

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan V. Koprivica

**Efekat primene etil-piruvata na razvoj  
dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan V. Koprivica

**Effects of ethyl pyruvate on the development  
of type 1 diabetes in C57BL/6 mice**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

MENTORI:

**dr Ivana Stojanović**, naučni savetnik

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

**dr Biljana Božić Nedeljković**, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Nataša Ilić**, viši naučni saradnik

Institut za primenu nuklearne energije, Univerzitet u Beogradu

**dr Nebojša Jasnić**, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Tamara Saksida**, naučni savetnik

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

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (OI173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvaljujem se

**dr Ivani Stojanović**, mom mentoru, na pruženoj šansi, razumevanju, strpljenju, poverenju, i beskrajnom optimizmu koji je uvek podrazumeo „izvući ćemo nešto iz toga sigurno“. Bilo je zadovoljstvo učiti, istraživati i sazrevati pod njenim mentorstvom.

**dr Biljani Božić Nedeljković**, na posvećenosti i konstruktivnim i rigoroznim sugestijama koje su unapredile ovu disertaciju.

**dr Nataši Ilić**, na predusretljivosti, ažurnosti i korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

**dr Nebojši Jasniću**, na ukazanom vremenu i stručnim i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

**dr Tamari Saksidi**, na ukazanoj pomoći, uloženom trudu i savetima tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i na i uvek prijateljskoj atmosferi.

Milici Vujičić, čije mi je prisustvo i prijateljstvo na Institutu značilo više nego što je svesna.

Dragici, Nadi i Nataliji na značajnoj pomoći u eksperimentalnom radu, podršci, savetima i na svim dragim trenucima. Ne bih mogao da zamislim (za mene) lepši tim od našeg.

Mojim dragim kolegama Bokiju, Milici L, Nedi, Suzi, Đorđu, Miri i Milji na kolegijalnosti, pomoći i što su doprineli da se od početka osećam kao deo naše divne grupe.

Svim članovima laboratorije 66 na kolegijalnosti, sjajnoj saradnji i druženju.

Sanji Despotović na ukazanoj pomoći oko meni omiljenog rezultata ove disertacije.

Aleksandri Elbakjan za kreiranje Sci-hub-a, bez kojeg ova disertacija ne bi bila napisana.

Džiju, Milki, Stefanu, Gogi, Marku, Džordanovcima i mojoj porodici na svojoj pruženoj ljubavi, zabavi i podršci. Vaše prisustvo je sve učinilo lakšim.



## Efekat primene etil-piruvata na razvoj dijabetesa tipa 1 kod C57BL/6 miševa

### Sažetak

Dijabetes tipa 1 (DT1) je autoimunska bolest koja podrazumeva inflamaciju u pankreasu i smrt  $\beta$  ćelija, što kao posledicu ima smanjenje nivoa insulina, a povećanje nivoa glukoze u krvi. S obzirom na to da lek za DT1 još nije pronađen i da se obolele osobe oslanjaju na doživotni tretman insulinom, konstantni naponi se ulažu u razvoj novih terapijskih pristupa. U tom cilju, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivano dejstvo etil-piruvata, koji ima potvrđena antiinflamacijska svojstva, na razvoj DT1 u modelu bolesti na C57BL/6 miševima kojim je DT1 hemijski izazvan primenom višestrukih malih doza streptozotocina. Njegova profilaktička primena u navedenom modelu DT1 je dovela do smanjenja incidence bolesti, što je bilo praćeno manjom infiltracijom imunskih ćelija u pankreasna ostrvca i smanjenjem ekspresije primarnog ciljnog molekula etil-piruvata, HMGB1 (engl. High Mobility Group Box 1). Mehanizmi protektivnog dejstva etil-piruvata su obuhvatali stimulaciju regulatorne grane imunskog odgovora, tj. uvećanje udela tolerogenih dendritskih ćelija i regulatornih T (Treg) ćelija. Efekat etil-piruvata na Treg ćelije je podrazumevao njihovu uvećanu proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i supresivnu funkciju i to prevashodno prema efektorskim T-bet<sup>+</sup> T limfocitima. Pored uticaja na Treg ćelije u patološkim uslovima, etil-piruvat je ostvario stimulatorni efekat na ove ćelije i u homeostatskim uslovima, bilo da je primenjivan oralno ili intraperitonealno. Komplementarna *in vitro* istraživanja su pokazala da etil-piruvat ostvaruje svoj potencirajući uticaj na proliferaciju Treg ćelija, i to modulisanjem ćelijskog metabolizma putem stimulacije glikolize i inhibicije  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, dok je uticaj na Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju potpuno izostao. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na značajan potencijal koji etil-piruvat ima u smirivanju inflamacije, ključnog efektorskog mehanizma tokom DT1, te da se njegova primena u lečenju DT1 može istraživati u budućim prekliničkim i kliničkim studijama.

**Ključne reči:** dijabetes tipa 1, etil-piruvat, streptozotocin, inflamacija, regulatorne T ćelije

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Imunologija

# Effects of ethyl pyruvate on the development of type 1 diabetes in C57BL/6 mice

## Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease which triggers inflammation in the pancreas and the death of pancreatic  $\beta$ -cells, resulting in a decrease in insulin levels and increase of blood glucose levels. Since a cure for T1D still hasn't been found and patients with T1D rely on a life-long insulin treatment, constant efforts are invested to develop new therapeutical approaches. To that end, this doctoral thesis was devoted to testing the effects of ethyl pyruvate, known to have anti-inflammatory properties, on the development of T1D, induced by multiple low-doses of streptozotocin, in C57BL/6 mice. Its prophylactic application in the aforementioned T1D model resulted in decreased disease incidence, accompanied by lessened immune cell infiltration into the pancreatic islets and reduced expression of the primary target molecule of ethyl pyruvate, HMGB1 (High Mobility Group Box 1). Ethyl pyruvate accomplished its protective influence by stimulating the regulatory arm of the immune response, namely by increasing the proportion of tolerogenic dendritic cells and regulatory T (Treg) cells. It also exerted its effects on Treg cells by increasing their proliferation, differentiation, migration and suppressive function, primarily towards effector T-bet<sup>+</sup> T cells. Aside from its effects on Treg cells in pathological conditions, ethyl pyruvate stimulated Treg cells in homeostatic conditions, whether applied orally or intraperitoneally. Complementary *in vitro* experiments showed that ethyl pyruvate potentiates Treg cell proliferation, which is achieved through the modulation of cell metabolism, by stimulating glycolysis and suppressing fatty acid  $\beta$ -oxidation, while there is no effect on the citric acid cycle or oxidative phosphorylation. The results of this doctoral thesis indicate a notable potential of ethyl pyruvate to inhibit inflammation, a key part of T1D pathology, and that its application in T1D therapy can be further explored in preclinical and clinical studies.

**Key words:** type 1 diabetes, ethyl pyruvate, streptozotocin, inflammation, regulatory T cells

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Immunobiology

## **Lista skraćenica:**

AMP – adenzin monofosfat

ATP – adenzin trifosfat

BB – engl. Biobreeding

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

CFSE – karboksifluorescin sukcinimidil estar

CPT1 – karnitin palmitoil-transferaza 1 (engl. Carnitine Palmitoyltransferase 1)

CTLA-4 – antigen koji je udružen sa citotoksičnim T limfocitima (engl. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4)

DAMP – molekularni obrasci oštećenja (engl. Damage-Associated Molecular Patterns)

DT1 – dijabetes tipa 1

EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina

ELISA – engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

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

FoxP3 – engl. Forkhead box P3

GAD65 – 65 kDa subjedinica dekarboksilaze glutaminske kiseline

GALT – limfno tkivo pridruženo crevima (engl. Gut-Associated Lymphoid Tissue)

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GITR – engl. Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor

GLUT – transporter za glukozu (engl. Glucose Transporter)

HBSS – Henkov rastvor (engl. Hank's Balanced Salt Solution)

HK2 – heksokinaza 2

HIF-1 $\alpha$  – engl. Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$

HLA – humani leukocitni antigen

HMGB1 – engl. High Mobility Group Box 1

HRP – peroksidaza poreklom iz rena (eng. Horse Radish Peroxidase)

IA-2 – protein asociran sa insulinomom 2 (engl. Insulinoma-Associated protein 2)

IGRP – katalitička subjedinica glukozo-6-fosfataze specifične za pankreasna ostrvca (engl. Islet-specific Glucose-6-phosphatase catalytic subunit-Related Protein)

IFN – interferon



IL – interleukin

LPS – lipopolisaharid

MFI – prosečni intenzitet fluorescencije (engl. Mean Fluorescence Intensity)

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

mTOR – mehanistička meta rapamicina (engl. mechanistic Target Of Rapamycin)

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

NF- $\kappa$ B – nuklearni faktor  $\kappa$ B

NFAT – nuklearni faktor aktiviranih T limfocita

NK – urođenoubilačke (NK, engl. Natural Killer) ćelije

NO – azot oksid

NOD – engl. Non-Obese Diabetic

PD-1 – protein 1 programirane ćelijske smrti (engl. Programmed cell Death protein 1)

PDH – piruvat dehidrogenaza

PDK4 – kinaza piruvat dehidrogenaze 4

PBS – engl. Phosphate Buffered Saline

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (engl. Polymerase Chain Reaction)

RAGE – engl. Receptor for Advanced Glycation End products

ROR $\gamma$ T – engl. RAR-related Orphan Receptor  $\gamma$ T

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

RPMI – engl. Roswell Park Memorial Institute

SOCS – engl. Suppressor Of Cytokine Signaling

STAT – engl. Signal Transducer and Activator of Transcription

STZ – streptozotocin

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

TGF- $\beta$  – faktor transformacije rasta  $\beta$  (engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ )

Th – pomoćnički T limfociti (engl. T helper cells)

TLR – receptor sličan Tollu (engl. Toll-Like Receptor)

TMB – tetrametilbenzidin

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora  $\alpha$  (engl. Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ )

Treg ćelije – regulatorne T ćelije

## **Sadržaj:**

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Dijabetes tipa 1.....	2
1.2. Etiologija dijabetesa tipa 1.....	4
1.2.1. Genska osnova dijabetesa tipa 1.....	5
1.2.2. Spoljašnji faktori kao pokretači dijabetesa tipa 1.....	6
1.3. Eksperimentalni modeli dijabetesa tipa 1.....	8
1.3.1. Model dijabetesa tipa 1 indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina.....	9
1.4. Imunopatogeneza dijabetesa tipa 1.....	9
1.4.1. Značaj regulatornih T limfocita u dijabetesu tipa 1.....	14
1.5. Terapijski pristupi u dijabetesu tipa 1.....	15
1.5.1. Terapija dijabetesa tipa 1 putem modulacije efektorskih T i B limfocita.....	15
1.5.2. Terapija dijabetesa tipa 1 putem modulacije Treg ćelija.....	16
1.5.3. Primena antiinflamacijskih jedinjenja u terapiji dijabetesa tipa 1.....	16
1.6. Antiinflamacijska dejstva etil-piruvata.....	17
<b>2. Ciljevi</b> .....	19
<b>3. Materijal i metode</b> .....	21
3.1. Reagensi i rastvori.....	22
3.2. Eksperimentalne životinje .....	23
3.3.1. Indukcija dijabetesa tipa 1 i tretman etil-piruvatom.....	23
3.3.2. Tretman zdravih miševa etil-piruvatom.....	23
3.4. <i>In vivo</i> test proliferacije.....	24
3.5. <i>Ex vivo</i> izolovanje ćelija i tkiva.....	24
3.5.1. Izolovanje ćelija slezine, pankreasnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča.....	24
3.5.2. Izolovanje mononuklearnih infiltrata pankreasa.....	24
3.5.3. Izolovanje pankreasnih ostrvaca.....	25
3.5.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka.....	25
3.5.5. Izolovanje ćelija lamine proprije tankog creva.....	25
3.5.6. Prečišćavanje T ćelija magnetnom separacijom.....	26

3.6. <i>In vitro</i> diferencijacija podtipova T limfocita.....	26
3.7. Određivanje broja ćelija metodom bojenja tripan plavim .....	27
3.8. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije .....	27
3.8.1. Detekcija površinskih ćelijskih markera.....	27
3.8.2. Detekcija unutarćelijskih citokina.....	28
3.8.3. Detekcija unutarjedarnih proteina i nukleotida.....	28
3.8.4. Detekcija unutarćelijskog azot oksida i reaktivnih vrsta kiseonika.....	29
3.9. Test bioluminiscencije ATP.....	29
3.10. <i>In vitro</i> test supresije proliferacije.....	29
3.11. <i>In vitro</i> test migracije.....	30
3.12. Imunoblot analiza.....	31
3.13. Izolovanje RNK.....	32
3.14. Reakcija reverzne transkripcije.....	32
3.15. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu .....	32
3.16. Merenje sekrecije citokina testom ELISA.....	33
3.17. Histološka analiza.....	34
3.17.1. Priprema histoloških preparata u parafinu.....	34
3.17.2. Bojenje tkivnih preseka hematoksilinom.....	34
3.17.3. Imunohistohemija.....	35
3.18. Statistička obrada podataka.....	36
<b>4. Rezultati.....</b>	<b>37</b>
4.1. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na razvoj dijabetesa tipa 1.....	38
4.1.1. Uticaj tretmana etil-piruvatom na klinički tok dijabetesa tipa 1.....	38
4.1.2. Uticaj etil-piruvata na morfologiju pankreasnih ostrvaca u dijabetesu tipa 1.....	39
4.1.3. Uticaj etil-piruvata na funkciju pankreasnih ostrvaca u dijabetesu tipa 1.....	40
4.2. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na ćelije imunskog sistema u dijabetesu tipa 1.....	42
4.2.1. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na antigen-prezentujuće ćelije urođene imunosti u dijabetesu tipa 1.....	42
4.2.2. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na ćelije adaptivne imunosti tokom dijabetesa tipa 1.....	45
4.2.3. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na Treg ćelije u dijabetesu tipa 1.....	49

4.2.4. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija u dijabetesu tipa 1.....	53
4.2.5. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na migraciju Treg ćelija u dijabetesu tipa 1.....	54
4.2.6. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na aktivaciju Treg ćelija i njihovu supresiju Th1 i Th17 odgovora u dijabetesu tipa 1.....	56
4.3. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na diferencijaciju imunskih ćelija.....	59
4.3.1. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na diferencijaciju Th1 i Th17 podtipova T limfocita.....	60
4.3.2. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija.....	61
4.4. Uticaj <i>in vivo</i> tretmana etil-piruvatom na broj Treg ćelija u peritonealnoj duplji i crevima zdravih miševa.....	63
4.5. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na fenotip Treg ćelija.....	65
4.5.1. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na sposobnost supresije Treg ćelija.....	67
4.5.2. Uticaj primene etil-piruvata na produkciju ATP u <i>in vitro</i> diferenciranim Treg ćelijama.....	69
4.5.3. Uticaj <i>in vitro</i> primene etil-piruvata na mTOR signalni put u Treg ćelijama.....	73
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>76</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>92</b>

# 1. Uvod

## 1.1. Dijabetes tipa 1

Kako bi se obezbedilo optimalno funkcionisanje ljudskog organizma, neophodna je striktna kontrola nivoa glukoze u krvi. Održavanje homeostaze glukoze je postignuto delovanjem visoko sofisticirane mreže hormona i neuropeptida koje oslobodaju mozak, pankreas, jetra, creva, kao i masno i mišićno tkivo. Pankreas predstavlja ključni organ zbog sekrecije hormona insulina, koji snižava količinu glukoze u krvi, i glukagona, koji ima suprotno dejstvo. Endokrine ćelije pankreasa su grupisane zajedno, formirajući Langerhansova ostrvca, a 65–80% tih ćelija čine  $\beta$  ćelije koje proizvode insulin (Röder i sar., 2016). Nakon što se insulin veže za svoj receptor na ćelijama mišićnog ili masnog tkiva, hepatocitima i drugim ćelijama, indukuje se ispoljavanje transportera za glukozu (GLUT, engl. Glucose Transporter) tip 4, čime se omogućava preuzimanje glukoze zavisno od insulina, a kao posledica toga dolazi do smanjenja nivoa glukoze u krvi. Dodatno, insulin u ovim tkivima promovise i konverziju prostih monosaharida (uključujući glukozu) i amino-kiselina u kompleksne makromolekule kao što su proteini, lipidi i glikogen (Leto i sar., 2012).

Dijabetes tipa 1 (DT1) je hronična autoimunska bolest koja se razvija kao posledica uništavanja  $\beta$  ćelija pankreasa. Iako veći broj tipova ćelija učestvuje u patogenezi DT1, ključnu ulogu imaju autoreaktivni pomoćnički  $CD4^+$  T limfociti tip 1, tj. Th1 ćelije (engl. T helper cells 1) koje proizvode proinflamacijski citokin interferon (IFN)- $\gamma$  (Haskins i Cooke, 2011). Kada se broj  $\beta$  ćelija dovoljno smanji i njihova funkcija bude suprimirana zbog prisutne inflamacije, nedostatak insulina onemogućava tkivima da preuzmu glukozu koja im je neophodna za održavanje aktivnosti. Zbog toga je DT1 bila smrtonosna bolest, sve do otkrića značaja insulina i razvoja terapije koja podrazumeva primenu egzogenog insulina (Wållberg i Cooke, 2013).

Iako se često smatra da se jasni simptomi DT1 javljaju nakon što je već 90–95%  $\beta$  ćelija uništeno, analiza pankreasa individua sa tek postavljenom dijagnozom DT1 je pokazala da se oko 70% pankreasnih ostrvaca odlikuje potpunim odsustvom insulina, a da je od ostrvaca koja i dalje sadrže insulin oko 20% u stanju inflamacije. Kod individua koje imaju DT1 duže od pet godina većina preostalih ostrvaca ne proizvodi insulin, dok broj drugih ćelija koje proizvode hormone ( $\alpha$  ćelije koje sekretuju glukagon i  $\delta$  ćelije koje sekretuju somatostatin) ostaje isti, što još jednom ukazuje da se DT1 zasniva na selektivnom gubitku  $\beta$  ćelija pankreasa koje proizvode insulin (Atkinson i sar., 2014).

Kod čoveka, dijagnoza DT1 se postavlja na osnovu nekoliko utvrđenih rezultata. Oni uključuju hiperglikemiju – izmerenu koncentraciju glukoze u krvi iznad 7 mmol/l (126 mg/dl) nakon 12 sati gladovanja ili nasumično izmerenu koncentraciju glukoze iznad 11,1 mmol/l (200 mg/dl) uz ispoljene simptome, ili patološke vrednosti rezultata testa oralne tolerancije na glukozu. Deca sa DT1 (juvenilni dijabetes) često ispoljavaju simptome u koje spadaju prekomerno izlučivanje mokraće (poliurija), prekomernu žeđ (polidipsija), prekomernu glad (polifagija), zamor i gubitak telesne mase, a oko trećina se odlikuje i dijabetesnom ketoacidozom (DiMeglio i sar., 2018). U okolnostima nedostatka insulina povećava se razgradnja masnog tkiva, a nastale masne kiseline iz cirkulacije preuzima jetra i oksiduje ih do ketonskih tela (aceton, acetosirćetna i beta-hidroksibuterna kiselina) koji mogu biti korišćeni za dobijanje energije umesto glukoze. Ketoacidoza se javlja kao posledica nakupljanja ketona u krvi, što joj povećava kiselost. Hiperglikemija i visok nivo ketona u krvi uzrokuju povećanu produkciju urina u bubrezima, uzrokujući hipovolemiju – smanjenje zapremine vanćelijske tečnosti u telu, kao i

smanjenu filtraciju u bubrežnim glomerulima, što dodatno pogoršava stanje hiperglikemije (Umpierrez i sar., 2016).

Iako sistemska hiperglikemija utiče na sve organe i tipove ćelija, najviše su pogođene ćelije koje u uslovima hiperglikemije ne mogu efikasno kontrolisati transport glukoze u ćeliju, što rezultuje u povećanju unutarćelijske koncentracije glukoze i posledičnim patološkim promenama. U takve ćelije se ubrajaju endotelne ćelije u kapilarima mrežnjače oka, mezengijalne ćelije u bubrežnim glomerulima, kao i neuroni i Švanove ćelije u perifernim nervima. Zbog toga u komplikacije koje prate DT1 spadaju ateroskleroza, retinopatija, nefropatija, neuropatija i druge. Dijabetesna retinopatija predstavlja glavni uzrok stečenog slepila kod odraslih, dok dijabetesna nefropatija najviše doprinosi otkazivanju rada bubrega (Stirban i sar., 2008).

Kod odraslih ispoljavanje DT1 može biti varijabilno i ne moraju biti ispoljeni klasični simptomi uočeni kod dece. Iako se DT1 standardno definiše kao bolest koja se javlja u juvenilnom stadijumu, može se ispoljiti u bilo kom dobu, a u oko 50% slučajeva DT1 se razvija kod odraslih osoba (DiMeglio i sar., 2018).

Brojne epidemiološke studije distribucije DT1 u svetu su ukazale na značajnu varijaciju incidence ove bolesti između različitih starosnih ili etničkih grupa i geografskih lokacija (Xia i sar., 2019). Po najnovijem Atlasu dijabetesa koji već 20 godina izdaje Internacionalna Federacija za Dijabetes (International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 2019), oko 1.100.000 dece i adolescenata (mlađih od 20 godina) imaju razvijen DT1. Incidenca DT1 kod dece i adolescenata je u porastu u mnogim zemljama, naročito kod individua mlađih od 15 godina, sa oko 100.000 novopotvrđenih obolelih u toj grupi godišnje. Ukupni godišnji porast razvoja ove bolesti je procenjen na oko 3%. Analizom podataka prikupljenih u periodu od 1982. do 2005. godine sa teritorije grada Beograda ustanovljen je značajni trend porasta incidence razvoja DT1 kod osoba mlađih od 15 godina, a koji je iznosio 5,4% (Sipetic i sar., 2013).

Prisustvo antitela specifičnih za autoantigene  $\beta$  ćelija trenutno predstavlja najraniji utvrđeni znak pojave autoimunosti u DT1 (Regnell i Lernmark, 2017). Ta autoantitela se javljaju mnogo meseci ili godina pre pojave simptoma bolesti i njihova uloga u patogenezi bolesti se i dalje razmatra, a svakako služe kao biomarkeri razvoja autoimunosti. Iako to nije dokazano, smatra se da se ova antitela produkuju usled dužeg izlaganja autoantigenima  $\beta$  ćelija. Najčešća autoantitela asocirana sa DT1 su specifična za insulin, 65 kDa subjedinicu dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD65), protein asociran sa insulinomom 2 (IA-2, engl. Insulinoma-Associated protein 2) ili transporter cinka 8 (ZNT8). Tokom ranog detinjstva kod osoba predisponiranih za razvoj DT1, prvo se javljaju antitela specifična za insulin i/ili GAD65, dok se retko prvo detektuju autoantitela specifična za IA-2 ili ZNT8. Uprkos velikom broju istraživanja, još uvek nije razjašnjeno šta uzrokuje pojavu prvih autoantitela asociranih sa ovom bolešću (Katsarou i sar., 2017). Oko 96% individua sa DT1 poseduju makar jedno od ova četiri autoantitela, a mogu biti prisutna i brojna druga. Dodatno, prisustvo više autoantitela značajno povećava šansu za razvoj DT1 – 70% osoba sa DT1 su pozitivna na tri do četiri različita autoantitela, dok samo 10% poseduje jedno autoantitelo (Regnell i Lernmark, 2017). Novija istraživanja su ukazala i na postojanje autoantitela specifičnih za PDX1 kod pacijenata sa DT1, sugerišući da PDX1 biva prepoznat kao autoantigen. PDX1 je transkripcioni faktor koji ima ulogu u embrionalnom razviću pankreasa (Zhu i sar., 2017), a utvrđeno je i da mutacije gena koji kodira ovaj protein ometaju formiranje endokrinog pankreasa kod čoveka i doprinose predispoziciji za razvoj DT1 (Wang i sar., 2019). Osim u dijagnostici, prisustvo autoantitela može biti iskorišćeno i za identifikaciju osoba sa povišenim rizikom od razvoja DT1, kroz njihovu detekciju kod srodnika

obolelih ili u opštoj populaciji (Atkinson i sar., 2014). Pored autoantitela, kao biomarker DT1 se standardno koristi i nivo HbA1C, glikozilirane forme hemoglobina (Ding i sar., 2018). Dodatno, jedan od potencijalnih biomarkera DT1 predstavlja hromogranin A, sekretorni protein koji se proizvodi u različitim tipovima endokrinih ćelija, uključujući i  $\beta$  ćelije, i ima ulogu u unutarćelijskom skladištenju i sekretovanju peptidnih produkata ovih ćelija. Prisustvo dijabetogenih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelija specifičnih za hromogranin A ili njegove fragmente je utvrđeno kod obolelih od DT1. Najnovija istraživanja sugeriraju da se bi se nivo hromogranina A u krvi mogao koristiti kao rani indikator određenih komplikacija DT1. Utvrđeno je da se među obolelima od DT1 autoimunski gastritis ili hiperplazija enterohromafinih ćelija češće javljaju kod pacijenata sa visokim prisustvom hromogranina A, a zna se da usled ovih poremećaja može doći do razvoja gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora, koji se oko 100 puta češće javljaju kod obolelih od DT1 nego u opštoj populaciji (Herold i sar., 2018; Herold i sar., 2019a).

