ćelija u slezini utvrđeno je da je tretman sa TsEV značajno povećao procenat CD4⁺Foxp3⁺ T ćelija u poređenju sa kontrolama. Unutar ove populacije, primećen je značajan porast intracelularne ekspresije IL-10 i TGF- β citokina. Međutim, tretman sa TsEV nije uticao na povećanje procenta Tr1 ćelija u slezinama (Grafici 13 i 14B).

Ovi rezultati ukazuju na sposobnost TsEV da stimulišu regulatorni imunski odgovor i na sistemskom nivou i u odsustvu inflamatornog oboljenja.



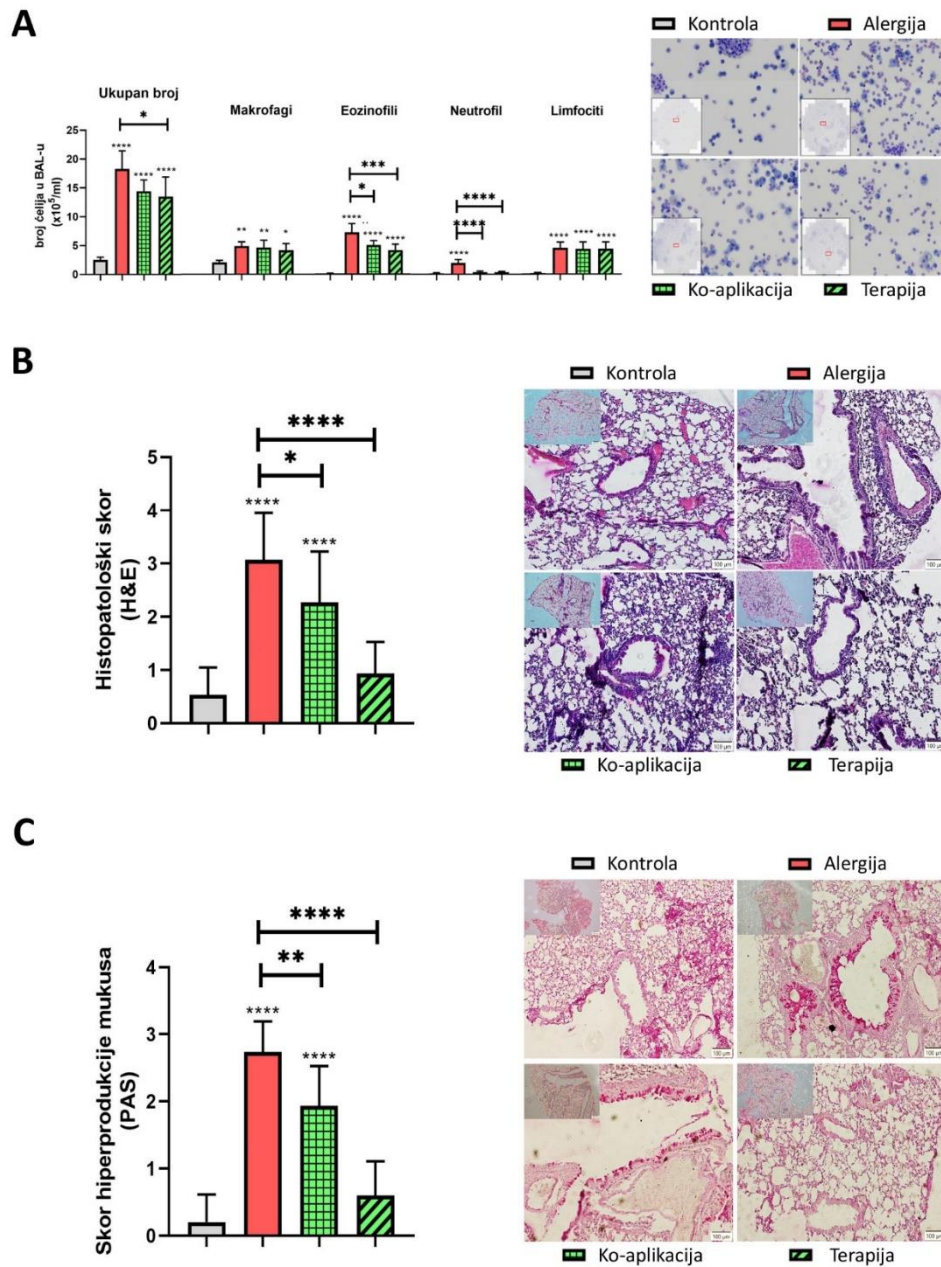
Grafik 14. Uticaj TsEV i.n. tretmana na ćelije slezine zdravih miševa. Miševi su primili TsEV kao što je prikazano u Slici 7A. Ćelije slezine su sakupljene i analizirane protočnom citometrijom. (A) Procenat pomoćničkih (CD4⁺) i citotoksičnih (CD8⁺) T limfocita kao i procenti ekspresije citokina IL-4, IL-17, IFN-γ, IL-10, TGF-β unutar populacija ovih ćelija. (B) Procenat regulatornih T ćelija u okviru kojih su analizirane Treg (CD4⁺Foxp3⁺) i Tr1 (CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺) ćelije kao i procenti intracelularne ekspresije citokina IL-10 i TGF-β u okviru Treg populacije ćelija. Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula je utvrđena na osnovu strategija sličnim onim prikazanim na Graficima 12 i 13 ali je analiza vršena na ćelijama iz slezine. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± S.D. Statističke značajnosti su utvrđene sa Student T testom i prikazane kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005.

4.4. TsEV tretman utiče na smanjenje prisustva inflamatornih ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom

Da bi se ispitali efekti TsEV u modelu respiratorne alergije, tretman sa TsEV je vršen na dva načina. U ko-aplikacionom modelu TsEV su davane u toku indukcije respiratorne alergije i pre restimulacije sa alergenom dok su u terapijskom modelu davane samo pre restimulacije sa alergenom (Slika 7B). Efekat TsEV tretmana na imunske ćelije u plućima je ispitivan kako na nivou ćelija prikupljenih u BAL tako i na nivou tkiva pluća.

U uzorcima BAL-a je uočeno smanjenje ukupnog broja ćelija kod miševa tretiranih sa TsEV u odnosu na miševe kod kojih je samo izazvana alergija (Alergija), pri čemu je to bilo statistički značajno samo u terapijskom modelu (Terapija) (Slika 9A). Pored smanjenja ukupnog broja inflamatornih ćelija, broj eozinofila i neutrofila bio je statistički značajno smanjen u oba modela.

Histohemijska analiza isečaka pluća miševa kod kojih je samo indukovana alergija pokazala je prisustvo inflamatornih ćelija u peribronhijalnim i perivaskularnim regionima, prekomernu proizvodnju mukusa i povećano prisustvo goblet ćelija (Slika 9B i C). TsEV tretmani su doprineli smanjenju zadebljanja epitela, smanjenju prisustva inflamatornih ćelija i redukciji mukusa (Slika 9B i C). Međutim, statistička analiza je pokazala da su TsEV davane u okviru terapijskog modela izazvale statistički značajnije smanjenje ovih simptoma u poređenju sa alergijskom grupom nego one date u okviru ko-aplikacionog modela.



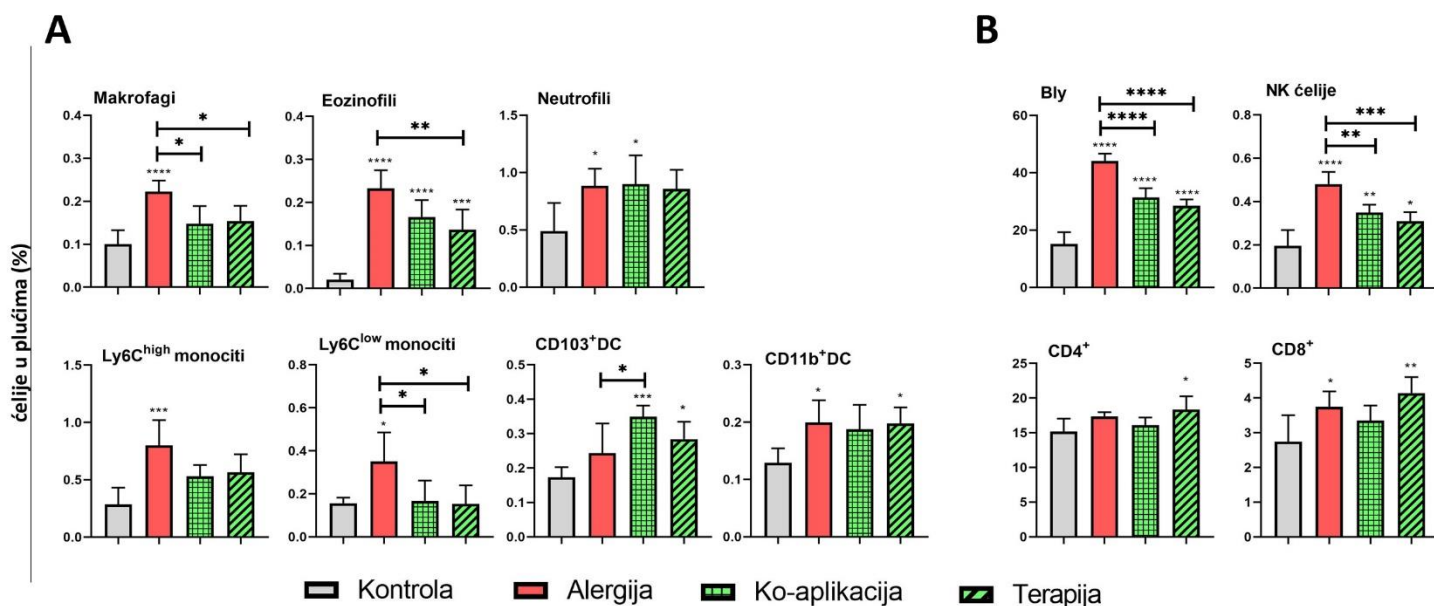
Slika 9. Uticaj TseV tretmana na ćelijske populacije u BAL-u i histologiju pluća kod miševa sa indukovanom respiratornom alergijom. (A) Reprezentativne slike BAL preparata i diferencijalna analiza ćelijskih populacija u BAL uzorcima za svaku grupu (B-C) Reprezentativni preseki plućnog tkiva bojeni H&E i PAS metodom, prikazujući prisustvo inflamatornih ćelija i produkciju mukusa. Kvantifikacija histoloških uzoraka izvršena je korišćenjem histopatološkog skora bolesti (1–4 za H&E) i skora hiperprodukcije mukusa (0–3 za PAS). Statističke značajnosti su utvrđene primenom jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 i ****P < 0.0001. Merna skala = 100 µm.

Analiza mijeloidnih ćelija pluća protočnom citometrijom je ukazala da su TsEV davane u okviru oba modela uticale na značajno smanjenje procenta makrofaga u odnosu na pluća miševa kod kojih je indukovana samo alergija (Grafici 11 i 15A). Slično kao i u analizi BAL, samo su TsEV davane u okviru terapijskog modela su dovele do statistički značajnog smanjenja procenta eozinofila dok je procenat neutrofila ostao nepromenjen u oba modela. Sa druge strane, procenat Ly6C^{low} monocita (neklasični monociti) je statistički smanjen davanjem TsEV u okviru oba modela u odnosu na miševa kod kojih je samo indukovana alergija, dok je procenat Ly6C^{high} monocita (klasičnih monocita) pokazao samo trend smanjenja u oba modela. Analiza populacije DC je pokazala da je procenat CD11b⁺ DC ostao nepromenjen u oba modela ali je procenat CD103⁺ DC ćelija statistički značajno povećan nakon davanja TsEV u okviru ko-aplikacionog modela.

Za razliku od toga, procenat B limfocita u tkivu pluća je bio smanjen davanjem TsEV u okviru oba modela u odnosu na pluća miševa kod kojih je samo indukovana alergija (Grafici 12 i 15B).

TsEV su u oba modela davanja dovele do statistički značajnog smanjenja procenta NK ćelija u plućima, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji kada su TsEV davane u okviru terapijskog modela. Međutim, ni sa jednim TsEV tretmanom nije došlo do promene procenta ukupnih CD4⁺ i CD8⁺ limfocita u poređenju sa kontrolnom grupom.

Analiza populacija mijeloidnih i limfoidnih ćelija u plućima pokazala je da TsEV značajno smanjuju procenat makrofaga, NK ćelija i B limfocita, a povećavaju prisustvo DC ćelija u plućima, bez obzira na model davanja. TsEV tretmani, međutim, nisu uticali na ukupan broj CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u plućima.



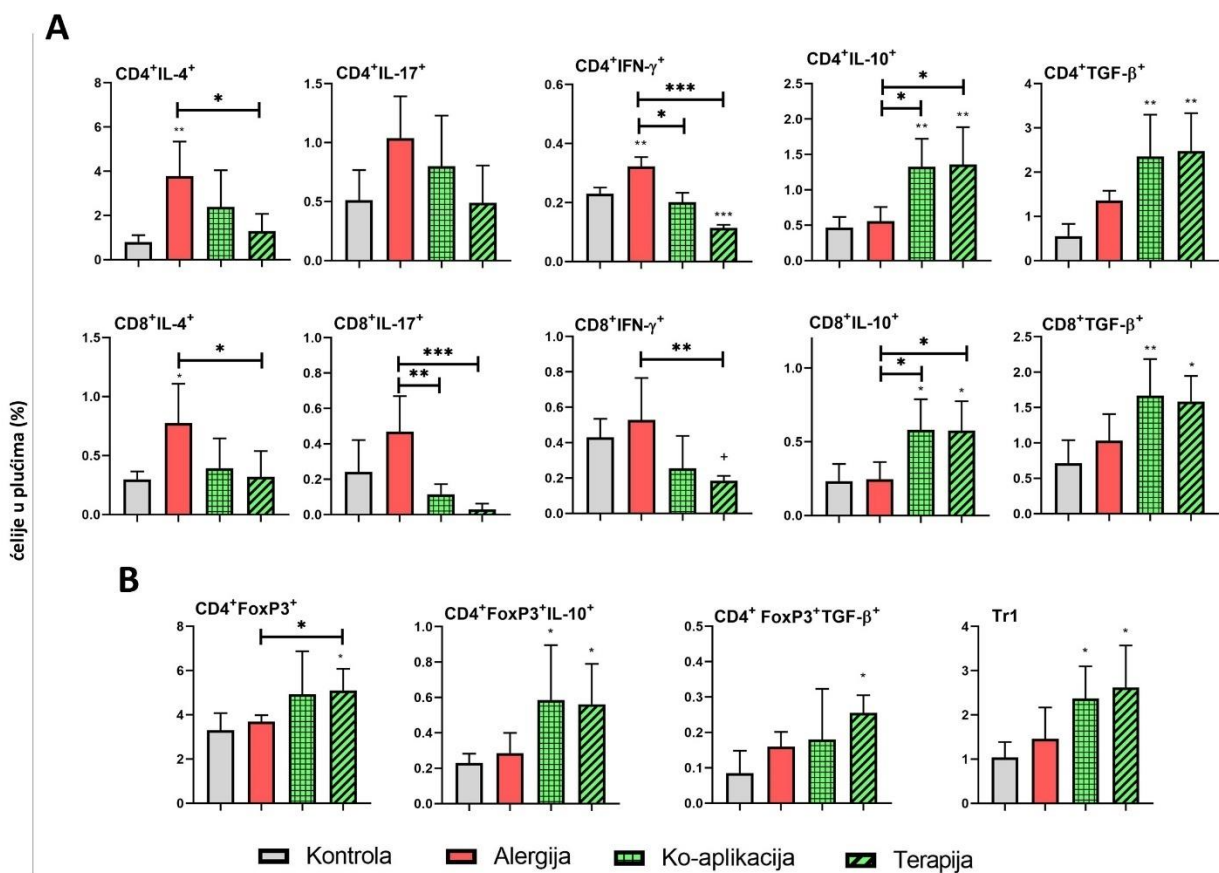
Grafik 15. Uticaj TsEV tretmana na populacije mijeloidnih i limfoidnih ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom. (A) Proceni mijeloidnih ćelija u plućima u okviru kojih su analizirani procenti makrofaga, eozinofila, neutrofila, Ly6C^{high} monocita, Ly6C^{low} monocita, CD103⁺ DC i CD11b⁺ DC. (B) Proceni limfoidnih ćelija u plućima u okviru kojih su analizirani procenti B limfocita (Bly), NK ćelija, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita. Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Grafcima 11 i 12. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti procenata ćelija ± SD rezultata iz tri različita eksperimenta. Statističke značajnosti su utvrđene primenom jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 i ****P < 0.0001.

4.4.1. TsEV tretman smanjuje ekspresiju inflamatornih citokina i povećava ekspresiju anti-inflamatornih citokina i regulatornih T ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom

U okviru analize limfoidnih ćelija pluća ispitivana je i intracelularna ekspresija citokina u CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijama, kao i zastupljenost regulatornih T ćelija.

Analiza CD4⁺ limfocita pokazala je da tretman sa TsEV smanjuje ekspresiju IL-4 i IFN- γ u ovim ćelijama, pri čemu su TsEV davane u okviru terapijskog modela uticale na statistički značajnije smanjenje ekspresije ovih citokina. TsEV su izazvale povećanu ekspresiju IL-10 citokina u poređenju sa alergijskom grupom, bez obzira na model primene (Grafici 12 i 16A).

Ovaj efekat primećen je i u analizi ekspresije citokina u CD8⁺ limfocitima. Tretman sa TsEV je doveo do smanjenja ekspresije IL-4, IL-17 i IFN- γ , dok je ekspresija IL-10 bila povećana u oba modela primene pri čemu su TsEV davane u okviru terapijskog modela imale statistički značajniji efekat (Grafici 16A).



Grafik 16. Uticaj TsEV tretmana na ekspresiju citokina u T limfocitima i na populacije Treg ćelija u plućima miševa sa indukovanom respiratornom alergijom. Miševi su tretirani prema protokolu prikazanom na Slici 7B. Ćelije pluća su sakupljene i analizirane pomoću protočne citometrije. **(A)** Procenat CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija koje ekspiriraju IL-4, IL-17, IFN- γ , IL-10 i TGF- β citokine. **(B)** Procenat regulatornih T ćelija: Treg (CD4⁺Foxp3⁺) i Tr1 (CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺) ćelija, kao i Treg ćelija koje ekspiriraju IL-10 i TGF- β . Strategija formiranja graničnika za analizu određenih molekula i kombinacija molekula prikazana je na Graficima 12 i 13. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti procenata ćelija \pm SD rezultata iz tri različita eksperimenta. Statističke značajnosti su utvrđene primenom jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 i ****P < 0.0001.

Populacije regulatornih T ćelija praćene su na osnovu ekspresije intracelularnog Foxp3 markera. Samo je kod miševa koji su primili TsEV u okviru terapijskog modela zapaženo značajno povećanje procenta CD4⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u plućima (Grafici 14 i 16B). Međutim, ekspresija citokina IL-10 i TGF- β unutar Treg ćelija nije pokazala značajno povećanje ni nakon jednog modela primene TsEV (Grafik 16B). Procenti Tr1 ćelija takođe su ostali nepromenjeni nakon tretmana sa TsEV (Grafik 16B).

Dobijeni rezultati ukazuju da TsEV utiču na modulaciju funkcionalnog profila T limfocita u plućima, smanjujući ekspresiju inflamatornih citokina u CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijama, uz istovremeno povećanje ekspresije anti-inflamatornog citokina IL-10. Ovi efekti su izraženiji u terapijskom modelu

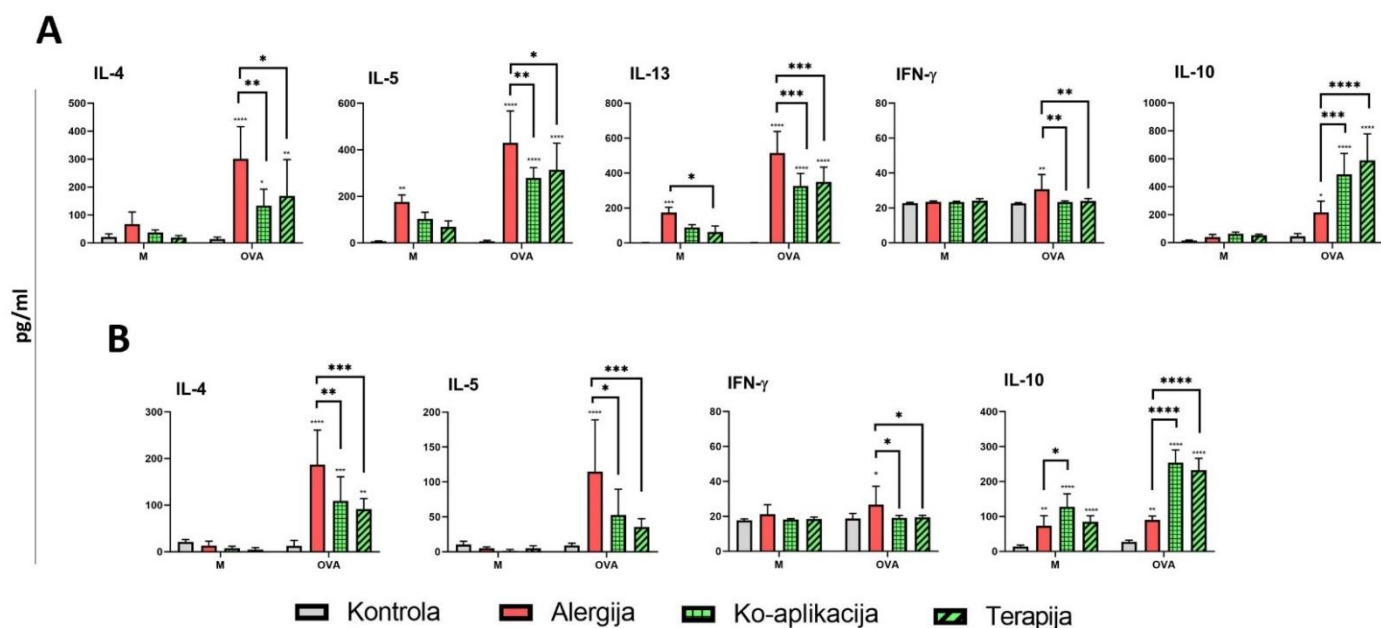
primene. Takođe, tretman TsEV u ovom modelu doveo je do povećanja zastupljenosti FoxP3⁺ regulatornih T ćelija, iako nije zabeležena povećana ekspresija IL-10 i TGF- β unutar ovih ćelija, niti promena u procentu Tr1 ćelija. Ukupno, ovi nalazi sugerišu da TsEV poseduju sposobnost imunomodulacije lokalnog T ćelijskog odgovora u plućima, prvenstveno kroz smanjenje inflamatorne aktivnosti i indukciju regulatornog fenotipa T ćelija.

4.5. TsEV menjaju citokinski profil ćelija pluća i ćelija slezine kod miševa sa indukovanom respiratornom alergijom

Uticaj TsEV na produkciju citokina (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 i IFN- γ) praćen je u supernatantima *ex vivo* kultivisanih ćelija pluća i slezine miševa kod kojih je prethodno indukovana alergija i koji su tretirani sa TsEV *in vivo*. Ove ćelije su tokom kultivacije restimulisane sa alergenom (OVA), dok je ta stimulacija izostala kod kontrolnih ćelija (M).

TsEV davane u okviru oba modela su značajno smanjile nivo IL-13 (Grafik 17A), pri čemu je efekat izraženiji nakon davanja tretmana u vidu ko-aplikacionog modela. Takođe, TsEV su dovele do smanjenja Th2 citokina IL-4 i IL-5, dok su istovremeno povećale nivo anti-inflamatornog IL-10 i smanjile produkciju inflamatornog IFN- γ , bez obzira na model davanja.

Sličan obrazac uočen je i u kulturama splenocita, gde su tretmani sa TsEV smanjili nivo Th2 citokina i IFN- γ , uz značajno povećanje IL-10 (Grafik 17B). Ovi rezultati su u skladu sa podacima intracelularne ekspresije i potvrđuju da tretmani sa TsEV efikasno redukuju Th2 odgovor dok istovremeno pojačavaju produkciju IL-10.

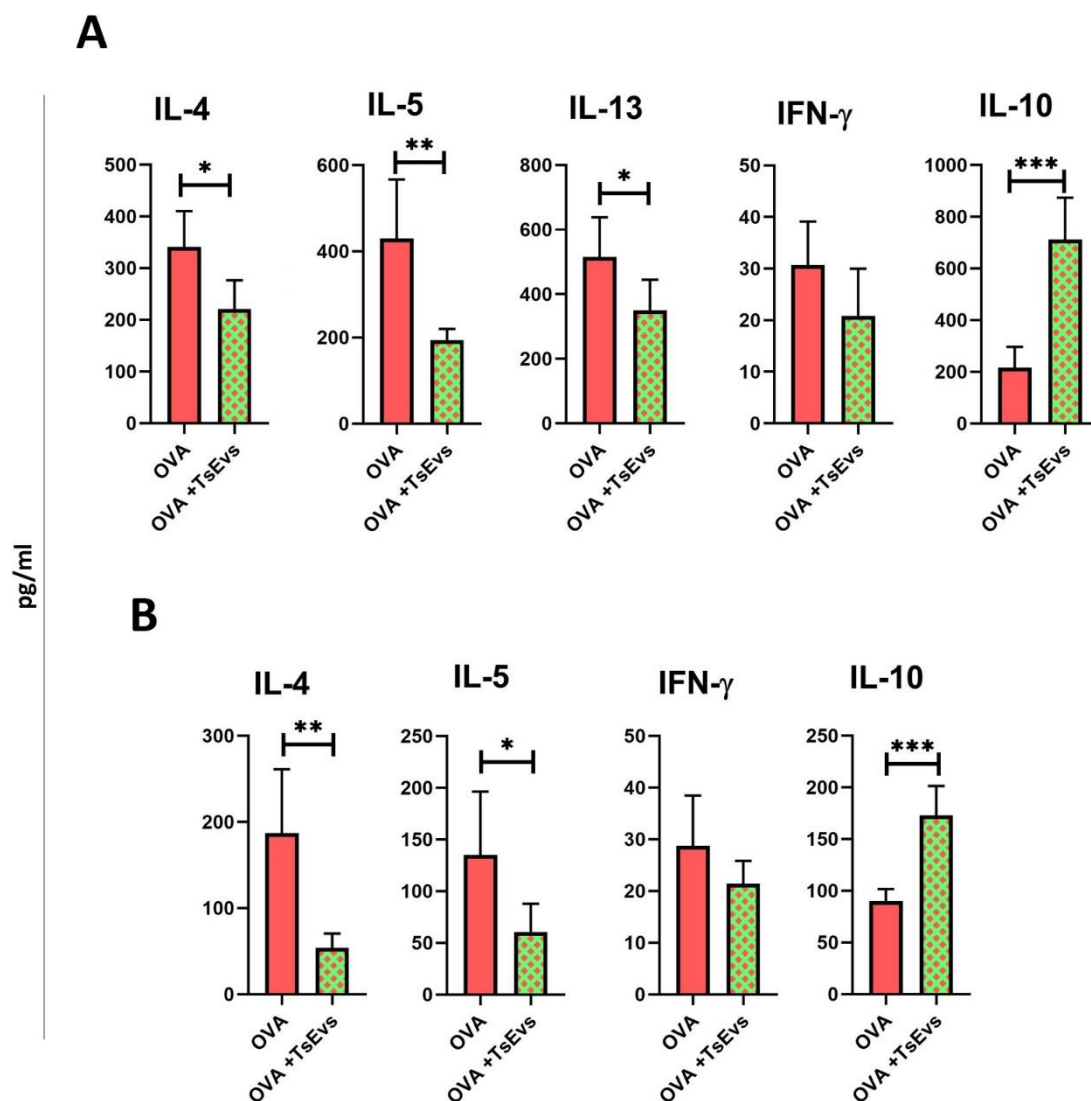


Grafik 17. Produkcija citokina u plućima i u slezinama nakon TsEV tretmana kod miševa sa indukovanom respiratornom alergijom. Miševi su tretirani prema protokolu prikazanom na Slici 7B. Čelije pluća (A) i čelije slezine (B) su izolovane i kultivisane u medijumu (M) ili u prisustvu OVA 100 µg/ml (OVA) 72h nakon čega su supernatanti sakupljeni koncentracije IL-4, IL-5, IFN-γ, IL-13 i IL-10 su izmereni korišenjem komercijalnih ELISA testova i određeni na osnovu standardne krive. Statističke značajnosti su utvrđene primenom jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 i ****P < 0.0001

Direktni imunomodulatorni efekat TsEV na već aktivisane imunske ćelije je istražen određivanjem nivoa produkcije citokina od strane *ex vivo* kultivisanih ćelija pluća i slezine miševa kod kojih je samo indukovana alergija a koje su u kulturi restimulisane sa alergenom (OVA) a zatim i tretirane sa TsEV (Grafik 18). U kulturama ćelija pluća, tretman sa TsEV je izazvao značajno smanjenu produkciju svih ispitivanih Th2 citokina, uz istovremeno povećanje produkcije IL-10, u poređenju sa grupom koja je bila samo OVA-restimulisana (Grafik 18A). S druge strane, TsEV nisu značajno uticale na produkciju IFN-γ u kultivisanim ćelijama pluća.

Slični rezultati dobijeni su i u kulturama ćelija slezine, gde je tretman sa TsEV doveo do značajnog smanjenja nivoa IL-4 i IL-5 u poređenju sa ćelijama koje su samo stimulisane sa OVA, dok je produkcija IL-10 bila značajno povećana. Kao i u ćelijama pluća, nivo IFN-γ ostao je nepromenjen (Grafik 18B).

Ovi rezultati dodatno ukazuju na to da TsEV mogu efikasno da modifikuju fenotip već senzibilisanih imunskih ćelija i da usmere inflamatorni imunski odgovor kod respiratornih alergija ka anti-inflamatornom profilu.



Grafik 18. Produkcija citokina u plućima i u slezinama miševa sa indukovanom respiratornom alergijom nakon *ex vivo* stimulacije sa TsEV. Ćelije pluća (**A**) i slezina (**B**) miševa grupe Alergije su izolovane i kultivisane u prisustvu OVA 100 $\mu\text{g/ml}$ (OVA) i nakon 1h su tretirane sa 3×10^7 TsEV/ml (OVA+TsEV). Svi supernatanti su sakupljeni nakon 72h i izmerene su koncentracije citokina IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ i IL-10 komercijalnim ELISA testovima. Statističke značajnosti su utvrđene primenom Student T testa i prikazane su kao * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ i *** $P < 0.005$.

4.6. TsEV tretman smanjuje nivo OVA-specifičnih antitela u serumu miševa sa indukovanom respiratornom alergijom

Uticaj tretmana sa TsEV ispitivan je na sistemskom nivou i analizom nivoa OVA-specifičnih antitela u serumu u tri vremenska termina: 0. dana (pre indukcije alergije), 21. dana (nakon indukcije alergije) i 26. dana (dan žrtvovanja).

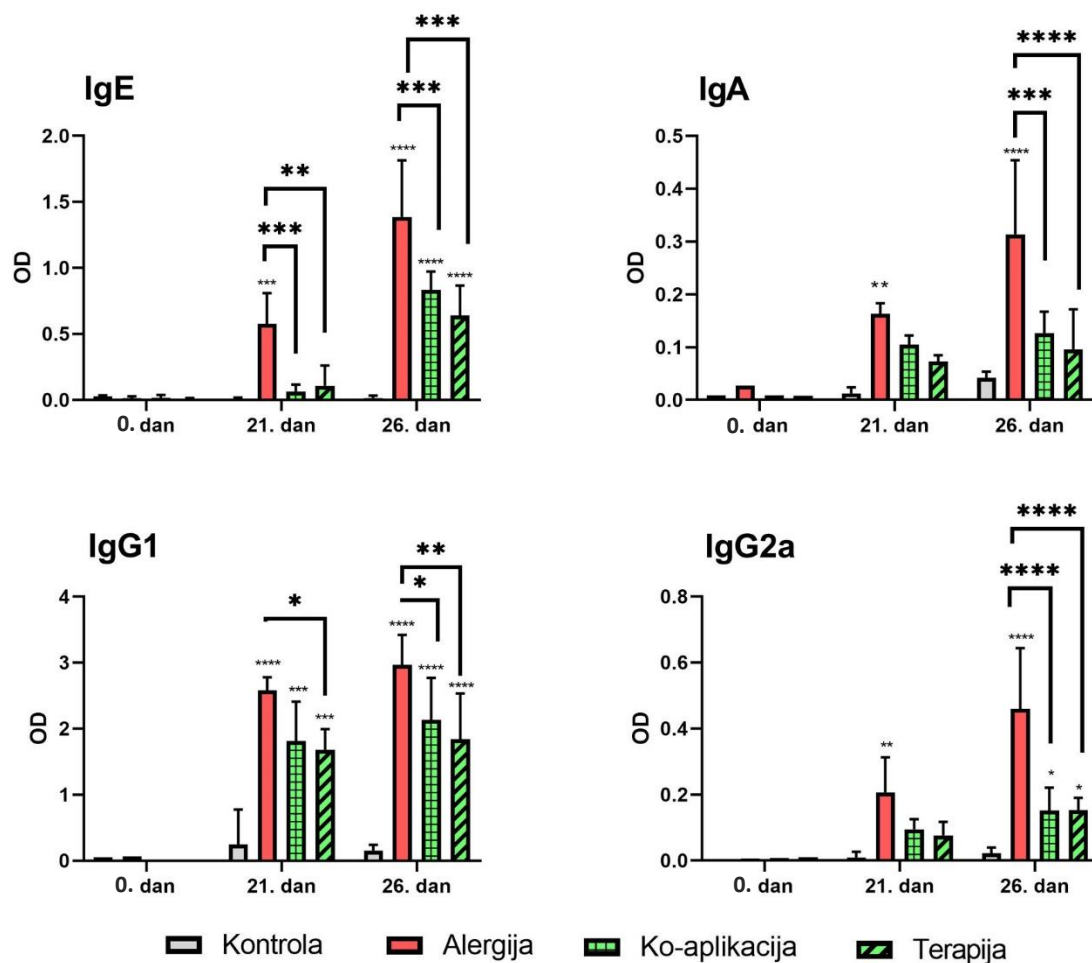
Grupa miševa sa indukovanom alergijom pokazala je značajno povećane nivoe OVA-specifičnih IgE, IgA, IgG1 i IgG2a antitela u sva tri termina, u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafik 19).

Oba modela davanja TsEV dovela su do značajnog smanjenja nivoa IgE antitela, u oba termina nakon indukcije alergije.

Nivoi IgA antitela takođe su bili sniženi u oba modela tretmana, ali su statistički značajne razlike zabeležene isključivo 26. dana, pri čemu su TsEV davane u okviru terapijskog modela pokazale izraženiji efekat.

Ovako davane TsEV su bile efikasnije i u smanjenju IgG1 antitela, sa statistički značajnim razlikama 21. i 26. dana. TsEV su u oba modela tretmana doprinele smanjenju IgG2a antitela ali je značajno smanjenje detektovano tek 26. dana.

Rezultati analize seruma ukazuju da tretman sa TsEV značajno utiče na smanjenje sistemskog humoralnog odgovora specifičnog za alergen. U oba modela primene, TsEV su dovele do redukcije OVA-specifičnih IgE, IgA, IgG1 i IgG2a antitela, pri čemu je terapijski model primene pokazao izraženiju efikasnost, naročito u kasnijim fazama eksperimenta. Ovi nalazi dodatno potvrđuju potencijal TsEV da modulišu alergijski imunski odgovor i na sistemskom nivou.



Grafik 19. Uticaj tretmana TsEV na nivo OVA-specifičnih antitela u serumu miševa sa indukovanom respiratornom alergijom. Miševima je sakupljen serum u tri termina da bi se odredilo prisustvo IgE, IgA, IgG1 i IgG2a antitela specifičnih na OVA. Statističke značajnosti su utvrđene primenom jednofaktorske analize varijanse koja je praćena Tukey testom za višestruka poređenja i prikazane su kao *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 i ****P < 0.0001.

5.DISKUSIJA

Respiratorne alergije predstavljaju značajan globalni zdravstveni problem, pri čemu postojeće terapije, poput antihistaminika i kortikosteroida, uglavnom donose samo privremeno ublažavanje simptoma. Iako alergen-specifična imunoterapija može pružiti dugotrajno olakšanje, njena primena je ograničena zbog nepoznavanja strukture mnogih alergena. Budući da se u osnovi alergijskih reakcija nalazi disbalans u funkcionisanju imunskog sistema, istraživanja usmerena ka sprečavanju prekomerne inflamacije i uspostavljanju imunske ravnoteže predstavljaju obećavajući pravac u formulisanju novih terapijskih strategija za prevenciju i lečenje ovih bolesti.

Jedan od takvih pravaca obuhvata ispitivanje mehanizama koje helminti koriste da bi izbegli imunski odgovor organizma domaćina i obezbedili sebi opstanak. Jedan od mehanizama je i indukcija regulatornog imunskog odgovora, za čije pokretanje su ključne tolerogene DC (tolDC). *T. spiralis* je parazit čiji ekskretorno-sekretorni produkti (ES L1) indukuju razvoj tolDC [166], koje poseduju potencijal da pokrenu procese koji vode ka ublažavanju simptoma autoimunskih i alergijskih bolesti, kao što su na primer EAE i respiratorne alergije [127,238–242]. Međutim, nije poznato koje komponente ES L1 su odgovorne za ovaj efekat. Ranija istraživanja su pokazala da su za imunomodulatorne efekte drugih helminata odgovorne EV koje se nalaze u njihovim produktima [243]. Istraživanja EV *Echinococcus granulosus* su pokazala da one ublažavaju simptome respiratorne alergije tako što smanjuju ekspresiju CD4⁺IL-4⁺ limfocita, dok povećavaju ekspresiju Treg ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima [207]. Polazna hipoteza ove teze je da su EV iz ES L1 produkata *T. spiralis* (TsEV) pretežno odgovorne za imunomodulatorne efekte ES L1 *T. spiralis*.

U ovom radu su analizirane karakteristike TsEV, kao što je njihova prosečna veličina, morfologija, koncentracija i glikozilacioni profil. Ispitana je i njihova sposobnost da indukuju diferencijaciju tolDC kao i kapacitet TsEV-tretiranih DC da stimulišu diferencijaciju Treg u *in vitro* uslovima. Njihova funkcionalna uloga dodatno je ispitana u *in vivo* modelu respiratorne alergije, sa ciljem procene njihovog terapijskog potencijala u lečenju respiratornih alergija.

Prvi korak u ispitivanju TsEV obuhvatio je analizu morfologije putem TEM, kojom je potvrđeno prisustvo čestica koje po veličini i obliku odgovaraju EV, što je u skladu sa ranijim nalazima o njihovim karakteristikama [213]. Analizom praćenja nanočestica (NTA), određena je koncentracija partikula po mililitru uzorka, koja je bila u rangu EV drugih helminata [244] kao i njihova prosečna veličina. S druge strane, zbog metodoloških razlika u kultivaciji larvi *T. spiralis*, nije uvek moguće direktno porediti koncentracije TsEV sa onima iz drugih studija koje su se bavile njihovim istraživanjem [245]. Takođe, treba napomenuti i da podaci o veličini dobijeni TEM i NTA analizama nisu direktno uporedivi, jer se NTA metodom određuje hidrodinamički radijus čestica u suspenziji,

dok TEM prikazuje vezikule nakon procesa pripreme koji uključuje dehidraciju, što može uticati na njihov oblik i veličinu [246–248].

Ekstracelularne vezikule, čak i kada potiču iz iste ćelije, pokazuju značajnu heterogenost, jer njihove osobine zavise od brojnih faktora koje uključuju fiziološko stanje ćelije, vrstu i intenzitet stimulacije, kao i mehanizme njihove biogeneze. Zbog te složenosti, još uvek ne postoji univerzalni marker za EV, ali se tetraspanini poput CD9, CD63 i CD81 rutinski koriste za njihovu karakterizaciju. Yang i saradnici (2020) [249] pokazali su prisustvo tetraspanina na EV iz mišićnih larvi *T. spiralis* korišćenjem poliklonskih antitela protiv humanog CD63. Nasuprot tome, u istraživanju koje je prvi put identifikovalo TsEV unutar ES L1 produkata [213] nije zabeležena reaktivnost sa anti-humanim CD63 antitelima. Odsustvo reaktivnosti može se objasniti činjenicom da helminti poseduju tetraspanine koji su evolutivno znatno udaljeni od humanih, pri čemu se ističe visoka divergentnost tetraspanina kod ovih organizama. Zbog toga se antitela koja prepoznaju humane CD63 tetraspanine ne mogu smatrati pouzdanim markerima za karakterizaciju TsEV [250]. Detekcija EV helminata može se zasnivati na proteinima specifičnim za određeni genus parazita, kao što je pokazano upotrebom monoklonskog antitela 7C2C5 koje prepoznaje imunodominantni epitop karakterističan za genus *Trichinella* [213].