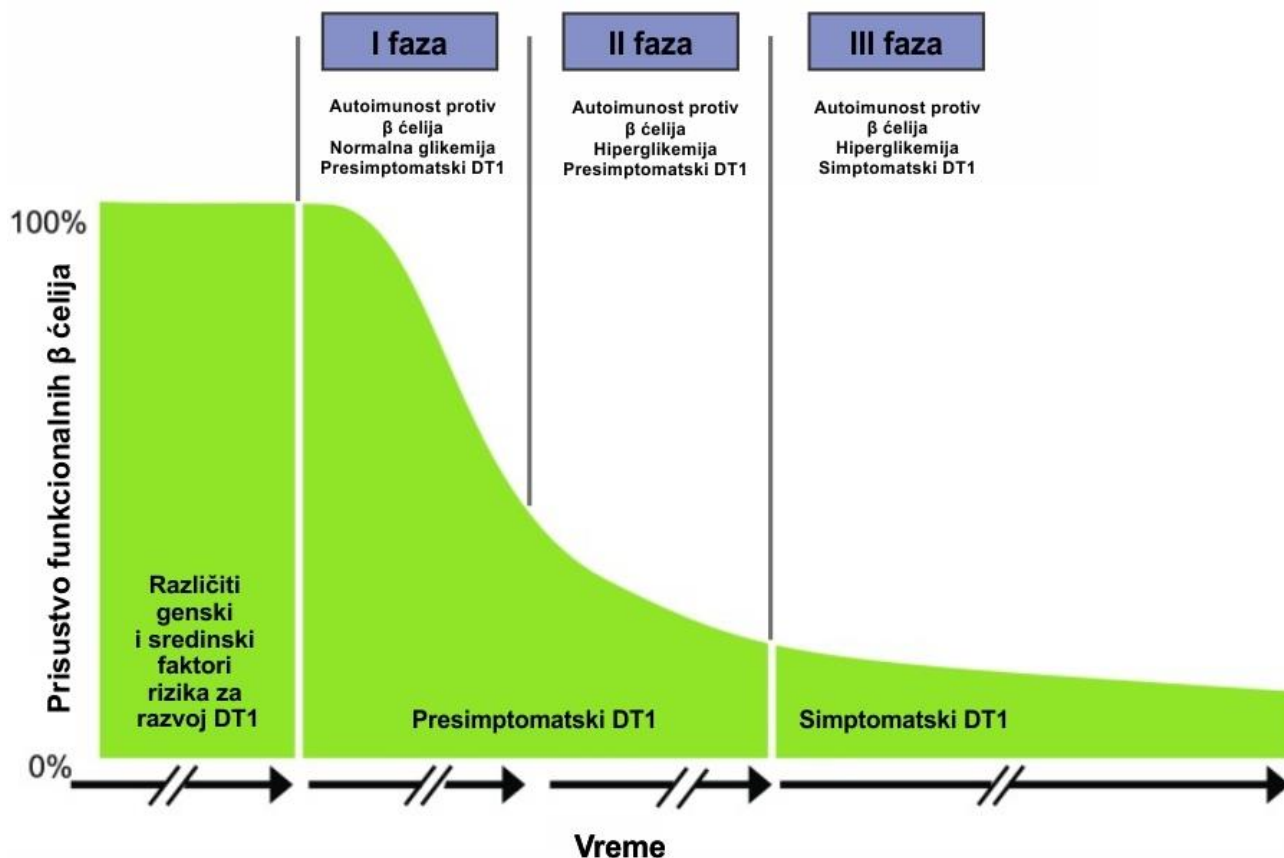
## 1.2. Etiologija dijabetesa tipa 1

DT1 je autoimunska bolest koja se razvija usled zajedničkog doprinosa različitih genskih i sredinskih faktora. Postoji više pristupa modelovanju kinetike progresije DT1. Prvobitno postavljen i najuticajniji je bio linearni model progresije bolesti i gubitka  $\beta$  ćelija. On je podrazumevao šest faza: (1) genska predispozicija, (2) sredinski faktor kao okidač, (3) aktivni autoimunski odgovor usmeren protiv autoantigena  $\beta$  ćelija, (4) gubitak sekrecije insulina, (5) razvijen DT1 i (6) potpuni gubitak  $\beta$  ćelija (Eisenbarth, 1986).

Tokom godina, u pokušaju da preciznije objasne nekada varijabilni proces razvoja bolesti, predloženi su i drugi modeli. Jedna od prihvaćenijih alternativa predstavlja relapsno-remitentnu hipotezu patogeneze DT1, u kojoj se fluktuacije brojnosti  $\beta$  ćelija koje se tokom vremena javljaju kod različitih pacijenata objašnjavaju različitim talasima uništavanja  $\beta$  ćelija (Christoffersson i sar., 2016). U tom modelu, povećanje broja autoreaktivnih efektorskih T limfocita je kontrolisano porastom broja regulatornih T (Treg) ćelija, a postepenim gubitkom te regulacije autoimunski odgovor bi mogao da nadvlada protektivne regulatorne mehanizme. Brzina progresije DT1 bi dodatno zavisila i od stepena širenja epitopa, kao i od proliferacije  $\beta$  ćelija u odgovoru na autoimunski napad na njih (von Herrath i sar., 2007).

Radi definisanja potencijalno sveobuhvatnog modela razvoja DT1, Fondacija za istraživanje juvenilnog dijabetesa, Društvo endokrinologa i Američko udruženje za dijabetes su predložili prihvatanje novog sistema klasifikacije faza DT1 koji bi integrisao kliničke aspekte progresije bolesti (Christoffersson i sar., 2016). Po njihovom predlogu, DT1 kod čoveka predstavlja kontinuum koji se može podeliti u faze. U prvoj fazi, on započinje detekcijom dva autoantitela asocirana sa DT1 (specifična za insulin i GAD65), ili više njih, kod individua bez simptoma koje se odlikuju normalnom glikemijom. Dalje se bolest razvija varijabilnom brzinom do druge faze u kojoj individue bez simptoma razvijaju netoleranciju na glukozu usled gubitka funkcionalnih  $\beta$  ćelija. U trećoj fazi, individue finalno ispoljavaju kliničke simptome bolesti. Takav sistem klasifikacije, u kojem se trenutak ispoljavanja bolesti može predvideti na osnovu detekcije biomarkera specifičnih za datu fazu razvoja DT1, može biti korišćen pri dizajniranju kliničkih studija, donošenju odluka povodom rizika/koristi medicinskih intervencija i razvoju terapija radi prevencije simptomatskog DT1 (Insel i sar., 2015).





Slika 1. Faze razvoja dijabetesa tipa 1. Prilagođeno od Insel i saradnika (2015).

Koji god da je model najbliži realnoj situaciji koja finalno dovodi do razvoja DT1, svim modelima je zajednička pretpostavka da su za razvoj autoimunskog odgovora neophodni i poligenska osnova i uticaj sredinskih faktora.

### 1.2.1. Genska osnova dijabetesa tipa 1

Genski faktori rizika su neophodni za razvoj DT1, ali samostalno ne mogu dovesti do razvoja bolesti. Zbog toga je mali procenat individua koje razvijaju kliničke simptome bolesti u odnosu na ukupan broj individua koje poseduju poznate genske faktore rizika (Katsarou i sar., 2017). U opštoj populaciji, rizik za nastanak DT1 iznosi 0,4% (Pociot i McDermott, 2002). Taj rizik značajno raste ako je nekom od najbližih članova porodice prethodno utvrđena bolest – 3% ako je to bila majka, 5% ako je otac, a 8% ako su u pitanju bili brat ili sestra. Rizik oboljevanja od DT1 kod oba jednojajčana blizanca je oko 50% ako je jedan od njih već oboleo, što ukazuje na jak uticaj sredine i/ili epigenetički uticaj (Regnell i Lernmark, 2017).

Rizik razvoja DT1 u najvećoj meri zavisi od nasleđivanja određenih haplotipova glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, engl. Major Histocompatibility Complex) II klase, koji se kod ljudi naziva kompleks humanih leukocitnih antigena (HLA) II klase. Ti membranski molekuli

prikazuju peptidne antigene T limfocitima. HLA geni su najpolimorfiji geni u ljudskom genomu, a u HLA II klase se ubrajaju DR, DQ, i DP molekuli. U kontekstu DT1, neke forme HLA II klase potencijalno mogu doprineti aktivaciji autoreaktivnih T limfocita, a riziku za razvoj DT1 najviše doprinosi nasleđivanje određenih alela HLA-DR i HLA-DQ grupe (Noble, 2015). Među njima, najvećem riziku doprinosi nasleđivanje HLA-DR3-DQ2 i HLA-DR4-DQ8 haplotipova (Katsarou i sar., 2017).

Određeni geni koji ne spadaju u HLA gene takođe mogu doprineti podložnosti DT1. Većina tih gena je uključena u regulaciju imunskog sistema, a ređe učestvuju i u regulaciji funkcije  $\beta$  ćelija. Među tim genima, najveći doprinos riziku za razvoj DT1 imaju polimorfizmi gena koji kodira preproinsulin, koji se dalje uz pomoć peptidaza konvertuje do proinsulina i insulina. Gen koji kodira tirozin fosfatazu uključenu u prenos signala T ćelijskog receptora (PTPN22, engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22) je takođe asociran sa DT1, a smatra se da mutacija ovog gena može pospešiti preživljavanje autoreaktivnih T limfocita. Riziku za razvoj DT1 može doprineti i gen koji kodira interleukin (IL)-2 (Hulme i sar., 2012), kao i gen koji kodira CD25, tj.  $\alpha$  subjedinicu receptora za IL-2 eksprimiranog na limfocitima (Regnell i Lernmark, 2017). Sa razvojem DT1 je asociran i gen koji kodira antigen koji je udružen sa citotoksičnim T limfocitima (CTLA-4, engl. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4). Pošto CTLA-4 predstavlja receptor na T limfocitima koji može posredovati u apoptozi i negativnoj regulaciji T limfocita, polimorfizmi ovog gena mogu značajno doprineti razvoju autoimunskih bolesti u kojima T limfociti imaju bitnu ulogu (Clark i sar., 2017).

### **1.2.2. Spoljašnji faktori kao pokretači dijabetesa tipa 1**

Tokom poslednjih godina incidenca DT1 je imala najbrži porast kod dece mlađe od 15 godina, a naročito kod onih mlađih od pet godina. Ovakav porast se ne može objasniti genskim promenama, što ukazuje na veliki značaj sredinskih faktora ili uticaja ponašanja na razvoj bolesti (DiMeglio i sar., 2018).

Enterovirusi se smatraju jednim od potencijalnih inicijatora DT1. Najprihvaćenije objašnjenje tog stanovišta je u molekularnoj mimikriji, pri kojoj aktivacija T limfocita specifičnih za virusni antigen može dovesti do razvoja autoimunske bolesti ako prepoznati virusni epitop pokazuje sličnost u sekvenci ili strukturi sa nekim autoantigenom. Tako je pokazano da koksaki virus B4 sadrži protein 2C koji je strukturno blizak GAD65, autoantigenu  $\beta$  ćelija. Molekularna mimikrija između autoantigena GAD65 i proteina 2C bi mogla predstavljati jedan od mehanizama pokretanja autoimunskog odgovora u DT1 (Varela-Calvino i sar., 2000). Dodatno, virusi bi mogli direktno uzrokovati oštećenje  $\beta$  ćelija, nakon čega bi autoimunska reakcija bila usmerena protiv prethodno nedostupnih antigena  $\beta$  ćelija izmenjenih virusom (Eiselein i sar., 2004). Pored direktnog uništavanja  $\beta$  ćelija, virusne infekcije bi mogle doprineti i razvoju „plodnog tla“ za autoimunski odgovor kod osoba sa već postojećom predispozicijom kroz povećanje ekspresije MHC I molekula ispunjenih sopstvenim antigenima i proinflamacijskih citokina kao što je IFN- $\alpha$  (von Herrath, 2009).

Sa druge strane, relativno odsustvo infekcija u modernom dobu je prepoznato kao mogući faktor rizika za razvoj DT1. Po „higijenskoj hipotezi“, imunski sistem se razvio kako bi zaštitio organizam od izlaganja različitim infektivnim agensima, a interakcija sa patogenima kao što su

paraziti je bitna za edukaciju imunskog sistema i promovisanje autotolerancije (Zacccone i Cooke, 2011). Mogućnost da infekcija može sprečiti razvoj DT1 je testirana u različitim životinjskim modelima, a pokazalo se da određeni patogeni i produkti koje oni oslobađaju mogu sprečiti razvoj bolesti (Tang i sar., 2019).

Porast incidence DT1 na svetskom nivou se odvija istovremeno sa značajnim porastom gojaznosti u opštoj populaciji (Xia i sar., 2019). Jedan od mehanizama koji može objasniti tu korelaciju je „hipoteza ubrzavanja“, po kojoj povećana telesna masa dovodi do povećanog zahteva tela za insulinom. Taj pritisak u  $\beta$  ćelijama uzrokuje stres, pri kojem se u sekretornim granulama povećava formiranje modifikovanih ili hibridnih peptida protiv kojih nije uspostavljena tolerancija, što  $\beta$  ćelije čini podložnijim autoimunskom napadu (Wilkin, 2012; Ilonen i sar., 2019). Osim toga, uništavanju  $\beta$  ćelija može doprineti i glukotoksičnost. Indukcija apoptoze  $\beta$  ćelija interakcijom Fas receptora na  $\beta$  ćelijama i Fas liganda na citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T limfocitima je proces koji značajno doprinosi gubitku  $\beta$  ćelija tokom DT1, a glukotoksičnost podrazumeva povećanje ekspresije Fas receptora na  $\beta$  ćelijama koje je uočeno u uslovima visoke glikemije (Maedler i sar., 2001). Smrti  $\beta$  ćelija doprinosi i ektopično taloženje masnih naslaga u pankreasnim ostrvcima, što je proces nazvan lipotoksičnost (Wilkin, 2012).

Oralna tolerancija se razvija u odgovoru na antigene koji nisu eksprimirani u timusu a sa kojima se imunski sistem susreće u crevima. Limfno tkivo pridruženo crevima (GALT, engl. Gut-Associated Lymphoid Tissue) ima dvostruku ulogu - ono obezbeđuje odbranu od infektivnih agenasa, a takođe indukuje toleranciju na neškodljive sastojke hrane i mikrobiotu creva (Vaarala, 1999). Specifični sastojci hrane su ispitivani u kontekstu prodijabetesnog ili protektivnog dejstva u DT1, uključujući kravlje ili majčino mleko, gluten, kao i vitamine D i E. Sve je više dokaza da GALT ima ulogu u razvoju DT1, najverovatnije kroz određene poremećene mehanizme oralne tolerancije (Virtanen i Knip, 2003). Ako se razviju uslovi povećanog preuzimanja antigena iz creva, autoreaktivni T ili B limfociti bi mogli prepoznati antigene poreklom iz hrane ili mikrobiote koji strukturno liče na autoantigene, što može dovesti do njihove aktivacije i razvoja autoimunosti (Ilonen i sar., 2019). Kod novorođenčeta je prvih nekoliko meseci ključno za indukciju oralne tolerancije, pošto su u tom periodu funkcija barijere creva i regulatoni imunski mehanizmi slabije razvijeni. Zbog toga su potencijalni efekti faktora rizika poreklom iz hrane drugačiji u različitim periodima života (Virtanen i Knip, 2003).

Mikrobiota creva čoveka je prošla kroz izražene promene u proteklom veku usled izmenjenih uslova života, povećanog konzumiranja hemijski obrađene vode i hrane, kao i obimne upotrebe antibiotika. Usled postojanja tesnih interakcija između imunskog sistema i mikrobiote creva, pomoću kojih mikrobiota učestvuje u sazrevanju i edukaciji imunskih ćelija, promene u mikrobioti se mogu odraziti i na promene u imunskom sistemu. Brojni podaci o značaju mikrobiote u DT1 su dobijeni upotrebom različitih životinjskih modela ove bolesti. Kao jedan od tih modela se koriste NOD (engl. Non-Obese Diabetic) miševi koji su skloni spontanom razvoju DT1, a pokazano je da je indukovana kolonizacija creva NOD miševa segmentiranim filamentoznim bakterijama uspešno smanjila incidencu bolesti. Na životinjskim modelima je pokazan i veliki uticaj izmene mikrobiote upotrebom antibiotika na razvoj DT1 (Knip i Siljander, 2016). Dodatno, ustanovljeno je da određeni proteini bakterija poseduju strukturu sličnu nekim autoantigenima iz pankreasa. U ovom kontekstu bi molekulska mimikrija omogućila aktiviranje autoimunskog odgovora u DT1 (Zheng i sar., 2018). Konačno, studije su pokazale da se zdrava deca i deca sa razvijenim DT1 odlikuju drugačijim profilom mikrobiote (Gholizadeh i sar., 2019).

Uticaj sredinskih faktora na gene je posredovan epigenetičkim modifikacijama DNK molekula. One u imunskim ćelijama omogućavaju integriranje signala iz sredine i sprovode kompleksnu i dinamičku kontrolu genske ekspresije, kontrolišući njihov razvoj, diferencijaciju i aktivaciju. Metilacija DNK je epigenetička modifikacija koja u kontekstu DT1 može biti pod uticajem brojnih sredinskih faktora, kao što su sastojci hrane, antibiotici, zagađivači životne sredine ili produkti mikrobiote (npr. masne kiseline kratkog lanca). Pored metilacije, i epigenetičke modifikacije histona mogu biti uključene u nastanak DT1 (Phillips i sar., 2017).

### 1.3. Eksperimentalni modeli dijabetesa tipa 1

Detaljno razumevanje imunskog odgovora usmerenog protiv  $\beta$  ćelija u DT1 kod čoveka je ograničeno nedovoljnim brojem i nepristupačnošću tkivnih uzoraka pankreasa (Katsarou i sar., 2017). Sličnosti etiologije, patoloških mehanizama i fenotipa DT1 uočenih kod ljudi i glodara su omogućile razvoj eksperimentalnih modela DT1 na glodarima. Iako nijedan model ne može pružiti odgovore na sva pitanja, oni se koriste radi optimizacije eksperimentalnih studija. Modeli na glodarima imaju više prednosti – glodari se odlikuju kratkim životnim ciklusima i efikasnim reproduktivnim potencijalom. Dodatno, relativno lako se može uticati na sastav njihovog genoma i životnu sredinu (Knip i Siljander, 2016). Životinjski modeli bolesti su neophodni u prekliničkim istraživanjima usmerenim ka razvoju novih terapija, a što su mehanizmi patogeneze bolesti u modelu bliži patogenezi bolesti kod čoveka, veća je verovatnoća da će novi terapeutici testirani na životinjama svoja dejstva iskazati i kod čoveka (Lenzen, 2017).

Modeli DT1 mogu biti spontani, indukovani ili transgeni. Među najpoznatije spontane modele DT1 spadaju NOD miševi i BB (engl. Biobreeding) pacovi. Ovi modeli su razvijeni pažljivim selektivnim ukrštanjem („inbridingom“) jedinki sklonih razvoju bolesti, do dobijanja sojeva koji poseduju uniformne genske odlike i čiji veći procenat jedinki razvija DT1 (Acharjee i sar., 2013). U odnosu na BB pacove, imunski mehanizmi u NOD modelu ispoljavaju više sličnosti sa bolešću kod čoveka, zbog čega su NOD miševi postali najkorišćeniji spontani model DT1 (Pearson i sar., 2016). Incidenca DT1 kod NOD miševa iznosi 60-80% kod ženki i 20% kod mužjaka, a incidenca bolesti je najviša kada se miševi uzgajaju u uslovima sa minimalnim prisustvom mikroorganizama. Mogući uzrok tog fenomena je u oblikovanju imunskog odgovora koje se dešava nakon izlaganja stranim antigenima, što smanjuje šansu razvoja različitih bolesti u kojima disregulacija imunskog odgovora ima bitnu ulogu (Anderson i Bluestone, 2005). Korišćenje ovog modela je doprinelo identifikaciji brojnih autoantigena i biomarkera koji se javljaju i kod ljudi sa DT1, što je omogućilo definisanje mogućih terapijskih meta. Kod NOD miševa i kod ljudi je poznato više od 40 genskih lokusa značajnih za podložnost razvoju DT1. Kroz stvaranje transgenih modela, genetičko modifikovanje NOD miševa (ili drugih sojeva) uklanjanjem i/ili uvođenjem određenih gena je pomoglo u identifikaciji njihove uloge u povećavanju ili smanjivanju šanse za razvoj bolesti (Pearson i sar., 2016).

Hemijski indukovani modeli DT1 su zasnovani na tretiranju miševa ili pacova jedinjenjima koja su selektivno toksična za  $\beta$  ćelije pankreasa. Takvi agensi uključuju streptozotocin (STZ) ili aloksan (Radenković i sar., 2016). Dok je kod miševa ili pacova razvoj DT1 moguće uzrokovati visokim dozama STZ ili aloksana, takvim pristupom hiperglikemija biva postignuta njihovom direktnom toksičnošću, bez posredovanja autoimunskog odgovora. Sa druge strane, upotreba

višestrukih malih subdijabetogenih doza STZ dovodi do uništavanja  $\beta$  ćelija i razvoja DT1 kombinacijom direktne toksičnosti i lokalne inflamacije i autoimunosti (Leiter i Schile, 2013).

### 1.3.1. Model dijabetesa tipa 1 indukovani višestrukim malim dozama streptozotocina

STZ je antibiotik otkriven kao proizvod *Streptomyces achromogenes* (Bolzán i Bianchi, 2002). Pošto predstavlja analog glukoze,  $\beta$  ćelije preuzimaju STZ preko GLUT2 transportera za glukozu, nakon čega ga razgrađuju do metilnitrozouree i glukoze. Metilnitrozourea alkilacijom modifikuje biomakromolekule i uvodi prekide DNK, dovodeći do inicijalnog uništavanja  $\beta$  ćelija (Lenzen, 2008). Fragmentacija DNK aktivira poli(ADP-riboza) polimerazu (PARP), protein uključen u popravku oštećenja DNK, što povećava potrošnju unutarćelijskih rezervi  $\text{NAD}^+$  (engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide) koenzima i adenozin trifosfata (ATP) u  $\beta$  ćelijama, a to kao rezultat ima umiranje i nekrozu  $\beta$  ćelija (Chaudhry i sar., 2013). Oštećenjem mitohondrijske DNK onesposobljava se i mitohondrijski metabolizam u  $\beta$  ćelijama, čime se inhibira sekrecija insulina pokrenuta glukozom (Lenzen, 2008). Dodatno, STZ u pankreasnim ostrvcima dovodi i do oslobađanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) koje mogu dodatno doprineti oštećenju  $\beta$  ćelija (Radenković i sar., 2016).

Korisna odlika primene STZ u modelima DT1 je da stepen oštećenja  $\beta$  ćelija zavisi od primenjene doze STZ, što pruža mogućnost pažljive kontrole razvoja bolesti (Acharjee i sar., 2013). Dok pojedinačne visoke doze STZ uzrokuju veliki mortalitet, kod mužjaka miševa podložnih razvoju DT1 (kao što su C57BL/6 miševi) se može uzrokovati hronična forma ove bolesti intraperitonealnim ili intravenskim davanjem višestrukih malih doza STZ (30-50 mg/kg telesne mase, u trajanju od tri do pet dana) (Leiter i Schile, 2013). Najčešće korišćen protokol podrazumeva injekcije STZ u dozi od 40 mg/kg telesne mase davane tokom pet uzastopnih dana, što je i model DT1 korišćen u ovoj disertaciji. Takve subdijabetogene doze STZ delimično oštećuju  $\beta$  ćelije, što inicira autoimunski inflamacijski proces koji uzrokuje dalji gubitak  $\beta$  ćelija i posledični razvoj DT1. Ovaj model podrazumeva brojne sličnosti sa patogenezom DT1 kod čoveka, uključujući hroničnu inflamaciju pankreasnih ostrvaca, nedostatak insulina, kao i razvoj autoantitela specifičnih za antigene oslobođene iz oštećenih  $\beta$  ćelija, kao što je npr. GAD65 (Furman, 2015; Manoylov i sar., 2019).

### 1.4. Imunopatogeneza dijabetesa tipa 1

Da bi se DT1 razvio, i kod miša i kod čoveka, prvo se mora pokrenuti imunski odgovor usmeren protiv autoantigena  $\beta$  ćelija. Dalje, kako bi  $\beta$  ćelije bile uništene, taj odgovor mora imati izražene proinflamacijske karakteristike. Finalno, regulatorna kontrola autoimunskog odgovora mora biti neuspešna kako bi taj odgovor postao hroničan, nakon čega se javljaju i prvi simptomi bolesti (Wållberg i Cooke, 2013).

Pokretanje autoimunosti može biti omogućeno na dva načina. Sa jedne strane,  $\text{CD4}^+$  T limfociti koji se odlikuju niskim afinitetom za autoantigen mogu izbeći negativnu selekciju u timusu, nakon čega mogu prepoznati autoantigene peptide koje prezentuju određeni MHC II molekuli na antigen-prezentujućim ćelijama na periferiji. Drugi mehanizam podrazumeva

pokretanje imunskog odgovora protiv neoantigena koji se formiraju u ciljnom tkivu na periferiji, nakon čega bivaju prezentovani pomoću određenih MHC II molekula (Marrack i Kappler, 2012).

Apoptoza  $\beta$  ćelija je fiziološki homeostazni mehanizam kojim se iz organizma konstantno uklanjaju ostarele, oštećene ili inficirane  $\beta$  ćelije. Apoptotske ćelije predstavljaju izvor autoantigena koji doprinose održavanju imunske tolerancije nakon što unutar apoptotskih tela bivaju uklonjeni delovanjem profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija, kao što su makrofagi ili dendritske ćelije, kroz proces fagocitoze koji se naziva eferocitoza. U fiziološkim uslovima, eferocitoza ne doprinosi sazrevanju dendritskih ćelija (Vives-Pi i sar., 2015). Sazrevanje dendritskih ćelija, koje uključuje povećanje ekspresije MHC II i kostimulatornih molekula CD80 i CD86, je ključno za pokretanje imunskog odgovora. Sa druge strane, nezrele ili tolerogene dendritske ćelije indukuju imunsku toleranciju (Green i sar., 2009). Smatra se da bi nakon fagocitoze apoptotskih tela  $\beta$  ćelija dendritske ćelije mogle migrirati u drenirajuće limfne čvorove, gde bi usled svog nezrelog fenotipa pri prezentaciji autoantigenih peptida poreklom iz  $\beta$  ćelija mogle vršiti indukciju tolerancije T limfocita specifičnih za te peptide (Steinman i sar., 2000; Pujol-Autonell i sar., 2013).

Kada se taj mehanizam pokaže neuspešnim, bilo zbog povećane stope apoptoze  $\beta$  ćelija i/ili defekata u eferocitozi, antigen-prezentujuće ćelije mogu biti aktivirane, doprinoseći inflamaciji i gubitku autotolerancije (Vives-Pi i sar., 2015; Elliott i sar., 2017). U više spontanijih modela DT1 je opisana smanjena sposobnost uklanjanja apoptotskih ćelija pomoću makrofaga (O'Brien i sar., 2002; O'Brien i sar., 2006). Ako apoptotske ćelije ne budu uklonjene na vreme iz tkiva, one postaju nekrotične. Nekroza podrazumeva gubitak integriteta ćelijske membrane i oslobađanje alarmina, tj. molekulskih obrazaca oštećenja (DAMP, engl. Damage-Associated Molecular Patterns) (Nagata i sar., 2010). Smatra se da je oslobađanje DAMP neophodno da bi se razvio imunski odgovor pokrenut ćelijskom smrću (Green i sar., 2009).