Dodatna karakterizacija TsEV je izvršena analizom njihovih površinskih glikana, ugljenohidratnih modifikacija proteina, lipida i RNK molekula. Informacije o strukturi glikana parazitskih antigena su od velikog interesa s obzirom da oni učestvuju u procesima kojima paraziti modulišu imunski odgovor domaćina, usmeravajući ga ka pravcu koji pogoduje njihovom opstanku [251]. Tako je nađeno da njihovim hemijskim modifikacijama ES L1 gubi efektivnost u stimulisanju tolDC [252]. Glikane prepoznaju receptori na imunskim ćelijama koji poseduju lektinske domene, kao što su lektinski receptori C tipa (CTL), prisutni na antigen-prezentujućim ćelijama (APC). Analiza glikanskih struktura prisutnih u ES L1 sprovedena je primenom biljnih lektina. Rezultati su pokazali da među dominantnim ugljenohidratnim strukturama preovlađuju glikani sa trimanozilnim jezgrom (prepoznaje ih lektin ConA), kao i ponovljeni nizovi N-acetil glukozamina (prepoznaje ih WGA). Takođe su identifikovani kompleksni bianternarni glikani sa bisektnim N-acetil glukozaminom (PHA) i kompleksni glikani sa tri- i tetra-antenarnim lancima koje sadrže fukozu vezanu α 1-6 za GlcNAc u jezgru (AAA) [253]. Ispitivanje TsEV pokazalo je da njihove glikane prepoznaju lektini ConA, WGA, AAA ali ne i PHA, što ukazuje na to da TsEV ne sadrže tri- i tetra-antenarne strukture. Ova razlika se može objasniti ne samo različitim sastavom ES L1 i TsEV, s obzirom na to da ES L1, pored TsEV, sadrži i solubilne proteine, već i načinom na koje *T. spiralis* proizvodi ES L1 i EV, pa se samim tim se razlikuju i obrasci glikozilacije molekula koji se oslobađaju u okviru ES L1 frakcije u odnosu na one koji su namenjeni za pakovanje u EV [254,255].

Od posebnog značaja je interakcija TsEV sa receptorom DC-SIGN (CD209), lektinom tipa C, koji prepoznaje visoko-manozni tip glikana i prisutan je pretežno na DC i pojedinim makrofagama [256,257]. Aktivacija ovog receptora utiče na signalne puteve koji favorizuju anti-inflamatorni odgovor i imunsku toleranciju. Pored direktne modulacije citokinske produkcije, DC-SIGN može kooperisati sa TLR receptorima, poput TLR4, modulišući signalizaciju preko NF- κ B puta i podstičući transkripciju gena za IL-10 [258,259]. Ovde je prvi put pokazano da TsEV sadrže gliko-epitope koje prepoznaje receptor DC-SIGN, što može imati značajne implikacije na njihovu interakciju sa DC. U studiji Cvetković i saradnika (2020) pokazano je da blokiranje DC-SIGN receptora na DC pre dodavanja ES L1 menja proces njihovog sazrevanja, usled čega one ne dobijaju tolerogeni fenotip.

Dendritske ćelije su profesionalne antigen-prezentujuće ćelije koje igraju ključnu ulogu u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora. Nakon stupanja u kontakt sa antigenima različitog porekla, DC obrađuju te antigene i prezentuju ih naivnim T ćelijama, koje se usled te interakcije diferenciraju u različite efektorske ili regulatorne subpopulacije. Uticaj TsEV na aktivaciju DC i sledstvenu polarizaciju adaptivnog imunskog odgovora ispitan je u kulturi humanih DC. Prethodno je pokazano da ES L1 produkti *T. spiralis* indukuju tolerogeni fenotip DC, koji ostaje stabilan i u pro-inflamatornoj sredini, kao što je stimulacija sa LPS/IFN- γ [166]. Pod dejstvom pro-inflamatornog stimulusa LPS/IFN- γ , DC se diferenciraju u inflamatorne tip 1 (DC1) ćelije, koje karakteriše visoka ekspresija kostimulatornih molekula (HLA-DR, CD86, CD83, CD40, CCR7) i produkcija citokina IL-12 i IL-23, koji su ključni za indukciju Th1 i Th17 imunskog odgovora [233]. Nasuprot tome, TsEV-tretirane humane DC pokazale su fenotipske karakteristike delimično zrelih, tolerogenih DC: smanjenu ekspresiju HLA-DR, CD83 i CCR7 i nisku produkciju IL-12, a visoku produkciju anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- β . Važno je istaći da je ovaj fenotip ostao stabilan i nakon dodatne stimulacije pro-inflamatornim stimulusom LPS/IFN- γ , što je veoma značajno zbog potencijalnog korišćenja tolDC u tretmanu inflamatornih bolesti.

Tolerogene DC se karakterišu i povišenom ekspresijom molekula važnih za indukciju tolerancije, poputIDO-1 i ILT3 [260]. EkspresijaIDO-1 je bila povećana u ćelijama tretiranim TsEV ili ES L1, a dodatno je porasla nakon LPS/IFN- γ stimulacije, što je u skladu s poznatim dejstvom IFN- γ i LPS-a na indukcijuIDO-1 [261] [262]. Ovaj efekat je potvrđen i analizom ekspresijeIDO-1 gena, merena na nivou iRNK izolovanih iz DC tretiranih sa TsEV.IDO-1 je enzim koji katalizuje metabolizam triptofana što utiče na diferencijaciju Treg [263,264] i inhibira proliferaciju efektorskih T ćelija [265]. Pokazano je i daIDO-1 indukuje ekspresiju ILT3 i ILT4 na DC čime se dodatno stimuliše tolerogeni status DC [266]. Ipak, efekat TsEV na ekspresijuIDO-1 bio je umeren, što implicira da i drugi mehanizmi, uključujući ekspresiju ILT-3 i produkciju IL-10, doprinose indukciji tolerogenih

svojstava DC. ILT3 je inhibitorni receptor koji ograničava prezentaciju antigena i narušava TCR signalizaciju čime doprinosi anergiji T ćelija [260]. Visok nivo IL-10, koji je detektovan u TsEV-tretiranim DC i T ćelijama iz ko-kultura, potencijalno stimuliše ekspresiju ILT3 i ILT4, čime se dodatno pojačava imunosupresivni potencijal DC [267].

Analizom ekspresije površinskih markera utvrđeno je da TsEV utiču na povećanu ekspresiju receptora za hemokine CCR7 na DC. Ovaj receptor ima ključnu ulogu u regulaciji migracije DC iz perifernih tkiva ka limfnim čvorovima gde DC prezentuju antigene naivnim T limfocitima i pokreće se njihova ekspanzija i diferencijacija [268]. Nivo ekspresije CCR7 na TsEV-tretiranim DC je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da je CCR7 neophodan za migraciju tolerogenih DC u drenirajuće limfne čvorove i za indukciju periferne tolerancije [269,270].

Daljom analizom intracelularne ekspresije i produkcije citokina potvrđeno je da TsEV stimulišu visoku produkciju anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- β , uz minimalnu ekspresiju IL-12 i IL-23, čak i nakon pro-inflamatorne stimulacije. Citokini IL-10 i TGF- β predstavljaju ključne pokazatelje i medijatore tolDC, zajednički deluju na ograničavanje prekomerne aktivacije T ćelija i utiču na indukciju regulatornih T ćelija i uspostavljanje tolerancije [271,272]. IL-10 i TGF- β mogu inhibirati ekspresiju gena za IL-12p40, koji kodira subjedinicu p40 neophodnu za produkciju IL-12 i IL-23 citokina, što dodatno objašnjava snižene nivoe ovih inflamatornih citokina u supernatantima DC tretiranih sa TsEV [273]. Povećana produkcija IL-10, uz istovremeno smanjenu produkciju IL-12 stvara mikrookruženje koje pogoduje indukciji regulatornih T ćelija [66,274,275].

Ekstracelularne vezikule poreklom od parazita mogu na različite načine da utiču na modulaciju imunskog sistema domaćina. Pokazano je da, slično dejstvu TsEV, EV *Schistosoma mansoni* utiču na povećanu ekspresiju anti-inflamatornih citokina [276], dok EV iz *Fasciola hepatica* indukuju snažan pro-inflamatorni odgovor DC koji uključuje povećanu ekspresiju TNF- α i kostimulatornih molekula [218], što ukazuje na široki spektar imunomodulatornih mehanizama koje različiti helminti koriste u cilju izbegavanja imunskog odgovora organizma domaćina.

Imajući u vidu da ES L1 produkti aktiviraju receptore na DC, čime utiču na transdukciju signala u DC [165,166,277], analizirana je i ekspresija gena čija aktivacija može biti posledica signalizacije nakon tretmana sa TsEV. Praćena je ekspresija gena koji su prethodno identifikovani kao ključni u formiranju tolerogenog fenotipa DC, uključujući mTOR, SOCS1, SOCS3, AhR, IDO-1, NF- κ B2 i RelB. U DC tretiranim TsEV zabeležena je izražena ekspresija svih analiziranih gena, što ukazuje na snažan uticaj ovih EV na regulaciju ključnih transkripcionih puteva povezanih sa tolerogenim fenotipom.

mTOR i SOCS geni povezani su sa regulacijom produkcije citokina u monocitima i DC [278]. Pojačana ekspresija mTOR pod uticajem TsEV korelira sa većom produkcijom anti-inflamatornog citokina IL-10 i smanjenjem produkcije pro-inflamatornog IL-12p70, što potvrđuje ulogu mTOR signalizacije u usmeravanju DC ka tolerogenom fenotipu. Pokazano je da je mTORC-1 signalizacija u intestinalnim DC neophodna za produkciju IL-10 i održavanje tolerancije u crevima [279], kao i da indukcija tolDC pod uticajem vitamina D3 zavisi od mTOR signalizacije [280].

SOCS proteini predstavljaju negativne regulatore u okviru mehanizama kontrole imunskog odgovora i inflamacije [281]. DC kod kojih je aktivirana signalna transdukcija zavisna od SOCS3 odlikuju se smanjenom ekspresijom MHC II i CD86, smanjenom produkcijom IL-12 i povećanom produkcijom IL-10, što vodi ka indukciji Th2 odgovora [282]. U ovoj studiji DC tretirane sa TsEV su pokazale povišenu ekspresiju gena SOCS1 i SOCS3, što je efekat sličan onom koji izazivaju EV parazita *F. hepatica* [218].

AhR je transkripcioni faktor koji se eksprimira u različitim ćelijama imunskog sistema, uključujući DC [283]. On je deo signalne kaskade u pozitivnoj povratnoj sprezi koja održava ekspresijuIDO-1, jednog od ključnih medijatora u regulatornom odgovoru [284]. Signalni put koji uključuje AhR pokreće i IL-10 čija je produkcija takođe stimulisana tretmanom TsEV, što doprinosi stabilizaciji i održavanju tolerogenih karakteristika DC [285,286]. To je potvrđeno i u rezultatima ovog rada gde je ekspresija Ahr je bila značajno povećana kod DC tretiranih sa TsEV koje su i produkovale visoke nivoe IL-10.

Studije su pokazale da je nekanonski NF- κ B signalni put (koji uključuje NF- κ B2/p52 i RelB transkripcione faktore) značajan za imunsku toleranciju, naročito za indukciju Foxp3⁺ T regulatornih ćelija [287–289]. Smatra se da povišena ekspresija RelB i NF- κ B2 može predstavljati tolerogeni marker DC u infekcijama helmintima [278]. Ovi nalazi su u skladu sa našim istraživanjima, koja su pokazala značajno povećanu ekspresiju gena povezanih sa alternativnim NF- κ B putem nakon tretmana DC sa TsEV. Slični efekti zabeleženi su i kod drugih helminata. Tako antigeni *Schistosoma mansoni* aktiviraju alternativni NF- κ B put u mišjim ćelijama [290], dok antigeni *Brugia malayi* pojačavaju ekspresiju RelB i NF- κ B2 u humanim DC [291]. Takođe, povećana ekspresija RelB primećena je u DC izolovanim iz miševa koji su inficirani sa *Nippostrongylus brasiliensis*, što ukazuje da različiti paraziti mogu koristiti slične mehanizme imunomodulacije [292].

Kako bismo ispitali da li DC tretirane sa TsEV imaju alo-stimulatorni kapacitet, ove ćelije su ko-kultivisane sa T limfocitima alogenog porekla. Rezultati su pokazali da TsEV-tretirane DC imaju ograničenu sposobnost stimulacije T ćelija, što se ogleda u slaboj proliferaciji T limfocita. Ovaj efekat verovatno je posledica niske ekspresije HLA-DR i kostimulatornih molekula, kao što je CD86, na

površini DC, koji imaju ključnu ulogu u aktivaciji i indukciji proliferacije T limfocita. Dendritske ćelije tretirane sa TsEV takođe imaju i smanjenu sposobnost da indukuju Th1 i Th17 imunski odgovor, što se ogleda u niskom nivou produkcije IFN- γ i IL-17, kao i u niskom procentu ćelija koje ih proizvode. Ovaj efekat se može objasniti smanjenom produkcijom IL-12 i IL-23 od strane DC [46,233]. Čak i pod uticajem pro-inflamatornih stimulusa, kao što je LPS/IFN- γ , TsEV-tretirane DC zadržavaju smanjen kapacitet da indukuju Th1 i Th17 odgovore. TsEV podstiču diferencijaciju DC sa tolerogenim svojstvima, koje ne promovišu produkciju inflamatornih citokina ključnih za razvoj autoimunskih bolesti već usmeravaju T ćelije ka izmenjenom Th2 i regulatornom fenotipu, slično efektima ES L1 [293]. DC tretirane sa TsEV podstiču T ćelije na povećanu produkciju IL-4, IL-10 i TGF- β . Uočeni efekat može biti posledica povećane produkcije IL-10 i TGF- β kod TsEV-tretiranih DC, čime doprinose usmeravanju T ćelijskog odgovora ka Th2 i anti-inflamatornom fenotipu [232,294].

Najjasnija potvrda tolerogenih svojstava TsEV-tretiranih DC jeste njihova sposobnost da indukuju ekspanziju regulatornih T ćelija, kako klasičnih CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija, tako i Tr1 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻IL-10⁺) ćelija, koje proizvode anti-inflamatorne citokine. Indukcija Foxp3⁺ Treg ćelija odgovara ranije opisanim efektima ES L1 produkata [166], a poznato je da ove ćelije igraju ključnu ulogu u održavanju tolerancije, između ostalog i putem produkcije IL-10 i TGF- β [65]. Prethodne studije su potvrdile da je interakcija između tolDC i Treg ćelija od suštinskog značaja za očuvanje imunske ravnoteže [66,69,295]. Prethodno je već opisano da TsEV-tretirane DC imaju povišenu ekspresiju tolerogenih markera IDO i ILT-3, promovišu Treg diferencijaciju [296–299].

U ko-kulturi sa alogenim T limfocitima, TsEV-tretirane DC (kao i one tretirane sa ES L1) indukuju formiranje i Tr1 ćelija. Generalno, ove ćelije se diferenciraju na periferiji u prisustvu tolerogenih signala, karakterišu se visokom produkcijom IL-10 i TGF- β i deluju suprimirajuće na efektorske imunske ćelije. Za razliku od klasičnih Treg, Tr1 ćelije ne ekspimiraju Foxp3, već deluju nezavisno od njega [237]. Njihov zaštitni efekat je potvrđen transferom ćelija u modelima autoimunskih bolesti, gde su Tr1 sprečile razvoj EAE kod miševa [300]. Takođe, pokazano je da su ključne za obnovu imunske tolerancije u alergijskim bolestima, jer alergen-specifične terapije promovišu prelazak Th1 i Th2 ćelija u Tr1 fenotip [301].

TsEV promovišu razvoj tolerogenog fenotipa DC, čime stimulišu regulatorni odgovor i potencijalno imaju sposobnost da suprimiraju prekomerne reakcije imunskog sistema, kao što je alergija. Zbog toga je terapijski potencijal TsEV ispitan *in vivo* na BALB/c miševima u modelu respiratorne alergije.

Poznato je da infekcija sa *T. spiralis* ili intraperitonealna primena ES L1 produkata indukuje povećanje produkcije IL-10 i ekspanziju Treg ćelija na lokalnom i sistemskom nivou, ključnih za očuvanje imunske homeostaze u domaćinu [238,240,302,303]. U ovoj studiji, intranazalna primena TsEV kod zdravih miševa nije promenila zastupljenost mijeloidnih ćelija u plućima, ali je dovela do umerene ekspresije Th2 citokina, bez značajnog uticaja na ekspresiju Th1 i Th17 citokina. Ovakav odgovor je u skladu sa imunskim profilom zabeleženim tokom infekcije sa *T. spiralis* u sličnim eksperimentalnim modelima [127,149]. Takođe, tretman sa TsEV je doveo do povećanog prisustva CD4⁺IL-10⁺ i CD8⁺IL-10⁺ ćelija, kao i do značajnog porasta proporcije regulatornih T ćelija u plućima i slezini, uključujući i klasične CD4⁺Foxp3⁺ Treg ćelije i Tr1 ćelije. Ovi nalazi ukazuju da TsEV mogu uticati na imunski odgovor kod zdravih miševa bez izazivanja inflamacije.

S obzirom na to da TsEV ne indukuju inflamaciju u zdravim miševima, testirane su kao potencijalna terapija za ovalbuminom-indukovanu respiratornu alergiju, i to kroz dva eksperimentalna modela: ko-aplikacioni i terapijski. U ko-aplikacionom modelu, TsEV su intranazalno davane paralelno sa indukcijom alergije i pre izlaganja alergenu (OVA). Ovaj model je testiran da bi se iskoristila plastičnost naivnih T i B ćelija čime se smanjuje širenje inflamacije u toku senzitivizacije sa alergenom [304]. U terapijskom modelu, TsEV su davane nakon indukcije alergije, nekoliko dana i neposredno pre izlaganja OVA. Terapijski modeli pokazali su nižu efikasnost u imunomodulaciji u odnosu na ko-aplikacioni pristup, ali su ipak rezultirali značajnim smanjenjem simptoma alergije [305]. S obzirom na to da je terapijski model lakše primeniti u kliničkoj praksi, predstavlja relevantnu opciju za dalje istraživanje i potencijalnu primenu. Oba modela su se pokazala uspešnim u podsticanju nastanka regulatornih T ćelija [306,307].

Kod miševa sa indukovanom alergijom, uočeno je pojačano prisustvo eozinofila i neutrofila u plućima, povišeni nivoi OVA-specifičnih IgE i IgG1 antitela u serumu, kao i intenzivna produkcija Th2 citokina u plućima i slezini. I ko-aplikacioni i terapijski model TsEV doveli su do značajnog ublažavanja alergijom izazvane inflamacije u plućima, što je potvrđeno manjom infiltracijom eozinofila i neutrofila, sniženim histopatološkim skorom, smanjenom produkcijom mukusa i nižim nivoima Th2 citokina. Uz to, zabeležen je i uticaj na sistemski imunski odgovor, izražen kroz smanjenje OVA-specifičnih IgE i IgG1 u serumu, kao i redukovanu produkciju IL-4 i IL-5 u kulturama ćelija slezine.

Pošto je *in vitro* potvrđeno da TsEV imaju značajan efekat na sazrevanje humanih DC, ispitan je i uticaj TsEV na DC populacije u plućima. Tokom inflamacije, Ly6C^{high} monociti se diferenciraju u inflamatorne DC i migriraju u pluća, gde luče hemokine koji privlače eozinofile i efektorske T ćelije u disajne puteve [308]. U fiziološkim uslovima, plućne DC čine tri glavne subpopulacije: plazmacitoidne

DC, kao i dve populacije koje potiču od prekursora konvencionalnih DC (cDC): CD11b⁺ DC, koje uglavnom podstiču Th2 imunski odgovor; i CD103⁺ DC, koje favorizuju razvoj Th1 i Th17 odgovora [309].

Prethodne studije su pokazale i da prisustvo CD11b⁺ i CD103⁺ DC, Ly6C^{high} i Ly6C^{low} monocita, kao i različitih podtipova plućnih makrofaga, značajno utiče na tok respiratornih alergija [310]. Iako se u plućima CD11b⁺ DC smatraju primarno zaslužne za indukciju Th2 odgovora dok CD103⁺ DC smatraju zaslužne za indukciju Th1 i Th17 odgovora, istraživanja su pokazala da su obe subpopulacije, CD11b⁺ i CD103⁺ DC, povezane sa nastankom alergijom izazvane inflamacije disajnih puteva i da CD103⁺ DC, u određenim okolnostima, takođe mogu indukovati Th2 odgovor [52]. Međutim, CD103⁺ DC ćelije su takođe pokazale sposobnost da indukuju i diferencijaciju CD4⁺Foxp3⁺ regulatornih T ćelija, čime doprinose ublažavanju inflamacije u modelima respiratorne alergije izazvane sa OVA [53]. Dodatno, studije na miševima bez funkcionalnih CD103⁺ DC ukazale su na važnu ulogu ovih ćelija u ublažavanju inflamacije tokom kasnijih faza alergijske reakcije [53,311].

U okviru ove studije, u alergijskoj grupi zabeležen je porast CD11b⁺ DC, koji nije bio značajno promenjen nijednim tretmanom TsEV. Nasuprot tome, uočen je porast CD103⁺ DC kod miševa tretiranih sa TsEV, pri čemu je statistički značajno povećanje registrovano samo u modelu ko-aplikacije. Imajući u vidu da CD103⁺ DC mogu podsticati razvoj Treg ćelija, naročito u prisustvu tolerogenih signala poput retinoične kiseline [53], može se pretpostaviti da su upravo ove ćelije, pod uticajem TsEV, imale ključnu ulogu u indukciji Treg odgovora i posrednom smanjenju inflamacije. Istraživanja Shi i saradnika (2024) pokazala su takođe povećanje broja CD103⁺ DC u plućima ali samo kod miševa inficiranih sa *T. spiralis* pre indukcije respiratorne alergije.

Analiza nivoa citokina u supernatantima ćelija pluća pokazala je da tretman sa TsEV dovodi do smanjenja produkcije IL-4, IL-5 i IL-13, ključnih citokina uključenih u razvoj i održavanje inflamacije izazvane alergijom [312]. IL-4, kao centralni regulator B ćelijskih funkcija tokom alergijskih reakcija, povećava ekspresiju sopstvenog receptora, čime dodatno pojačava osetljivost B ćelija na IL-4 signalizaciju [313]. Ovaj mehanizam pozitivne povratne sprege omogućava kontinuiranu produkciju IgE antitela specifičnih za alergen, dok istovremeno podržava preživljavanje i proliferaciju B ćelija tokom inflamacije izazvane alergijom [314]. U terapijskom modelu ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, zabeležena je značajno smanjena produkcija IL-4, kao i niži procenat CD4⁺IL-4⁺ i CD8⁺IL-4⁺ T ćelija u plućima. Ova redukcija može oslabiti pomenutu povratnu spregu, što je u skladu sa uočenim smanjenjem broja B ćelija u plućima i sniženim nivoima OVA-specifičnih IgE, IgG1 i IgA antitela u serumu.

Smanjena inflamatorna aktivnost nakon TsEV tretmana odrazila se i na smanjenje produkcije IL-5 u ćelijama pluća i slezine. IL-5 je jedan od ključnih citokina u razvoju alergijskih bolesti, jer stimuliše sazrevanje, preživljavanje i aktivaciju eozinofila [315,316]. Aktivirani eozinofili oslobađaju brojne inflamatorne medijatore, uključujući IL-4, IL-5 i IL-13, kao i lipide i citotoksične granule, koji doprinose simptomima poput bronhokonstrikcije i prekomerne produkcije mukusa [317,318]. Niži nivoi IL-5 u plućnim ćelijama tretiranih miševa bili su u saglasnosti sa smanjenim brojem eozinofila u bronhoalveolarnom lavazu i plućima, pri čemu je terapijski model pokazao izraženiju efikasnost.

Pored eozinofila, u regulaciji produkcije citokina u okviru alergijskih reakcija učestvuju i Th2 ćelije, mast ćelije, urođene limfoidne ćelije tipa 2 (ILC2), kao i NK ćelije. Aktivaciju NK ćelija podstiče IL-4, a ujedno i same NK ćelije doprinose produkciji IL-4, IL-5 i IL-13 [319,320]. U ovoj studiji, grupa alergičnih miševa je imala značajno veći procenat NK ćelija u plućima, dok je u oba modela tretmana sa TsEV uspešno smanjena njihova zastupljenost, s tim što je u terapijskom modelu bila statistički veću efikasnost ovog smanjenja.

Posebno je značajno smanjenje nivoa IL-13 u plućima u oba modela primene TsEV. IL-13 je značajan u patogenezi alergija, jer učestvuje u regrutovanju i aktivaciji eozinofila, produkciji mukusa, fibrozi i remodelovanju disajnih puteva [321,322]. Za razliku od parazitskih infekcija koje izazivaju porast IL-13, čak i slučajevima kada se koriste u terapeutske svrhe na eksperimentalnim modelima alergijskih bolesti [149], tretman TsEV nije izazvao sličan efekat. To ukazuje da EV parazita mogu modulirati imunski odgovor bez izazivanja izražene inflamacije, koja se javlja prilikom primene živih parazita, što je potvrđeno i u studijama sa EV *Heligmosomoides polygyrus* [210,323].

Detektovana supresija Th2 imunskog odgovora nije bila posledica povećane produkcije Th1 citokina, budući da je ekspresija IFN- γ bila značajno snižena u CD4⁺ i CD8⁺ T ćelijama pluća u oba eksperimentalna modela. Dalja analiza CD8⁺ T ćelija pokazala je da su miševi iz terapijskog modela imali znatno manji procenat CD8⁺IL-17⁺ ćelija u poređenju sa alergijskom grupom. Ova subpopulacija ćelija povezuje se sa patološkim procesima u različitim autoimunskim i alergijskim bolestima [324,325], što dodatno naglašava potencijal TsEV u modulaciji inflamacije.

Kao što je prethodno istaknuto, tokom infekcije helmintima dolazi do aktivacije APC kao što su alternativno aktivirani makrofagi i tolDC što doprinosi povećanoj produkciji anti-inflamatornih citokina IL-10 i TGF- β [118,326]. Ovi citokini pospešuju razvoj Treg koje dodatno produkuju IL-10 i TGF- β , uspostavljajući snažno anti-inflamatorno mikrokruženje [327]. IL-10 inhibira dejstvo Th2 imunskog odgovora smanjujući IL-4-zavisnu produkciju IgE od strane B ćelija, kao i preživljavanje i aktivaciju eozinofila i mast ćelija [328,329], dok TGF- β suzbija proliferaciju efektorskih T ćelija [330]. Diferencijacija tolDC i širenje Treg populacije dodatno su podstaknuti ovim faktorima.

Imunomodulatorni i anti-inflamatorni potencijal TsEV ispitan je i *ex vivo*, na ćelijama pluća i slezine izolovanim iz miševa kod kojih je bila indukovana respiratorna alergija. Rezultati su pokazali da ove ćelije, restimulisane sa OVA u kulturi, a potom tretirane sa TsEV pokazuju smanjenu produkciju citokina IL-4, IL-5 i IL-13, i značajno višu produkciju IL-10 u odnosu na ćelije koje su bile izložene samo OVA. Dobijeni rezultati ukazuju na sposobnost TsEV da modulišu fenotip već senzibilizovanih imunskih ćelija, što je od velike važnosti za njihovu potencijalnu terapijsku primenu.

TsEV, kao aktivni činilac ES L1 produkata *T. spiralis*, pokazuju obećavajući terapijski potencijal u modulaciji imunskog odgovora kod respiratornih alergija, što ih čini relevantnim kandidatom za razvoj novih pristupa lečenju. Utvrđeno je da ove ekstracelularne vezikule sadrže specifične gliko-epitope koji bi nakon kontakta sa DC mogli da aktiviraju signalnu transdukciju i time podstaknu diferencijaciju toIDC. Takve toIDC ostaju stabilne u pro-inflamatornim uslovima i sposobne su da promovišu razvoj regulatornih T ćelija i produkciju anti-inflamatornih citokina. Indukcija Treg ćelija i pojačano otpuštanje anti-inflamatornih medijatora predstavljaju ključne mehanizme putem kojih TsEV efikasno suzbijaju inflamaciju izazvanu alergijom bez stimulisanja neželjenih imunskih reakcija, kao što su pokretanje Th1 i Th17 imunskog odgovora, što je bio čest izazov pri primeni parazitskih infekcija u lečenju inflamatornih bolesti. Podaci dobijeni u *in vivo* i *ex vivo* eksperimentima potvrđuju da TsEV poseduju kapacitet da modulišu imunski odgovor u već prisutnoj inflamaciji, što ukazuje na njihov potencijal za kliničku primenu. Ovakav selektivan i balansiran imunomodulatorni efekat čini TsEV perspektivnim kandidatom za razvoj novih terapija u lečenju respiratornih alergija.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. TsEV izolovane iz ES L1 produkata *Trichinella spiralis* su okruglog, konkavnog oblika i visoke propustljivosti za elektrone što je potvrđeno transmisijom elektronskom mikroskopijom. Analiza praćenja nanočestica je pokazala prosečnu veličinu partikula od 156 ± 74 nm.
2. Specifična reaktivnost TsEV sa različitim lektinima ukazuje da su TsEV visoko glikozilovane i potvrđuje prisustvo glikana sa trimanozilnim jezgrom, ponovljenim nizovima N-acetilglukozamina, glikana sa N-acetilgalaktozaminom, kao i kompleksnih glikana koji sadrže fukozu. Od posebnog značaja je specifična interakcija TsEV sa DC-SIGN receptorom, koji je prisutan pretežno na DC i pojedinim makrofagima i čija aktivacija utiče na signalne puteve koji favorizuju anti-inflamatorni odgovor i imunsku toleranciju.
3. TsEV poseduju kapacitet da indukuju tolerogeni fenotip DC, koji ostaje stabilan u inflamatornim uslovima. DC, nepotpuno sazrele pod uticajem TsEV, pokazuju povećanu produkciju anti-inflamatornih i regulatornih citokina IL-10 i TGF- β , kao i povećanu ekspresiju tolerogenih markera ILT3 i IDO-1 u odnosu na nestimulisane DC. Tretman DC sa TsEV dovodi do značajnog povećanja ekspresije gena uključenih u signalne puteve koji regulišu diferencijaciju tolerogenih DC, uključujući mTOR, AhR, NF- κ B2, RelB, SOCS1 i SOCS3.
4. DC tretirane sa TsEV imaju ograničen alo-stimulatorni kapacitet u kokulturi sa alogenim T ćelijama i smanjenu sposobnost da indukuju Th1 i Th17 imunski odgovor, čak i u prisustvu pro-inflamatornih stimulusa, dok u isto vreme usmeravaju T ćelije ka Th2 i regulatornom fenotipu. Tolerogena svojstva DC koje su tretirane sa TsEV najjasnije potvrđuje njihova sposobnost da indukuju ekspanziju regulatornih T ćelija, kako klasičnih CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg ćelija, tako i Tr1 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺) ćelija.
5. Intranazalni tretman TsEV kod zdravih miševa dovodi do ekspanzije regulatornih CD4⁺Foxp3⁺ T ćelija i CD4⁺Foxp3⁻IL-10⁺ Tr1 ćelija, uz pojačanu ekspresiju anti-inflamatornih i regulatornih citokina IL-10 i TGF- β , u plućima i slezini.
6. U modelu respiratorne alergije, intranazalni TsEV tretman smanjuje prisustvo inflamatornih ćelija i citokina u plućima, pri čemu je terapijski model efikasniji u redukciji inflamacije i stimulaciji regulatornih T ćelija od ko-aplikacionog modela. TsEV aplikovane pre restimulacije sa alergenom (terapijski model), dovode do: a) smanjenja broja inflamatornih ćelija u plućima i

bronhoalvelarnom lavažu; b) smanjene ekspresije IL-4, IFN- γ i IL-17, i povećane ekspresije IL-10 u CD4⁺ i CD8⁺ T limfocitima poreklom iz pluća; c) povećane zastupljenosti CD4⁺Foxp3⁺ Treg ćelija u plućima; d) smanjene produkcije Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-13) od strane ćelija pluća u kulturi .

7. Intranazalni tretman sa TsEV dovodi do promena imunskog odgovora na sistemskom nivou, koje su izražene kroz smanjenje IgE, IgA, IgG1 i IgG2a antitela specifičnih na OVA u serumu, i redukovanu produkciju IL-4 i IL-5 u kulturama ćelija slezine, u odnosu na životinje sa respiratornom alergijom.

7.LITERATURA

1. Valero, A.; Quirce, S.; Dávila, I.; Delgado, J.; Domínguez-Ortega, J. Allergic Respiratory Disease: Different Allergens, Different Symptoms. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2017**, *72*, 1306–1316, doi:10.1111/all.13141.
2. Abbas, A.K.L.A.H., P.S. *Cellular and Molecular Immunology*; Tenth.; Elsevier, 2022;
3. Jamieson, D.B.; Matsui, E.C.; Belli, A.; McCormack, M.C.; Peng, E.; Pierre-Louis, S.; Curtin-Brosnan, J.; Breysse, P.N.; Diette, G.B.; Hansel, N.N. Effects of Allergic Phenotype on Respiratory Symptoms and Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, *188*, 187–192, doi:10.1164/rccm.201211-2103OC.
4. Bousquet, P.J.; Demoly, P.; Devillier, P.; Mesbah, K.; Bousquet, J. Impact of Allergic Rhinitis Symptoms on Quality of Life in Primary Care. *Int Arch Allergy Immunol* **2013**, *160*, 393–400, doi:10.1159/000342991.
5. Tanno, L.K.; Calderon, M.A.; Smith, H.E.; Sanchez-Borges, M.; Sheikh, A.; Demoly, P.; Jakob, R.; Best, L.; Chalmers, R.J.G.; Linzer, J.; et al. Dissemination of Definitions and Concepts of Allergic and Hypersensitivity Conditions. *World Allergy Organization Journal* 2016, *9*.
6. Walker, S.; Khan-Wasti, S.; Fletcher, M.; Cullinan, P.; Harris, J.; Sheikh, A. Seasonal Allergic Rhinitis Is Associated with a Detrimental Effect on Examination Performance in United Kingdom Teenagers: Case-Control Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2007**, *120*, 381–387, doi:10.1016/j.jaci.2007.03.034.
7. Pawankar, R.; Canonica, G.W.; Holgate, S.T.; Lockey, R.F.; Blaiss, M.S. *WAO White Book on Allergy*; 2013;
8. House, W. *Global Report on Atopic Dermatitis 2022 Atopicdermatitisatlas.Org International League of Dermatological Societies (ILDS) International League of Dermatological Societies*; 2022;
9. Larsson, K.; Ställberg, B.; Lisspers, K.; Telg, G.; Johansson, G.; Thuresson, M.; Janson, C. Prevalence and Management of Severe Asthma in Primary Care: An Observational Cohort Study in Sweden (PACEHR). *Respir Res* **2018**, *19*, doi:10.1186/s12931-018-0719-x.
10. Haahtela, T.; Valovirta, E.; Saarinen, K.; Jantunen, J.; Lindström, I.; Kauppi, P.; Laatikainen, T.; Pelkonen, A.; Salava, A.; Tommila, E.; et al. The Finnish Allergy Program 2008-2018: Society-Wide Proactive Program for Change of Management to Mitigate Allergy Burden. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021, *148*, 319-326.e4.
11. Aït-Khaled, N.; Pearce, N.; Anderson, H.R.; Ellwood, P.; Montefort, S.; Shah, J.; Asher, M.I.; Beasley, R.; Björkstén, B.; Brunekreef, B.; et al. Global Map of the Prevalence of Symptoms of Rhinoconjunctivitis in Children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2009**, *64*, 123–148, doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01884.x.
12. Nathan, R.A. The Burden of Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Proc* **2007**, *28*, 3–9, doi:10.2500/aap.2007.28.2934.
13. Campbell, D.E.; Boyle, R.J.; Thornton, C.A.; Prescott, S.L. Mechanisms of Allergic Disease - Environmental and Genetic Determinants for the Development of Allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **2015**, *45*, 844–858, doi:10.1111/cea.12531.
14. Murrison, L.B.; Brandt, E.B.; Myers, J.B.; Khurana Hershey, G.K. Environmental Exposures and Mechanisms in Allergy and Asthma Development. *Journal of Clinical Investigation* 2019, *129*, 1504–1515.

15. Riedler, J.; Eder, W.; Oberfeld, G.; Schreuer², M. Austrian Children Living on a Farm Have Less Hay Fever, Asthma and Allergic Sensitization. *Clinical and Experimental Allergy* 2000, *30*, 194–200.
16. Sánchez, J.; Sánchez, A.; Cardona, R. Clinical Differences between Children with Asthma and Rhinitis in Rural and Urban Areas. *Colomb Med* **2018**, *49*, 169–174, doi:10.25100/cm.v49i2.3015.
17. Jakwerth, C.A.; Ordovas-Montanes, J.; Blank, S.; Schmidt-Weber, C.B.; Zissler, U.M. Role of Respiratory Epithelial Cells in Allergic Diseases. *Cells* 2022, *11*.
18. Nur Husna, S.M.; Tan, H.T.T.; Md Shukri, N.; Mohd Ashari, N.S.; Wong, K.K. Allergic Rhinitis: A Clinical and Pathophysiological Overview. *Front Med (Lausanne)* 2022, *9*.
19. Schicke, E.; Cseresnyés, Z.; Rennert, K.; Vau, V.; Haupt, K.F.; Hornung, F.; Nietzsche, S.; Swiczak, F.; Schmidtke, M.; Glück, B.; et al. Staphylococcus Aureus Lung Infection Results in Down-Regulation of Surfactant Protein-A Mainly Caused by pro-Inflammatory Macrophages. *Microorganisms* **2020**, *8*, doi:10.3390/microorganisms8040577.
20. Amatngalim, G.D.; Schrumpf, J.A.; Dishchekenian, F.; Mertens, T.C.J.; Ninaber, D.K.; Van Der Linden, A.C.; Pilette, C.; Taube, C.; Hiemstra, P.S.; Van Der Does, A.M. Aberrant Epithelial Differentiation by Cigarette Smoke Dysregulates Respiratory Host Defence. *European Respiratory Journal* **2018**, *51*, doi:10.1183/13993003.01009-2017.
21. Yaqub, N.; Wayne, G.; Birchall, M.; Song, W. Recent Advances in Human Respiratory Epithelium Models for Drug Discovery. *Biotechnol Adv* 2022, *54*.
22. Holgate, S.T. Innate and Adaptive Immune Responses in Asthma. *Nat Med* 2012, *18*, 673–683.
23. Fadilah, S.; Cheong, S.; Malaysia, K.; Yaacob Latiff, J.; Tun Razak, B.; Lumpur, K. *Dendritic Cell Immunobiology and Potential Roles in Immunotherapy*; 2007; Vol. 29;.
24. Kool, M.; Hammad, H.; Lambrecht, B.N. Cellular Networks Controlling Th2 Polarization in Allergy and Immunity. *F1000 Biol Rep* 2012, *4*.
25. Hilligan, K.L.; Ronchese, F. Antigen Presentation by Dendritic Cells and Their Instruction of CD4+ T Helper Cell Responses. *Cell Mol Immunol* 2020, *17*, 587–599.
26. Kucuksezer, U.C.; Ozdemir, C.; Cevhertas, L.; Ogulur, I.; Akdis, M.; Akdis, C.A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy and Allergen Tolerance. *Allergology International* 2020, *69*, 549–560.
27. Allen, C.D.C. Features of B Cell Responses Relevant to Allergic Disease. *The Journal of Immunology* **2022**, *208*, 257–266, doi:10.4049/jimmunol.2100988.
28. Tay, T.R.; Bosco, J.; Aumann, H.; O’Hehir, R.; Hew, M. Elevated Total Serum Immunoglobulin E (>1000 IU/ML): Implications? *Intern Med J* **2016**, *46*, 846–849, doi:10.1111/imj.13073.
29. Kostova, P.; Papochieva, V.; Miteva, D.; Georgieva, B.; Mileva, S.; Shahid, M.; Lukanov, T.; Petrova, G. Elevated IgE Levels—An Allergy or an Underlying Inborn Error of Immunity in Children with Recurrent Infections? *Antibodies* **2023**, *12*, doi:10.3390/antib12040070.
30. Amin, K. The Role of Mast Cells in Allergic Inflammation. *Respir Med* 2012, *106*, 9–14.
31. Galli, S.J.; Tsai, M. IgE and Mast Cells in Allergic Disease. *Nat Med* 2012, *18*, 693–704.

32. Moon, T.C.; Dean Befus, A.; Kulka, M. Mast Cell Mediators: Their Differential Release and the Secretory Pathways Involved. *Front Immunol* 2014, 5.
33. Korošec, P.; Gibbs, B.F.; Rijavec, M.; Custovic, A.; Turner, P.J. Important and Specific Role for Basophils in Acute Allergic Reactions. *Clinical and Experimental Allergy* 2018, 48, 502–512.
34. Lombardi, C.; Berti, A.; Cottini, M. The Emerging Roles of Eosinophils: Implications for the Targeted Treatment of Eosinophilic-Associated Inflammatory Conditions. *Current Research in Immunology* 2022, 3, 42–53.
35. Hansen, I.; Klimek, L. Mediators of Inflammation in the Early and the Late Phase of Allergic Rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004, 4, 159–163, doi:10.1097/01.all.0000129444.81350.23.
36. Canonica, Walter.G. Introduction to Nasal and Pulmonary Allergy. *Allergy* 2002.
37. Medzhitov, R. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. *Nature* 2007, 449, 819–826.
38. Wager, C.M.L.; Wormley, F.L. Classical versus Alternative Macrophage Activation: The Ying and the Yang in Host Defense against Pulmonary Fungal Infections. *Mucosal Immunol* 2014, 7, 1023–1035.
39. Italiani, P.; Boraschi, D. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Netw* 2015, 15, 167, doi:10.4110/in.2015.15.4.167.
40. Joshi, N.; Walter, J.M.; Misharin, A. V. Alveolar Macrophages. *Cell Immunol* 2018, 330, 86–90, doi:10.1016/j.cellimm.2018.01.005.
41. Draijer, C.; Peters-Golden, M. Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: The Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017, 17.
42. Collin, M.; Bigley, V. Human Dendritic Cell Subsets: An Update. *Immunology* 2018, 154, 3–20.
43. Liu, K.; Nussenzweig, M.C. *Origin and Development of Dendritic Cells*; 2010; Vol. 234;.
44. Van Lith, M.; McEwen-Smith, R.M.; Benham, A.M. HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR Have Different Requirements for Invariant Chain and HLA-DM. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285, 40800–40808, doi:10.1074/jbc.M110.148155.
45. Collin, M.; Bigley, V. Human Dendritic Cell Subsets: An Update. *Immunology* 2018, 154, 3–20.
46. Calmeiro, J.; Carrascal, M.A.; Tavares, A.R.; Ferreira, D.A.; Gomes, C.; Falcão, A.; Cruz, M.T.; Neves, B.M. Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy: The Role of Human Conventional Type 1 Dendritic Cells. *Pharmaceutics* 2020, 12.
47. Saito, Y.; Komori, S.; Kotani, T.; Murata, Y.; Matozaki, T. The Role of Type-2 Conventional Dendritic Cells in the Regulation of Tumor Immunity. *Cancers (Basel)* 2022, 14.
48. Ronchese, F.; Webb, G.R.; Ochiai, S.; Lamiabile, O.; Brewerton, M. How Type-2 Dendritic Cells Induce Th2 Differentiation: Instruction, Repression, or Fostering T Cell-T Cell Communication? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2024.
49. Ye, Y.; Gaugler, B.; Mohty, M.; Malard, F. Plasmacytoid Dendritic Cell Biology and Its Role in Immune-Mediated Diseases. *Clin Transl Immunology* 2020, 9.