U DAMP spada i HMGB1 (engl. High Mobility Group Box 1), jedan od najprisutnijih i evolutivno najviše konzerviranih proteina kod eukariota. Kao nehistski hromozomski protein, HMGB1 u ćeliji učestvuje u određivanju strukture i stabilnosti nukleozoma i vezivanju transkripcionih faktora za DNK (Wang i sar., 2004). Izvan ćelije, HMGB1 detektuju receptori ćelija urođene imunosti. U fiziološkim uslovima HMGB1 oslobođen iz oštećenih ćelija deluje kao alarmin, „obaveštavajući“ vanćelijsku sredinu o nastalom oštećenju. Sa druge strane, tokom patogeneze brojnih bolesti, prekomerno prisustvo vanćelijskog HMGB1 uzrokuje inflamaciju, doprinoseći oštećenju tkiva i disfunkciji organa (Yang i sar., 2020). *In vitro* studije su pokazale da je izlaganje  $\beta$  ćelija pacova ili pankreasnih ostrvaca čoveka proinflamacijskom citokinu IL-1 $\beta$  dovelo do povećanog oslobađanja HMGB1 (Steer i sar., 2006). Prilikom transplantacije pankreasnih ostrvaca kao terapije DT1, inflamacijski odgovor posredovan HMGB1 je asociran sa ranim gubitkom transplantiranih ostrvaca (Itoh i sar., 2012; Matsuoka i sar., 2010). Kod NOD miševa, uočena je veza između progresije DT1 i povišene ekspresije HMGB1 u  $\beta$  ćelijama (Li i sar., 2012). Dodatno, pokazano je da se kod NOD miševa HMGB1 pasivno oslobađa iz oštećenih  $\beta$  ćelija i sekretuje iz dendritskih ćelija koje su infiltrirale pankreasna ostrvca, nakon čega vanćelijski HMGB1 potentno indukuje sazrevanje dendritskih ćelija i stimuliše aktivaciju makrofaga (Han i sar., 2008).

Profesionalne antigen-prezentujuće ćelije su prve ćelije koje se nakupljaju u okolini ostrvaca, započinjući imunopatološku kaskadu razvoja DT1 kod NOD miševa. U pankreasnim ostrvcima mladih NOD miševa dolazi do povećane ekspresije različitih hemokina, što uzrokuje migraciju monocita/makrofaga i dendritskih ćelija u pankreas (Jayasimhan i sar., 2014). Kada

makrofagi preuzmu sadržaj nekrotičnih ćelija, započinju produkciju proinflamacijskih citokina (Nagata i sar., 2010). Ovi citokini služe kao okidač za razvoj autoimunskih bolesti, a za jedan od njih, IFN- $\alpha$ , je pokazano da ima ključnu ulogu u inicijaciji DT1 kod NOD miševa (Li i sar., 2008). Među te citokine spadaju i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , engl. Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ) i IL-1 $\beta$ , koji su direktno toksični za  $\beta$  ćelije (Jayasimhan i sar., 2014).  $\beta$  ćelije eksprimiraju visoke nivoe receptora za IL-1 $\beta$  i deluje da su osetljivije na apoptozu indukovanu sa IL-1 $\beta$  u odnosu na druge endokrine ćelije pankreasnih ostrvaca (Lehuen i sar., 2010). Kod NOD miševa TNF- $\alpha$  takođe ima ulogu u inicijaciji DT1, dovodeći do sazrevanja CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> dendritskih ćelija, a time i do aktivacije autoreaktivnih T limfocita u pankreasnim limfnim čvorovima (Lee i sar., 2005). Značaj TNF- $\alpha$  kod pacijenata sa DT1 je pokazan i time što je nakon neutralizacije TNF- $\alpha$  korišćenjem specifičnog anti-TNF- $\alpha$  antitela došlo do delimičnog očuvanja funkcije  $\beta$  ćelija i posledičnog porasta nivoa insulina u krvi (Mastrandrea i sar., 2009). Dodatno, povećana produkcija proinflamacijskog citokina IL-12 od strane makrofaga NOD miševa može doprineti dodatnom regrutovanju dendritskih ćelija na mesto inflamacije, što uzrokuje pogoršanje inflamacijskog odgovora i vodi aktivaciji autoreaktivnih T limfocita (Jayasimhan i sar., 2014).

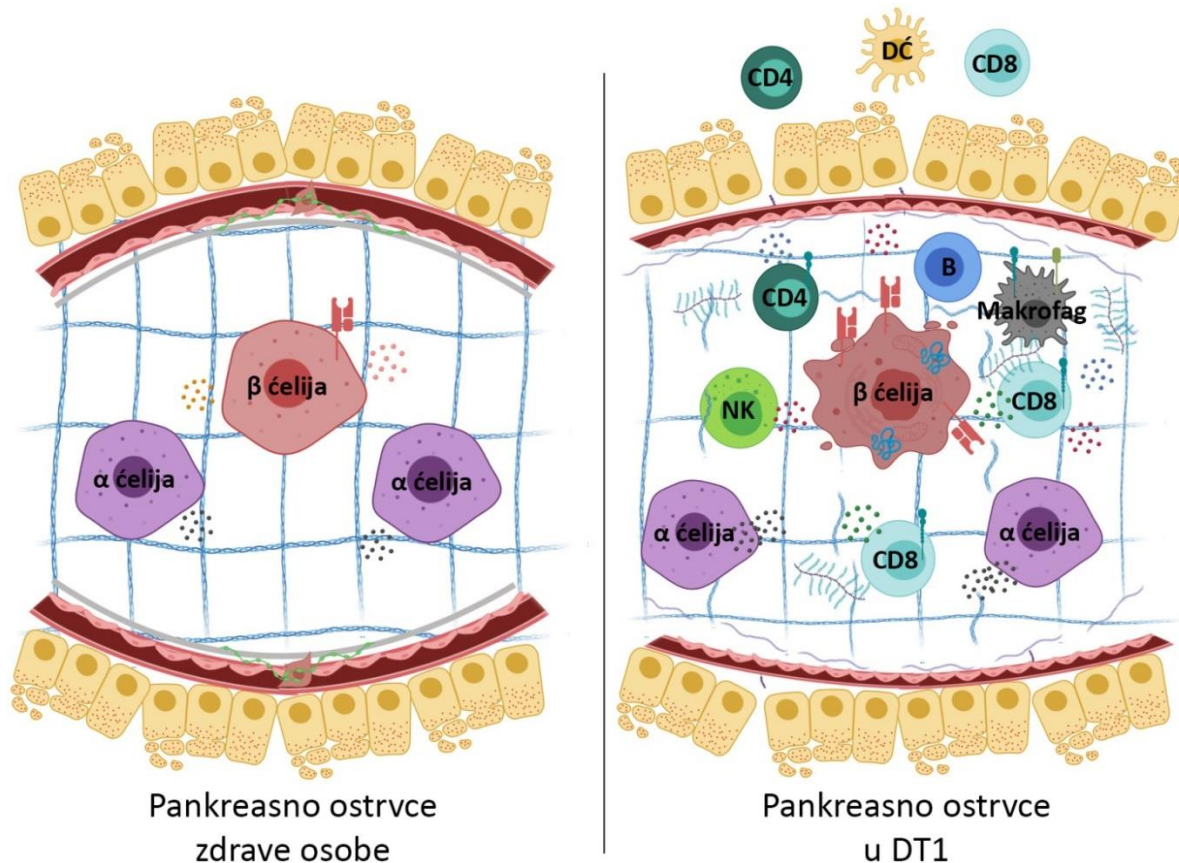
Početno aktiviranje naivnih autoreaktivnih T limfocita se kod NOD miševa odvija u drenirajućim pankreasnim limfnim čvorovima, u koje aktivirane dendritske ćelije migriraju iz tkiva. Nakon što njihov T ćelijski receptor prepozna epitop autoantigena prezentovan u okviru MHC II molekula, a CD28 receptor T limfocita prepozna kostimulatorne molekule zrelih dendritskih ćelija, tako aktivirani T limfociti menjaju svoj fenotip i stiču sposobnost da infiltriraju pankreasna ostrvca (Anderson i Bluestone, 2005). U tom procesu, pankreasna ostrvca NOD miševa se prvo odlikuju izraženom inflamacijom u svojoj okolini (peri-insulitis), dok je razvoj hiperglikemije povezan sa regrutovanjem inflamacijskih ćelija u ostrvca (insulitis) (Katsarou i sar., 2017).

Studije na NOD mišjem modelu DT1 su pokazale da razvoj bolesti zavisi i od CD4<sup>+</sup> i od CD8<sup>+</sup> T limfocita (Phillips i sar., 2009). U skladu sa ovim rezultatima, deplecija T limfocita kod pacijenata sa tek dijagnostifikovanim DT1 je kao rezultat imala zaštitu funkcije  $\beta$  ćelija (Chatenoud, 2010), dok je autoreaktivnost CD8<sup>+</sup> T limfocita asocirana sa uništavanjem  $\beta$  ćelija i kod pacijenata sa DT1 (Pinkse i sar., 2005). Pokazano je da su CD4<sup>+</sup> T limfociti iz pankreasnih limfnih čvorova obolelih od DT1 autoreaktivni na specifični deo aminokiselinske sekvence insulina (Mannering i sar., 2009), a u brojnim studijama na uzorcima obolelih ili u NOD ili transgenim životinjskim modelima je pokazano da u DT1 autoreaktivni CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti reaguju i na epitope proinsulina, GAD65, IA-2 i katalitičke subjedinice glukozo-6-fosfataze specifične za pankreasna ostrvca (IGRP, engl. Islet-specific Glucose-6-phosphatase catalytic subunit-Related Protein) (Mallone i sar., 2011; Jarchum i sar., 2008).

Uništavanje  $\beta$  ćelija delovanjem T limfocita se može odvijati na više načina. Različiti inflamacijski faktori, kao što je npr. TNF- $\alpha$ , u pankreasnim ostrvcima stimulišu  $\beta$  ćelije da povećaju ekspresiju MHC I molekula, koje potom mogu prepoznati citotoksični CD8<sup>+</sup> T limfociti i indukovati smrt takvih ćelija (Eizirik i sar., 2009; Lu i sar., 2020). Mehanizmi ovog procesa podrazumevaju oslobađanje citolitičkih granula sa perforinom i granzimom iz CD8<sup>+</sup> T limfocita, kao i indukciju apoptoze interakcijom Fas receptora na  $\beta$  ćelijama i Fas liganda na CD8<sup>+</sup> T limfocitima (van Belle i sar., 2011). CD8<sup>+</sup> T limfociti svojom direktnom efektorskom funkcijom dodatno doprinose inflamaciji u DT1, tako što sadržaj oslobođen iz uništenih  $\beta$  ćelija dalje privlači autoreaktivne CD4<sup>+</sup> T limfocite (Anderson i Bluestone, 2005).



Značaj B limfocita za progresiju DT1 nije potpuno jasan. Iako je prisustvo antitela specifičnih za autoantigene  $\beta$  ćelija najraniji pokazatelj razvoja autoimunosti, izgleda da autoantitela nemaju patogenu ulogu. Sa druge strane, B limfociti poseduju uspešnu antigen-prezentujuću sposobnost, pa nakon preuzimanja antigena  $\beta$  ćelija mogu učestvovati u aktivaciji autoreaktivnih  $CD4^+$  T limfocita (Anderson i Bluestone, 2005; Li i sar., 2014).



**Slika 2. Uporedni prikaz zdravog pankreasnog ostrvca i ostrvca koje se odlikuje infiltracijom imunskih ćelija tokom autoimunskog odgovora u DT1.**  $CD4$  – efektorski  $CD4^+$  T limfociti;  $CD8$  – citotoksični  $CD8^+$  T limfociti; B – B limfociti; DĆ – dendritske ćelije; NK – urođenoubilačke (NK, engl. Natural Killer) ćelije. Prilagođeno od Peters i saradnika (2019).

T limfociti na mestu inflamacije proizvode proinflamacijske citokine, kao što su  $IL-1\beta$ ,  $IFN-\gamma$  i  $TNF-\alpha$ .  $IFN-\gamma$ , koji sekretuju Th1 ćelije, indukuje ekspresiju Fas receptora i posledičnu apoptozu  $\beta$  ćelija. Proinflamacijski citokini narušavaju aktivnost ćelijske mašinerije za produkciju i potonju sekreciju proteina, što u endoplazmatskom retikulumu  $\beta$  ćelija dovodi do nakupljanja proteina izmenjene konformacije. Takvi proteini onda mogu biti prezentovani imunskim ćelijama i doprineti autoimunskom odgovoru.  $\beta$  ćelije u ovoj situaciji mogu proizvoditi i hemokine, što kao rezultat ima dalje regrutovanje mononuklearnih ćelija u pankreas (Eizirik i sar., 2009). Sem toga,  $IFN-\gamma$  može dodatno aktivirati makrofage i indukovati njihovu povećanu produkciju  $IL-1\beta$  i  $TNF-\alpha$ , time formirajući proinflamacijsku pozitivnu povratnu spregu. Ovi citokini takođe indukuju oslobađanje ROS iz  $\beta$  ćelija, a ROS imaju potencijal da uzrokuju njihovu apoptozu



(Lehuen i sar., 2010) s obzirom da se  $\beta$  ćelije odlikuju niskom ekspresijom antioksidativnih enzima koji bi ih potencijalno zaštitili od ROS (Padgett i sar., 2013). Dodatno, ROS oslobođene na mestu inflamacije zauzvrat promovišu oslobađanje proinflamacijskih citokina iz makrofaga i dendritskih ćelija, doprinoseći i aktivaciji adaptivnog imunskog odgovora (Padgett i sar., 2013).

U imunopatogenezi DT1 učestvuje i IL-17, proinflamacijski citokin Th17 ćelija. Kod pacijenata sa DT1 je utvrđeno prisustvo autoreaktivnih Th17 ćelija koje oslobađanjem IL-17 doprinose uništavanju  $\beta$  ćelija (Honkanen i sar., 2010; Arif i sar., 2011). Blokiranje dejstva IL-17 kod NOD miševa starih 10 nedelja dovelo je do sprečavanja razvoja DT1, uz smanjenje prisustva Th17 ćelija i povećanje zastupljenosti Treg ćelija u okolini pankreasnih ostrvaca (Emamaullee i sar., 2009). Sa druge strane, neutralisanje IL-17 kod NOD miševa starih pet nedelja nije imalo efekta, što sugeriše da IL-17 ima ulogu u uništavanju  $\beta$  ćelija, ali ne u inicijaciji bolesti (Emamaullee i sar., 2009).

Očigledno je da citokini imaju ključnu ulogu u orkestriranju međućelijskih interakcija između  $\beta$  ćelija i imunskih ćelija tokom razvoja DT1. Dok prethodno nabrojani proinflamacijski citokini promovišu diferencijaciju i funkciju dijabetogenih imunskih ćelija (Th1 i Th17 CD4<sup>+</sup> i citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita i NK ćelija) doprinoseći razvoju i progresiji DT1, njihovom dejstvu se suprotstavljaju antiinflamacijski citokini koji indukuju različite regulatorne funkcije, uspostavljajući imunsku toleranciju i sprečavajući uništavanje  $\beta$  ćelija (Lu i sar., 2020).

Neke od antiinflamacijskih citokina koji bi mogli doprineti sprečavanju razvoja DT1 produkuju Th2 ćelije. U tu grupu spadaju IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13. Tako je kod pacijenata sa DT1 utvrđeno smanjeno prisustvo IL-4 u krvi u odnosu na zdrave individue, dok je u NOD mišjem modelu pokazano da povećano prisustvo Th2 ćelija koje produkuju IL-4 u pankreasnim ostrvcima štiti  $\beta$  ćelije od uništenja (Kukreja i sar., 2002). IL-13 je antiinflamacijski citokin za koga se smatra da antagonistički deluje u odnosu na citokine Th1 imunskog odgovora, a utvrđeno je da je kod obolelih od DT1 produkcija ovog citokina smanjena (Rydén i Faresjö, 2013). U skladu sa time, tretman NOD miševa višenedeljnog intraperitonealnom primenom IL-13 je doveo do kasnijeg razvoja insulitisa i smanjene incidence bolesti (Zacccone i sar., 1999).

IL-10 je antiinflamacijski citokin koji produkuju brojne ćelije, u koje spadaju različite ćelije urođene imunosti i T i B limfociti. Velika brojnost ćelija koje mogu biti izvor IL-10 ukazuje na njegov veliki fiziološki značaj i kompleksnost njegovih regulatornih uloga, koje između ostalog uključuju inhibiciju produkcije proinflamacijskih citokina, prezentacije antigena ili proliferacije ćelija. IL-10 oslobođen iz antigen-prezentujućih ćelija na autokrini način ograničava aktivaciju ovih ćelija i sprečava dalji razvoj adaptivnog imunskog odgovora (Saxena i sar., 2015). B limfocite koji ispoljavaju imunosupresivnu funkciju i produkuju IL-10 predstavljaju regulatorne B (Breg) ćelije. Njihov značaj u održavanju autotolerancije kroz sekreciju IL-10 je pokazan u brojnim autoimunskim bolestima, uključujući DT1. Tako NOD miševi koji nisu razvili hiperglikemiju u pankreasnim ostrvcima poseduju više Breg ćelija u odnosu na hiperglikemične NOD miševe, a pokazalo se da zdrave osobe u perifernoj krvi poseduju više Breg ćelija koje proizvode IL-10 u odnosu na obolele od DT1 (Kleffel i sar., 2015).

### 1.4.1. Značaj regulatornih T limfocita u dijabetesu tipa 1

Treg ćelije predstavljaju subpopulaciju CD4<sup>+</sup> limfocita koja se odlikuje visokom ekspresijom CD25 i poseduju jake immunosupresivne sposobnosti (Lindley i sar., 2005). Za njihovu diferencijaciju i funkciju je neophodan transkripcijski faktor FoxP3 (engl. Forkhead box P3) (Rudra i sar., 2012), a mogu se razviti u timusu ili mogu biti indukovane na periferiji. U uslovima homeostaze Treg ćelije mogu suprimirati aktivaciju naivnih T limfocita uskraćivanjem signala neophodnih za njihovu aktivaciju kao što su CD28 ili IL-2. U sredini jake inflamacije, kao u slučaju infekcije ili potencijalnog autoimunskog odgovora, Treg ćelije stiču sposobnost da uzrokuju smrt ili inaktivaciju efektorskih T limfocita ili antigen-prezentujućih ćelija radi aktivnog ublažavanja prejakog imunskog odgovora (Yamaguchi i sar., 2011). Treg ćelije su esencijalne za održavanje imunske tolerancije, a istraživanja na mišjim i pacovskim modelima DT1 sugeriraju da disfunkcija Treg ćelija može dovesti do razvoja bolesti (Marwaha i sar., 2010). Tako je u transgenom NOD mišjem modelu pokazano da Treg ćelije u inflamacijskoj sredini gube ekspresiju FoxP3 i čak stiču određene proinflamacijske osobine (Zhou i sar., 2009). Analiza pankreasnih limfnih čvorova ljudi obolelih od DT1 je pokazala da je u njima smanjen broj Treg ćelija u odnosu na zdrave individue, dok to nije bio slučaj u perifernoj krvi (Ferraro i sar., 2011).

Treg ćelije su značajni producenti IL-10 i ovaj citokin predstavlja jedan od mehanizama putem kojih Treg ćelije mogu suprimirati imunski odgovor. Tako aktivacija T limfocita specifičnih za antigen u prisustvu IL-10 u njima indukuje anergiju, ograničavajući obim proinflamacijskog odgovora (Moore i sar., 2001). Faktor transformacije rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ ) je još jedan immunosupresivni citokin koji je povezan sa efektorskim funkcijama Treg ćelija. TGF- $\beta$  oslobođen iz Treg ćelija može suprimirati proliferaciju efektorskih T limfocita (Liu i sar., 2018), dok uticajem na dendritske ćelije doprinosi razvoju njihovog tolerogenog fenotipa (Pallotta i sar., 2011). TGF- $\beta$ , koji može biti oslobođen i iz drugih imunskih ćelija, takođe ima ključnu ulogu u indukovanju i održavanju ekspresije FoxP3 kod Treg ćelija, time podržavajući njihov opstanak i supresivne funkcije (Yamaguchi i sar., 2011). Treg ćelije eksprimiraju CTLA-4, čijim prioritarnim vezivanjem CD80 i CD86 molekula antigen-prezentujućih ćelija inhibiraju koaktivaciju T limfocita. Dodatno, u dendritskim ćelijama se nakon prepoznavanja CTLA-4 pokreće produkcija antiinflamacijskih citokina kao što su IL-10 i TGF- $\beta$ . Brojne supresivne funkcije Treg ćelija koje se ostvaruju direktnim ćelijskim kontaktom podrazumevaju i delovanje ekto-enzima CD39 ili CD73 i protein 1 programirane ćelijske smrti (PD-1, engl. Programmed cell Death protein 1) (Yu i sar., 2018). Vezivanje PD-1 za svoje ligande na T limfocitima upućuje inhibitorne signale koji regulišu ravnotežu između aktivacije T ćelija i održavanja imunske tolerancije, a kako je ovaj proces ključan u uslovima dugotrajne antigenske stimulacije, PD-1 na taj način učestvuje u sprečavanju razvoja autoimunskog odgovora (Francisco i sar., 2010).

Upoređujući zastupljenosti podtipova T ćelija poreklom iz krvi pacijenata sa DT1 i zdravih kontrola, došlo se do zaključka da razvoj bolesti zavisi od ravnoteže između zastupljenosti autoreaktivnih proinflamacijskih Th1 i antiinflamacijskih Treg ćelija (Arif i sar., 2004). Treg ćelije specifične za autoantigene  $\beta$  ćelija su potentni inhibitori efektorskih Th1 ćelija, a za supresiju proinflamacijskog Th1 odgovora može biti neophodno da Treg i Th1 ćelije prepoznaju autoantigen prezentovan na istoj antigen-prezentujućoj ćeliji. Pri takvim uslovima, Treg ćelije sekretuju granule koje sadrže perforin i granzime. Perforin u membrani antigen-prezentujuće ćelije oligomerizuje u transmembranske pore i time omogućava ulazak granzima u citoplazmu, gde granzimi vrše isecanje različitih proteina i uzrokuju apoptozu ciljane ćelije, doprinoseći

sprečavanju prezentacije autoantigena i posredno sprečavajući razvoj DT1 (Tree i sar., 2010; Cao i sar., 2007; Voskoboinik i sar., 2015).

## **1.5. Terapijski pristupi u dijabetesu tipa 1**

Uprkos razvoju moderne medicine i primeni različitih terapija, DT1 je i dalje bolest koja uzrokuje brojne komplikacije i doprinosi povećanom mortalitetu obolelih. Čak i ograničeno funkcionisanje  $\beta$  ćelija omogućava upotrebu manjih doza egzogenog insulina i generalno olakšava tretman, umanjuje fluktuacije nivoa glukoze u krvi i smanjuje rizik od razvoja komplikacija i sa njima povezan mortalitet. Zbog toga je značajan razvoj terapija koje bi sprečile autoimunski napad na  $\beta$  ćelije, kako bi se očuvala njihova funkcija. Takve terapije, ako bi se pokazale dovoljno uspešnim, bi mogle dovesti i do izlečenja ili prevencije bolesti (Ludvigsson, 2016). Različiti pristupi u terapiji DT1 doveli su do kratkoročne supresije uništenja  $\beta$  ćelija. Mnogi pristupi u lečenju DT1 su pokazali različitu efikasnost delovanja kod različitih pacijenata, sugerišući da je ova bolest značajno heterogena (Greenbaum i sar., 2019).

Različiti pristupi u lečenju DT1 imaju za cilj da se nadomesti broj i/ili funkcija  $\beta$  ćelija, često kroz inhibiciju autoimunskog odgovora. U njih spadaju deplecija efektorskih T ili B limfocita, primena specifičnih autoantigena radi indukovanja tolerancije, supresija autoimunskog odgovora upotrebom antiinflamacijskih agenasa ili neutralisanjem proinflamacijskih medijatora, ćelijska terapija upotrebom dendritskih ili Treg ćelija ili primena imunoregulatornih stem ćelija (Frumento i sar., 2017).

Iako nespecifična sistemska supresija imunskog sistema pomoću kortikosteroida ili ciklosporina deluje kao jedan od mogućih pristupa efikasne supresije autoimunskog odgovora u DT1, ona je povezana sa brojnim rizicima i neželjenim efektima. Specifična imunomodulacija predstavlja aleternativni pristup u imunosupresivnoj terapiji. Ona podrazumeva ciljano delovanje na pojedine efektorske molekule ili ćelije uključene u autoimunski odgovor, sa željom da se pomoću njene veće specifičnosti zadrži efikasnost terapije uz odsustvo ozbiljnih neželjenih efekata (Ludvigsson, 2016).

### **1.5.1. Terapija dijabetesa tipa 1 putem modulacije efektorskih T i B limfocita**

T i B limfociti su značajne ciljne ćelije u imunoterapiji DT1. Do sada su testirani brojni agensi koji bi mogli sprečiti aktivaciju potencijalno autoreaktivnih T limfocita, suprimirati broj ili funkciju efektorskih T limfocita ili poboljšati broj ili funkciju protektivnih Treg ćelija (Greenbaum i sar., 2019). U tu svrhu su testirana različita blokirajuća antitela, uključujući Teplizumab (anti-CD3 antitelo) koji suprimira citotoksične CD8<sup>+</sup> limfocite (Herold i sar., 2019b), kao i Rituximab (anti-CD20 antitelo) koji dovodi do deplecije B limfocita (Pescovitz i sar., 2009). Testiran je i Abatacept, koji inhibira kostimulaciju T limfocita, a koji je generisan fuzionisanjem konstantnog regiona imunoglobulina IgG1 i vanćelijskog domena CTLA-4 (Orban i sar., 2011). Većina kliničkih studija u kojima je vršena deplecija T ili B limfocita se odlikovala i različitim neželjenim efektima (Frumento i sar., 2017).