50. Yang, J.; Zhang, L.; Yu, C.; Yang, X.-F.; Wang, H. *Monocyte and Macrophage Differentiation: Circulation Inflammatory Monocyte as Biomarker for Inflammatory Diseases*; 2014;
51. Marzaioli, V.; Canavan, M.; Floudas, A.; Wade, S.C.; Low, C.; Veale, D.J.; Fearon, U. Monocyte-Derived Dendritic Cell Differentiation in Inflammatory Arthritis Is Regulated by the JAK/STAT Axis via NADPH Oxidase Regulation. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01406.
52. Nakano, H.; Free, M.E.; Whitehead, G.S.; Maruoka, S.; Wilson, R.H.; Nakano, K.; Cook, D.N. Pulmonary CD103+ Dendritic Cells Prime Th2 Responses to Inhaled Allergens. *Mucosal Immunol* **2012**, *5*, 53–65, doi:10.1038/mi.2011.47.
53. Khare, A.; Krishnamoorthy, N.; Oriss, T.B.; Fei, M.; Ray, P.; Ray, A. Cutting Edge: Inhaled Antigen Upregulates Retinaldehyde Dehydrogenase in Lung CD103+ but Not Plasmacytoid Dendritic Cells To Induce Foxp3 De Novo in CD4+ T Cells and Promote Airway Tolerance. *The Journal of Immunology* **2013**, *191*, 25–29, doi:10.4049/jimmunol.1300193.
54. Zhuang, Q.; Cai, H.; Cao, Q.; Li, Z.; Liu, S.; Ming, Y. Tolerogenic Dendritic Cells: The Pearl of Immunotherapy in Organ Transplantation. *Front Immunol* **2020**, *11*.
55. Manavalan, J.S.; Rossi, P.C.; Vlad, G.; Piazza, F.; Yarinina, A.; Cortesini, R.; Mancini, D.; Suci-Foca, N. High Expression of ILT3 and ILT4 Is a General Feature of Tolerogenic Dendritic Cells. *Transpl Immunol* **2003**, *11*, 245–258, doi:10.1016/S0966-3274(03)00058-3.
56. Zhang, X.; Zheng, P.; Prestwood, T.R.; Zhang, H.; Carmi, Y.; Tolentino, L.L.; Wu, N.; Choi, O.; Winer, D.A.; Strober, S.; et al. Human Regulatory Dendritic Cells Develop From Monocytes in Response to Signals From Regulatory and Helper T Cells. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01982.
57. Crusio, W.E.; Dong, H.; Radeke, H.H. *T Regulatory Cells in Human Health and Diseases*; 2019;
58. Wu, H.; Gong, J.; Liu, Y. Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Regulation of Immune Response (Review). *Mol Med Rep* **2018**, *17*, 4867–4873.
59. Bakdash, G.; Vogelpoel, L.T.C.; Van Capel, T.M.M.; Kapsenberg, M.L.; De Jong, E.C. Retinoic Acid Primes Human Dendritic Cells to Induce Gut-Homing, IL-10-Producing Regulatory T Cells. *Mucosal Immunol* **2015**, *8*, 265–278, doi:10.1038/mi.2014.64.
60. Zheng, Y.; Chaudhry, A.; Kas, A.; Deroos, P.; Kim, J.M.; Chu, T.-T.; Corcoran, L.; Treuting, P.; Klein, U.; Rudensky, A.Y. *Regulatory T-Cell Suppressor Program Co-opts Transcription Factor IRF4 to Control T H 2 Responses*; 2009;
61. Littringer, K.; Moresi, C.; Rakebrandt, N.; Zhou, X.; Schorer, M.; Dolowschiak, T.; Kirchner, F.; Rost, F.; Keller, C.W.; McHugh, D.; et al. Common Features of Regulatory T Cell Specialization during Th1 Responses. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.01344.
62. Joller, N.; Lozano, E.; Burkett, P.R.; Patel, B.; Xiao, S.; Zhu, C.; Xia, J.; Tan, T.G.; Sefik, E.; Yajnik, V.; et al. Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* **2014**, *40*, 569–581, doi:10.1016/j.immuni.2014.02.012.
63. Yu, X.; Harden, K.; Gonzalez, L.C.; Francesco, M.; Chiang, E.; Irving, B.; Tom, I.; Ivelja, S.; Refino, C.J.; Clark, H.; et al. The Surface Protein TIGIT Suppresses T Cell Activation by Promoting the Generation of Mature Immunoregulatory Dendritic Cells. *Nat Immunol* **2009**, *10*, 48–57, doi:10.1038/ni.1674.

64. Shao, Y.; Yang, W.Y.; Saaoud, F.; Drummer, C.; Sun, Y.; Xu, K.; Lu, Y.; Shan, H.; Shevach, E.M.; Jiang, X.; et al. IL-35 Promotes CD4 + Foxp3 + Tregs and Inhibits Atherosclerosis via Maintaining CCR5-Amplified Treg-Suppressive Mechanisms. **2021**, doi:10.1172/jci.
65. Vignali, D.A.A.; Collison, L.W.; Workman, C.J. How Regulatory T Cells Work. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**, 523–532.
66. Torres-Aguilar, H.; Aguilar-Ruiz, S.R.; González-Pérez, G.; Munguía, R.; Bajaña, S.; Meraz-Ríos, M.A.; Sánchez-Torres, C. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* **2010**, **184**, 1765–1775, doi:10.4049/jimmunol.0902133.
67. Kraszula, L.; Eusebio, M.O.; Kuna, P.; Pietruczuk, M. Relationship between CCR5+FoxP3+Treg Cells and Forced Expiratory Volume in 1 s, Peak Expiratory Flow in Patients with Severe Asthma. *Postepy Dermatol Alergol* **2021**, **38**, 262–268, doi:10.5114/ada.2021.106202.
68. Chantveerawong, T.; Sangkangjanavanich, S.; Chiewchalerm Sri, C.; Pradubongsa, P.; Mitthamsiri, W.; Jindarat, S.; Wang, M.; Akdis, M.; Sokolowska, M.; Akdis, C.A.; et al. Increased Circulating CRTH2+Tregs Are Associated with Asthma Control and Exacerbation. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2022, **77**, 681–685.
69. Nguyen, K.D.; Vanichsarn, C.; Nadeau, K.C. Impaired IL-10-Dependent Induction of Tolerogenic Dendritic Cells by CD4+CD25hiCD127lo/- Natural Regulatory T Cells in Human Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**, **180**, 823–833, doi:10.1164/rccm.200905-0761OC.
70. Zhang, H.; Kong, H.; Zeng, X.; Guo, L.; Sun, X.; He, S. Subsets of Regulatory T Cells and Their Roles in Allergy. *J Transl Med* 2014, **12**.
71. Noval Rivas, M.; Chatila, T.A. Regulatory T Cells in Allergic Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016, **138**, 639–652.
72. Molinari, G.; Colombo, G.; Celenza, C. Respiratory Allergies: A General Overview of Remedies, Delivery Systems, and the Need to Progress. *ISRN Allergy* **2014**, **2014**, 1–15, doi:10.1155/2014/326980.
73. Varshney, J.; Varshney, H. Allergic Rhinitis: An Overview. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* **2015**, **67**, 143–149, doi:10.1007/s12070-015-0828-5.
74. Aziz, M.I.A.; Tan, L.E.; Wu, D.B.C.; Pearce, F.; Chua, G.S.W.; Lin, L.; Tan, P.T.; Ng, K. Comparative Efficacy of Inhaled Medications (ICS/LABA, LAMA, LAMA/LABA and SAMA) for COPD: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *International Journal of COPD* **2018**, **13**, 3203–3231, doi:10.2147/COPD.S173472.
75. Malone, M. Review: Side Effects of Some Commonly Used Allergy Medications (Decongestants, Anti-Leukotriene Agents, Antihistamines, Steroids, and Zinc) and Their Safety in Pregnancy. *International Journal of Allergy Medications* **2017**, **3**, doi:10.23937/2572-3308.1510024.
76. Sitkauskienė, B.; Sakalauskas, R. *The Role of B2-Adrenergic Receptors in Inflammation and Allergy*; 2005; Vol. 4;
77. Chan, J.; Cabrol, D.; Ingemarsson, I.; Marsal, K.; Moutquin, J.M.; Fisk, N.M. Pragmatic Comparison of β 2-Agonist Side Effects within the Worldwide Atosiban versus Beta Agonists Study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **2006**, **128**, 135–141, doi:10.1016/j.ejogrb.2006.01.030.

78. Loh, Z.C.; Hussain, R.; Balan, S.; Saini, B.; Muneswarao, J.; Ong, S.C.; Babar, Z.U.D. Perceptions, Attitudes, and Behaviors of Asthma Patients towards the Use of Short-Acting B2-Agonists: A Systematic Review. *PLoS One* **2023**, *18*, doi:10.1371/journal.pone.0283876.
79. Cabrera, C.S.; Nan, C.; Lindarck, N.; Beekman, M.J.H.I.; Arnetorp, S.; van der Valk, R.J.P. Sabina: Global Programme to Evaluate Prescriptions and Clinical Outcomes Related to Short-Acting B2-Agonist Use in Asthma. *European Respiratory Journal* **2020**, *55*.
80. Canonica, G.W.; Paggiaro, P.; Blasi, F.; Musarra, A.; Richeldi, L.; Rossi, A.; Papi, A. Manifesto on the Overuse of SABA in the Management of Asthma: New Approaches and New Strategies. *Ther Adv Respir Dis* **2021**, *15*.
81. Cazzola, M.; Page, C.P.; Rogliani, P.; Matera, M.G. B2-Agonist Therapy in Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, *187*, 690–696.
82. Rodrigo, G.J.; Castro-Rodríguez, J.A. Safety of Long-Acting β Agonists for the Treatment of Asthma: Clearing the Air. *Thorax* **2012**, *67*, 342–349.
83. Barnes, P.J. Scientific Rationale for Inhaled Combination Therapy with Long-Acting B2-Agonists and Corticosteroids. *European Respiratory Journal* **2002**, *19*, 182–191.
84. Matera, M.G.; Cazzola, M. Muscarinic Receptor Antagonists. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer New York LLC, 2016; Vol. 237, pp. 41–62.
85. Aziz, M.I.A.; Tan, L.E.; Wu, D.B.C.; Pearce, F.; Chua, G.S.W.; Lin, L.; Tan, P.T.; Ng, K. Comparative Efficacy of Inhaled Medications (ICS/LABA, LAMA, LAMA/LABA and SAMA) for COPD: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *International Journal of COPD* **2018**, *13*, 3203–3231, doi:10.2147/COPD.S173472.
86. Afonso, A.S.M.; Verhamme, K.M.C.; Stricker, B.H.C.; Sturkenboom, M.C.J.M.; Brusselle, G.G.O. Inhaled Anticholinergic Drugs and Risk of Acute Urinary Retention. *BJU Int* **2011**, *107*, 1265–1272, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09600.x.
87. D'Amato, M.; Vitale, C.; Molino, A.; Lanza, M.; D'Amato, G. Anticholinergic Drugs in Asthma Therapy. *Curr Opin Pulm Med* **2017**, *23*, 103–108.
88. Melani, A.S.; Sestini, P. Safety of Long Acting Muscarinic Antagonists: Are All These Drugs Always and Equally Safe? *Curr Med Res Opin* **2016**, *32*, 975–977.
89. Matera, M.G.; Calzetta, L.; Rogliani, P.; Hanania, N.; Cazzola, M. Cardiovascular Events with the Use of Long-Acting Muscarinic Receptor Antagonists: An Analysis of the FAERS Database 2020–2023. *Lung* **2024**, *202*, 119–125, doi:10.1007/s00408-024-00677-3.
90. Kawauchi, H.; Yanai, K.; Wang, D.Y.; Itahashi, K.; Okubo, K. Antihistamines for Allergic Rhinitis Treatment from the Viewpoint of Nonsedative Properties. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.
91. Fein, M.N.; Fischer, D.A.; O'Keefe, A.W.; Sussman, G.L. CSACI Position Statement: Newer Generation H1-Antihistamines Are Safer than First-Generation H1-Antihistamines and Should Be the First-Line Antihistamines for the Treatment of Allergic Rhinitis and Urticaria. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* **2019**, *15*.
92. Okano, M. Mechanisms and Clinical Implications of Glucocorticosteroids in the Treatment of Allergic Rhinitis. *Clin Exp Immunol* **2009**, *158*, 164–173.

93. Schäcke, H.; Döcke, W.-D.; Asadullah, K. Mechanisms Involved in the Side Effects of Glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002, 23–43.
94. Oray, M.; Abu Samra, K.; Ebrahimiadib, N.; Meese, H.; Foster, C.S. Long-Term Side Effects of Glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf* 2016, 15, 457–465.
95. Masterlerz, L.; Kumik Jagoda Antileukotriene Drugs in the Treatment of Asthma. *Pol Arch Med Wewn* 2010, 3, 103–108.
96. Watkins, P.B.; Dube, L.M.; Walton-Bowen, K.; Cameron, C.M.; Kasten, L.E. *Clinical Pattern of Zileuton-Associated Liver Injury Results of a 12-Month Study in Patients with Chronic Asthma*; 2007; Vol. 30;.
97. Corboz, M.R.; Rivelli, M.A.; Mingo, G.G.; McLeod, R.L.; Varty, L.; Jia, Y.; Hey, J.A. Mechanism of Decongestant Activity of A2-Adrenoceptor Agonists. *Pulm Pharmacol Ther* 2008, 21, 449–454, doi:10.1016/j.pupt.2007.06.007.
98. Ajanların, D.; Yan, K.; Özet, E.; Kaya, Z.; Tuncez, A. *Adverse Cardiac Effects Of Decongestant Agents*; 2013; Vol. 10;.
99. Rabe, K.F.; Calhoun, W.J.; Smith, N.; Jimenez, P. Can Anti-IgE Therapy Prevent Airway Remodeling in Allergic Asthma? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011, 66, 1142–1151.
100. Segal, M.; Stokes, J.R.; Casale, T.B. Anti-Immunoglobulin E Therapy. *World Allergy Organization Journal* 2008, 1, 174–183.
101. Sullivan, S.D.; Turk, F. An Evaluation of the Cost-Effectiveness of Omalizumab for the Treatment of Severe Allergic Asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, 63, 670–684.
102. Dorofeeva, Y.; Shilovskiy, I.; Tulaeva, I.; Focke-Tejkl, M.; Flicker, S.; Kudlay, D.; Khaitov, M.; Karsonova, A.; Riabova, K.; Karaulov, A.; et al. Past, Present, and Future of Allergen Immunotherapy Vaccines. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021, 76, 131–149.
103. Akdis, C.A.; Akdis, M. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy and Immune Tolerance to Allergens. *World Allergy Organization Journal* 2015, 8, doi:10.1186/s40413-015-0063-2.
104. Mitsias, D.I.; Xepapadaki, P.; Makris, M.; Papadopoulos, N.G. Immunotherapy in Allergic Diseases — Improved Understanding and Innovation for Enhanced Effectiveness. *Curr Opin Immunol* 2020, 66, 1–8.
105. Marogna, M.; Spadolini, I.; Massolo, A.; Canonica, G.W.; Passalacqua, G. Long-Lasting Effects of Sublingual Immunotherapy According to Its Duration: A 15-Year Prospective Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 126, 969–975, doi:10.1016/j.jaci.2010.08.030.
106. Tankersley, M.; Han, J.K.; Nolte, H. Clinical Aspects of Sublingual Immunotherapy Tablets and Drops. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2020, 124, 573–582.
107. Bonertz, A.; Roberts, G.C.; Hoefnagel, M.; Timon, M.; Slater, J.E.; Rabin, R.L.; Bridgewater, J.; Pini, C.; Pfaar, O.; Akdis, C.; et al. Challenges in the Implementation of EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: A Global Perspective on the Regulation of Allergen Products. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, 73, 64–76.
108. Quirt, J.; Gagnon, R.; Ellis, A.K.; Kim, H.L. CSACI Position Statement: Prescribing Sublingual Immunotherapy Tablets for Aeroallergens. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2018, 14.

109. Nicolaou, N.; Siddique, N.; Custovic, A. Allergic Disease in Urban and Rural Populations: Increasing Prevalence with Increasing Urbanization. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, *60*, 1357–1360.
110. Stein, M.; Greenberg, Z.; Boaz, M.; Handzel, Z.T.; Meshesha, M.K.; Bentwich, Z. The Role of Helminth Infection and Environment in the Development of Allergy: A Prospective Study of Newly-Arrived Ethiopian Immigrants in Israel. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*, doi:10.1371/journal.pntd.0004208.
111. Amoah, A.S.; Boakye, D.A.; van Ree, R.; Yazdanbakhsh, M. Parasitic Worms and Allergies in Childhood: Insights from Population Studies 2008-2013. *Pediatric Allergy and Immunology* 2014, *25*, 208–217.
112. Mpairwe, H.; Amoah, A.S. Parasites and Allergy: Observations from Africa. *Parasite Immunol* 2019, *41*.
113. de Andrade, C.M.; Carneiro, V.L.; Cerqueira, J. V.; Fonseca, H.F.; Queiroz, G.A.; Costa, R.S.; Alcantara-Neves, N.M.; Cooper, P.; Figueiredo, C.A. Parasites and Allergy: Observations from Brazil. *Parasite Immunol* 2019, *41*.
114. Stewart, D.; Nichol, A. Inflammation, Immunity and Allergy. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2021, *22*, 488–493.
115. Bloomfield, S.F.; Stanwell-Smith, R.; Crevel, R.W.R.; Pickup, J.; Bloomfield, S.; Lane, W.G.; Leigh, L. Too Clean, or Not Too Clean: The Hygiene Hypothesis and Home Hygiene Clinical and Experimental Allergy. *Clinical and experimental allergy* 2006, *36*, 402–425.
116. Stiemsma, L.; Reynolds, L.; Turvey, S.; Finlay, B. The Hygiene Hypothesis: Current Perspectives and Future Therapies. *Immunotargets Ther* **2015**, *143*, doi:10.2147/itt.s61528.
117. MacDonald, A.S.; Araujo, M.I.; Pearce, E.J. Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect Immun* 2002, *70*, 427–433.
118. Finlay, C.M.; Walsh, K.P.; Mills, K.H.G. Induction of Regulatory Cells by Helminth Parasites: Exploitation for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Immunol Rev* 2014, *259*, 206–230.
119. Babu, S.; Kumaraswami, V.; Nutman, T.B. Alternatively Activated and Immunoregulatory Monocytes in Human Filarial Infections. *Journal of Infectious Diseases* **2009**, *199*, 1827–1837, doi:10.1086/599090.
120. Doetze, A.; Satoguina, J.; Burchard, G.; Rau, T.; Lö Liger, C.; Fleischer, B.; Hoerauf, A. *Antigen-Specific Cellular Hyporesponsiveness in a Chronic Human Helminth Infection Is Mediated by T h 3/T r 1-Type Cytokines IL-10 and Transforming Growth Factor-β but Not by a T h 1 to T h 2 Shift*; 2000; Vol. 12;.
121. Korten, S.; Hoerauf, A.; Kaifi, J.T.; Büttner, D.W. Low Levels of Transforming Growth Factor-Beta (TGF-Beta) and Reduced Suppression of Th2-Mediated Inflammation in Hyperreactive Human Onchocerciasis. *Parasitology* **2011**, *138*, 35–45, doi:10.1017/S0031182010000922.
122. Metenou, S.; Dembele, B.; Konate, S.; Dolo, H.; Coulibaly, S.Y.; Coulibaly, Y.I.; Diallo, A.A.; Soumaoro, L.; Coulibaly, M.E.; Sanogo, D.; et al. At Homeostasis Filarial Infections Have Expanded Adaptive T Regulatory but Not Classical Th2 Cells. *The Journal of Immunology* **2010**, *184*, 5375–5382, doi:10.4049/jimmunol.0904067.
123. Wilson, M.S.; Taylor, M.D.; Balic, A.; Finney, C.A.M.; Lamb, J.R.; Maizels, R.M. Suppression of Allergic Airway Inflammation by Helminth-Induced Regulatory T Cells. *Journal of Experimental Medicine* **2005**, *202*, 1199–1212, doi:10.1084/jem.20042572.