### 1.5.2. Terapija dijabetesa tipa 1 putem modulacije Treg ćelija

Kako Treg ćelije imaju bitnu ulogu u kontroli autoimunskog odgovora, terapijski pristupi u lečenju ili sprečavanju razvoja DT1 uključuju i ćelijsku terapiju Treg ćelijama ili terapiju koja ima cilj da povrati ravnotežu između Treg ćelija i efektorskih T limfocita, a različiti pristupi su ispitivani kako u životinjskim modelima bolesti, tako i u kliničkim studijama (Göschl i sar., 2019). Niske doze anti-timocitnog globulina, primenjenog samostalno ili u kombinaciji sa faktorom stimulacije kolonija granulocita (GCSF, engl. granulocyte colony-stimulating factor) su kod osoba sa nedavno dijagnostifikovanim DT1 dovele do očuvanja funkcije  $\beta$  ćelija, a uočen je i povećan odnos zastupljenosti između Treg ćelija i konvencionalnih T limfocita (Haller i sar., 2019). Ispitivanje potencijala terapije rapamicinom, inhibitorom signalnog puta mehanističke mete rapamicina (mTOR, engl. mechanistic Target Of Rapamycin) koji se inače koristi kao imunosupresivni lek pri transplantaciji organa, kod pacijenata sa DT1 je pokazalo da rapamicin povećava sposobnost supresije Treg ćelija (Monti i sar., 2008). Neke kliničke studije su podrazumevale kombinovanje imunosupresivnih i antiinflamacijskih molekula, kao na primer rapamicina i IL-2, imajući u vidu da je IL-2 neophodan Treg ćelijama (Rabinovitch i sar., 2002). Iako je tretman NOD miševa kombinacijom ta dva molekula sprečio razvoj DT1, ovakav tretman je u kliničkoj studiji iskazao prolazan negativan efekat na funkciju  $\beta$  ćelija, uprkos utvrđenom povećanju prisustva Treg ćelija (Long i sar., 2012). Istraživanja na utvrđivanju optimalne niske doze IL-2, pri kojoj bi broj Treg ćelija bio povećan a ekspanzija efektorskih T limfocita ostala ograničena, su i dalje u toku (Seelig i sar., 2018). Postoji i pristup koji podrazumeva izolovanje Treg ćelija iz pacijenata sa DT1 i njihovu *in vitro* ekspanziju, nakon čega se one vraćaju u pacijenta adoptivnim transferom (Bluestone i sar., 2015). Nekoliko kliničkih studija je u procesu testiranja terapije DT1 pomoću Treg ćelija, a do sada završene kliničke studije su pokazale da je upotreba Treg ćelija bezbedna i potencijalno efikasna, a da upotrebeljene Treg ćelije u pacijentima ostaju žive i fenotipski stabilne tokom više meseci (Spence i Tang, 2016). Trenutno traje i klinička studija u kojoj se testira kombinovana primena Treg ćelija i niskih doza IL-2 u terapiji DT1 (Raffin i sar., 2020).

### 1.5.3. Primena antiinflamacijskih jedinjenja u terapiji dijabetesa tipa 1

Pojedine kliničke studije su se fokusirale na inhibiciju proinflamacijskih citokina koji učestvuju u patogenezi DT1. Blokiranje efekta IL-1 $\beta$  upotrebom antitela specifičnih za IL-1 $\beta$  ili za njegov receptor nije imalo efekat na patogenezu bolesti (Moran i sar., 2013), dok neutralizacija TNF- $\alpha$  jeste pokazala određene protektivne efekte kod pacijenata sa DT1 (Mastrandrea i sar., 2009).  $\alpha$ -1 antitripsin je inhibitor serinske proteinaze koji sprečava produkciju proinflamacijskih citokina i infiltraciju imunskih ćelija. Njegova primena u NOD mišjem modelu je dovela do sprečavanja razvoja bolesti, a pokazao je određena pozitivna dejstva i u studijama na pacijentima sa DT1 (Schneider i sar., 2013). Na NOD miševima je testirana i primena Imatiniba, inhibitora tirozin kinaze, koja je postigla sprečavanje razvoja DT1 ili čak i njegovo izlečenje (Greenbaum i sar., 2019).

Sem molekula sa poznatom specifičnošću delovanja, u životinjskim modelima DT1 je testiran i terapijski potencijal raznih imunomodulatornih molekula, bilo veštački sintetisanih ili

prirodnog porekla. Tako je primena CORM-A1, donora ugljen-monoksida, umanjila razvoj DT1 indukovanog primenom STZ suprimirajući inflamaciju i stimulišući regulatorne imunske mehanizme (Nikolic i sar., 2015). Primena elementalnog gvožđa, za koje se zna da ima dejstva adjuvanta, u ovom modelu je dovela je do inhibicije proinflamacijskog odgovora i time sprečila razvoj bolesti (Vujicic i sar., 2018). Kontrola glikemije u istom modelu je postignuta i pri ispitivanju primene različitih biljnih ekstrakata. Prilikom tretmana ekstraktom ginka inflamacijski odgovor u DT1 je sprečen inhibicijom oslobađanja proinflamacijskih IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Rhee i sar., 2015), dok je tretman ekstraktom origana doveo do neutralisanja ROS i supresije Th17 imunskog odgovora, kao i do povećanog prisustva Treg ćelija u infiltratima pankreasa (Vujicic i sar., 2015).

## 1.6. Antiinflamacijska dejstva etil-piruvata

Etil-piruvat predstavlja stabilni lipofilni estar piruvata (Fink, 2002). Tretman etil-piruvatom je u prekliničkim modelima različitih bolesti ispoljio brojne antiinflamacijske i antioksidativne efekte, dovodeći do poboljšanja preživljavanja i umanjena disfunkcije organa zahvaćenih inflamacijom (Yang i sar., 2016a). Modeli bolesti, u kojim snažan proinflamacijski odgovor uzrokuje oštećenja različitih ćelija i organa i u kojim je etil-piruvat ublažio tu imunsku reakciju, uključuju model sepse (Qiu i sar., 2020), akutnog pankreatitisa (Yao i sar., 2019), uveitisa (Kalariya i sar., 2011) i povrede srca pri ishemiji (Jang i sar., 2010). Sigurnost primene etil-piruvata je potvrđena i kod ljudi, testiranjem i na zdravim dobrovoljcima i na osobama sa rizikom od razvijanja komplikacija nakon upotrebe aparata za vantelesni krvotok (Fink, 2008).

Brojne studije su pokazale da etil-piruvat inhibira oslobađanje HMGB1, time suprimirajući inflamaciju koju HMGB1 osloboden iz oštećenih ćelija potencira (Kao i Fink, 2010; Davé i sar., 2009). Kako vanćelijski HMGB1 doprinosi patogenezi autoimunskih bolesti i hronične inflamacije (Musumeci i sar., 2014), etil-piruvat je ispoljio protektivno dejstvo i u različitim modelima autoimunskih bolesti. U njih spadaju eksperimentalni autoimunski orhitis, eksperimentalni artritis (Jung i sar., 2017), model hronične inflamacije testisa (Aslani i sar., 2015), kolitisa (Guo i sar., 2015) i sistemskog eritemskog lupusa (Ji i sar., 2019). U eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu, modelu multiple skleroze, tretman etil-piruvatom je doveo do ublažavanja kliničke slike bolesti, smanjenog oslobađanja proinflamacijskih citokina iz efektorskih T limfocita i supresije aktivacije antigen-prezentujućih ćelija (Miljković i sar., 2015; Djedović i sar., 2017).

U kontekstu DT1, do sada je u životinjskim modelima isključivo testiran uticaj tretmana etil-piruvatom na određene komplikacije asocirane sa ovom bolešću. Studije su pokazale da etil-piruvat štiti mrežnjaču oka (Lee i sar., 2013), bubrege (Ju i sar., 2012) i jetru (Akkoc i sar., 2012; Jovanović Stojanov i sar., 2018) od oštećenja uzrokovanih u toku DT1 i pri razvoju hiperglikemije. Imajući u vidu da HMGB1 ima ulogu u progresiji bolesti u NOD mišjem modelu (Li i sar., 2012), primena etil-piruvata bi se mogla pokazati korisnom u terapiji DT1.

Brojne studije su pokazale da etil-piruvat uzrokuje smanjenu produkciju proinflamacijskih citokina putem delovanja na različite unutarćelijske signalne puteve, kao što su oni posredovani nuklearnim faktorom  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ili Janus kinazom (JAK) i STAT (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription) transkripcionim faktorom (Kao i Fink, 2010). *In vitro* istraživanja su ustanovila da etil-piruvat sprečava oslobađanje proinflamacijskih citokina i HMGB1 od strane

makrofaga stimulisanih lipopolisaharidom (LPS) (Yang i sar., 2016a; Kim i sar., 2016). Makrofagi imaju značajnu ulogu na mestu inflamacije u pankreasnim ostrvcima NOD miševa, gde zahvaljujući prezentaciji autoantigena i oslobađanju citokina mogu oblikovati adaptivni imunski odgovor usmeren protiv  $\beta$  ćelija (Ferris i sar., 2016; Parsa i sar., 2012), što sugeriše da bi eventualna supresija proinflamacijskih sposobnosti makrofaga u pankreasu upotrebom etil-piruvata mogla sprečiti aktivaciju efektorskih T limfocita. Dodatno, u dve studije je pokazano da etil-piruvat suprimira *in vitro* sazrevanje dendritskih ćelija, favorizujući njihov tolerogeni fenotip (Djedovic i sar., 2019; Chakhtoura i sar., 2019). Tolerogene dendritske ćelije oslobađaju manje proinflamacijskih citokina neophodnih za promovisanje Th1 imunskog odgovora, a smanjena ekspresija kostimulatornih molekula ih sprečava da indukuju aktivaciju T limfocita. Tolerogene dendritske ćelije su takođe sposobne da indukuju proliferaciju i diferencijaciju Treg ćelija (Wällberg i Cooke, 2013). Kako je pokazano da Treg ćelije pacijenata sa DT1 poseduju smanjenu supresivnu moć u odnosu na Treg ćelije zdravih osoba (Lindley i sar., 2005), imunomodulacijski pristup koji bi doveo do povećanja broja Treg ćelija i/ili njihove snažnije supresije bi se mogao pokazati značajnim u terapiji DT1.

Potruga za efikasnom i pristupačnom terapijom koja bi sprečila ili usporila razvoj DT1 je i dalje u toku. Iako su dosadašnje terapijske intervencije zasebno pokazale uglavnom prolaznu ili nedovoljnu efikasnost, njihova kombinovana upotreba deluje kao najbolja opcija za buduće terapije DT1, usled njihovih različitih mehanizama zaštite  $\beta$  ćelija (Ludvigsson, 2016). Terapijske intervencije bi tako mogle podrazumevati kombinovanu primenu blokirajućih antitela i imunomodulacijskih agenasa koji bi inhibirali autoreaktivne T limfocite ili doprineli indukciji Treg ćelija (Castro i sar., 2010). Takođe, neophodno je nastaviti potragu za novim terapeutima koji bi doprineli efikasnijem lečenju DT1.

*Efekat etil-piruvata na imunopatogenezu DT1 nije prethodno testiran. Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da etil-piruvat poseduje potencijal da modulira autoimunski odgovor. U skladu sa time, u ovoj doktorskoj disertaciji je testiran uticaj etil-piruvata na razvoj DT1 indukovano primenom STZ kod C57BL/6 miševa, sa posebnom pažnjom posvećenom ulozi Treg ćelija u sprečavanju razvoja DT1.*

## **2. Ciljevi**

Imajući u vidu da je DT1 hronična inflamacijska bolest, kao i na osnovu dosadašnjih podataka o antiinflamacijskom delovanju etil-piruvata u brojnim životinjskim modelima različitih inflamacijskih bolesti, postavljena je hipoteza da **profilaktička primena etil-piruvata dovodi do supresije autoimunskog odgovora tokom DT1 i time sprečava uništavanje  $\beta$  ćelija pankreasa i razvoj bolesti**. Da bi se ova hipoteza testirala, postavljeni su sledeći ciljevi ovog istraživanja:

**1. Ispitati dejstvo *in vivo* profilaktičkog tretmana etil-piruvatom na razvoj DT1 kod C57BL/6 miševa kojima je bolest indukovana primenom STZ:**

- Praćenjem kliničkog toka DT1
- Određivanjem morfologije pankreasnih ostrvaca i funkcije  $\beta$  ćelija
- Utvrđivanjem zastupljenosti različitih populacija antigen-prezentujućih ćelija i njihovom funkcionalnom karakterizacijom u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa
- Određivanjem zastupljenosti Th1, Th2, Th17 i Treg subpopulacija CD4<sup>+</sup> T limfocita, citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita i B limfocita u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa
- Karakterizacijom fenotipa Treg ćelija i procenom supresivnih funkcija u pankreasnim limfnim čvorovima, infiltratima pankreasa i slezini
- Ispitivanjem diferencijacije i proliferacije Treg ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa
- Određivanjem migratorne sposobnosti Treg ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima, infiltratima pankreasa i slezini
- Utvrđivanjem aktivacije Treg ćelija i njihove sposobnosti supresije Th1 i Th17 imunskog odgovora u pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa

**2. Ispitati *in vitro* dejstvo etil-piruvata na diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita izolovanih iz slezine zdravih C57BL/6 miševa:**

- Procenjivanjem diferencijacije Th1 i Th17 podtipova CD4<sup>+</sup> T limfocita
- Procenjivanjem diferencijacije i proliferacije Treg ćelija

**3. Ispitati dejstvo *in vivo* tretmana etil-piruvatom na broj Treg ćelija u peritonealnoj duplji i crevima kod zdravih C57BL/6 miševa:**

- Određivanjem zastupljenosti i broja Treg ćelija u peritonealnoj duplji i crevima
- Procenom sposobnosti proliferacije Treg ćelija izolovanih iz peritonealne duplje

**4. Ispitati *in vitro* dejstvo etil-piruvata na fenotip i metabolički status Treg ćelija diferenciranih iz naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita izolovanih iz slezine zdravih C57BL/6 miševa:**

- Utvrđivanjem ekspresije markera asociranih sa supresivnom aktivnošću Treg ćelija
- Određivanjem produkcije antiinflamacijskih citokina od strane Treg ćelija
- Merenjem *in vitro* sposobnosti supresije Treg ćelija
- Procenom produkcije ATP od strane Treg ćelija
- Merenjem zastupljenosti različitih metaboličkih puteva u Treg ćelijama



# **3. Materijal i metode**

### 3.1. Reagensi i rastvori

U istraživanjima su korišćeni:

PBS (engl. Phosphate Buffered Saline) rastvor u vodi, koji sadrži 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl i 137 mM NaCl (svi iz LachNer, Neratovice, Češka), pH 7,4.

Serum fetusa govečeta (FCS, engl. Fetal Calf Serum, PAA Laboratories, Pašing, Austrija), prethodno inkubiran na 56°C tokom 30 min radi inaktiviranja komponenti komplementa.

Goveđi albumin iz seruma (BSA, engl. Bovine Serum Albumin, frakcija V, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD).

Ćelijski medijum koji predstavlja RPMI (engl. Roswell Park Memorial Institute)-1640 (sa 25 mM HEPES i 2 mM L-glutaminom), sa dodatkom 5% FCS, 1% penicillinom i streptomycinom (svi iz PAA Laboratories) i 0,001% gentamicinom (Galenika, Beograd, Srbija).

Medijum za T ćelije koji predstavlja RPMI koji sadrži 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamin, 10% FCS, 1% penicilin i streptomycin, 0,001% gentamicin, 0,02 mM natrijum-piruvat (Sigma-Aldrich) i 5 µM β-merkaptetanol (Fluka, Buh, Nemačka).

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

Pufer za lizu za Western Blot koji sadrži 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 50 mM ditiotritol (DTT) i 10% glicerol (Sigma-Aldrich).

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

Hartmanov rastvor (Hemofarm A.D., Vršac, Srbija); etanol, metanol, izopropanol, ksilol, vodonik-peroksid, hlorovodonična kiselina (HCl) (svi iz Zorka, Šabac, Srbija); Biomount aqua (Biognost, Zagreb, Hrvatska); pufer za lizu eritrocita, supstrat za peroksidazu TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) (svi iz eBioscience, San Dijego, SAD); tripan plavo (BDSL, Velika Britanija); lipopolisaharid (LPS), streptozotocin (STZ), etil-piruvat (EP), 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU), kolagenaza V, kolagenaza D, rotenon, rapamicin, 2-Deoksi-D-glukoza (2-DG), Perkol, hloroform, Triton X-100, Tween-20, Dihidrorodamin 123 (DHR), koktel inhibitora proteaza (svi iz Sigma-Aldrich); 4-Amino-5-metilamino-2'7'-difluoro-fluorescein diacetat (DAF-FM diacetat, Molecular Probes, Lajden, Holandija); karboksifluorescein sukcinimidil estar (CFSE), reagens za izolovanje RNK (TRIZOL) (svi iz Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD); natrijum dodecil sulfat (SDS) (Applichem, Darmštadt, Nemačka); paraformaldehid (PFA), Tris-HCl, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (svi iz Serva, Hajdelberg, Nemačka); parafin (Novogen Diagnostik, Istanbul, Turska); Majerov hematoksilin (Bio-Optica, Milano, Italija).

### 3.2. Eksperimentalne životinje

Zarad ovog istraživanja korišćeni su mužjaci miševa soja C57BL/6, starosti od dva do tri meseca. Životinje su uzgajane i čuvane u odgajalištu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod standardnim uslovima, sa stalnim pristupom hrani i vodi. Sve eksperimente je odobrio Etički komitet Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (odluka broj 01-11/17 - 01-2475). Dodatno, eksperimenti na miševima su vršeni u skladu sa direktivom 2010/63/EU i ARRIVE (engl. Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) smernicama.

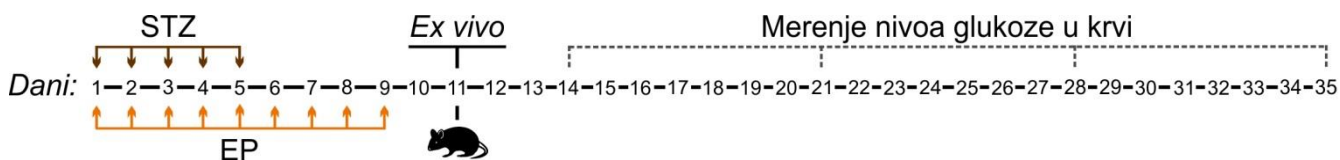
#### 3.3.1. Indukcija dijabetesa tipa 1 i tretman etil-piruvatom

DT1 je kod miševa indukovano intraperitonealnim davanjem višestrukih malih doza STZ, u trajanju od pet dana. STZ, doze 40 mg/kg telesne mase, rastvaran je u hladnom 0,1 M citratnom puferu (pH 6) neposredno pre davanja.

Etil-piruvat je rastvaran u Hartmanovom rastvoru i davan intraperitonealno u dozi od 100 mg/kg telesne mase, u trajanju od devet dana, počevši od prve doze STZ. Injekcije STZ i etil-piruvata su davane sa 3 h razmaka. Netretirana grupa životinja je intraperitonealno primala jednaku zapreminu rastvarača.

Razvoj hiperglikemije kod miševa je posmatran kroz nedeljna merenja nivoa glukoze u krvi iz repne vene, koristeći glukometar (GlucoSure glucometer, Apex Biotechnology Group, Hsinšu, Tajvan), a merena je i promena telesne mase. Životinje su smatrane hiperglikemičnim ako im je koncentracija glukoze u krvi bila  $\geq 11$  mmol/l. Prisustvo ketona u urinu, kao indirektno merilo visokog nivoa glukoze u krvi, je mereno pomoću URiSCAN test tračica (YD Diagnostics, Kjungji-Do, Južna Koreja).

*Ex vivo* analize su vršene između 11 i 15 dana nakon prve STZ injekcije.



Slika 3. Dijagram indukcije dijabetesa i tretmana etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

#### 3.3.2. Tretman zdravih miševa etil-piruvatom

Radi utvrđivanja uticaja etil-piruvata na peritonealne ćelije, etil-piruvat je rastvaran u Hartmanovom rastvoru u dozi od 100 mg/kg telesne mase i davan intraperitonealno zdravim

miševima dva puta, sa 6 h razmaka. Netretirani miševi su intraperitonealno primali jednaku zapreminu rastvarača. *Ex vivo* analize su vršene 18 h kasnije.

Radi utvrđivanja uticaja etil-piruvata na GALT, zdravim miševima je oralnom gavažom davan etil-piruvat u dozi od 100 mg/kg telesne mase ili rastvarač u trajanju od sedam dana. *Ex vivo* analize su vršene dan kasnije.

### **3.4. *In vivo* test proliferacije**

Zdravim miševima je intraperitonealno davan etil-piruvat rastvoren u Hartmanovom rastvoru u dozi od 100 mg/kg telesne mase, u trajanju od dva dana, svakog dana po dva puta sa 6 h razmaka. Netretirani miševi su intraperitonealno primali jednaku zapreminu rastvarača. Radi merenja ćelijske proliferacije limfocita, iskorišćen je 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU), koji se prilikom sinteze DNK inkorporira u DNK umesto timidina. Drugog dana tretmana, BrdU je primenjen intraperitonealno u dozi od 100 mg/kg telesne mase. *Ex vivo* analize su vršene 24 h kasnije.

### **3.5. *Ex vivo* izolovanje ćelija i tkiva**

#### **3.5.1. Izolovanje ćelija slezine, pankreasnih limfnih čvorova i Pejerovih ploča**

Nakon žrtvovanja životinja, na sterilan način su izvađeni slezina, pankreasni limfni čvorovi i tanko crevo sa kojeg su potom isecane Pejerove ploče. Radi dobijanja suspenzije imunskih ćelija, organi su protiskivani kroz plastične mrežice promera 40 µm u Petri šoljama sa PBS sa 3% FCS. Suspenzije ćelija su zatim centrifugirane (550 g, 5 min). U uzorcima dobijenim iz slezina je zatim izvršena eritroliza pomoću pufera za lizu eritrocita. Sve ćelije su na kraju resuspendovane u ćelijskom medijumu.

#### **3.5.2. Izolovanje mononuklearnih infiltrata pankreasa**

Radi izolovanja mononuklearnih infiltrirajućih ćelija iz pankreasa, žrtvovanim životinjama su na sterilan način izvađeni pankreasi i očišćeni od limfnih čvorova. Tkivo je smešteno u u Petri šolje sa Henkovim rastvorom (HBSS, engl. Hank's Balanced Salt Solution) koji je sadržao 10% FCS i usitnjavano makazama na vrlo sitne komadiće (oko 1 mm širine). Nakon centrifugiranja (250 g, 10 min), talog je resuspendovan u rastvoru kolagenaze V, koncentracije 2 mg/ml, u 10 ml HBSS sa 10% FCS po pankreasu. Enzimska digestija tkiva je izvođena mućkanjem uzoraka 15 min na 37°C u vodenom kupatilu, nakon čega su uzorci vorteksovani 20 s. Dobijeni uzorci su dva puta filtrirani kroz plastične mrežice promera 70 µm i nekoliko puta prani u HBSS. Ćelije su finalno resuspendovane u ćelijskom medijumu.

### **3.5.3. Izolovanje pankreasnih ostrvaca**

Nakon žrtvovanja životinja, pankreasi su vađeni na sterilan način i čišćeni od limfnih čvorova. Nakon prebacivanja tkiva u Petri šolje sa HBSS sa 10% FCS, ono je usitnjeno makazama na sitne delove (oko 3-4 mm širine). Enzimaska digestija tkiva je vršena sa kolagenazom V (1 mg/ml) rastvorenom u 3 ml HBSS sa 10% FCS, prilikom mućkanja tokom 15 min na 37°C u vodenom kupatilu. Reakcija je prekidana dodavanjem hladnog HBSS u višku, nakon čega su uzorci ostavljeni na ledu radi taloženja tkiva. Posle odlivanja viška tečnosti, uzorci su presipani u Petri šolje iz kojih su pankreasna ostrvca onda ručno prikupljana pod stereomikroskopom, biranjem pomoću automatske pipete.

### **3.5.4. Izolovanje ćelija peritonealnog ispirka**

Nakon žrtvovanja, životinjama je intraperitonealno ubrizgavano 5 ml hladnog PBS. Trbušna duplja im je potom delom otvarana i peritonealni ispirak je sakupljan pipetom. Suspenzija ćelija peritonealnog ispirka je zatim centrifugirana (550 g, 5 min), a ćelije su potom resuspendovane u ćelijskom medijumu.

### **3.5.5. Izolovanje ćelija lamine proprije tankog creva**

Radi izolovanja mononuklearnih ćelija iz lamine proprije tankog creva, nakon žrtvovanja životinja tanko crevo je izvađeno na sterilan način i čuvano u hladnom PBS. Sadržaj creva je istisnut i Pejerove ploče su uklonjene, nakon čega je crevo rasečeno uzdužno, izdeljeno na delove dužine 1 cm, i isprano tri puta u PBS. Tkivo je onda tri puta prano u PBS 10% FCS, 5 mM EDTA na orbitalnom šejkeru (350 RPM, 15 min) na sobnoj temperaturi. Nakon finalnog pranja u RPMI 10% FCS (350 RPM, 5 min), uzorci su inkubirani na šejkeru sa rastvorom kolagenaze D (500 µg/ml) rastvorene u RPMI sa 10% FCS (500 RPM, 1 h) na 37°C. Reakcija je prekidana pomoću PBS sa 10% FCS, 5 mM EDTA, a dobijena suspenzija ćelija i preostali komadići tkiva su u Petri šolji protiskivani kroz plastične mrežice promera 40 µm. Dobijeni uzorci su dva puta prani sa PBS sa 10% FCS, 5mM EDTA cenrifugiranjem (550 g, 5 min). Talog uzoraka je resuspendovan u 40% rastvoru Perkola i polako nalivan na 80% rastvor perkola, formirajući gradijent koncentracije Perkola. Nakon centrifugiranja (2000 RPM, 20 min, bez koćenja), mononuklearne ćelije iz lamine proprije su finalno izolovane iz prstena koji se nalazio na granici između dva sloja. Nakon ispiranja od viška Perkola sa PBS (800 g, 10 min), ćelije su resuspendovane u ćelijskom medijumu.

### 3.5.6. Prečišćavanje T ćelija magnetnom separacijom

Nakon žrtvovanja životinja, na sterilan način je vađena slezina, protisnuta kroz plastičnu mrežicu promera 40  $\mu\text{m}$  u Petri šolji sa PBS sa 3% FCS, i suspenzija splenocita je dobijana nakon liziranja eritrocita. Radi dobijanja  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  ili  $\text{CD25}^+$  ćelijske frakcije, ćelije su prvo resuspendovane u 800  $\mu\text{l}$  PBS sa 3% FCS i inkubirane sa mišjim antitelom specifičnim za CD25 obeleženim biotinom (1:100, eBioscience) u plastičnim tubama od 2 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) tokom 20 min na 4°C, uz povremeno mućkanje. Nakon toga, ćelije su dva puta prane sa PBS i jednom sa hladnim puferom za magnetne kuglice. Ćelije su onda resuspendovane u 800  $\mu\text{l}$  pufera koji je sadržao magnetne kuglice obložene streptavidinom (BD IMag™ Streptavidin Particles Plus-DM, 1:20, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, SAD) na 4°C, tokom 30 min uz povremeno mućkanje. Ćelijska suspenzija je zatim postavljena u magnet za separaciju (BD IMag™ Cell Separation Magnet, BD Biosciences), u tri ponavljanja po 8 min. Magnetno polje je činilo da pozitivna ćelijska frakcija ( $\text{CD25}^+$ ) ostane zalepljena za zidove plastične tube usled interakcije streptavidina i biotina, dok je negativna frakcija ( $\text{CD25}^-$ ) čuvana i dalje inkubirana sa mišjim antitelom specifičnim za CD4 obeleženim biotinom (1:60, eBioscience). Prateći sve dalje gorenavedene korake, prečišćena je i  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  ćelijska frakcija. Sve ćelije su finalno resuspendovane u medijumu za T ćelije.

### 3.6. *In vitro* diferencijacija podtipova T limfocita

Naivni T limfociti ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ ) prečišćeni iz slezina zdravih životinja su postavljeni u ploče sa 96 bunarića oblog dna (Sarstedt) i stimulirani na različite načine radi usmeravanja diferencijacije ka odgovarajućim podtipovima T limfocita. Ploče su prvo obložene sa 50  $\mu\text{l}$  mišjeg anti-CD3 antitela rastvorenog u PBS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , eBioscience) na 3 h na 37°C, radi aktiviranja T-ćelijskog receptora. Nakon dva ispiranja sa PBS, u bunariće je dodavano po  $5 \times 10^5$  ćelija u 200  $\mu\text{l}$  medijuma za T ćelije, koji je radi kostimulacije takođe sadržao i mišje antitelo specifično za CD28 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , eBioscience).

U cilju diferencijacije Th1 ćelija, ćelije su dodatno stimulirane sa rekombinantnim mišjim interleukinom 12 (IL-12, 20 ng/ml, R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD) i anti-IL-4 antitelom (10 ng/ml, eBioscience). U cilju diferencijacije Th17 ćelija, dodatna stimulacija je vršena sa rekombinantnim mišjim TGF- $\beta$  (10 ng/ml, R&D Systems) i IL-6 (10 ng/ml, R&D Systems). U cilju diferencijacije Treg ćelija, u bunariće su dodavani rekombinantni mišji TGF- $\beta$  (2 ng/ml) i IL-2 (10 ng/ml, R&D Systems), što je predstavljalo potpunu Treg stimulaciju. Radi testiranja uslova nepotpune Treg stimulacije, u bunariće je dodavan samo IL-2.

Radi testiranja uticaja etil-piruvata na diferencijaciju i fenotipske karakteristike podtipova T limfocita, etil-piruvat (125  $\mu\text{M}$ ) je dodavan u ćelijsku kulturu 24 h nakon njenog postavljanja. U cilju pojašnjenja mehanizama delovanja etil-piruvata, 24 h nakon postavljanja ćelijske kulture ćelije su takođe izlagane i rotenonu (5 nM), rapamicinu (100 ng/ml) ili 2-Deoksi-D-glukozi (2-DG, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Fenotip diferenciranih podtipova T limfocita je utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije 72 h (ili 48 h) nakon dodavanja navedenih supstanci.

### 3.7. Određivanje broja ćelija metodom bojenja tripan plavim

Određivanje broja ćelija u uzorcima je vršeno pomoću boje tripan plavo i brojanjem živih ćelija pod svetlosnim mikroskopom. Suspenzije ćelija su mešane sa 0,1% tripan plavim rastvorenim u PBS u odnosu 1:10 ili 1:1, nakon čega su nanošene u komoru po Bürker-Türku sa ugraviranim poljima radi brojanja ćelija pod mikroskopom. Tripan plavo omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija usled sposobnosti da prodire u ćelije sa narušenom membranom, zbog čega žive ćelije pod mikroskopom ostaju nebojene, a mrtve ćelije bivaju obojene u plavo. Ukupan broj živih ćelija po ml uzorka je izračunavan po formuli: broj izbrojanih nebojenih ćelija/broj polja $\times 10^6 \times 2,5$  ako je korišćeno razblaženje 1:10, ili  $\times 0,5$  ako je korišćeno razblaženje 1:1. Na osnovu dobijenog broja, gustina ćelija u suspenziji je razblaživanjem sa ćelijskim medijumom podešavana za upotrebu u daljim eksperimentima.

### 3.8. Analiza ćelija metodom protočne citofluorimetrije

Metoda protočne citofluorimetrije (FACS, engl. Fluorescence Activated Cell Sorting) omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu fluorescentnih signala pojedinačnih ćelija prethodno obojenih specifičnim antitelima konjugovanim sa fluorescentnom bojom. Pri analizi je korišćeno između  $0,5 \times 10^6$  i  $1 \times 10^6$  ćelija po uzorku. Pored uzoraka inkubiranih sa antitelima (obojene ćelije), postojala je i kontrola bojenja, pri kojoj su ćelije prolazile istovetne uslove bojenja, sem što antitelo nije bilo prisutno (nebojene ćelije). Dodatno, korišćene su i odgovarajuće izotipske kontrole radi proveravanja specifičnosti vezivanja primarnog antitela. Uzorci su finalno resuspendovani u PBS. Detekcija signala je vršena na Partec CyFlow Space protočnom citofluorimetru i analizirana FlowMax softverom (Partec, Gerlic, Nemačka), ili na BD FACSCalibur i BD FACSaria III protočnim citofluorimetrima (BD Biosciences) i analizirana FlowMax ili FlowJo (TreeStar, Ešlend, Oregon, SAD) softverom. Očitani rezultati su predstavljeni kroz procenat ćelija koji je vezao odgovarajuće antitelo.

#### 3.8.1. Detekcija površinskih ćelijskih markera

Radi detekcije površinskih molekula, ćelije su inkubirane sa odgovarajućim antitelima rastvorenim u PBS sa 1% BSA na 4°C na 40 min. Korišćena su sledeća fluorescentno obeležena mišja antitela specifična za: CD4-FITC (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova), CD4-PerCP-Cyanine5.5 (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD4-APC (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova), CD8-PE (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), B220-FITC (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD19-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD11c-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG iz jermenskog hrčka), F4/80-FITC (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD25-Alexa Fluor® 488 (izotipska kontrola IgG1  $\lambda$  lanac iz pacova), CD25-PE (izotipska kontrola IgG1  $\lambda$  lanac iz pacova), CD101-PE (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD62L-PE-Cy7 (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), CD206-PE (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova), CD39-PE (izotipska kontrola IgG2b  $\kappa$  lanac iz pacova), CD127-APC-eFluor 780 (izotipska kontrola IgG2a  $\kappa$  lanac iz pacova), MHC II-FITC (izotipska kontrola

IgG2b κ lanac iz pacova), CD357 (GITR)-FITC (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova), CD80-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG iz jermenskog hrčka), CD86-PE-Cy5 (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD103-FITC (izotipska kontrola IgG iz jermenskog hrčka), CD5-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD11a-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), CD40-PE (izotipska kontrola IgM κ lanac iz jermenskog hrčka) (sva iz eBioscience), CD11b (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova) (BD Biosciences), PD-1 (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova) (Abcam, Kembridž, Masačusets, SAD) i obeleženo pacovsko antitelo specifično za IgG-PE (eBioscience).

### **3.8.2. Detekcija unutarćelijskih citokina**

Radi detekcije unutarćelijskih citokina, ćelije su prvo inkubirane 4 h na 37°C sa koktelom za stimulaciju ćelija koji je sadržao i inhibitore transporta proteina (1:500, eBioscience) rastvorenim u ćelijskom medijumu. Uzorci su onda bojeni za površinske markere, pa fiksirani u 2% PFA tokom 15 min radi zadržavanja strukture ćelija. Radi pravljenja pora na ćelijskim membranama i omogućavanju antitelima da dođu u kontakt sa ciljnim molekulima, ćelije su permeabilizovane puferom za permeabilizaciju (eBioscience), nakon čega su inkubirane sa odgovarajućim antitelima rastvorenim u istom puferu na 4°C tokom 40 min. Korišćena su sledeća fluorescentno obeležena mišja antitela specifična za: IFN-γ-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-4-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), IL-10-FITC (izotipska kontrola IgG2b κ lanac iz pacova) (sva iz eBioscience) i IL-17-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova) (BD Biosciences).

### **3.8.3. Detekcija unutarjedarnih proteina i nukleotida**

Za unutarjedarno bojenje, ćelije su permeabilizovane upotrebom uputstva i pufera iz kompleta za bojenje mišjih Treg ćelija (eBioscience). Nakon bojenja površinskih markera, uzorci su ostavljani na 4°C preko noći u puferu za fiksaciju i permeabilizaciju. Sutradan su ćelije inkubirane sa odgovarajućim antitelima rastvorenim u puferu za permeabilizaciju na 4°C tokom 40 min. Korišćena su sledeća fluorescentno obeležena mišja antitela specifična za: FoxP3-PE-Cyanine5 (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), T-bet-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz miša), RORγT-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz pacova), Perforin-PE (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), Granzim B-FITC (izotipska kontrola IgG2a κ lanac iz pacova), BrdU-PE (izotipska kontrola IgG1 κ lanac iz miša) (sva iz eBioscience) i Ki67-FITC (izotipska kontrola poliklonsko antitelo iz kože) (SantaCruz Biotechnology, San Dijego, Kalifornija, SAD). Za bojenje BrdU, dodatni korak pre inkubacije sa antitelom je podrazumevao denaturaciju DNK sa 2 N HCl 0.5% Triton X-100 tokom blagog mućkanja tokom 30 min i neutralizaciju sa 0,1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.



### 3.8.4. Detekcija unutarćelijskog azot oksida i reaktivnih vrsta kiseonika

Radi merenja prisustva unutarćelijskog azot oksida (NO), ćelije su inkubirane sa 2  $\mu\text{M}$  4-Amino-5-metilamino-2'7'-difluoro-fluorescein diacetata (DAF-FM diacetat). DAF-FM diacetat je sposoban da prođe kroz ćelijske membrane, i unutar ćelija biva deacetilovan pomoću unutarćelijskih esteraza, prelazeći u DAF-FM. DAF-FM ne emituje fluorescencu dok ne reaguje sa NO, nakon čega formira fluorescentni benzotriazol. Nakon 1 h na 37°C i ispiranja viška boje sa PBS, uzorci su inkubirani tokom dodatnih 15 min na 37°C u medijumu bez fenola radi dovršavanja deesterifikacije unutarćelijskih diacetata.

Radi detekcije unutarćelijskih ROS, ćelije su inkubirane sa 5  $\mu\text{M}$  Dihidrorodamin 123 (DHR) rasvorenim u ćelijskom medijumu. DHR je nefluorescentna boja koja u prisustvu ROS biva oksidovana do fluorescentne boje rodamin 123. Nakon 20 min na 37°C, višak boje je ispiran sa PBS.

Prilikom analize na protočnom citofluorimetru, prosečni intenzitet fluorescencije (MFI, engl. Mean Fluorescence Intensity) je utvrđivan kao merilo unutarćelijske produkcije NO i ROS.

### 3.9. Test bioluminiscencije ATP

Radi kvantitativnog merenja produkcije ATP, korišćeni su protokol i puferi iz kompleta za test bioluminiscencije ATP HS II (Roche Diagnostics GmbH, Manhajm, Nemačka) visoke osetljivosti. Do oslobađanja svetla kao signala dolazi usled katalize reakcije pomoću luciferaze, pri čemu je jačina dobijenog signala u korelaciji sa količinom prisutnog ATP. Nakon što su ćelije izvađene iz ćelijske kulture, resuspendovane su u Puferu za razblaživanje. Tome je dodavana jednaka količina Reagensa za ćelijsku lizu, nakon čega su uzorci prebacivani u crnu mikrotitarsku ploču i inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi. Potom je dodavan Luciferazni reagens i bioluminiscencija je odmah merena pomoću Chameleon čitača za mikrotitarske ploče (Hidex, Turku, Finska). Nakon izvršenih merenja, koncentracija ATP u uzorcima je izračunavana na osnovu standardne krive formirane na osnovu vrednosti dobijenih od poznatih koncentracija ATP.

### 3.10. *In vitro* test supresije proliferacije

U prvom tipu testa supresije proliferacije, merena je sposobnost supresije Treg ćelija *ex vivo* izolovanih iz slezina netretiranih dijabetičnih miševa ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. Prečišćene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije su prvo inkubirane sa 2  $\mu\text{M}$  CFSE fluorescentnom bojom tokom 20 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je reakcija prekidana dodavanjem medijuma za T ćelije u višku. Posle inkubiranja u trajanju od 5 min na 37°C i ispiranja od viška boje, ćelije su finalno resuspendovane u medijumu za T ćelije. Ploča sa 96 bunarića oblog dna je oblogana sa mišjim anti-CD3 antitelom rastvorenim u PBS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tokom 3 h na 37°C. Jednaka količina ( $25 \times 10^3$ ) prečišćenih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija je smeštana u svaki bunarić. Prečišćene CD25<sup>+</sup> ćelije su

zatim dodavane u seriji razblaženja, počevši od  $25 \times 10^3$  ćelija i smanjujući taj broj 2, 4, 8 i 16 puta. Kao kontrola su služili bunarići koji su sadržali samo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije. Ćelije su takođe stimulisane dodavanjem mišjeg antitela specifičnog za CD28 (1 µg/ml) u medijum za T ćelije. Nakon tri dana kokultivacije, ćelije su prane u PBS i proliferacija T limfocita obojenih pomoću CFSE je analizirana metodom protočne citofluorimetrije, određivanjem sekvencijalnog gubitka fluorescence CFSE.

U drugom tipu testa supresije proliferacije, merena je sposobnost supresije Treg ćelija indukovanih u kulturi u odgovarajućim uslovima diferencijacije, sa ili bez prisustva etil-piruvata. Nakon četiri dana konvencionalne Treg diferencijacije ili diferencijacije stimulisane etil-piruvatom, CD4<sup>+</sup> ćelije iz kulture su inkubirane sa fluorescentno obeleženim mišjim antitelom specifičnim za CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 λ lanac iz pacova) rastvorenim u PBS sa 1% BSA, tokom 40 min na 4°C. CD25<sup>high</sup> Treg ćelije su onda prečišćene pomoću BD FACS Aria™ III ćelijskog sortera (BD Biosciences). Sveže izolovani splenociti zdravih miševa su inkubirani sa mišjim antitelom specifičnim za CD25-PE (izotipska kontrola IgG1 λ lanac iz pacova) i CD4-PE-Cyanine7 (IgG2b κ lanac iz pacova, eBioscience) rastvorenim u PBS sa 1% BSA, u trajanju od 40 min na 4°C. Na ćelijskom sorteru su potom prečišćeni CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfociti i obojeni pomoću CFSE na gorenavedeni način. Ploča sa 96 bunarića oblog dna je prvo oblagana sa mišjim anti-CD3 antitelom rastvorenim u PBS (1 µg/ml) tokom 3 h na 37°C, nakon čega je jednaka količina ( $25 \times 10^3$ ) prečišćenih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija smeštana u svaki bunarić. CD25<sup>high</sup> ćelije su zatim dodavane u seriji razblaženja, počevši od  $25 \times 10^3$  ćelija i smanjujući taj broj 2, 4, 8 i 16 puta. Kao kontrola su služili bunarići koji su sadržali samo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelije. Limfociti su dodatno stimulisani dodavanjem mišjeg antitela specifičnog za CD28 (1 µg/ml) u medijum za T ćelije. Nakon dodatna dva dana kokultivacije, ćelije su prane i resuspendovane u PBS i metodom protočne citofluorimetrije je određivan sekvencijalni gubitak fluorescence CFSE, kao merilo proliferacije T limfocita obojenih CFSE.

### 3.11. *In vitro* test migracije

Radi izvođenja *in vitro* testa migracije, iskorišćen je posebni sistem za hemotaksu (ChemoTX System, Neuro Probe Inc., Gajtersburg, Merilend, SAD). CD25<sup>+</sup> ili CD25<sup>-</sup> ćelije ( $1 \times 10^5$  ćelija u 50 µl medijuma za T ćelije) *ex vivo* prečišćenih iz slezina netretiranih dijabetičnih miševa ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom je postavljano na gornju stranu membrane sistema za hemotaksu. Testirana je migratorna sposobnost tih ćelija ka bunarićima u kojima su se nalazili: izolovana pankreasna ostrvca u medijumu za T ćelije (20 po bunariću); medijum za T ćelije koji je sadržao hemokin CXCL12 (10 ng/ml, Gibco, ThermoFisher Scientific, Valtam, Masačusets, SAD); ili čist medijum za T ćelije kao kontrola. Nakon 4 h, broj ćelija koji je migrirao kroz membranu u bunariće je utvrđivan pomoću LUNA-II™ automatskog brojača ćelija (Logos Biosystems, Kjongi-do, Južna Koreja), nakon što su suspenzije ćelija pomešane sa 0,1% tripan plavim rastvorenim u PBS u odnosu 1:1 i nanešene u pločicu za brojanje (Luna™ Cell Counting Slides, Logos Biosystems).

### 3.12. Imunoblot analiza

Ćelije izolovane *ex vivo* ili iz ćelijske kulture ( $5 \times 10^6$ ) su centrifugirane (2000 g, 3 min). Radi liziranja ćelija, na talog je dodavan pufer za lizu za Western Blot, sa dodatim koktelom inhibitora proteaza. Dobijeni uzorci su mešani sa  $4 \times$  koncentrovanim SDS puferom za nalivanje na gel za elektroforezu u odnosu 3:1. Svi uzorci su onda kuvani tokom 5 min, sem onih namenjenih za detekciju mitohondrijskih proteina oksidativne fosforilacije, usled njihove osetljivosti na zagrevanje. Razdvajanje proteina uzoraka je izvedeno elektroforezom na 12% SDS-poliakrilamidnom gelu. Nakon toga je vršen transfer proteina sa gela na polivinil-difluoridnu membranu pomoću polusuvog blotting sistema (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka) pri jačini struje od  $5 \text{ mA/cm}^2$  gela. Nespecifično vezivanje antitela za membranu je onda sprečavano blokiranjem membrane sa PBS sa 0,1% Tween-20 (PBSTw), 5% BSA ili sa TBS sa 0,1% Tween-20 (TBSTw), 5% BSA, tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana je onda inkubirana preko noći na  $4^\circ\text{C}$  sa primarnim antitelom, u prvom slučaju rastvorenim u PBSTw sa 1% BSA, a u drugom slučaju rastvorenim u TBSTw 5% BSA, u zavisnosti od uputstva proizvođača antitela. Sutradan je membrana inkubirana sa sekundarnim antitelom specifičnim za IgG (tj. konstantni region) primarnog antitela i konjugovanim sa peroksidazom poreklom iz rena (HRP, engl. Horse Radish Peroxidase), tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon svake inkubacije membrana je prošla kroz pet puta po 5 min ispiranja u PBSTw/TBSTw radi uklanjanja nevezanih antitela.

U paru sa primarnim antitelima specifičnim za mišji IL-10 (1:600, eBioscience) i IL-2 (1:500, eBioscience) koja su proizvedena u pacovu, korišćeno je sekundarno antitelo specifično za pacovski IgG konjugovano sa HRP (1:5000, eBioscience). U paru sa primarnim antitelima specifičnim za mišji HMGB1 (1:1500, Invitrogen) i  $\beta$ -aktin (1:1000, Sigma-Aldrich), kao i sa koktelom antitela specifičnih za proteine oksidativne fosforilacije glodara (1:500, Abcam), korišćeno je sekundarno antitelo specifično za mišji IgG konjugovano sa HRP (1:5000, Invitrogen). U paru sa primarnim antitelom specifičnim za mišji CTLA-4 (1:1000, Invitrogen) proizvedenim u sirijskom hrčku, kao sekundarna antitela korišćeni su koktel antitela specifičnih za IgG jermenskog i sirijskog hrčka (1:1000, BD Biosciences) proizvedenog u mišu i antitelom specifičnim za mišji IgG konjugovanim sa HRP (1:5000). U paru sa primarnim antitelima specifičnim za mišju fosforilisanu formu E1- $\alpha$  subjedinice PDH (pPDH, 1:600), PDH (1:1000), PDK4 (1:1000) (sva iz Abcam), za fosforilisanu formu p70 subjedinice S6K (1:600), S6K (1:600), za fosforilisanu formu Akt (1:600), Akt (1:600) (sva iz Cell Signaling Technology, Denvers, Masačusets, SAD), HK2 (1:1000, Invitrogen) i CPT1 (1:800, SantaCruz Biotechnology) koja su proizvedena u zecu, korišćeno je sekundarno antitelo specifično za zečji IgG konjugovano sa HRP (1:3000, Cell Signaling Technology). Dobijanje signala je postignuto inkubacijom membrane sa Immobilon hemiluminiscentnim supstratom za HRP (Millipore, Bilerika, Masačusets, SAD), nakon čega je detekcija hemiluminiscentnog signala izvedena upotrebom rendgenskog filma (Kodak, Ročester, Njujork, SAD). Intenzitet signala je meren densitometrijski pomoću Fiji programa, verzije ImageJ softvera za analizu bioloških slika (Schindelin i sar., 2012). Relativna produkcija specifičnih proteina je izražavana u odnosu na produkciju njihove ukupne proteinske forme ili u odnosu na produkciju  $\beta$ -aktina.

### 3.13. Izolovanje RNK

Suspenzije ćelija ( $5 \times 10^6$ ) dobijene iz različitih tkiva ili ćelijske kulture su prebacivane u plastične tube od 1,5 ml (Sarstedt) i centrifugirane (2000 g, 3 min). Na dobijeni talog je zatim dodavano 500  $\mu$ l reagensa za liziranje (TRIzol), nakon čega su uzorci čuvani na  $-20^\circ\text{C}$ . Nakon odmrzavanja, u uzorke je dodavano po 100  $\mu$ L hladnog hloroforma. Nakon vorteksovanja, uzorci su centrifugirani (12000 g, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ), što je dovelo do formiranja dva distinktna sloja tečnosti – donji organski sloj u kome su se nalazili proteini i gornji vodeni sloj u kome se nalazila RNK, dok je između njih formiran prsten koji je sadržao DNK. Do 200  $\mu$ l vodene faze sa RNK je dalje prebacivano u nove plastične tube od 1,5 ml i mešano sa 250  $\mu$ l izopropanola. Radi precipitacije RNK, uzorci su inkubirani na  $-20^\circ\text{C}$  na 30 min, pa centrifugirani (12000 g, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Dobijeni talozi su tri puta ispirani sa 500  $\mu$ l hladnog 70% etanola pri istim uslovima centrifugiranja. Nakon poslednjeg pranja, etanol je odlivan, a talog RNK sušen do potpunog isparenja etanola i finalno resuspendovan u 13  $\mu$ l vode bez nukleaza (engl. RNase Free Water).

Radi spektrofotometrijskog određivanja koncentracije RNK, napravljena su na dva razblažena svakog uzorka: 1  $\mu$ l uzorka sa 49  $\mu$ l vode, i 2  $\mu$ l uzorka sa 48  $\mu$ l vode. Koncentracija izolovane RNK ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) u uzorcima je određivana pomoću spektrofotometra (GeneQuant Pro, Ameršam, Bakingamšajr, Velika Britanija), zadavanjem programa za određivanje koncentracije RNK, a finalna koncentracija je izračunavana kao srednja vrednost merenja dva različita razblaženja.

### 3.14. Reakcija reverzne transkripcije

Jednake količine (1 do 3  $\mu\text{g}$ ) RNK svakog uzorka su reakcijom reverzne transkripcije prevođene u komplementarnu DNK (cDNK). U 11,5  $\mu$ l uzorka RNK je dodavano 1  $\mu$ l nasumičnih heksamernih prajmera (Fermentas, Villjus, Litvanija). Uzorci su inkubirani na  $70^\circ\text{C}$  tokom 5 min, a potom prebacivani na led. U uzorke je potom dodavano 4  $\mu$ l koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju, 0,5  $\mu$ l inhibitora RNaze, 2  $\mu$ l smeše sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, 10 mM) i 1  $\mu$ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (svi iz Fermentas), do finalne zapremine od 20  $\mu$ l. Nastavak reakcije je podrazumevao inkubaciju na  $25^\circ\text{C}$  na 10 min, a potom na  $42^\circ\text{C}$  u trajanju od 60 min. Prekid reakcije je vršen inkubacijom uzoraka na  $70^\circ\text{C}$  tokom 10 min, a razdvajanje sintetisanih lanaca cDNK je izvedeno inkubacijom na  $95^\circ\text{C}$  u trajanju od 3 min. Uzorci cDNK su čuvani na  $4^\circ\text{C}$  do dalje upotrebe.

### 3.15. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (RT-qPCR, engl. Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction) je korišćena radi analize relativne promene transkripcije RNK gena od interesa. U bunariće ploče sa 96 bunarića za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Vulston, Velika Britanija) je dodavana reakciona smeša za PCR, koja se sastojala od 5  $\mu$ l Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 1  $\mu$ l specifičnih

prajmera za gen od interesa ili za referentni gen  $\beta$ -aktin (Forward i Reverse, Metabion, Štajnkirhen, Nemačka) i 2  $\mu$ l dejonizovane vode. Finalno je u bunariće dodavano po 2  $\mu$ l odgovarajućeg uzorka cDNK, prethodno razblaženog pet puta u dejonizovanoj vodi. Svi uzorci su nalivani u duplikatu, nakon čega je ploča pokrivana optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems), kratko centrifugirana i zatim smeštana u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Uslovi amplifikacije su podrazumevali: 10 min na 50°C, 10 min na 95°C, a potom 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 s na 95°C i 1 min na 60°C. Analiza dobijenih rezultata je izvršena odgovarajućim softverom (7500 System software) koji je obezbedio proizvođač aparata za kvantitativni PCR. Nivo relativne ekspresije gena od interesa je standardizovan u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin poreklom iz istog uzorka, i izražen je kao  $2^{-(C_{ti}-C_{ta})}$ , gde  $C_{ti}$  predstavlja  $C_t$  vrednost gena od interesa, a  $C_{ta}$  dobijenu  $C_t$  vrednost gena za  $\beta$ -aktin.