124. Kitagaki, K.; Businga, T.R.; Racila, D.; Elliott, D.E.; Weinstock, J. V; Kline, J.N. Intestinal Helminths Protect in a Murine Model of Asthma. *The Journal of Immunology* 2006, *177*, 1628–1635.
125. Gao, X.; Ren, X.; Wang, Q.; Yang, Z.; Li, Y.; Su, Z.; Li, J. Critical Roles of Regulatory B and T Cells in Helminth Parasite-Induced Protection against Allergic Airway Inflammation. *Clin Exp Immunol* **2019**, *198*, 390–402, doi:10.1111/cei.13362.
126. Mangan, N.E.; van Rooijen, N.; McKenzie, A.N.J.; Fallon, P.G. Helminth-Modified Pulmonary Immune Response Protects Mice from Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness. *The Journal of Immunology* **2006**, *176*, 138–147, doi:10.4049/jimmunol.176.1.138.
127. Aranzamendi, C.; de Bruin, A.; Kuiper, R.; Boog, C.J.P.; van Eden, W.; Rutten, V.; Pinelli, E. Protection against Allergic Airway Inflammation during the Chronic and Acute Phases of *Trichinella Spiralis* Infection. *Clinical and Experimental Allergy* **2013**, *43*, 103–115, doi:10.1111/cea.12042.
128. Montaner, S.; Galiano, A.; Trelis, M.; Martin-Jaular, L.; del Portillo, H.A.; Bernal, D.; Marcilla, A. The Role of Extracellular Vesicles in Modulating the Host Immune Response during Parasitic Infections. *Front Immunol* **2014**, *5*, doi:10.3389/fimmu.2014.00433.
129. Despommier, D.D. *How Does Trichinella Spiralis Make Itself at Home?*; 1998; Vol. 75;.
130. Wu, Z.; Sofronic-Milosavljevic, L.; Nagano, I.; Takahashi, Y. *Trichinella Spiralis*: Nurse Cell Formation with Emphasis on Analogy to Muscle Cell Repair. *Parasit Vectors* **2008**, *1*, doi:10.1186/1756-3305-1-27.
131. 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, doi:10.1017/S0031182001007958.
132. Kotula, A.W.; Murrell, K.D.; Acosta-Stein, L.; Lamb, L. Distribution of *Trichinella Spiralis* Larvae in Selected Muscles and Organs of Experimentally Infected Swine. *J Anim Sci* 1984, *58*.
133. Hernández-Ancheyta, L.; Salinas-Tobón, M. del R.; Cifuentes-Goches, J.C.; Hernández-Sánchez, J. *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae Excretory–Secretory Products Induce Changes in Cytoskeletal and Myogenic Transcription Factors in Primary Myoblast Cultures. *Int J Parasitol* **2018**, *48*, 275–285, doi:10.1016/j.ijpara.2017.10.002.
134. Wu, Z.; Nagano, I.; Takahashi, Y. Candidate Genes Responsible for Common and Different Pathology of Infected Muscle Tissues between *Trichinella Spiralis* and *T. Pseudospiralis* Infection. *Parasitol Int* **2008**, *57*, 368–378, doi:10.1016/j.parint.2008.03.005.
135. Jasmer, D.P.; Kwak, D. Fusion and Differentiation of Murine C2C12 Skeletal Muscle Cells That Express *Trichinella Spiralis* P43 Protein. *Exp Parasitol* **2006**, *112*, 67–75, doi:10.1016/j.exppara.2005.09.013.
136. Wu, Z.; Nagano, I.; Boonmars, T.; Takahashi, Y. A Spectrum of Functional Genes Mobilized after *Trichinella Spiralis* Infection in Skeletal Muscle. *Parasitology* **2005**, *130*, 561–573, doi:10.1017/S0031182004006912.
137. Polvere, R.I.; Kabbash, C.A.; Capó, V.A.; Kadan, I.; Despommier, D.D. *Trichinella Spiralis: Synthesis of Type IV and Type VI Collagen during Nurse Cell Formation*; 1997;
138. Ashour, D.S. *Trichinella Spiralis* Immunomodulation: An Interactive Multifactorial Process. *Expert Rev Clin Immunol* 2013, *9*, 669–675.

139. Bruschi, F.; Chiumiento, L. *Immunomodulation in Trichinellosis: Does Trichinella Really Escape the Host Immune System?*; 2012; Vol. 12;.
140. Bruschi, F.; Murrell, K.D. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*; 10th ed.; 2020; Vol. 119;.
141. Xue, Y.; Xu, Y.-F.; Zhang, B.; Huang, H.-B.; Pan, T.-X.; Li, J.-Y.; Tang, Y.; Shi, C.-W.; Wang, N.; Yang, G.-L.; et al. Trichinella Spiralis Infection Ameliorates the Severity of Citrobacter Rodentium-Induced Experimental Colitis in Mice. *Exp Parasitol* **2022**, *238*, 108264, doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108264>.
142. Ashour, D.S.; Othman, A.A.; Shareef, M.M.; Gaballah, H.H.; Mayah, W.W. Interactions between Trichinella Spiralis Infection and Induced Colitis in Mice. *J Helminthol* **2014**, *88*, 210–218, doi:[10.1017/S0022149X13000059](https://doi.org/10.1017/S0022149X13000059).
143. Khan, W.I.; Blennerhasset, P.A.; Varghese, A.K.; Chowdhury, S.K.; Omsted, P.; Deng, Y.; Collins, S.M. Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect Immun* **2002**, *70*, 5931–5937, doi:[10.1128/IAI.70.11.5931-5937.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.5931-5937.2002).
144. Saunders, K.A.; Raine, T.; Cooke, A.; Lawrence, C.E. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. *Infect Immun* **2007**, *75*, 397–407, doi:[10.1128/IAI.00664-06](https://doi.org/10.1128/IAI.00664-06).
145. Cheng, Y.; Zhu, X.; Wang, X.; Zhuang, Q.; Huyan, X.; Sun, X.; Huang, J.; Zhan, B.; Zhu, X. Trichinella Spiralis Infection Mitigates Collagen-Induced Arthritis via Programmed Death 1-Mediated Immunomodulation. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:[10.3389/fimmu.2018.01566](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01566).
146. Gruden-Movsesijan, A.; Ilic, N.; Mostarica-Stojkovic, M.; Stosic-Grujicic, S.; Milic, M.; Sofronic-Milosavljevic, L. Trichinella Spiralis: Modulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in DA Rats. *Exp Parasitol* **2008**, *118*, 641–647, doi:[10.1016/j.exppara.2007.12.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.003).
147. Gruden-Movsesijan, A.; Ilic, N.; Mostarica-Stojkovic, M.; Stosic-Grujicic, S.; Milic, M.; Sofronic-Milosavljevic, L. Mechanisms of Modulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Chronic Trichinella Spiralis Infection in Dark Agouti Rats. *Parasite Immunol* **2010**, *32*, 450–459, doi:[10.1111/j.1365-3024.2010.01207.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01207.x).
148. Park, H.K.; Cho, M.K.; Choi, S.H.; Kim, Y.S.; Yu, H.S. Trichinella Spiralis: Infection Reduces Airway Allergic Inflammation in Mice. *Exp Parasitol* **2011**, *127*, 539–544, doi:[10.1016/j.exppara.2010.10.004](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.004).
149. Shi, W.; Xu, Q.; Liu, Y.; Hao, Z.; Liang, Y.; Vallée, I.; You, X.; Liu, M.; Liu, X.; Xu, N. Immunosuppressive Ability of Trichinella Spiralis Adults Can Ameliorate Type 2 Inflammation in a Murine Allergy Model. *Journal of Infectious Diseases* **2024**, *229*, 1215–1228, doi:[10.1093/infdis/jiad518](https://doi.org/10.1093/infdis/jiad518).
150. Sun, X.M.; Guo, K.; Hao, C.Y.; Zhan, B.; Huang, J.J.; Zhu, X. Trichinella Spiralis Excretory–Secretory Products Stimulate Host Regulatory T Cell Differentiation through Activating Dendritic Cells. *Cells* **2019**, *8*, doi:[10.3390/cells8111404](https://doi.org/10.3390/cells8111404).
151. Bruschi, F.; Gruden-Movesijan, A.; Pinto, B.; Ilic, N.; Sofronic-Milosavljevic, L. Trichinella Spiralis Excretory-Secretory Products Downregulate MMP-9 in Dark Agouti Rats Affected by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Exp Parasitol* **2021**, *225*, doi:[10.1016/j.exppara.2021.108112](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108112).
152. Dea-Ayuela, M.A.; Bolas-Fernández, F. *Trichinella Antigens: A Review*; 1999; Vol. 30;.

153. 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*. *Exp Parasitol* **2013**, *134*, 129–137, doi:10.1016/j.exppara.2013.02.007.
154. Takahashi, Y. Antigens of *Trichinella Spiralis*. *Parasitology Today* **1997**, *13*.
155. Yépez-Mulia, L.; Hernández-Bello, R.; Arizmendi-Puga, N.; Fonseca-Liñán, R.; Ortega-Pierres, G. Contributions to the Study of *Trichinella Spiralis* TSL-1 Antigens in Host Immunity. *Parasite Immunol* **2007**, *29*, 661–670.
156. Bolás-Fernandez, F.; Corral Bezara, L. del TSL-1 Antigens of *Trichinella*: An Overview of Their Potential Role in Parasite Invasion, Survival and Serodiagnosis of Trichinellosis. *Res Vet Sci* **2006**, *81*, 297–303.
157. Nagano, I.; Wu, Z.; Takahashi, Y. Functional Genes and Proteins of *Trichinella* Spp. *Parasitol Res* **2009**, *104*, 197–207.
158. Gamble, H.R.; Graham, C.E.; Fs, F.S. *Monoclonal Antibody-Purified Antigen for the Immunodiagnosis of Trichinosis*; 1984;
159. Romarís, F.; Dea-Ayuela, M.A.; Bolás, F.; Martínez-Fernández, A.R.; Sanmartín, M.L.; Ubeira, F.M. *Heterogeneity and Immunogenicity of the Trichinella TSL-1 Antigen Gp53*; 2003; Vol. 25;.
160. Gómez-Morales, M.A.; Ludovisi, A.; Amati, M.; Cherchi, S.; Pezzotti, P.; Pozio, E. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis. *Clinical and Vaccine Immunology* **2008**, *15*, 1723–1729, doi:10.1128/CVI.00257-08.
161. Morelle, W.; Haslam, S.M.; Olivier, V.; Appleton, J.A.; Morris, H.R.; Dell, A. *Phosphorylcholine-Containing N-Glycans of Trichinella Spiralis: Identification of Multiantennary LacdiNAc Structures*; 2000; Vol. 10;.
162. Ellis, L.A.; Mcvay, C.S.; Probert, M.A.; Zhang, J.; Bundle, D.R.; Appleton, J.A.; Baker, J.A. Terminal β -Linked Tyvelose Creates Unique Epitopes in *Trichinella Spiralis* Glycan Antigens. *Glycobiology* **1997**, *7*, 383–390.
163. Mcvay, C.S.; Bracken, † Peter; Gagliardo, L.F.; Appleton, J.; Baker, J.A. *Antibodies to Tyvelose Exhibit Multiple Modes of Interference with the Epithelial Niche of Trichinella Spiralis*; 2000; Vol. 68;.
164. Kuijk, L.M.; Klaver, E.J.; Kooij, G.; van der Pol, S.M.A.; Heijnen, P.; Bruijns, S.C.M.; Kringel, H.; Pinelli, E.; Kraal, G.; de Vries, H.E.; et al. Soluble Helminth Products Suppress Clinical Signs in Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Differentially Modulate Human Dendritic Cell Activation. *Mol Immunol* **2012**, *51*, 210–218, doi:10.1016/j.molimm.2012.03.020.
165. Cvetkovic, J.; Ilic, N.; Gruden-Movsesijan, A.; Tomic, S.; Mitic, N.; Pinelli, E.; Sofronic-Milosavljevic, L. DC-SIGN Signalling Induced by *Trichinella Spiralis* Products Contributes to the Tolerogenic Signatures of Human Dendritic Cells. *Sci Rep* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-020-77497-x.
166. Ilic, N.; Gruden-Movsesijan, A.; Cvetkovic, J.; Tomic, S.; Vucevic, D.B.; Aranzamendi, C.; Colic, M.; Pinelli, E.; Sofronic-Milosavljevic, L. *Trichinella Spiralis* Excretory-Secretory Products Induce Tolerogenic Properties in Human Dendritic Cells via Toll-like Receptors 2 and 4. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.00011.
167. Berumen Sánchez, G.; Bunn, K.E.; Pua, H.H.; Rafat, M. Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication in Tissue Injury and Disease. *Cell Communication and Signaling* **2021**, *19*.
168. Yuana, Y.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Extracellular Vesicles in Physiological and Pathological Conditions. *Blood Rev* **2013**, *27*, 31–39, doi:10.1016/j.blre.2012.12.002.

169. Buzas, E.I. The Roles of Extracellular Vesicles in the Immune System. *Nat Rev Immunol* 2023, *23*, 236–250.
170. Teng, F.; Fussenegger, M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science* 2021, *8*.
171. Hessvik, N.P.; Llorente, A. Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018, *75*, 193–208.
172. Vietri, M.; Radulovic, M.; Stenmark, H. The Many Functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020, *21*, 25–42.
173. Pashkova, N.; Gakhar, L.; Winistorfer, S.C.; Sunshine, A.B.; Rich, M.; Dunham, M.J.; Yu, L.; Piper, R.C. The Yeast Alix Homolog Bro1 Functions as a Ubiquitin Receptor for Protein Sorting into Multivesicular Endosomes. *Dev Cell* **2013**, *25*, 520–533, doi:10.1016/j.devcel.2013.04.007.
174. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brugger, B.; Simons, M. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science (1979)* 2008, *319*, 1241–1244.
175. van Niel, G.; Charrin, S.; Simoes, S.; Romao, M.; Rochin, L.; Saftig, P.; Marks, M.S.; Rubinstein, E.; Raposo, G. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell* **2011**, *21*, 708–721, doi:10.1016/j.devcel.2011.08.019.
176. Xu, M.; Ji, J.; Jin, D.; Wu, Y.; Wu, T.; Lin, R.; Zhu, S.; Jiang, F.; Ji, Y.; Bao, B.; et al. The Biogenesis and Secretion of Exosomes and Multivesicular Bodies (MVBs): Intercellular Shuttles and Implications in Human Diseases. *Genes Dis* 2023, *10*, 1894–1907.
177. Andjus, P.; Kosanović, M.; Milićević, K.; Gautam, M.; Vainio, S.J.; Jagečić, D.; Kozlova, E.N.; Pivoriūnas, A.; Chachques, J.C.; Sakaj, M.; et al. Extracellular Vesicles as Innovative Tool for Diagnosis, Regeneration and Protection against Neurological Damage. *Int J Mol Sci* 2020, *21*, 1–27.
178. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014, *30*, 255–289.
179. Zhang, L.; Parot, J.; Hackley, V.A.; Turko, I. V. Quantitative Proteomic Analysis of Biogenesis-Based Classification for Extracellular Vesicles. *Proteomes* **2020**, *8*, 1–9, doi:10.3390/proteomes8040033.
180. Vagner, T.; Chin, A.; Mariscal, J.; Bannykh, S.; Engman, D.M.; Di Vizio, D. Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity. *Proteomics* 2019, *19*.
181. Lin, C.; Guo, J.; Jia, R. Roles of Regulatory T Cell-Derived Extracellular Vesicles in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 2022, *23*.
182. Fyfe, J.; Casari, I.; Manfredi, M.; Falasca, M. Role of Lipid Signalling in Extracellular Vesicles-Mediated Cell-to-Cell Communication. *Cytokine Growth Factor Rev* 2023, *73*, 20–26.
183. Record, M.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Emerging Concepts on the Role of Exosomes in Lipid Metabolic Diseases. *Biochimie* 2014, *96*, 67–74.
184. Schulz-Siegmund, M.; Aigner, A. Nucleic Acid Delivery with Extracellular Vesicles. *Adv Drug Deliv Rev* 2021, *173*, 89–111.

185. Veziroglu, E.M.; Mias, G.I. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Front Genet* 2020, **11**.
186. Tung, S.L.; Boardman, D.A.; Sen, M.; Letizia, M.; Peng, Q.; Cianci, N.; Dioni, L.; Carlin, L.M.; Lechler, R.; Bollati, V.; et al. Regulatory T Cell-Derived Extracellular Vesicles Modify Dendritic Cell Function. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-24531-8.
187. Théry, C.; Duban, L.; Segura, E.; Væron, P.; Lantz, O.; Amigorena, S. Indirect Activation of Naïve CD4+ T Cells by Dendritic Cell-Derived Exosomes. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 1156–1162, doi:10.1038/ni854.
188. Kumar, M.A.; Baba, S.K.; Sadida, H.Q.; Marzooqi, S. Al; Jerobin, J.; Altemani, F.H.; Algehaiy, N.; Alanazi, M.A.; Abou-Samra, A.B.; Kumar, R.; et al. Extracellular Vesicles as Tools and Targets in Therapy for Diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2024, *9*.
189. Prada, I.; Meldolesi, J. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17081296.
190. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.M.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *J Extracell Vesicles* 2015, *4*, 1–60.
191. Zareba, L.; Szymanski, J.; Homoncik, Z.; Czystowska-Kuzmicz, M. Evs from Balf—Mediators of Inflammation and Potential Biomarkers in Lung Diseases. *Int J Mol Sci* 2021, *22*.
192. Javadi, J.; Görgens, A.; Vanky, H.; Gupta, D.; Hjerpe, A.; El-andaloussi, S.; Hagey, D.; Dobra, K. Diagnostic and Prognostic Utility of the Extracellular Vesicles Subpopulations Present in Pleural Effusion. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:10.3390/biom11111606.
193. Bartel, S.; Deshane, J.; Wilkinson, T.; Gabrielsson, S. Extracellular Vesicles as Mediators of Cellular Cross Talk in the Lung Microenvironment. *Front Med (Lausanne)* 2020, *7*.
194. Cañas, J.A.; Sastre, B.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; Fernández-Nieto, M.; Barranco, P.; Quirce, S.; Sastre, J.; del Pozo, V. Eosinophil-Derived Exosomes Contribute to Asthma Remodelling by Activating Structural Lung Cells. *Clinical and Experimental Allergy* **2018**, *48*, 1173–1185, doi:10.1111/cea.13122.
195. Skokos, D.; Le Panse, S.; Villa, I.; Rousselle, J.-C.; Peronet, R.; Namane, A.; David, B.; Mécheri, S. *Nonspecific B and T Cell-Stimulatory Activity Mediated by Mast Cells Is Associated with Exosomes*; 2001; Vol. 124;.
196. Bahmer, T.; Krauss-Etschmann, S.; Buschmann, D.; Behrends, J.; Watz, H.; Kirsten, A.M.; Pedersen, F.; Waschki, B.; Fuchs, O.; Pfaffl, M.W.; et al. RNA-Seq-Based Profiling of Extracellular Vesicles in Plasma Reveals a Potential Role of MiR-122-5p in Asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021, *76*, 366–371.
197. Peregrino, E.S.; Castañeda-Casimiro, J.; Vázquez-Flores, L.; Estrada-Parra, S.; Wong-Baeza, C.; Serafín-López, J.; Wong-Baeza, I. The Role of Bacterial Extracellular Vesicles in the Immune Response to Pathogens, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci* 2024, *25*.
198. Monari, C.; Bistoni, F.; Vecchiarelli, A. Glucuronoxylomannan Exhibits Potent Immunosuppressive Properties. *FEMS Yeast Res* 2006, *6*, 537–542.
199. Eichenberge, R.M.; Sotillo, J.; Loukas, A. Immunobiology of Parasitic Worm Extracellular Vesicles. *Immunol Cell Biol* 2018, *96*, 683–693.