Korišćeni su parovi prajmera za amplifikaciju gena za: IL-10 (sekvence 5'-TGTGAAAATAAGAGCAAGGCAGTG-3' i 5'-CATTCATGGCCTTGATAGACACC-3', identifikacioni broj NM\_010548.1); TGF- $\beta$  (sekvence 5'-GACCCTGCCCTATATTTGGA-3' i 5'-CGCCCGGGTTGTGTTG-3', identifikacioni broj NM\_011577.2); GAPDH (sekvence 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' i 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3', identifikacioni broj NM\_001289726.1) i  $\beta$ -aktin (sekvence 5'-GACCTGACAGACTACC-3' i 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3', identifikacioni broj NM\_007393.2).

### 3.16. Merenje sekrecije citokina testom ELISA

Splenociti su inkubirani u ćelijskoj kulturi u prisusvu LPS (100 ng/ml) u trajanju od 48 h, nakon čega je koncentracija citokina iz supernatana utvrđivana metodom sendvič ELISA (engl. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Ovom metodom su testirani i supernatanti iz prethodno opisanih *in vitro* eksperimenata diferencijacije sakupljeni nakon 96 h kultivacije.

Korišćene su MaxiSorp ploče sa 96 bunarića (Nunck, Roskilde, Danska) i komercijalni parovi antitela za merenje koncentracija odgovarajućih citokina, a postupci izvođenja metode su vršeni prateći protokole koje je obezbedio proizvođač. Uzorci su analizirani u duplikatu, uz primenu antitela specifičnih za TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TGF- $\beta$  (sva iz eBioscience). Za početak, radi oblaganja dna bunarića primarnim antitelom, isti su preko noći inkubirani sa 50  $\mu$ l primarnog antitela rastvorenog u PBS u odgovarajućoj koncentraciji, na 4°C ili na sobnoj temperaturi u zavisnosti od preporuke proizvođača. Sutradan su bunarići ispirani rastvorom PBS sa 0,05% Tween-20 (tri puta, sa 200  $\mu$ l po bunariću) kako bi se uklonila nevezana antitela. Blokiranje nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela je izvedeno tokom 1 h sa po 100  $\mu$ l PBS sa 10% FCS u slučaju detekcije TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , ili sa PBS sa 5% Tween-20 u slučaju detekcije TGF- $\beta$ . Ploče su zatim isprane tri puta sa PBS sa 0,05% Tween-20, nakon čega je naliveno po 50  $\mu$ l uzoraka supernatana i serije razblaženja traženog citokina poznatih koncentracija (stadarda). Uzorci iz kojih je merena koncentracija TGF- $\beta$  su pre nalivanja prošli aktivaciju, kako bi latentna forma TGF- $\beta$  prešla u imunoreaktivnu formu. To je postignuto zakišeljavanjem uzoraka i potonjom neutralizacijom, prateći protokol proizvođača TGF- $\beta$  antitela. Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, bunarići su ispirani tri puta sa PBS sa 0,05% Tween-20, a zatim je dodato po 50  $\mu$ l odgovarajućeg sekundarnog antitela obeleženog biotinom tokom 1 h. Nakon šest ispiranja, u bunariće je dodato po 50  $\mu$ l rastvora avidina konjugovanog sa HRP (eBioscience), tokom 30 min inkubiranja u mraku. Nakon šest ispiranja sa PBS sa 0,05% Tween-20, dodato je po 50  $\mu$ l TMB,

kao supstrat za peroksidazu. Po razvijanju plave boje, reakcija je prekidana nalivanjem po 50  $\mu$ l 1 M HCl. Apsorbancija je merena pomoću LKB automatskog čitača za mikrotitarske ploče (LKB Instruments, Beč, Austrija) na talasnoj dužini od 450 nm i korigovana za apsorbanciju na talasnoj dužini od 670 nm. Koncentracija citokina prisutnih u uzorcima je određivana preko standardne krive formirane na osnovu vrednosti apsorbancije serije razblaženja rekombinantnih citokina poznatih koncentracija.

### **3.17. Histološka analiza**

#### **3.17.1. Priprema histoloških preparata u parafinu**

Nakon izolovanja iz životinja, pankreasi su postavljeni u 10% rastvor puferisanog formalina na nedelju dana radi fiksacije tkiva. Nakon toga, pankreasi su sprovedeni kroz seriju etanola rastućih koncentracija - dva puta po 30 min u 30% etanolu, dva puta po 30 min u 50% etanolu, i finalno smeštani u 70% etanol, u kojem su držani do nastavka pripreme za parafinizaciju. Nakon toga, dehidracija tkiva je podrazumevala provlačenje tkiva kroz 96% i 100% etanol, u svakom dva puta po 1 h. Tkiva su onda smeštana dva puta po 3 min u ksilol, pa u otopljeni parafin na 1 h, u termostatu na 56°C. Iz njega su tkiva prebacivana u novi parafin, u kojem su ostala preko noći na sobnoj temperaturi. Sledećeg dana, nakon otapanja parafina sa tkivima u termostatu, pankreasi su stavljeni u kalupe sa finalnim parafinom i čuvani na sobnoj temperaturi. Preseci tkiva debljine 5  $\mu$ m su pravljani na Leica RM2265 mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Veclar, Nemačka), sa najmanje 100  $\mu$ m između preseka, i postavljeni na SuperFrost predmetna stakla (ThermoScientific, Braunšvajg, Nemačka).

#### **3.17.2. Bojenje tkivnih preseka hematoksilinom**

Radi uklanjanja parafina sa tkivnih preseka pankreasa izolovanih 35 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom, predmetna stakla sa presecima su smeštena u ksilol, dva puta po 7 min. Rehidracija tkiva je izvođena prebacivanjem predmetnih stakala u 100%, 96% i 75% etanol, redom, i finalno u vodu, svuda po 5 min. Preseci su bojani izlaganjem Majerovom hematoksilinu tokom 3 min, i posle spiranja viška boje u vodi tokom 5 min, na tkivne preseke je nakapavan Biomount aqua medijum za prekrivanje mikroskopskih preparata i preko su postavljana pokrovna stakla. Preparati su ispitivani na Leica svetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems GmbH) i fotografisani pod uveličanjem od 20 $\times$ . Analiza prisustva infiltriranih mononuklearnih ćelija je vršena podelom uočenih pankreasnih ostrvaca u tri grupe: zdrava ostrvca, bez uočene infiltracije; peri-insulitis, sa očuvanom arhitekturom ostrvaca ali sa infiltratima prisutnim oko ostrvaca; i insulitis, sa intenzivnom infiltracijom ćelija u ostrvca, često uz znatno narušavanje arhitekture ostrvaca. Za analizu je korišćeno najmanje 20 ostrvaca po posmatranom pankreasu, a rezultati su predstavljani kao procenat pankreasnih ostrvaca koji pripadaju datoj grupi u odnosu na ukupan broj uočenih ostrvaca.

### 3.17.3. Imunohistohemija

Nakon deparafinizacije i rehidratacije tkivih preseka, sprovedena su imunohistohemijska bojenja na presecima pankreasa izolovanih 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom. Radi demaskiranja antigena, preseci su kuvani u 10 mM citratnom puferu (pH 6) sa 0,05% Tween-20 (tri puta po 8 min, u mikrotalasnoj pećnici na 80% snage). Nakon hlađenja do sobne temperature, preseci su uranjeni u metanol sa 0,1% vodonik-peroksidom na 20 min radi blokiranja endogene peroksidaze, i finalno stavljeni u PBS.

Radi određivanja prisustva HMGB1 u pankreasnim ostrvcima, preseci tkiva su inkubirani sa antitelom specifičnim za HMGB1 proizvedenim u mišu (1:500, Invitrogen) u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi tokom 1 h. Preseci su onda inkubirani sa sekundarnim antitelom specifičnim za mišji IgG konjugovanim sa HRP (1:1000, Invitrogen) u trajanju od 1 h. Inkubacija sa ExtrAvidinom konjugovanim sa peroksidazom (1:10, Sigma-Aldrich) je trajala 30 min. Između svih koraka inkubacije pločice su prane u PBS, tri puta po 5 min, radi uklanjanja viška nevezanog antitela. Na kraju su preseci izlagani rastvoru DAB hromogena (1:50, DakoCytomation, Glostrup, Danska) koji je reagovao kao supstrat za peroksidazu. Po postizanju braon boje, u roku od 2 do 3 min, reakcija je prekidana pomoću PBS. Radi kontrastnog bojenja, preseci su bojani i hematoksilinom na 3 min. Radi kontrole bojenja, korišćeni su preseci inkubirani samo sa antitelom specifičnim za mišji IgG konjugovanim sa HRP. Radi merenja prisustva HMGB1 u pankreasnim ostrvcima, fotografije su pravljene na Leica svetlosnom mikroskopu na 20× uvećanju. Regioni ostrvaca pozitivni na HMGB1 su utvrđivani korišćenjem Icy programa, softvera za analizu bioloških slika, pomoću dodatka za izbor praga boje (engl. Color Picker Threshold Plugin) (de Chaumont i sar., 2012). Na reprezentativnom preseku pankreasa, izabrano je najmanje 15 pozitivnih boja (nijanse tamnije braon) i najmanje 15 negativnih boja (plave, bele i svetlije braon) i zadato kao standardni obrasci prepoznavanja. Oni su zatim primenjivani pri analizi svih preseka pankreasa, radi razlikovanja obojenih i neobojenih regiona ostrvaca. Prisustvo HMGB1 unutar pankreasnih ostrvaca je izražavano kao relativni procenat HMGB1-pozitivne površine ostrvca podeljene sa površinom celog ostrvca.

Radi merenja prisustva insulina u pankreasnim ostrvcima, preseci tkiva su inkubirani sa antitelom specifičnim za insulin proizvedenim u zecu i konjugovanim PE fluorescentnom bojom (1:400, Cell Signaling Technology) u vlažnoj komori tokom 1 h, u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon nekoliko pranja u PBS, jedra su bojena Hoechst 33342 bojom (2 µl/ml, ChemoMetec, Alerod, Danska) u trajanju od 10 min. Radi kontrole bojenja, korišćeni su preseci inkubirani sa antitelom specifičnim za kozji IgG proizvedenim u zecu i konjugovanim sa biotinom (Vector Laboratories, Burlingejm, Kalifornija, SAD), zajedno sa streptavidinom konjugovanim sa PE fluorescentnom bojom (ThermoFisher Scientific). Između svih koraka inkubacije pločice su prane u PBS, tri puta po 5 min, radi uklanjanja viška nevezanog antitela ili boje. Fotografije na 20× uvećanju su pravljene AxioVision mikroskopom (Carl Zeiss Meditec AG, Nemačka). Prisustvo insulina u pankreasnim ostrvcima je određivano pomoću Fiji programa. Napravljene fotografije su konvertovane u paletu sivih tonova, nakon čega je intenzitet fluorescence kvantifikovan određivanjem srednje vrednosti sive (engl. mean gray value), koja predstavlja zbir vrednosti sive svih piksela unutar regiona od interesa podeljen sa ukupnim brojem piksela.

### 3.18. Statistička obrada podataka

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti je utvrđivana upotrebom Studentovog t-testa. Dodatno, za analizu podataka koji nemaju normalnu raspodelu je korišćen Mann-Whitney neparametarski test. Upotreba ovog testa je naznačena u odgovarajućim opisima slika. Razlike između srednjih vrednosti su smatrane statistički značajnim ako je vrednost parametra p bila manja od 0,05. Statistička obrada podataka je izvođena pomoću GraphPad Prism 5 softverskog paketa (GraphPad Software, Inc., La Hoja, Kalifornija, SAD).



# 4. Rezultati

#### 4.1. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na razvoj dijabetesa tipa 1

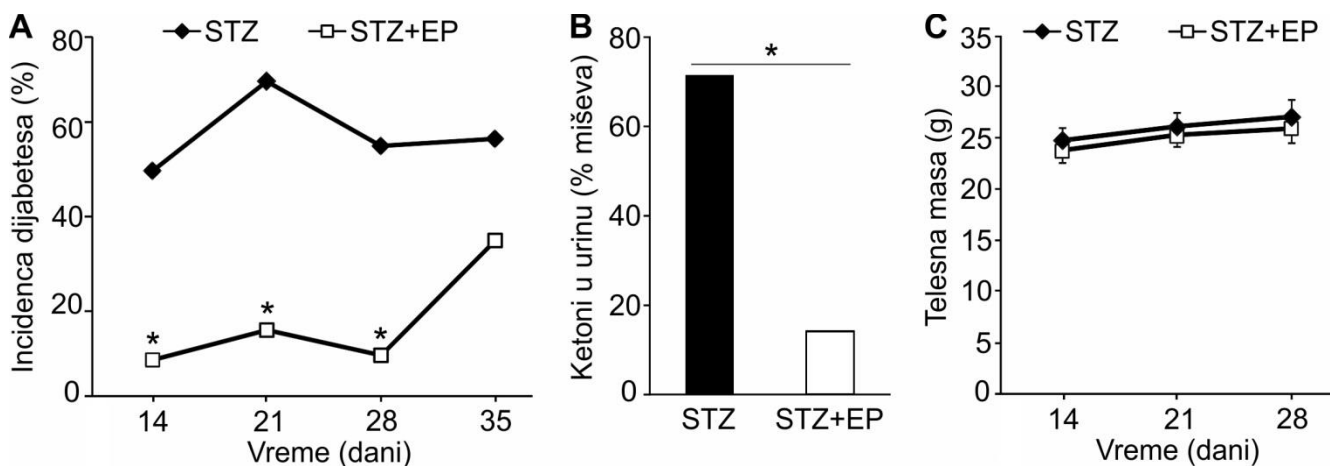
Radi ispitivanja efekta etil-piruvata na razvoj DT1, bolest je indukovana kod mužjaka C57BL/6 miševa intraperitonealnim davanjem višestrukih malih doza STZ u trajanju od pet dana, u subdijabetogenim dozama od 40 mg/kg telesne mase. Razvoj bolesti u ovom modelu podrazumeva odložen i progresivan porast nivoa glukoze u krvi. Hiperglikemija se javlja kao rezultat pokretanja autoimunskog odgovora koji dovodi do narušavanja arhitekture pankreasnih ostrvaca i uništenja  $\beta$  ćelija pankreasa (Luo i sar., 2019). Ovaj model DT1 se generalno koristi za testiranje efikasnosti potencijalnih antidijabetogenih agenasa (Furman, 2015).

##### 4.1.1. Uticaj tretmana etil-piruvatom na klinički tok dijabetesa tipa 1

Prilikom praćenja kliničkog toka bolesti nedeljnim merenjem nivoa glukoze u krvi, utvrđeno je da tretman etil-piruvatom smanjuje incidencu razvoja bolesti (Slika 4A). Netretirana grupa miševa je imala incidencu razvoja DT1 od oko 60%, a grupa tretirana etil-piruvatom se odlikovala značajno manjim procentom miševa koji su razvili hiperglikemiju – 14. dana od početka indukcije bolesti ona je iznosila 7%, 21. dana od početka indukcije bolesti ona je iznosila 13%, a 28. dana od početka indukcije bolesti ona je iznosila 8%. Iako je i 35 dana nakon početka indukcije bolesti procenat bolesnih životinja bio manji u grupi koja je primala etil-piruvat (33%), to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Takođe, mereno je i prisustvo ketona u urinu. U situaciji nedovoljne produkcije insulina i posledične nemogućnosti pravilnog korišćenja glukoze kao izvora energije, dolazi do razgradnje tkiva kao što su masno ili mišićno tkivo. Tim procesom nastaju ketoni koji se mogu koristiti kao izvor energije i u odsustvu insulina. Rezultati su pokazali da je 14 dana nakon početka indukcije bolesti samo 14% miševa tretiranih etil-piruvatom posedovalo ketone u urinu, u poređenju sa 71% miševa iz netretirane dijabetične grupe (Slika 4B).

Tretman etil-piruvatom nije ispoljio uticaj na promenu telesne mase miševa (Slika 1C).

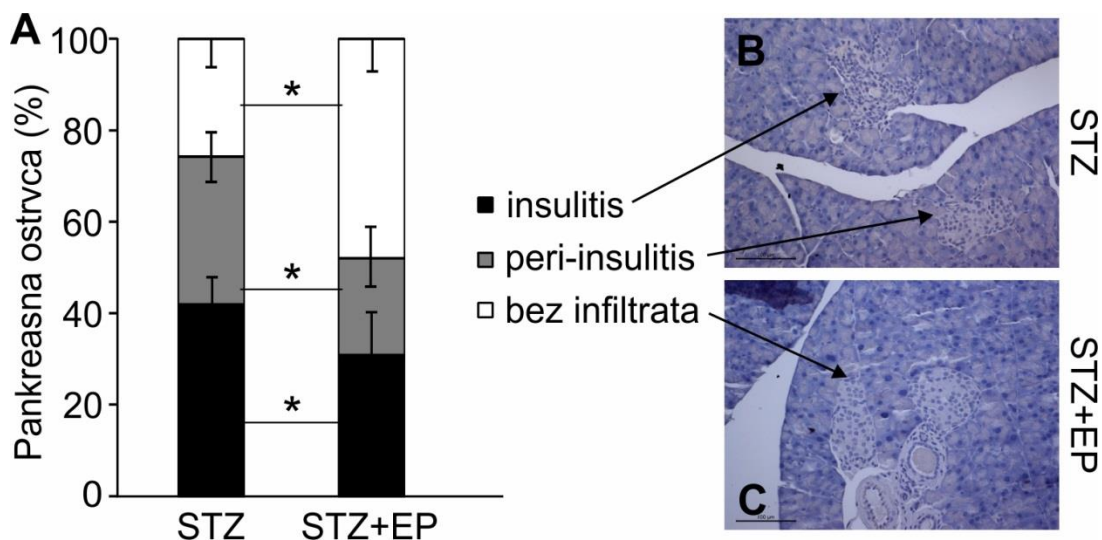


**Slika 4. Efekat etil-piruvata na klinički tok dijabetesa tipa 1.** (A) Incidenca DT1 iskazana kao procenat C57BL/6 miševa sa glikemijom  $\geq 11$  mmol/l u odnosu na ukupan broj netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP). (B) Procenat miševa sa ketonima u urinu, određivan 14 dana nakon početka indukcije bolesti. (C) Promena telesne mase miševa kroz vreme. Sve grupe su se sastojale od 7-10 životinja. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Ovi rezultati su pokazali da tretman etil-piruvatom štiti C57BL/6 miševе od razvoja DT1 izazvanog STZ. Pošto se hiperglikemija u DT1 javlja kao posledica smanjene vijabilnosti i funkcije  $\beta$  ćelija pankreasa koje proizvode insulin, radi detaljnijeg ispitivanja primećenog protektivnog efekta etil-piruvata dalje je izvršena histološka analiza pankreasnih ostrvaca.

#### 4.1.2. Uticaj etil-piruvata na morfologiju pankreasnih ostrvaca u dijabetesu tipa 1

Radi utvrđivanja efekta etil-piruvata na morfologiju pankreasnih ostrvaca, analizirani su histološki preseki pankreasa izolovanih 35 dana nakon početka indukcije bolesti i obojenih hematoksilinom. Utvrđeno je da su pankreasi miševa tretiranih etil-piruvatom posedovali značajno manji procenat pankreasnih ostrvaca u koja su infiltrirale mononuklearne ćelije (insulitis), kao i značajno manje ostrvaca okruženih infiltratima (peri-insulitis) u odnosu na grupu sa DT1 (Slika 5A-C). Životinje tretirane etil-piruvatom su se takođe odlikovale i većom zastupljenošću zdravih pankreasnih ostrvaca bez uočenih infiltrata, u odnosu na netretirane dijabetične životinje kod kojih je veći procenat ostrvaca bio narušene arhitekture i zahvaćen insulitisom.



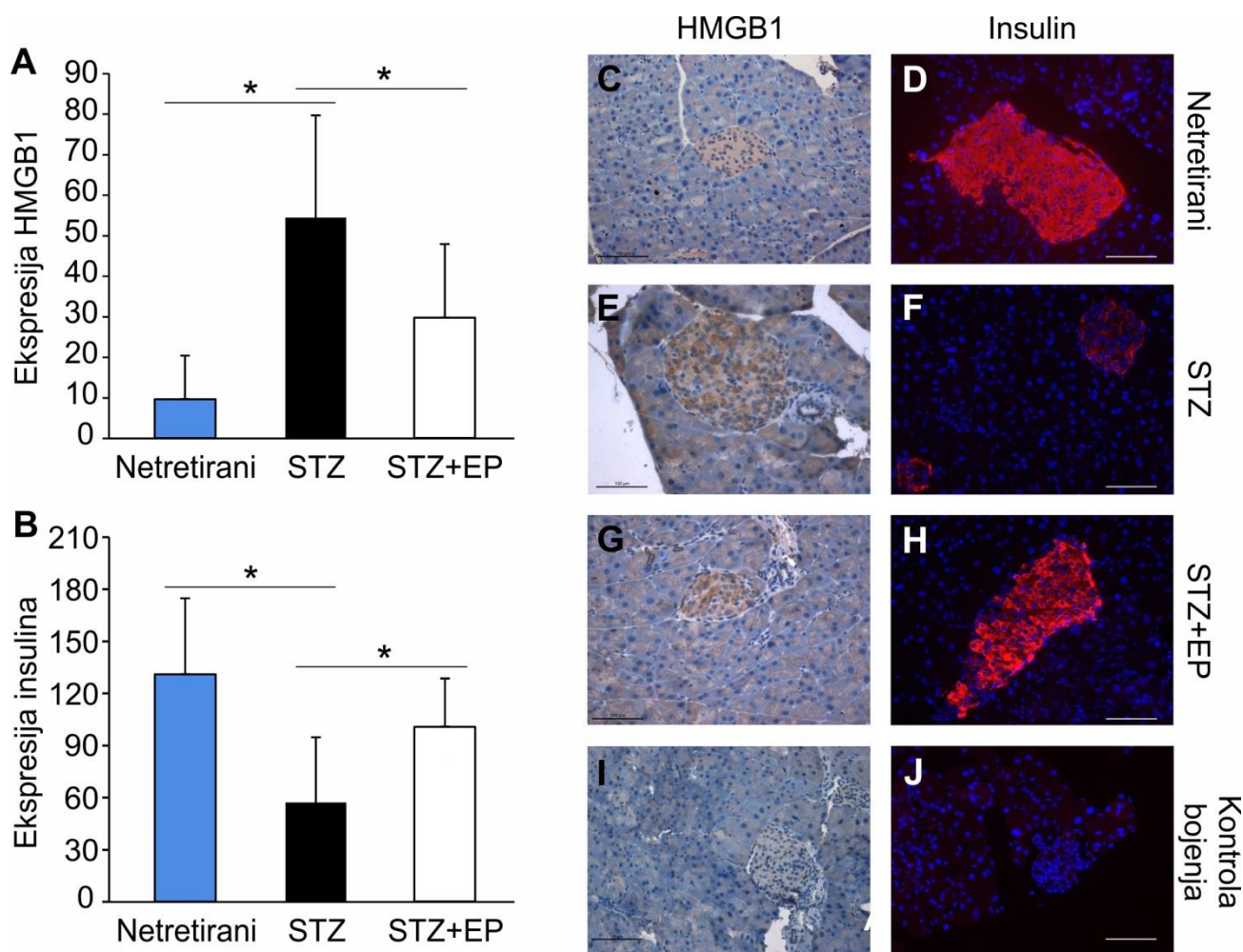
**Slika 5. Efekat etil-piruvata na infiltraciju ćelija u pankreasna ostrvca.** (A) Analiza infiltracije na presecima pankreasa izolovanih 35 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom i obojenih hematoksilinom. Kvantitativna analiza stepena zahvaćenosti pankreasnih ostrvaca infiltracijom je izražena kao procenat ostrvaca sa insulitisom (sa intenzivnom infiltracijom ćelija u ostrvca

često narušene arhitekture), peri-insulitisom (sa infiltratima prisutnim oko ostrvaca očuvane arhitekture), i bez infiltrata (zdrava ostrvca), u odnosu na ukupan broj uočenih ostrvaca. Za kvantifikaciju je korišćeno najmanje 20 ostrvaca po posmatranom pankreasu. Reprezentativni histološki preseki pankreasa poreklom iz netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) (B) i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) (C). Dužina skale je 100  $\mu$ m. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

#### **4.1.3. Uticaj etil-piruvata na funkciju $\beta$ ćelija u dijabetesu tipa 1**

HMGB1 je jedarni protein koji nakon oslobađanja iz nekrotičnih ćelija može delovati kao pokretač inflamacijskog odgovora, a postoje dokazi da je progresija DT1 u NOD mišjem modelu DT1 povezana sa povišenom ekspresijom HMGB1 u  $\beta$  ćelijama (Li i sar., 2012). Zato je merena ekspresija HMGB1 na histološkim presecima pankreasnih ostrvaca iz pankreasa izolovanih 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom. U poređenju sa zdravim, netretiranim miševima, koji su se odlikovali niskom ekspresijom HMGB1, u pankreasnim ostrvcima dijabetičnih miševa ekspresija HMGB1 je bila značajno viša (Slika 6A,C,E). Kvantifikacija prisustva HMGB1 je pokazala da je tretman dijabetičnih miševa etil-piruvatom uspešno inhibirao povećanje HMGB1 (Slika 6A,E,G).

Kao aspekt vijabiliteta i funkcionalnosti  $\beta$  ćelija, merena je i ekspresija insulina unutar pankreasnih ostrvaca iz pankreasa izolovanih 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom. Ekspresija insulina na histološkim presecima pankreasnih ostrvaca je bila veća kod netretiranih, zdravih miševa u poređenju sa dijabetičnim miševima (Slika 6B,D,F). Sa druge strane, tretman dijabetičnih miševa etil-piruvatom je uzrokovao vraćanje nivoa ekspresije insulina u  $\beta$  ćelijama na nivo sličnji onom kod netretiranih, zdravih miševa (Slika 6B,F,H).



**Slika 6. Efekat etil-piruvata na ekspresiju HMGB1 i insulina u pankreasnim ostrvcima.** (A) Analiza ekspresije HMGB1 u pankreasnim ostrvcima poreklom iz pankreasa izolovanih 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom i imunohistohemijski bojenih antitelom specifičnim za HMGB1 (tamno braon), kao i hematoksilinom zarad kontrastnog bojenja. Ekspresija HMGB1 je utvrđivana korišćenjem Icy programa, pomoću dodatka za izbor praga boje, a izražena je kao relativni procenat HMGB1-pozitivne površine ostrvca podeljene sa površinom celog ostrvca. Reprezentativne slike koje prikazuju bojenje HMGB1 u pankreasnim ostrvcima poreklom iz netretiranog, zdravog miša (C), netretiranih dijabetičnih miševa (E) i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (G), kao i kontrole bojenja radi potvrđivanja specifičnosti detekcije (I). (B) Analiza ekspresije insulina u pankreasnim ostrvcima poreklom iz pankreasa izolovanih 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom i imunohistohemijski bojenih antitelom specifičnim za insulin (crveno), dok su jedra obojena Hoechst 33342 bojom (plavo). Ekspresija insulina je utvrđivana merenjem intenziteta fluorescence pomoću Fiji programa. Reprezentativne slike koje prikazuju bojenje insulina u pankreasnim ostrvcima poreklom iz netretiranog, zdravog miša (D), netretiranih dijabetičnih miševa (F), dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (H), kao i kontrole bojenja radi potvrđivanja specifičnosti detekcije (J). Dužina skale je 100  $\mu\text{m}$ . Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP). STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Ovi rezultati ukazuju da je tretman etil-piruvatom sprečio oštećenje pankreasnih ostrvaca i omogućio očuvanje funkcije  $\beta$  ćelija koje proizvode insulin kroz smanjivanje infiltracije imunskih ćelija.

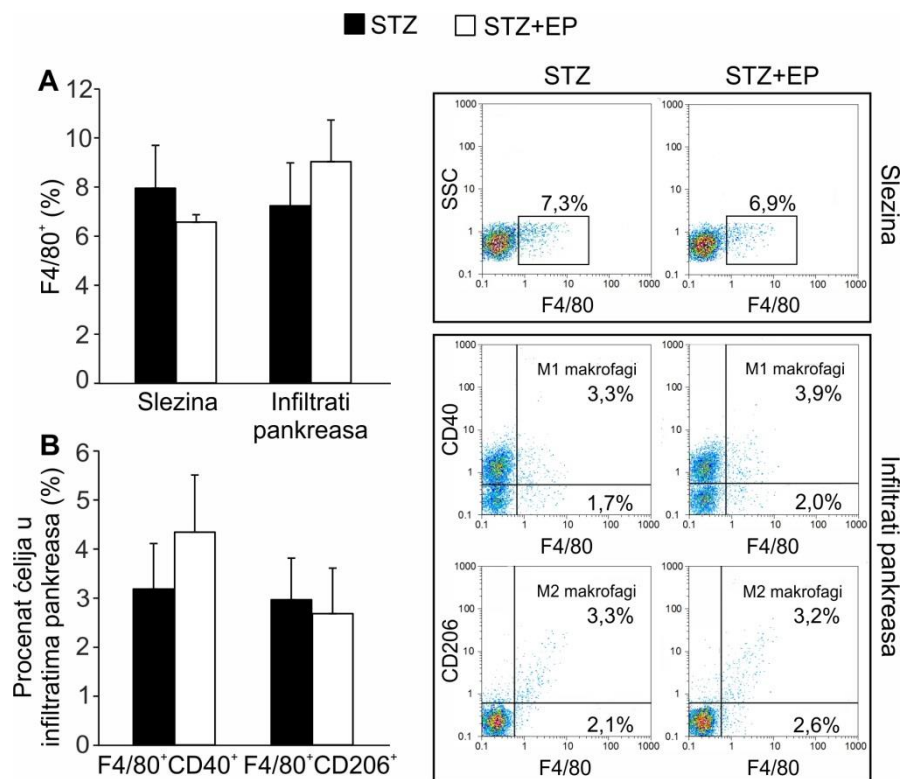
#### **4.2. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na ćelije imunskog sistema u dijabetesu tipa 1**

Kako je utvrđeno da tretman etil-piruvatom sprečava razvijanje DT1 izazvanog STZ, sledeći korak je bilo ispitivanje eventualnog uticaja etil-piruvata na promene broja i funkcije imunskih ćelija koje bi bile zaslužne za njegov uočeni protektivni efekat. *Ex vivo* analiza različitih populacija ćelija je izvršena 15 dana nakon početka indukcije bolesti i profilaktičkog tretmana etil-piruvatom. Analizirane su ćelijske populacije izolovane iz slezine, kao indikator sistemskog imunskog odgovora; iz pankreasnih limfnih čvorova, kao drenirajućih limfnih čvorova i mesta inicijacije autoimunskog odgovora; kao i iz mononuklearnih infiltrata pankreasa, direktnih izvršitelja odgovora pokrenutog protiv  $\beta$  ćelija pankreasa.

##### **4.2.1. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na antigen-prezentujuće ćelije urođene imunosti u dijabetesu tipa 1**

*Ex vivo* analizom ćelija izolovanih iz netretiranih dijabetičnih miševa ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom prvo su posmatrane populacije antigen-prezentujućih ćelija. Makrofagi su jedne od prvih ćelija koje u ovom modelu DT1 vrše infiltraciju u pankreasna ostrvca (Lukić i sar., 1998) i svojim efektorskim mehanizmima doprinose njihovom oštećenju, dok njihova prezentacija antigena  $\beta$  ćelija zatim doprinosi aktivaciji autoreaktivnih T limfocita. Ispitivanjem makrofaga (F4/80<sup>+</sup> ćelija) izolovanih iz slezine i infiltrata pankreasa utvrđeno je da tretman etil-piruvatom nije doveo do promene njihove zastupljenosti (Slika 7A).

Subpopulacije makrofaga mogu biti heterogenog fenotipa, i najčešće se dele na dva podtipa: na klasično aktivirane, proinflamacijske M1 makrofage i alternativno aktivirane, antiinflamacijske i imunoregulatorne M2 makrofage. M1 makrofagi tako oslobađaju proinflamacijske citokine kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 i IL-23 i odlikuju se produkcijom NO i ekspresijom kostimulatornog molekula CD40, dok se M2 makrofagi odlikuju sekrecijom antiinflamacijskih citokina kao što su IL-10 i TGF- $\beta$  i na svojoj površini ekspimiraju CD206 manozni receptor. Balans u polarizaciji ka M1 ili M2 fenotipu makrofaga može imati značajan uticaj na tok inflamacije (Shapouri-Moghaddam i sar., 2018). Zato je sledeći korak bilo ispitivanje efekta etil-piruvata na odnos između proinflamacijskih M1 i antiinflamacijskih M2 makrofaga. Detektovane su populacije F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> ćelija koje predstavljaju M1 makrofage i F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> ćelija koje predstavljaju M2 makrofage u infiltratima pankreasa. Rezultati su pokazali da etil-piruvat nije imao uticaj na polarizaciju makrofaga ni ka M1 ni ka M2 fenotipu (Slika 7B).

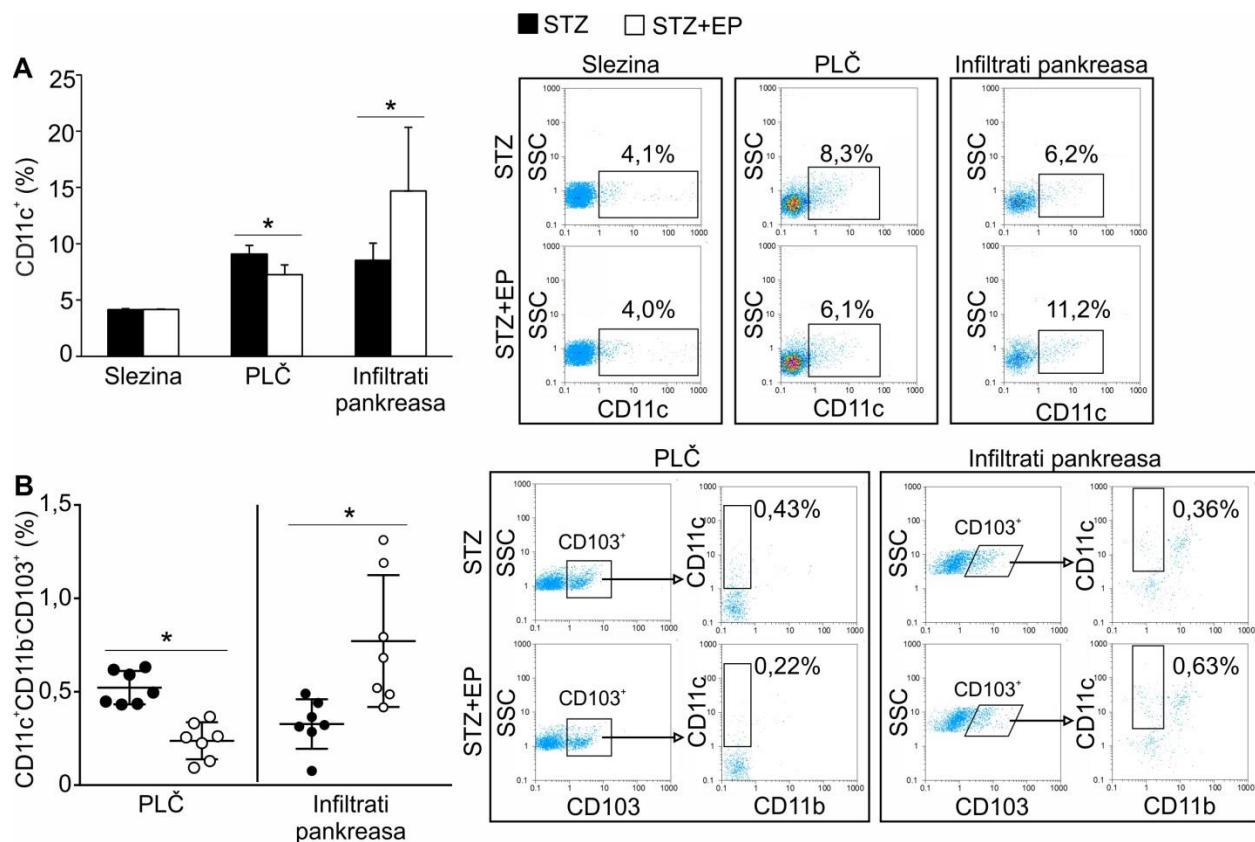


**Slika 7. Efekat etil-piruvata na zastupljenost populacija makrofaga.** Procenti ćelija izolovanih iz netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi su prikazani sa desne strane. (A) Procentat makrofaga (F4/80<sup>+</sup>) izolovanih iz slezine i infiltrata pankreasa. (B) Procenti M1 (F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) i M2 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) makrofaga izolovanih iz infiltrata pankreasa. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Sem makrofaga, i dendritske ćelije doprinose prezentaciji autoantigena  $\beta$  ćelija i daljem pokretanju imunskog odgovora. Ispitivanjem uticaja tretmana etil-piruvatom na dendritske ćelije, utvrđeno je da je procenat CD11c<sup>+</sup> dendritskih ćelija nakon tretmana bio značajno smanjen u pankreasnim limfnim čvorovima, dok je istovremeno bio značajno povišen u infiltratima pankreasa (Slika 8A). Tretman etil-piruvatom nije doveo do promene zastupljenosti dendritskih ćelija u slezini (Slika 8A).

Slično makrofagima, i subpopulacije dendritskih ćelija se međusobno mogu razlikovati po svom pro- ili antiinflamacijskom fenotipu. Tako su tolerogene dendritske ćelije sposobne da različitim imunosupresivnim mehanizmima dovedu do pojave anergije T limfocita ili do promovisanja njihove diferencijacije u Treg ćelije (Domogalla i sar., 2017). Zbog toga je ispitivana specifična tolerogena subpopulacija dendritskih ćelija (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>), pri čemu je utvrđeno da je etil-piruvat doveo do povećanja njihove zastupljenosti u infiltratima pankreasa (Slika 8B). Moguće je da je migracija ovih ćelija u pankreas iz pankreasnih limfnih čvorova bila povećana, pošto je utvrđeno da je nakon tretmana etil-piruvatom u ovim čvorovima njihov broj bio smanjen (Slika 8B).



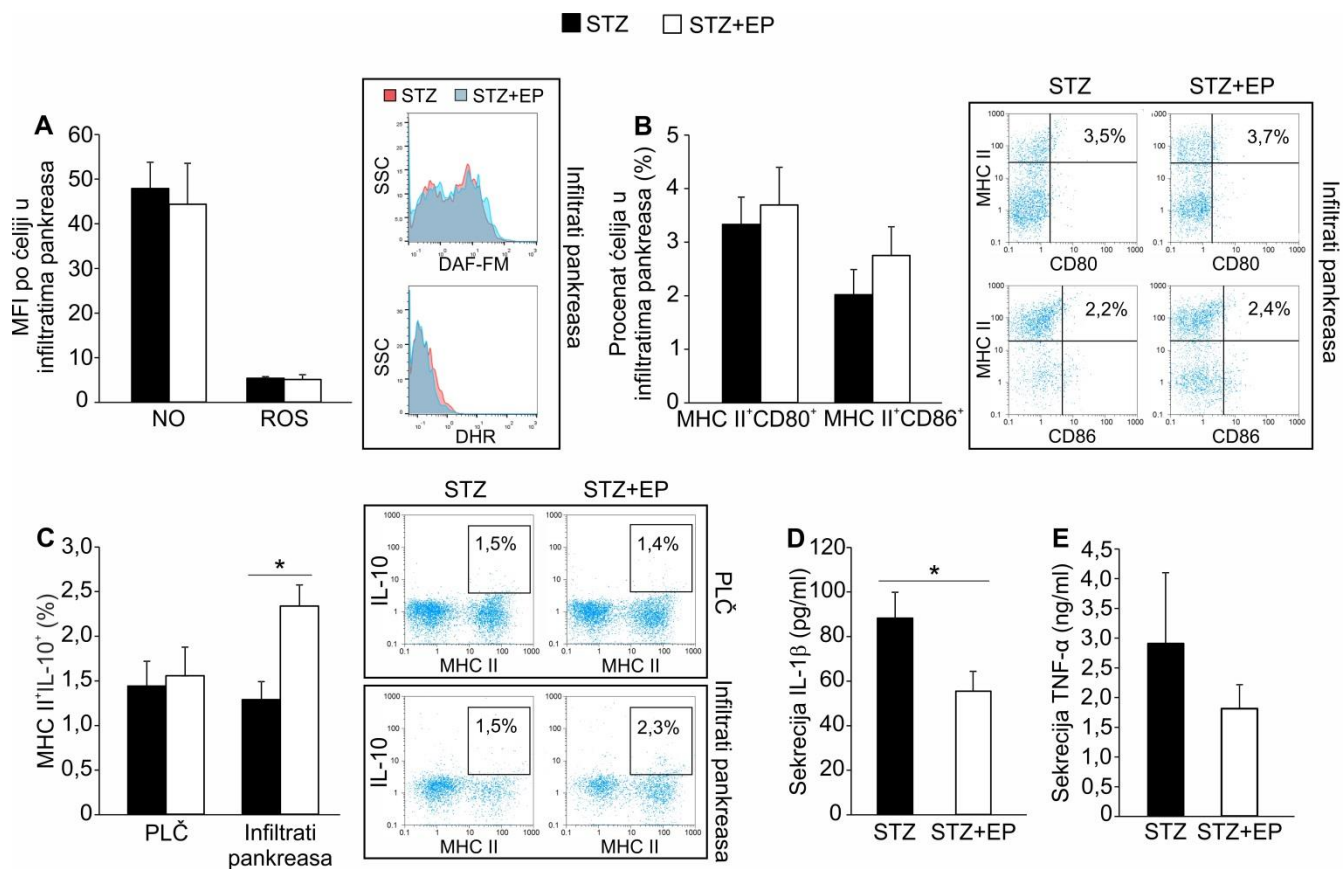


**Slika 8. Efekat etil-piruvata na zastupljenost populacija dendritskih ćelija.** Procenti ćelija izolovanih iz netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. (A) Procenat dendritskih ćelija (CD11c<sup>+</sup>) izolovanih iz slezine, pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa, sa reprezentativnim dot plotovima i odgovarajućim strategijama ograničavanja. (B) Procenti tolerogenih dendritskih ćelija (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>) izolovanih iz PLČ i infiltrata pankreasa, sa reprezentativnim dot plotovima. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Za analizu rezultata je korišćen Mann-Whitney neparametarski test. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Radi daljeg ispitivanja uticaja etil-piruvata na funkciju antigen-prezentujućih ćelija, merena je njihova sposobnost produkcije proinflamacijskog medijatora NO i ROS. Uprkos tome što se etil-piruvat generalno smatra antioksidantom, on nije uticao na produkciju NO ili ROS u fagocitnim ćelijama iz infiltrata pankreasa (Slika 9A). Dodatno, etil-piruvat nije imao uticaj na antigen-prezentujuću sposobnost ovih ćelija pošto je ekspresija kostimulatornih molekula CD80 i CD86 na MHC II<sup>+</sup> ćelijama bila ista u obe grupe životinja (Slika 9B).

Međutim, tretman etil-piruvatom je doveo do značajnog povećanja supresivne funkcije MHC II<sup>+</sup> ćelija, pošto je produkcija antiinflamacijskog citokina IL-10 u ovim ćelijama bila povećana (Slika 9C). Dodatno, merenjem koncentracije citokina produkovanih u splenocitima stimulisanim primenom LPS izolovanim iz netretiranih dijabetičnih miševa ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom, pokazalo se da su splenociti iz životinja tretiranih etil-piruvatom produkovali manju količinu proinflamacijskog IL-1β (Slika 9D), dok je produkcija proinflamacijskog TNF-α bila slična između grupa životinja (Slika 9E).





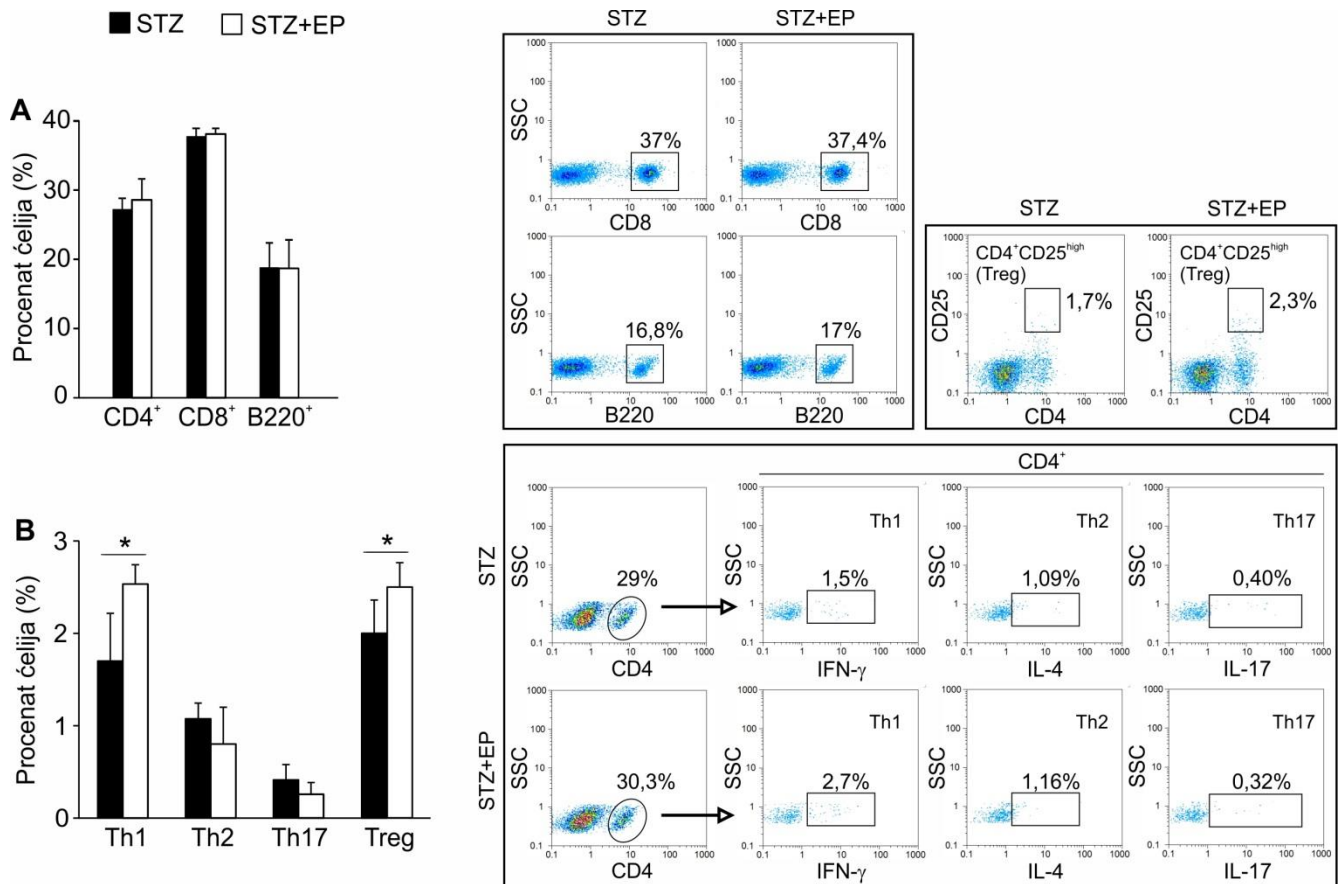
**Slika 9. Efekat etil-piruvata na funkciju ćelija urođene imunosti.** (A) Unutarćelijska produkcija NO utvrđena metodom protočne citofluorimetrije putem merenja prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI) DAF-FM diacetata, i ROS putem merenja MFI DHR, ćelija izolovanih iz infiltrata pankreasa netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP), sa reprezentativnim histogram plotovima. (B) Procenat MHC II<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> i MHC II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ćelija izolovanih iz infiltrata pankreasa, sa reprezentativnim dot plotovima. (C) Procenat MHC II<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa, sa reprezentativnim dot plotovima. Sekretija IL-1 $\beta$  (D) i TNF- $\alpha$  (E) merena metodom ELISA iz supernatanta splenocita izolovanih *ex vivo* i stimulisanih primenom LPS na 48 h. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

#### 4.2.2. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na ćelije adaptivne imunosti tokom dijabetesa tipa 1

Antigen-prezentujuće ćelije koje su infiltrirale pankreasna ostrvca preuzimaju antigene  $\beta$  ćelija i prezentuju ih pomoćničkim CD4<sup>+</sup> ili citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T limfocitima koji onda preuzimaju glavnu ulogu u daljem autoimunskom napadu na  $\beta$  ćelije, ili oslobađanjem proinflamacijskih medijatora i citokina ili putem direktnog ćelijskog kontakta. I autoreaktivni B limfociti bivaju aktivirani, doprinoseći patofiziologiji bolesti sekretovanjem antitela specifičnih za antigene  $\beta$  ćelija. Zbog toga su u sledećem koraku analizirani citotoksični T limfociti, različite subpopulacije pomoćničkih T limfocita, kao i B limfociti. Ispitivani pomoćnički T limfociti su

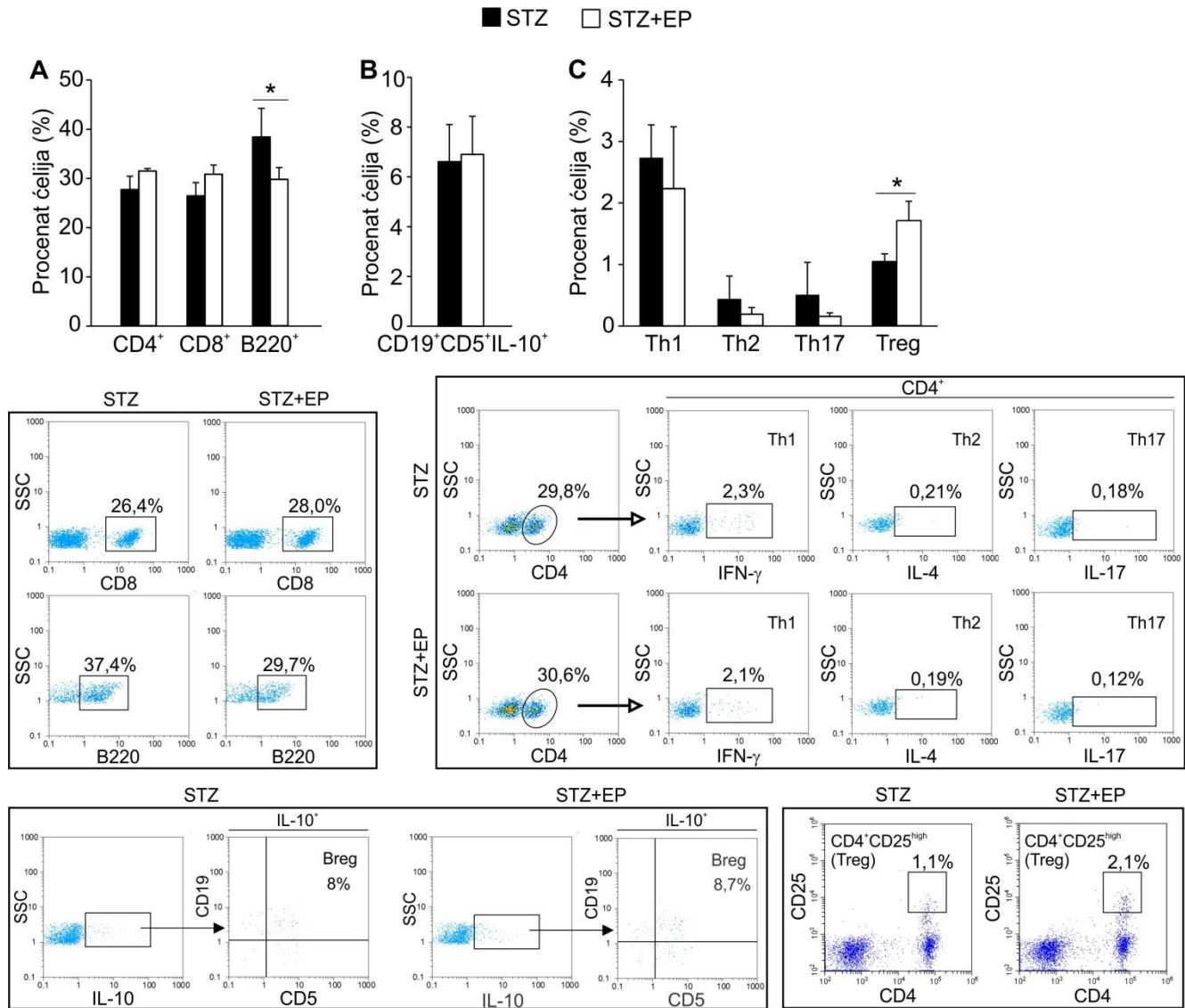
podrazumevali proinflamacijske Th1 (koje proizvode IFN- $\gamma$ ) i Th17 (koje proizvode IL-17) ćelije i antiinflamacijske Th2 (koje proizvode IL-4) i Treg ćelije. Kako preživljavanje Treg ćelija zavisi od citokina IL-2, one se odlikuju visokom ekspresijom CD25, koji predstavlja subjedinicu receptora za IL-2 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>).