200. Roig, J.; Saiz, M.L.; Galiano, A.; Trelis, M.; Cantalapiedra, F.; Monteagudo, C.; Giner, E.; Giner, R.M.; Recio, M.C.; Bernal, D.; et al. Extracellular Vesicles from the Helminth *Fasciola Hepatica* Prevent DSS-Induced Acute Ulcerative Colitis in a T-Lymphocyte Independent Mode. *Front Microbiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.01036.
201. Trelis, M.; Galiano, A.; Bolado, A.; Toledo, R.; Marcilla, A.; Bernal, D. Subcutaneous Injection of Exosomes Reduces Symptom Severity and Mortality Induced by *Echinostoma Caproni* Infection in BALB/c Mice. *Int J Parasitol* **2016**, *46*, 799–808, doi:10.1016/j.ijpara.2016.07.003.
202. Bernal, D.; Trelis, M.; Montaner, S.; Cantalapiedra, F.; Galiano, A.; Hackenberg, M.; Marcilla, A. Surface Analysis of *Dicrocoelium Dendriticum*. The Molecular Characterization of Exosomes Reveals the Presence of MiRNAs. *J Proteomics* **2014**, *105*, 232–241, doi:10.1016/j.jprot.2014.02.012.
203. Chaiyadet, S.; Sotillo, J.; Krueajampa, W.; Thongsen, S.; Brindley, P.J.; Sripan, B.; Loukas, A.; Laha, T. Vaccination of Hamsters with *Opisthorchis Viverrini* Extracellular Vesicles and Vesicle-Derived Recombinant Tetraspanins Induces Antibodies That Block Vesicle Uptake by Cholangiocytes and Reduce Parasite Burden after Challenge Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2019**, *13*, doi:10.1371/journal.pntd.0007450.
204. Nowacki, F.C.; Swain, M.T.; Klychnikov, O.I.; Niazi, U.; Ivens, A.; Quintana, J.F.; Hensbergen, P.J.; Hokke, C.H.; Buck, A.H.; Hoffmann, K.F. Protein and Small Non-Coding RNA-Enriched Extracellular Vesicles Are Released by the Pathogenic Blood Fluke *Schistosoma Mansoni*. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, doi:10.3402/jev.v4.28665.
205. Wang, L.; Li, Z.; Shen, J.; Liu, Z.; Liang, J.; Wu, X.; Sun, X.; Wu, Z. Exosome-like Vesicles Derived by *Schistosoma Japonicum* Adult Worms Mediates M1 Type Immune- Activity of Macrophage. *Parasitol Res* **2015**, *114*, 1865–1873, doi:10.1007/s00436-015-4373-7.
206. Liu, C.; Cao, J.; Zhang, H.; Field, M.C.; Yin, J. Extracellular Vesicles Secreted by *Echinococcus Multilocularis*: Important Players in Angiogenesis Promotion. *Microbes Infect* **2023**, *25*, doi:10.1016/j.micinf.2023.105147.
207. Jeong, M.J.; Kang, S.A.; Choi, J.H.; Lee, D.I.; Yu, H.S. Extracellular Vesicles of *Echinococcus Granulosus* Have Therapeutic Effects in Allergic Airway Inflammation. *Parasite Immunol* **2021**, *43*, doi:10.1111/pim.12872.
208. Wang, L.Q.; Liu, T.L.; Liang, P.H.; Zhang, S.H.; Li, T.S.; Li, Y.P.; Liu, G.X.; Mao, L.; Luo, X.N. Characterization of Exosome-like Vesicles Derived from *Taenia Pisiformis* Cysticercus and Their Immunoregulatory Role on Macrophages. *Parasit Vectors* **2020**, *13*, doi:10.1186/s13071-020-04186-z.
209. Ancarola, M.E.; Marcilla, A.; Herz, M.; Macchiaroli, N.; Pérez, M.; Asurmendi, S.; Brehm, K.; Poncini, C.; Rosenzvit, M.; Cucher, M. Cestode Parasites Release Extracellular Vesicles with MicroRNAs and Immunodiagnostic Protein Cargo. *Int J Parasitol* **2017**, *47*, 675–686, doi:10.1016/j.ijpara.2017.05.003.
210. Coakley, G.; McCaskill, J.L.; Borger, J.G.; Simbari, F.; Robertson, E.; Millar, M.; Harcus, Y.; McSorley, H.J.; Maizels, R.M.; Buck, A.H. Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Rep* **2017**, *19*, 1545–1557, doi:10.1016/j.celrep.2017.05.001.
211. Palm Hansen, E.; Parasitology, in; Kringel, H.; Andrew Richard Williams, P.; Williams, A.R.; Nejsum, P. Secretion of RNA-Containing Extracellular Vesicles by the Porcine Whipworm, *Trichuris*. *Journal of Parasitology* **2015**.

212. Eichenberger, R.M.; Talukder, M.H.; Field, M.A.; Wangchuk, P.; Giacomini, P.; Loukas, A.; Sotillo, J. Characterization of *Trichuris Muris* Secreted Proteins and Extracellular Vesicles Provides New Insights into Host–Parasite Communication. *J Extracell Vesicles* **2018**, *7*, doi:10.1080/20013078.2018.1428004.
213. Kosanović, M.; Cvetković, J.; Gruden-Movsesijan, A.; Vasilev, S.; Svetlana, M.; Ilić, N.; Sofronić-Milosavljević, L. *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae Release Extracellular Vesicles with Immunomodulatory Properties. *Parasite Immunol* **2019**, *41*, doi:10.1111/pim.12665.
214. Tzelos, T.; Matthews, J.B.; Buck, A.H.; Simbari, F.; Frew, D.; Inglis, N.F.; McLean, K.; Nisbet, A.J.; Whitelaw, C.B.A.; Knox, D.P.; et al. A Preliminary Proteomic Characterisation of Extracellular Vesicles Released by the Ovine Parasitic Nematode, *Teladorsagia Circumcincta*. *Vet Parasitol* **2016**, *221*, 84–92, doi:10.1016/j.vetpar.2016.03.008.
215. Zamanian, M.; Fraser, L.M.; Agbedanu, P.N.; Harischandra, H.; Moorhead, A.R.; Day, T.A.; Bartholomay, L.C.; Kimber, M.J. Release of Small RNA-Containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia Malayi*. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9*, doi:10.1371/journal.pntd.0004069.
216. Tritten, L.; Clarke, D.; Timmins, S.; McTier, T.; Geary, T.G. *Dirofilaria Immitis* Exhibits Sex- and Stage-Specific Differences in Excretory/Secretory miRNA and Protein Profiles. *Vet Parasitol* **2016**, *232*, 1–7, doi:10.1016/j.vetpar.2016.11.005.
217. Eichenberger, R.M.; Ryan, S.; Jones, L.; Buitrago, G.; Polster, R.; de Oca, M.M.; Zuvelek, J.; Giacomini, P.R.; Dent, L.A.; Engwerda, C.R.; et al. Hookworm Secreted Extracellular Vesicles Interact with Host Cells and Prevent Inducible Colitis in Mice. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.00850.
218. Murphy, A.; Cwiklinski, K.; Lalor, R.; O’connell, B.; Robinson, M.W.; Gerlach, J.; Joshi, L.; Kilcoyne, M.; Dalton, J.P.; O’neill, S.M. *Fasciola Hepatica* Extracellular Vesicles Isolated from Excretory-Secretory Products Using a Gravity Flow Method Modulate Dendritic Cell Phenotype and Activity. *PLoS Negl Trop Dis* **2020**, *14*, 1–25, doi:10.1371/journal.pntd.0008626.
219. Gao, X.; Yang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Yang, Y.; Boireau, P.; Liu, M.; Bai, X. Extracellular Vesicles Derived from *Trichinella Spiralis* Prevent Colitis by Inhibiting M1 Macrophage Polarization. *Acta Trop* **2021**, *213*, doi:10.1016/j.actatropica.2020.105761.
220. Wu, J.; Liao, Y.; Li, D.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Wu, Z.; He, P.; Wang, L. Extracellular Vesicles Derived from *Trichinella Spiralis* Larvae Promote the Polarization of Macrophages to M2b Type and Inhibit the Activation of Fibroblasts. *Front Immunol* **2022**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.974332.
221. Khueangchiangkhwang, S.; Wu, Z.; Hosoda-Yabe, R.; Okamoto, T.; Takada, C.; Okada, H.; Ogura, S. *Trichinella Spiralis* Secretes Stage-Specific Extracellular Vesicles for Modulating Host Microenvironment for Parasitism. **2023**, doi:10.1101/2023.08.02.551739.
222. Kosanović, M.; Janković, M. Isolation of Urinary Extracellular Vesicles from Tamm-Horsfall Protein–Depleted Urine and Their Application in the Development of a Lectin-Exosome-Binding Assay. *Biotechniques* **2014**, *57*, 143–149, doi:10.2144/000114208.
223. Mavin, E.; Nicholson, L.; Rafez Ahmed, S.; Gao, F.; Dickinson, A.; Wang, X. Human Regulatory T Cells Mediate Transcriptional Modulation of Dendritic Cell Function. *The Journal of Immunology* **2017**, *198*, 138–146, doi:10.4049/jimmunol.1502487.

224. Yin, W.; Liu, Y.; Liu, X.; Ma, X.; Sun, B.; Yu, Z. Metformin Inhibits Epithelial-mesenchymal Transition of Oral Squamous Cell Carcinoma via the MTOR/HIF-1 α /PKM2/STAT3 Pathway. *Oncol Lett* **2021**, *21*, 1–7, doi:10.3892/ol.2020.12292.
225. Dowran, R.; Sarvari, J.; Moattari, A.; Fattahi, M.-R.; Ramezani, A.; Younes Hosseini, S.; Hosseini, Y.S. Analysis of TLR7, SOCS1 and ISG15 Immune Genes Expression in the Peripheral Blood of Responder and Non-Responder Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **2017**, *10*, 272–277, doi:10.22037/GHFBB.V010.1098.
226. Yin Yin; Lin Qu; Dicong Zhu; Yang Wu; Xin Zhou Effect of SOCS3 on Apoptosis of Human Trophoblasts via Adjustment of the JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Preterm Birth. *Transl Pediatr* **2021**, *10*, 1637–1646, doi:10.21037/tp-21-39.
227. Alanazi, F.E.; As Sobeai, H.M.; Alhazzani, K.; Al-Dhfyhan, A.; Alshammari, M.A.; Alotaibi, M.; Al-hosaini, K.; Korashy, H.M.; Alhoshani, A. Metformin Attenuates V-Domain Ig Suppressor of T-Cell Activation through the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway in Melanoma: In Vivo and In Vitro Studies. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2022**, *30*, 138–149, doi:10.1016/j.jsps.2021.12.014.
228. Chao Mao; Min Wang; Banglun Qian; Lianlian Ouyang; Ying Shi; Na Liu; Ling Chen; Desheng Xiao; Xiang Wang; Ya Cao; et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activated by Benzo (a) Pyrene Promotes SMARCA6 Expression in NSCLC. *Am J Cancer Res* **2018**, *8*, 1214–1227, doi:2156-6976/ajcr0079815.
229. Zhou, D.; Huang, W.; Wei, J.; Zhang, J.; Liu, Z.; Ji, R.; Ge, S.; Xiao, M.; Fan, Y.; Lu, C. RelB Promotes Liver Fibrosis via Inducing the Release of Injury-Associated Inflammatory Cytokines. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 6008–6014, doi:10.1111/jcmm.15108.
230. Marta, Ź.N.; Agnieszka, W.; Jacek, P.; Jeleń, A.; Adrian, K.; Dagmara, S.K.; Sařagacka-Kubiak, A.; Balcerczak, E. NFKB2 Gene Expression in Patients with Peptic Ulcer Diseases and Gastric Cancer. *Mol Biol Rep* **2020**, *47*, 2015–2021, doi:10.1007/s11033-020-05299-5.
231. Pavlović, B.; Tomić, S.; Dokić, J.; Vasilijić, S.; Vučević, D.; Lukić, J.; Gruden-Movsesijan, A.; Ilić, N.; Marković, M.; Čolić, M. Fast Dendritic Cells Matured with Poly (I:C) May Acquire Tolerogenic Properties. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 1763–1776, doi:10.1016/j.jcyt.2015.08.001.
232. Kryczanowsky, F.; Raker, V.; Graulich, E.; Domogalla, M.P.; Steinbrink, K. IL-10–Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. *The Journal of Immunology* **2016**, *197*, 3607–3617, doi:10.4049/jimmunol.1501769.
233. McKenzie, B.S.; Kastelein, R.A.; Cua, D.J. Understanding the IL-23-IL-17 Immune Pathway. *Trends Immunol* **2006**, *27*, 17–23, doi:10.1016/j.it.2005.10.003.
234. Oppmann, B.; Lesley, R.; Blom, B.; Timans, J.C.; Xu, Y.; Hunte, B.; Vega, F.; Yu, N.; Wang, J.; Singh, K.; et al. Novel P19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12; 2000; Vol. 13;.
235. Dalod, M.; Chelbi, R.; Malissen, B.; Lawrence, T. Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization through Signaling Specificity and Transcriptional Programming. *EMBO Journal* **2014**, *33*, 1104–1116.
236. Dáňová, K.; Klapetková, A.; Kayserová, J.; Šedivá, A.; Špiřek, R.; Jelínková, L.P. NF-KB, P38 MAPK, ERK1/2, MTOR, STAT3 and Increased Glycolysis Regulate Stability of Paricalcitol/Dexamethasone-Generated Tolerogenic Dendritic Cells in the Inflammatory Environment; 2015; Vol. 6;.

237. Roncarolo, M.G.; Gregori, S.; Bacchetta, R.; Battaglia, M.; Gagliani, N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity* **2018**, *49*, 1004–1019.
238. Gruden-Movsesijan, A.; Ilic, N.; Colic, M.; Majstorovic, I.; Vasilev, S.; Radovic, I.; Sofronic-Milosavljevic, L.J. The Impact of *Trichinella Spiralis* Excretory-Secretory Products on Dendritic Cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2011**, *34*, 429–439, doi:10.1016/j.cimid.2011.08.004.
239. Kang, S.A.; Park, M.K.; Park, S.K.; Choi, J.H.; Lee, D.I.; Song, S.M.; Yu, H.S. Adoptive Transfer of *Trichinella Spiralis*-Activated Macrophages Can Ameliorate Both Th1- and Th2-Activated Inflammation in Murine Models. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-43057-1.
240. Radovic, I.; Gruden-Movsesijan, A.; Ilic, N.; Cvetkovic, J.; Mojsilovic, S.; Devic, M.; Sofronic-Milosavljevic, L. Immunomodulatory Effects of *Trichinella Spiralis*-Derived Excretory–Secretory Antigens. *Immunol Res* **2015**, *61*, 312–325, doi:10.1007/s12026-015-8626-4.
241. Xu, J.; Yu, P.; Wu, L.; Liu, M.; Lu, Y. Effect of *Trichinella Spiralis* Intervention on TNBS-Induced Experimental Colitis in Mice. *Immunobiology* **2019**, *224*, 147–153, doi:10.1016/j.imbio.2018.09.005.
242. Zhen, J.-B.; Zhang, J.-P.; Sun, F.; Lin, L.-H.; Zhang, Y.-H.; Wang, R.-B.; Han, Y.; Li, Z.-X.; Lu, Y.-X. Intervention Effects of *Trichinella Spiralis* Excretory-Secretory Antigens on Allergic Asthma in Mice . *Int Immunopharmacol* **2023**, *119*.
243. Sánchez-López, C.M.; Trelis, M.; Bernal, D.; Marcilla, A. Overview of the Interaction of Helminth Extracellular Vesicles with the Host and Their Potential Functions and Biological Applications. *Mol Immunol* **2021**, *134*, 228–235, doi:10.1016/j.molimm.2021.03.020.
244. Sánchez-López, C.M.; González-Arce, A.; Ramírez-Toledo, V.; Bernal, D.; Marcilla, A. Unraveling New Players in Helminth Pathology: Extracellular Vesicles from *Fasciola Hepatica* and *Dicrocoelium Dendriticum* Exert Different Effects on Hepatic Stellate Cells and Hepatocytes. *Int J Parasitol* **2024**, *54*, 617–634, doi:10.1016/j.ijpara.2024.06.002.
245. Taylor, P.J.; Hagen, J.; Faruqu, F.N.; Al-Jamal, K.T.; Quigley, B.; Beeby, M.; Selkirk, M.E.; Sarkies, P. *Trichinella Spiralis* Secretes Abundant Unencapsulated Small RNAs with Potential Effects on Host Gene Expression. *Int J Parasitol* **2020**, *50*, 697–705, doi:10.1016/j.ijpara.2020.05.008.
246. van der Pol, E.; Coumans, F.A.W.; Grootemaat, A.E.; Gardiner, C.; Sargent, I.L.; Harrison, P.; Sturk, A.; van Leeuwen, T.G.; Nieuwland, R. Particle Size Distribution of Exosomes and Microvesicles Determined by Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry, Nanoparticle Tracking Analysis, and Resistive Pulse Sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12*, 1182–1192, doi:10.1111/jth.12602.
247. Bachurski, D.; Schuldner, M.; Nguyen, P.H.; Malz, A.; Reiners, K.S.; Grenzi, P.C.; Babatz, F.; Schauss, A.C.; Hansen, H.P.; Hallek, M.; et al. Extracellular Vesicle Measurements with Nanoparticle Tracking Analysis– An Accuracy and Repeatability Comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J Extracell Vesicles* **2019**, *8*, doi:10.1080/20013078.2019.1596016.
248. Kotrbová, A.; Štěpka, K.; Maška, M.; Pálenik, J.; Ilkovic, L.; Klemová, D.; Kravec, M.; Hubatka, F.; Dave, Z.; Hampl, A.; et al. TEM ExosomeAnalyzer: A Computer-Assisted Software Tool for Quantitative Evaluation of Extracellular Vesicles in Transmission Electron Microscopy Images. *J Extracell Vesicles* **2019**, *8*, 1560808, doi:10.1080/20013078.2018.1560808.

249. Yang, Y.; Liu, L.; Liu, X.; Zhang, Y.Y.; Shi, H.; Jia, W.; Zhu, H.F.; Jia, H.; Liu, M.; Bai, X. Extracellular Vesicles Derived From *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae Ameliorate TNBS-Induced Colitis in Mice. *Front Immunol* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01174.
250. Huang, S.; Yuan, S.; Dong, M.; Su, J.; Yu, C.; Shen, Y.; Xie, X.; Yu, Y.; Yu, X.; Chen, S.; et al. The Phylogenetic Analysis of Tetraspanins Projects the Evolution of Cell-Cell Interactions from Unicellular to Multicellular Organisms. *Genomics* **2005**, *86*, 674–684, doi:10.1016/j.ygeno.2005.08.004.
251. Yan, S. Glycans of Parasitic Nematodes – from Glycomes to Novel Diagnostic Tools and Vaccines. *Carbohydr Res* **2025**, *550*.
252. Cvetkovic, J.; Ilic, N.; Sofronic-Milosavljevic, L.; Gruden-Movsesijan, A. Glycans Expressed on *Trichinella Spiralis* Excretory-Secretory Antigens Are Important for Anti-Inflammatory Immune Response Polarization. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2014**, *37*, 355–367, doi:10.1016/j.cimid.2014.10.004.
253. Gruden-Movsesijan, A.; Ilic, N.; Sofronic-Milosavljevic, L. Lectin-Blot Analyses of *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae Excretory-Secretory Components. *Parasitol Res* **2002**, *88*, 1004–1007, doi:10.1007/s00436-002-0606-7.
254. Hallal, S.; Túzesi, Á.; Grau, G.E.; Buckland, M.E.; Alexander, K.L. Understanding the Extracellular Vesicle Surface for Clinical Molecular Biology. *J Extracell Vesicles* **2022**, *11*.
255. Buzás, E.I.; Tóth, E.; Sódar, B.W.; Szabó-Taylor, K. Molecular Interactions at the Surface of Extracellular Vesicles. *Semin Immunopathol* **2018**, *40*, 453–464.
256. Zhou, T.; Chen, Y.; Hao, L.; Zhang, Y. *DC-SIGN and Immunoregulation*; 2006; Vol. 3;.
257. Steinman, R.M. *DC-SIGN: A Guide to Some Mysteries Minireview of Dendritic Cells Entry into the DC. Therefore, DC-SIGN Likely Will Be Piv-Otal for Explaining Some Important Functions of DCs. The Potency of DC in Initiating Immune Responses*; 2000; Vol. 100;.
258. Van der Kleij, D.; Latz, E.; Brouwers, J.F.H.M.; Kruize, Y.C.M.; Schmitz, M.; Kurt-Jones, E.A.; Espevik, T.; De Jong, E.C.; Kapsenberg, M.L.; Golenbock, D.T.; et al. A Novel Host-Parasite Lipid Cross-Talk. Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine Activates Toll-like Receptor 2 and Affects Immune Polarization. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 48122–48129, doi:10.1074/jbc.M206941200.
259. Geijtenbeek, T.B.H.; Gringhuis, S.I. Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses. *Nat Rev Immunol* **2009**, *9*, 465–479.
260. Domogalla, M.P.; Rostan, P. V.; Raker, V.K.; Steinbrink, K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol* **2017**, *8*.
261. Jürgens, B.; Hainz, U.; Fuchs, D.; Felzmann, T.; Heitger, A. Interferon- γ -Triggered Indoleamine 2,3-Dioxygenase Competence in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Induces Regulatory Activity in Allogeneic T Cells. *Blood* **2009**, *114*, 3235–3243, doi:10.1182/blood-2008-12-195073.
262. Wang, Y.; Lawson, M.A.; Dantzer, R.; Kelley, K.W. LPS-Induced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Regulated in an Interferon- γ -Independent Manner by a JNK Signaling Pathway in Primary Murine Microglia. *Brain Behav Immun* **2010**, *24*, 201–209, doi:10.1016/j.bbi.2009.06.152.
263. Yan, Y.; Zhang, G.-X.; Gran, B.; Fallarino, F.; Yu, S.; Li, H.; Cullimore, M.L.; Rostami, A.; Xu, H. IDO Upregulates Regulatory T Cells via Tryptophan Catabolite and Suppresses Encephalitogenic T Cell

- Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **2010**, *185*, 5953–5961, doi:10.4049/jimmunol.1001628.
264. Kushwah, R.; Hu, J. Role of Dendritic Cells in the Induction of Regulatory T Cells. *Cell Biosci* 2011, *1*.
265. Munn, D.H.; Mellor, A.L. Indoleamine 2,3 Dioxygenase and Metabolic Control of Immune Responses. *Trends Immunol* 2013, *34*, 137–143.
266. Brenk, M.; Scheler, M.; Koch, S.; Neumann, J.; Takikawa, O.; Häcker, G.; Bieber, T.; von Bubnoff, D. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* **2009**, *183*, 145–154, doi:10.4049/jimmunol.0803277.
267. Chang, C.C.; Ciubotariu, R.; Manavalan, J.S.; Yuan, J.; Colovai, A.I.; Piazza, F.; Lederman, S.; Colonna, M.; Cortesini, R.; Dalla-Favera, R.; et al. Tolerization of Dendritic Cells by Ts Cells: The Crucial Role of Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 237–243, doi:10.1038/ni760.
268. Riol-Blanco, L.; Sánchez-Sánchez, N.; Torres, A.; Tejedor, A.; Narumiya, S.; Corbí, A.L.; Sánchez-Mateos, P.; Rodríguez-Fernández, J.L. The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed. *The Journal of Immunology* **2005**, *174*, 4070–4080, doi:10.4049/jimmunol.174.7.4070.
269. Hintzen, G.; Ohl, L.; del Rio, M.-L.; Rodriguez-Barbosa, J.-I.; Pabst, O.; Kocks, J.R.; Krege, J.; Hardtke, S.; Förster, R. Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node. *The Journal of Immunology* **2006**, *177*, 7346–7354, doi:10.4049/jimmunol.177.10.7346.
270. Förster, R.; Davalos-Miszlitz, A.C.; Rot, A. CCR7 and Its Ligands: Balancing Immunity and Tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008, *8*, 362–371.
271. Hsu, P.; Santner-Nanan, B.; Hu, M.; Skarratt, K.; Lee, C.H.; Stormon, M.; Wong, M.; Fuller, S.J.; Nanan, R. IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *The Journal of Immunology* **2015**, *195*, 3665–3674, doi:10.4049/jimmunol.1402898.
272. Coombes, J.L.; Siddiqui, K.R.R.; Arancibia-Cárcamo, C. V.; Hall, J.; Sun, C.M.; Belkaid, Y.; Powrie, F. A Functionally Specialized Population of Mucosal CD103+ DCs Induces Foxp3+ Regulatory T Cells via a TGF- β -and Retinoic Acid-Dependent Mechanism. *Journal of Experimental Medicine* **2007**, *204*, 1757–1764, doi:10.1084/jem.20070590.
273. Du, C.; Sriram, S. Mechanism of Inhibition of LPS-Induced IL-12p40 Production by IL-10 and TGF- β in ANA-1 Cells. In Proceedings of the Journal of Leukocyte Biology; Federation of American Societies for Experimental Biology, 1998; Vol. 64, pp. 92–97.
274. Ma, X.; Yan, W.; Zheng, H.; Du, Q.; Zhang, L.; Ban, Y.; Li, N.; Wei, F. Regulation of IL-10 and IL-12 Production and Function in Macrophages and Dendritic Cells. *F1000Res* 2015, *4*, 1–13.
275. Olivar, R.; Luque, A.; Cárdenas-Brito, S.; Naranjo-Gómez, M.; Blom, A.M.; Borràs, F.E.; Rodríguez de Córdoba, S.; Zipfel, P.F.; Aran, J.M. The Complement Inhibitor Factor H Generates an Anti-Inflammatory and Tolerogenic State in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **2016**, *196*, 4274–4290, doi:10.4049/jimmunol.1500455.

276. Klaver, E.J.; Kuijk, L.M.; Lindhorst, T.K.; Cummings, R.D.; Van Die, I. Schistosoma Mansoni Soluble Egg Antigens Induce Expression of the Negative Regulators SOCS1 and SHP1 in Human Dendritic Cells via Interaction with the Mannose Receptor. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0124089.
277. Cvetkovic, J.; Sofronic-Milosavljevic, L.; Ilic, N.; Gnjatovic, M.; Nagano, I.; Gruden-Movsesijan, A. Immunomodulatory Potential of Particular Trichinella Spiralis Muscle Larvae Excretory–Secretory Components. *Int J Parasitol* **2016**, *46*, 833–842, doi:10.1016/j.ijpara.2016.07.008.
278. Vendelova, E.; Ashour, D.; Blank, P.; Erhard, F.; Saliba, A.E.; Kalinke, U.; Lutz, M.B. Tolerogenic Transcriptional Signatures of Steady-State and Pathogen-Induced Dendritic Cells. *Front Immunol* **2018**, *9*.
279. Ohtani, M.; Hoshii, T.; Fujii, H.; Koyasu, S.; Hirao, A.; Matsuda, S. Cutting Edge: MTORC1 in Intestinal CD11c+CD11b+ Dendritic Cells Regulates Intestinal Homeostasis by Promoting IL-10 Production. *The Journal of Immunology* **2012**, *188*, 4736–4740, doi:10.4049/jimmunol.1200069.
280. Ferreira, G.B.; Vanherwegen, A.S.; Eelen, G.; Gutiérrez, A.C.F.; VanLommel, L.; Marchal, K.; Verlinden, L.; Verstuyf, A.; Nogueira, T.; Georgiadou, M.; et al. Vitamin D3 Induces Tolerance in Human Dendritic Cells by Activation of Intracellular Metabolic Pathways. *Cell Rep* **2015**, *10*, 711–725, doi:10.1016/j.celrep.2015.01.013.
281. Tamiya, T.; Kashiwagi, I.; Takahashi, R.; Yasukawa, H.; Yoshimura, A. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT Pathways: Regulation of T-Cell Inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31*, 980–985, doi:10.1161/ATVBAHA.110.207464.
282. Yoshimura, A.; Naka, T.; Kubo, M. SOCS Proteins, Cytokine Signalling and Immune Regulation. *Nat Rev Immunol* **2007**, *7*, 454–465.
283. Gutiérrez-Vázquez, C.; Quintana, F.J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* **2018**, *48*, 19–33.
284. Salazar, F.; Awuah, D.; Negm, O.H.; Shakib, F.; Ghaemmaghami, A.M. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway in the TLR4-Induced Tolerogenic Phenotype in Human DCs. *Sci Rep* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep43337.
285. Avancini, D.; Testori, A.; Fresolone, L.; Andolfi, G.; Vuono, M.; Martinelli, V.; Santoni de Sio, F.R.; Gregori, S. Aryl Hydrocarbon Receptor Activity Downstream of IL-10 Signaling Is Required to Promote Regulatory Functions in Human Dendritic Cells. *Cell Rep* **2023**, *42*, doi:10.1016/j.celrep.2023.112193.
286. Takenaka, M.C.; Quintana, F.J. Tolerogenic Dendritic Cells. *Semin Immunopathol* **2017**, *39*, 113–120.
287. Azukizawa, H.; Döhler, A.; Kanazawa, N.; Nayak, A.; Lipp, M.; Malissen, B.; Autenrieth, I.; Katayama, I.; Riemann, M.; Weih, F.; et al. Steady State Migratory RelB+ Langerin+ Dermal Dendritic Cells Mediate Peripheral Induction of Antigen-Specific CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *Eur J Immunol* **2011**, *41*, 1420–1434, doi:10.1002/eji.201040930.
288. Shih, V.F.S.; Davis-Turak, J.; MacAl, M.; Huang, J.Q.; Ponomarenko, J.; Kearns, J.D.; Yu, T.; Fagerlund, R.; Asagiri, M.; Zuniga, E.I.; et al. Control of RelB during Dendritic Cell Activation Integrates Canonical and Noncanonical NF-KB Pathways. *Nat Immunol* **2012**, *13*, 1162–1170, doi:10.1038/ni.2446.
289. Sun, S.C. The Non-Canonical NF-KB Pathway in Immunity and Inflammation. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 545–558.

290. Thomas, P.G.; Carter, M.R.; Da'dara, A.A.; DeSimone, T.M.; Harn, D.A. A Helminth Glycan Induces APC Maturation via Alternative NF- κ B Activation Independent of I κ B α Degradation. *The Journal of Immunology* **2005**, *175*, 2082–2090, doi:10.4049/jimmunol.175.4.2082.
291. Chaussabel, D.; Semnani, R.T.; McDowell, M.A.; Sacks, D.; Sher, A.; Nutman, T.B. Unique Gene Expression Profiles of Human Macrophages and Dendritic Cells to Phylogenetically Distinct Parasites. *Blood* **2003**, *102*, 672–681, doi:10.1182/blood-2002-10-3232.
292. Connor, L.M.; Tang, S.C.; Cognard, E.; Ochiai, S.; Hilligan, K.L.; Old, S.I.; Pellefigues, C.; White, R.F.; Patel, D.; Smith, A.A.T.; et al. Th2 Responses Are Primed by Skin Dendritic Cells with Distinct Transcriptional Profiles. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, 125–142, doi:10.1084/jem.20160470.
293. Stromnes, I.M.; Cerretti, L.M.; Liggitt, D.; Harris, R.A.; Goverman, J.M. Differential Regulation of Central Nervous System Autoimmunity by T H1 and TH17 Cells. *Nat Med* **2008**, *14*, 337–342, doi:10.1038/nm1715.
294. Steinman, R.M.; Hawiger, D.; Nussenzweig, M.C. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* **2003**, *21*, 685–711.
295. Cheng, H.; Chen, W.; Lin, Y.; Zhang, J.; Song, X.; Zhang, D. Signaling Pathways Involved in the Biological Functions of Dendritic Cells and Their Implications for Disease Treatment. *Molecular Biomedicine* **2023**, *4*.
296. Gregori, S.; Tomasoni, D.; Pacciani, V.; Scirpoli, M.; Battaglia, M.; Magnani, C.F.; Hauben, E.; Roncarolo, M.G. Differentiation of Type 1 T Regulatory Cells (Tr1) by Tolerogenic DC-10 Requires the IL-10-Dependent ILT4/HLA-G Pathway. *Blood* **2010**, *116*, 935–944, doi:10.1182/blood-2009-07-234872.
297. Raker, V.K.; Domogalla, M.P.; Steinbrink, K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol* **2015**, *6*.
298. Kanamori, M.; Nakatsukasa, H.; Okada, M.; Lu, Q.; Yoshimura, A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol* **2016**, *37*, 803–811.
299. Mellor, A.L.; Lemos, H.; Huang, L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Front Immunol* **2017**, *8*.
300. Barrat, F.J.; Cua, D.J.; Boonstra, A.; Richards, D.F.; Crain, C.; Savelkoul, H.F.; De Waal-Malefyt, R.; Coffman, R.L.; Hawrylowicz, C.M.; O'garra, A. *In Vitro Generation of Interleukin 10-Producing Regulatory CD4 T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)-and Th2-Inducing Cytokines*; Rockefeller University Press, 2002; Vol. 195;.
301. Meiler, F.; Zumkehr, J.; Klunker, S.; Rückert, B.; Akdis, C.A.; Akdis, M. In Vivo Switch to IL-10-Secreting T Regulatory Cells in High Dose Allergen Exposure. *Journal of Experimental Medicine* **2008**, *205*, 2887–2898, doi:10.1084/jem.20080193.
302. Ilic, N.; Gruden-Movsesijan, A.; Sofronic-Milosavljevic, L. *Trichinella Spiralis*: Shaping the Immune Response. *Immunol Res* **2012**, *52*, 111–119.
303. Sofronic-Milosavljevic, L.; Ilic, N.; Pinelli, E.; Gruden-Movsesijan, A. Secretory Products of *Trichinella Spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies. *J Immunol Res* **2015**, *2015*.

304. Linhart, B.; Bigenzahn, S.; Hartl, A.; Lupinek, C.; Thalhamer, J.; Valenta, R.; Wekerle, T. Costimulation Blockade Inhibits Allergic Sensitization but Does Not Affect Established Allergy in a Murine Model of Grass Pollen Allergy. *The Journal of Immunology* **2007**, *178*, 3924–3931, doi:10.4049/jimmunol.178.6.3924.
305. Korb, E.; Drinić, M.; Wagner, A.; Geissler, N.; Inic-Kanada, A.; Peschke, R.; Joachim, A.; Wiedermann, U.; Schabussova, I. Reduction of Allergic Lung Disease by Mucosal Application of Toxoplasma Gondii-Derived Molecules: Possible Role of Carbohydrates. *Front Immunol* **2021**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.612766.
306. Paris, J.L.; de la Torre, P.; Flores, A.I. New Therapeutic Approaches for Allergy: A Review of Cell Therapy and Bio-or Nano-Material-Based Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
307. Smole, U.; Schabussova, I.; Pickl, W.F.; Wiedermann, U. Murine Models for Mucosal Tolerance in Allergy. *Semin Immunol* **2017**, *30*, 12–27.
308. Williams, M.; Ginhoux, F.; Jakubzick, C.; Naik, S.H.; Onai, N.; Schraml, B.U.; Segura, E.; Tussiwand, R.; Yona, S. Dendritic Cells, Monocytes and Macrophages: A Unified Nomenclature Based on Ontogeny. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14*, 571–578.
309. Plantinga, M.; Hammad, H.; Lambrecht, B.N. Origin and Functional Specializations of DC Subsets in the Lung. *Eur J Immunol* **2010**, *40*, 2112–2118.
310. Camp, B.; Jorde, I.; Sittel, F.; Pausder, A.; Jeron, A.; Bruder, D.; Schreiber, J.; Stegemann-Koniszewski, S. Comprehensive Analysis of Lung Macrophages and Dendritic Cells in Two Murine Models of Allergic Airway Inflammation Reveals Model- and Subset-Specific Accumulation and Phenotypic Alterations. *Front Immunol* **2024**, *15*, doi:10.3389/fimmu.2024.1374670.
311. Bernatchez, E.; Gold, M.J.; Langlois, A.; Lemay, A.M.; Brassard, J.; Flamand, N.; Marsolais, D.; McNagny, K.M.; Blanchet, M.R. Pulmonary CD103 Expression Regulates Airway Inflammation in Asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2015**, *308*, L816–L826, doi:10.1152/ajplung.00319.2014.
312. Webb, D.C.; McKenzie, A.N.J.; Koskinen, A.M.L.; Yang, M.; Mattes, J.; Foster, P.S. Integrated Signals Between IL-13, IL-4, and IL-5 Regulate Airways Hyperreactivity. *The Journal of Immunology* **2000**, *165*, 108–113, doi:10.4049/jimmunol.165.1.108.
313. Chakma, C.R.; Good-Jacobson, K.L. Requirements of IL-4 during the Generation of B Cell Memory. *The Journal of Immunology* **2023**, *210*, 1853–1860, doi:10.4049/jimmunol.2200922.
314. Cernescu, L.; Haidar, L.; Panaitescu, C. Dendritic Cell-CD4 + T Cell Interaction: The Differential Role of IL-4/IL-13 in Serum IgE Levels in House Dust Mite Allergic Patients. *Exp Ther Med* **2020**, *21*, doi:10.3892/etm.2020.9527.
315. O’byrne, P.M.; Inman, M.D.; Parameswaran, K. The Trials and Tribulations of IL-5, Eosinophils, and Allergic Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2001**, *108*, 503–508, doi:10.1067/mai.2001.119149.
316. Takatsu, K.; Nakajima, H. IL-5 and Eosinophilia. *Curr Opin Immunol* **2008**, *20*, 288–294.
317. Humbles, A.A.; Lloyd, C.M.; McMillan, S.J.; Friend, D.S.; Xanthou, G.; McKenna, E.E.; Ghiran, S.; Gerard, N.P.; Yu, C.; Orkin, S.H.; et al. A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *Science (1979)* **2004**, *305*, 1776–1779, doi:10.1126/science.1100283.

318. Long, H.; Liao, W.; Wang, L.; Lu, Q. A Player and Coordinator: The Versatile Roles of Eosinophils in the Immune System. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2016, *43*, 96–108.
319. Deniz, G.; Akdis, M. NK Cell Subsets and Their Role in Allergy. *Expert Opin Biol Ther* 2011, *11*, 833–841.
320. Deniz, G.; Van De Veen, W.; Akdis, M. Natural Killer Cells in Patients with Allergic Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013, *132*, 527–535.
321. Marone, G.; Granata, F.; Pucino, V.; Pecoraro, A.; Heffler, E.; Loffredo, S.; Scadding, G.W.; Varricchi, G. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01387.
322. Wang, M.; Takeda, K.; Shiraishi, Y.; Okamoto, M.; Dakhama, A.; Joetham, A.; Gelfand, E.W. Peanut-Induced Intestinal Allergy Is Mediated through a Mast Cell-IgE-FcεRI-IL-13 Pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, *126*, doi:10.1016/j.jaci.2010.05.017.
323. Reynolds, L.A.; Filbey, K.J.; Maizels, R.M. Immunity to the Model Intestinal Helminth Parasite *Heligmosomoides Polygyrus*. *Semin Immunopathol* 2012, *34*, 829–846.
324. Chen, H.; Xu, X.; Teng, J.; Cheng, S.; Bunjhoo, H.; Cao, Y.; Liu, J.; Xie, J.; Wang, C.; Xu, Y.; et al. CXCR4 Inhibitor Attenuates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation and Hyperresponsiveness by Inhibiting Th17 and Tc17 Cell Immune Response. *Exp Ther Med* **2016**, *11*, 1865–1870, doi:10.3892/etm.2016.3141.
325. Huber, M.; Heink, S.; Grothe, H.; Guralnik, A.; Reinhard, K.; Elflein, K.; Hünig, T.; Mittrücker, H.W.; Brüstle, A.; Kamradt, T.; et al. Th17-like Developmental Process Leads to CD8+ Tc17 Cells with Reduced Cytotoxic Activity. *Eur J Immunol* **2009**, *39*, 1716–1725, doi:10.1002/eji.200939412.
326. Shi, W.; Xu, N.; Wang, X.; Vallée, I.; Liu, M.; Liu, X. Helminth Therapy for Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Current and Future Perspectives. *J Inflamm Res* 2022, *15*, 475–491.
327. Mahnke, K.; Johnson, T.S.; Ring, S.; Enk, A.H. Tolerogenic Dendritic Cells and Regulatory T Cells: A Two-Way Relationship. *J Dermatol Sci* 2007, *46*, 159–167.
328. Akdis, C.A.; Blaser, K. Role of IL-10 in Allergen-Specific Immunotherapy and Normal Response to Allergens. *Microbes Infect* **2001**, *3*, 891–898.
329. Lin, A.A.; Freeman, A.F.; Nutman, T.B. IL-10 Indirectly Downregulates IL-4-Induced IgE Production by Human B Cells. *Immunohorizons* **2018**, *2*, 398–406, doi:10.4049/immunohorizons.1800076.
330. Tirado-Rodriguez, B.; Ortega, E.; Segura-Medina, P.; Huerta-Yepe, S. TGF-β: An Important Mediator of Allergic Disease and a Molecule with Dual Activity in Cancer Development. *J Immunol Res* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/318481.

BIOGRAFIJA

Sofija J. Glamočlija Jekić je rođena 12. maja 1994. godine u Beogradu. Nakon završetka gimnazijskog školovanja u Beogradu upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 2013. godine. Osnovne akademske studije je završila sa prosečnom ocenom 8,72 i upisala master akademske studije Imunobiologije na istom fakultetu 2017. godine. Master studije je završila 2018. godine sa prosekom 9,67, nakon čega upisuje doktorske akademske studije Biološkog fakulteta na modulu Imunobiologija iste godine. Od novembra 2018. godine je uključena u naučno-istraživački rad i zaposlena na Institutu za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu (INEP-UB) na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju gde je trenutno u zvanju istraživača saradnika. Do sada je učestvovala na 5 nacionalna projekta (173047, 5906, 115003, 7542203 i 500-7339/2021), dva bilateralna projekta Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja sa Republikom Austrijom (#337-00-577/2021-09/41 i #337-00-577/2021-09/41) i jednom međunarodnom projektu (COST Action # CA20110). Tokom studija je učestvovala na nekoliko međunarodnih konferencija, bioinformatičkih radionica i kurseva u Srbiji i inostranstvu. Objavila je dva rada kao prvi autor u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21. Kao koautor je objavila sedam publikacija (1 - M21a+, 1 - M21a, 4 - M21, 1- M22). Kumulativni IF radova iznosi 50.1.

Član je Srpskog društva za ekstracelularne vezikule, Međunarodnog društvo za ekstracelularne vezikule, Društva imunologa Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju, Biohemijskog društva Srbije i Srpskog biološkog društva.

Прилог 1

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Софија Гламочлија Јекић

Број индекса _____ Б3005/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Имуномодулаторни ефекат екстрацелуларних везикула L1 ларви на моделу респираторне алергије код BALB/с мишева

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Софија Гламочлија Јекић

Број индекса Б3005/2018

Студијски програм Биологија; модул имунобиологија

Наслов рада **Имуномодулаторни ефекат екстрацелуларних везикула L1 ларви на моделу респираторне алергије код BALB/с мишева**

Ментор др Маја Косановић, др Биљана Божић Недељковић

Потписани/а _____

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Имуномодулаторни ефекат екстрацелуларних везикула L1 ларви на моделу респираторне алергије код BALB/с мишева

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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