Analizom ćelija izolovanih iz slezina netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat, uvrđeno je da etil-piruvat nije uticao na zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita i B220<sup>+</sup> B limfocita (Slika 10A). Detaljnijom analizom podtipova CD4<sup>+</sup> T limfocita, utvrđeno je da je nakon tretmana etil-piruvat procenat Th1 i Treg ćelija nakon tretmana u slezini bio povećan, dok promena nije uočena u Th2 i Th17 subpopulacijama (Slika 10B).



**Slika 10. Efekat etil-piruvata na zastupljenost ćelija adaptivne imunosti u slezini.** Procenti ćelija izolovanih iz slezina netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. (A) Procenat ukupnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, citotoksičnih T limfocita (CD8<sup>+</sup>) i B limfocita (B220<sup>+</sup>). (B) Procenat ćelija koje spadaju u podtipove T limfocita: Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th2 (CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>), Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) i Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>). Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

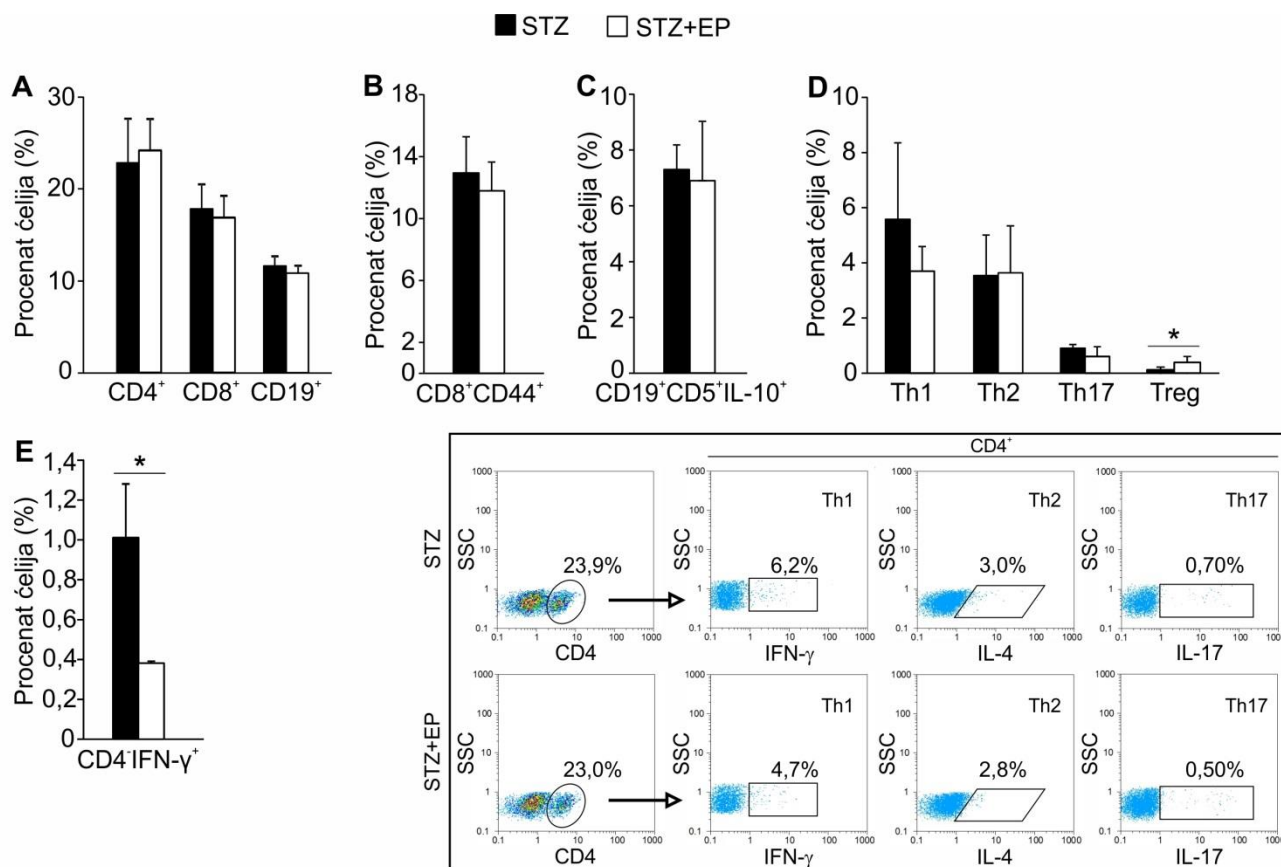
Analizom ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom, utvrđeno je da tretman etil-piruvatom nije imao efekat na zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita, dok je doveo do smanjenja procenta B220<sup>+</sup> B limfocita (Slika 11A). Analizirana je i zastupljenost regulatornog podtipa B (Breg) ćelija, koji može doprineti imunskoj supresiji pretežno kroz oslobađanje antiinflamacijskog citokina IL-10 (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>). Rezultati su pokazali da je zastupljenost Breg ćelija bila ista u obe ispitivane grupe (Slika 11B). Posmatranjem podtipova CD4<sup>+</sup> T limfocita, utvrđeno je da je samo procenat Treg ćelija bio povišen nakon tretmana etil-piruvatom, dok su procenti Th1, Th2 i Th17 ćelija ostali nepromenjeni (Slika 11C).

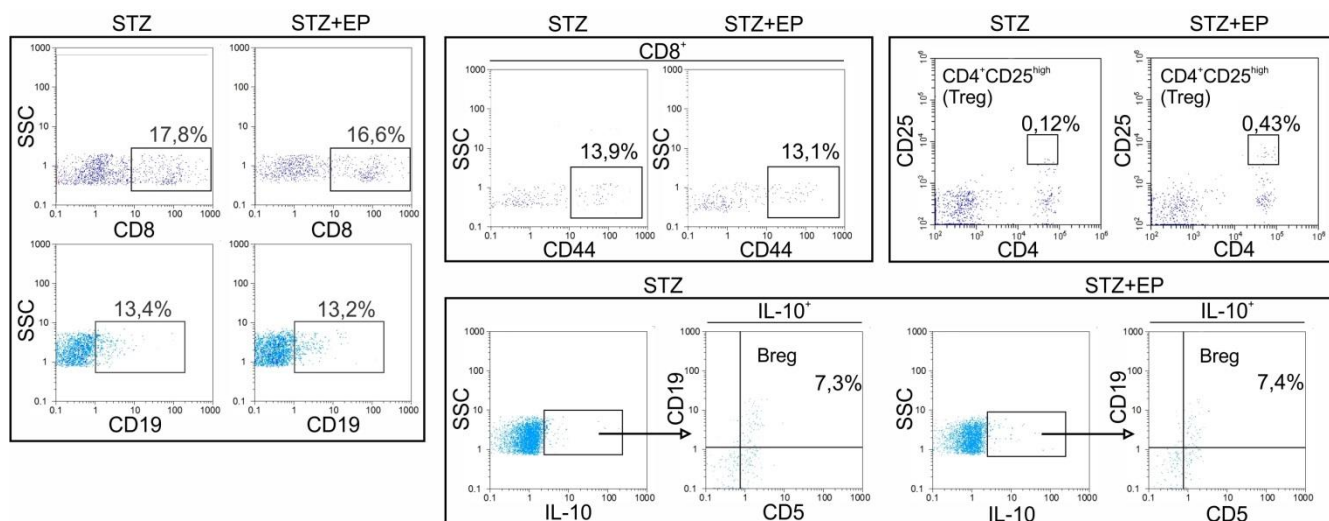


**Slika 11. Efekat etil-piruvata na zastupljenost ćelija adaptivne imunosti u pankreasnim limfnim čvorovima.** Procenti ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. (A) Procentat ukupnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, citotoksičnih T limfocita (CD8<sup>+</sup>) i B limfocita (B220<sup>+</sup>). (B) Procentat Breg ćelija (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>). (C) Procentat ćelija koje spadaju u podtipove T limfocita: Th1

(CD4+IFN- $\gamma$ ), Th2 (CD4+IL-4), Th17 (CD4+IL-17) i Treg (CD4+CD25<sup>high</sup>). Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Upoređivanjem zastupljenosti ćelija koje su infiltrirale pankrease netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat, utvrđeno je da tretman etil-piruvat nije doveo do promene zastupljenosti ni CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ni CD19<sup>+</sup> B limfocita (Slika 12A). Dalje ispitivanje aktivnosti citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita, merenjem prisustva CD44 markera aktivacije, pokazalo je da su ove ćelije bile podjednako aktivirane u infiltratima pankreasa obe grupe životinja (Slika 12B). Zastupljenost Breg ćelija je takođe ostala nepromenjena (Slika 12C). Posmatranjem podtipova CD4<sup>+</sup> T limfocita, utvrđeno je da je i u ovom tkivu samo procenat Treg ćelija bio povišen nakon tretmana etil-piruvat, dok nije bilo promene u zastupljenosti Th1, Th2 i Th17 ćelija (Slika 12D). Dodatno, nakon tretmana etil-piruvat uočeno je smanjeno prisustvo ćelija koje nisu ispoljavale CD4 a jesu produkovale proinflamacijski IFN- $\gamma$  (Slika 12E).





**Slika 12. Efekat etil-piruvata na zastupljenost ćelija adaptivne imunosti u infiltratima pankreasa.** Procenti ćelija izolovanih iz infiltrata pankreasa netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprerentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. (A) Procenat ukupnih CD4<sup>+</sup> T ćelija, citotoksičnih T limfocita (CD8<sup>+</sup>) i B limfocita (CD19<sup>+</sup>). (B) Procenat aktiviranih citotoksičnih limfocita (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>). (C) Procenat Breg (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) ćelija. (D) Procenat ćelija koje spadaju u podtipove T limfocita: Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th2 (CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>), Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) i Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>). (E) Procenat CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ćelija. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

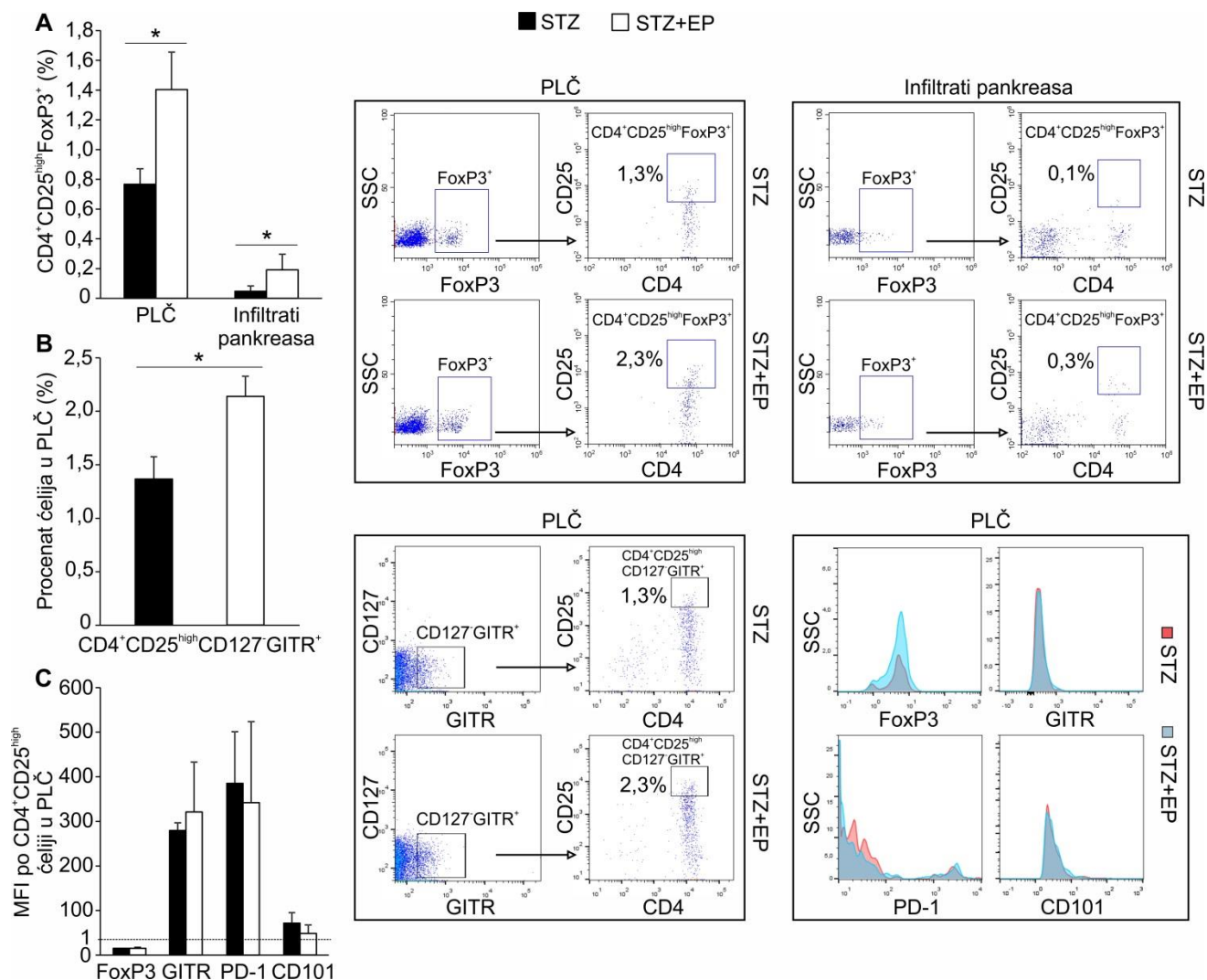
Rezultati su pokazali da je procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija nakon tretmana etil-piruvatom bio povišen u sva tri ispitivana tkiva. Pošto bi njihovo imunosupresivno dejstvo moglo stajati iza utvrđenog smanjenja razvoja DT1 uzrokovanog etil-piruvatom, dalje analize su bile fokusirane na Treg ćelije i njihovu funkciju u regionu pankrasa.

#### 4.2.3. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na Treg ćelije u dijabetesu tipa 1

Radi detaljnije karakterizacije fenotipa Treg ćelija oblikovanog etil-piruvatom, utvrđivana je ekspresija većeg broja Treg-specifičnih markera. FoxP3 se generalno smatra ključnim transkripcionim faktorom Treg ćelija i neophodan je za njihov razvoj i supresivnu funkciju. GITR (engl. Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor) predstavlja marker aktivno supresivnih Treg ćelija (Ronchetti i sar., 2015). Treg ćelije takođe ispoljavaju PD-1, preko čije interakcije sa svojim ligandom, PD-L1, mogu ispoljiti svoje direktno supresivno dejstvo. Dodatno, ekspresija CD101 na površini Treg ćelija ukazuje na veću potentnost njihove supresivne moći (Fernandez i sar., 2007). Finalno, CD127 ( $\alpha$  subjedinica receptora za IL-7), marker koji nije ispoljen na Treg ćelijama, može biti iskorišćen za isključivanje ovih ćelija pri citofluorimetrijskoj analizi.



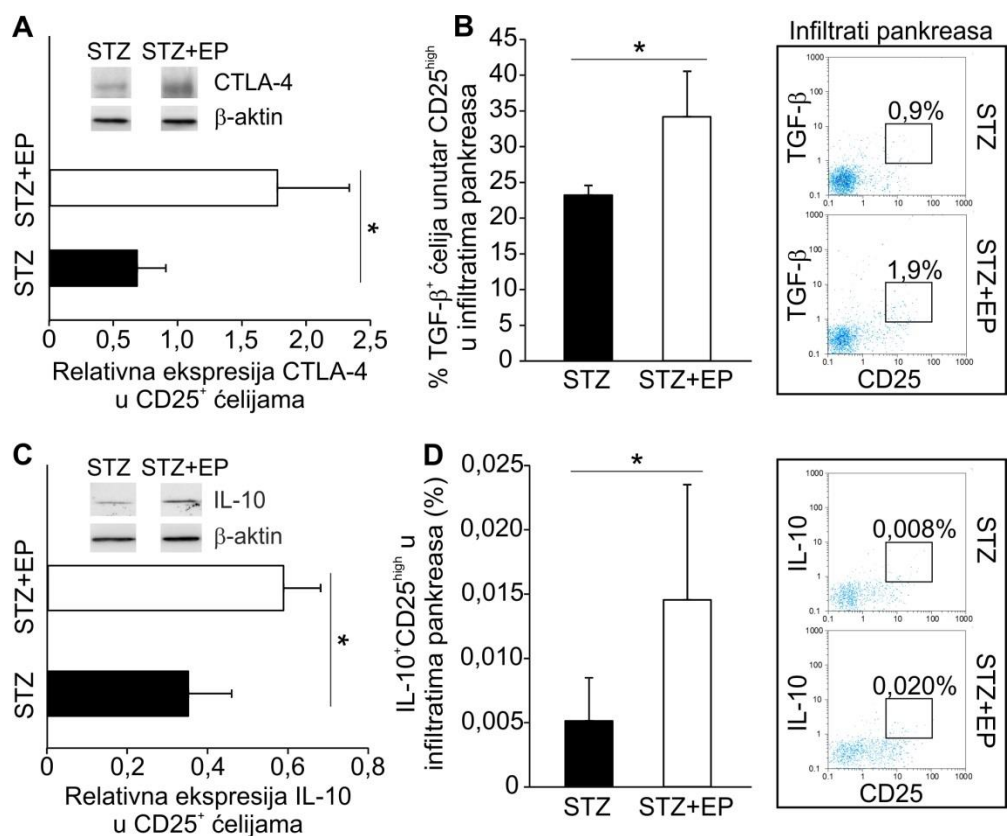
Navedeni markeri su posmatrani u okviru populacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg ćelija. Rezultati su pokazali da je tretman dijabetičnih miševa etil-piruvatom doveo do povećanja procenta FoxP3<sup>+</sup> Treg ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa (Slika 13A). Dodatno, procenat CD127<sup>-</sup>GITR<sup>+</sup> Treg ćelija je takođe bio povećan u pankreasnim limfnim čvorovima (Slika 13B). Ekspresija FoxP3, GITR, PD-1 i CD101 po Treg ćeliji nije bila promenjena između grupa (Slika 13C).



**Slika 13. Fenotipska karakterizacija Treg ćelija nakon tretmana etil-piruvatom.** Procenti ćelija izolovanih iz netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. (A) Procenat Treg ćelija (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa. (B) Procenat Treg ćelija koje ekspiriraju GITR a ne ispoljavaju CD127. (C) Ekspresija FoxP3, GITR, PD-1 i CD101 po CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ćeliji, utvrđena merenjem prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI). Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Za analizu (A) i (B) rezultata korišćen je Mann-Whitney neparametarski test. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Uticaj tretmana etil-piruvatom na sposobnost supresije Treg ćelija je dodatno testiran. Pri ispitivanju ekspresije supresivnog molekula CTLA-4, imunoblot metodom je utvrđeno da je tretman etil-piruvatom doveo do povećane ekspresije CTLA-4 u prečišćenim CD25<sup>+</sup> ćelijama (Slika 14A). Takođe, etil-piruvat je uzrokovao i povećanu zastupljenost TGF-β<sup>+</sup> Treg ćelija u infiltratima pankreasa (Slika 14B).

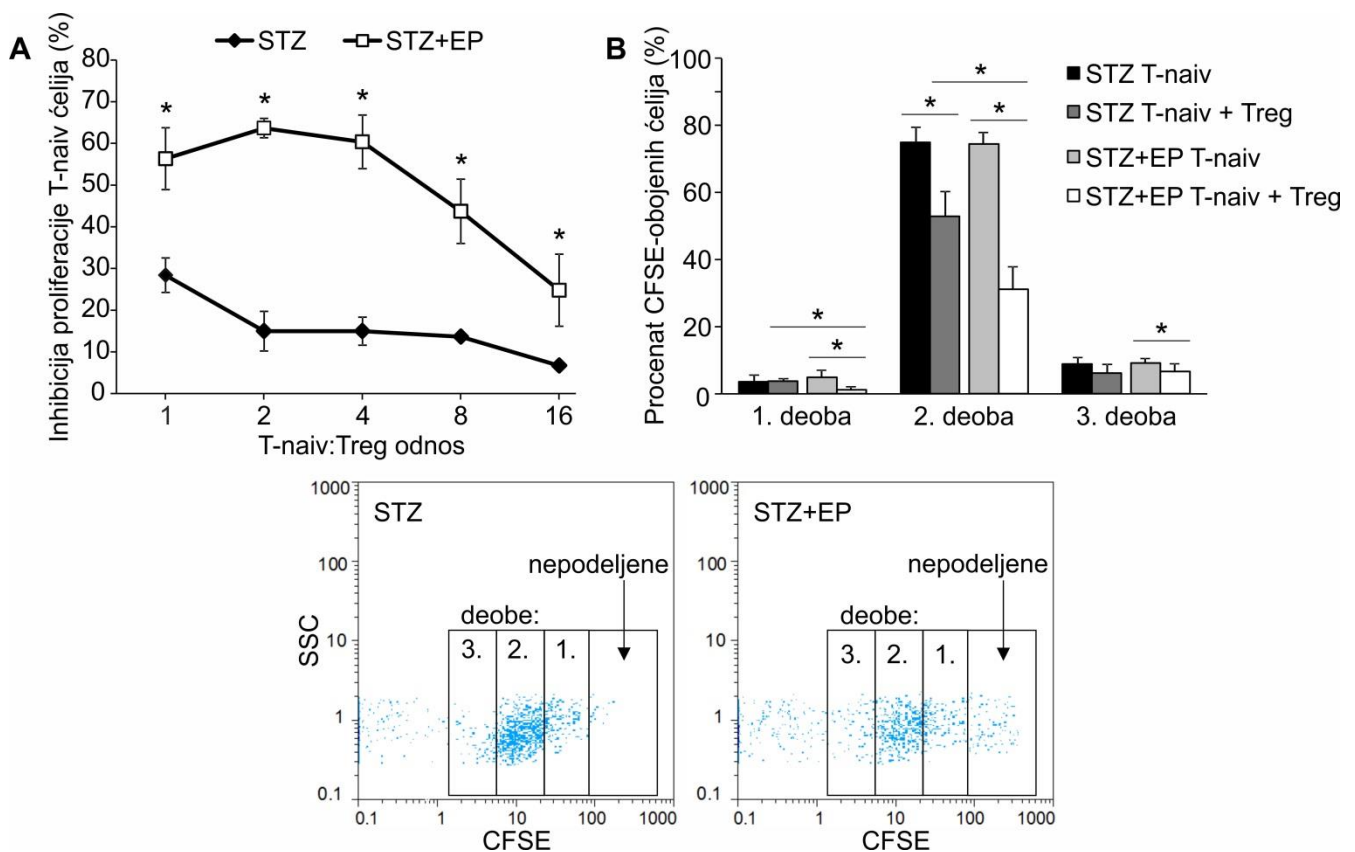
Efekat etil-piruvata na supresivnu funkciju Treg ćelija je bio ispoljen i kroz povećanu produkciju IL-10 u prečišćenim CD25<sup>+</sup> ćelijama, što je utvrđeno imunoblot metodom (Slika 14C), kao i kroz povećanu zastupljenost IL-10<sup>+</sup> Treg ćelija u infiltratima pankreasa dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom u odnosu na netretirane dijabetične miševе (Slika 14D).



**Slika 14. Karakterizacija supresivnih markera Treg ćelija nakon tretmana etil-piruvatom.**

(A) Ekspresija CTLA-4 proteina u CD25<sup>+</sup> ćelijama prečišćenim iz slezine netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP), normalizovana prema ekspresiji β-aktina, sa reprezentativnim proteinskim trakama detektovanim imunoblot metodom. (B) Procenat TGF-β<sup>+</sup> ćelija unutar Treg ćelija (CD25<sup>high</sup>) izolovanih iz infiltrata pankreasa, utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije, sa reprezentativnim dot plotovima. (C) Ekspresija IL-10 u CD25<sup>+</sup> ćelijama prečišćenim iz slezine, normalizovana prema ekspresiji β-aktina, sa reprezentativnim proteinskim trakama detektovanim imunoblot metodom. (D) Procenat Treg ćelija koje ekspimiraju IL-10 (CD25<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup>) izolovanih iz infiltrata pankreasa, utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije, sa reprezentativnim dot plotovima. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Rezultati su pokazali da tretman etil-piruvatom dovodi do povećanja zastupljenosti FoxP3<sup>+</sup> i CD127-GITR<sup>+</sup> Treg ćelija i ekspresije inhibitornog molekula CTLA-4, kao i do povećanja sinteze antiinflamacijskih citokina TGF- $\beta$  i IL-10. Kako su ovi rezultati sugerisali da etil-piruvat povećava aktivnost supresije Treg ćelija, to je testirano u *ex vivo* testu supresije. Merenjem fluorescence poreklom od vitalne boje CFSE koja se sa svakom deobom ćelije smanjuje, utvrđeno je da su CD25<sup>+</sup> ćelije prečišćene iz dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom uzrokovale značajno jaču inhibiciju proliferacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naivnih T limfocita obojenih pomoću CFSE, u poređenju sa CD25<sup>+</sup> ćelijama izolovanim iz netretiranih dijabetičnih miševa (Slika 15A,B). Taj porast sposobnosti supresije Treg ćelija je pokazan u uslovima kokultivacije naivnih T limfocita sa Treg ćelijama u jednakom broju, pa sve do uslova u kojima je Treg ćelija bilo 16 puta manje nego naivnih T ćelija (Slika 15A).



**Slika 15. Karakterizacija supresivnih funkcija Treg ćelija nakon tretmana etil-piruvatom.** (A) Nivo inhibicije proliferacije naivnih T limfocita (T-naiv, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) nakon kokulture sa Treg (CD25<sup>+</sup>) ćelijama prečišćenim iz slezine netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP). Proliferacija je merena nakon 72 h inkubacije kroz određivanje sekvencijalnog gubitka fluorescence CFSE. (B) Procenat podeljenih naivnih T limfocita, ili naivnih T limfocita kokultivisanih sa Treg ćelijama (odnos 1:1), sa reprezentativnim dot plotovima sa donje strane. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

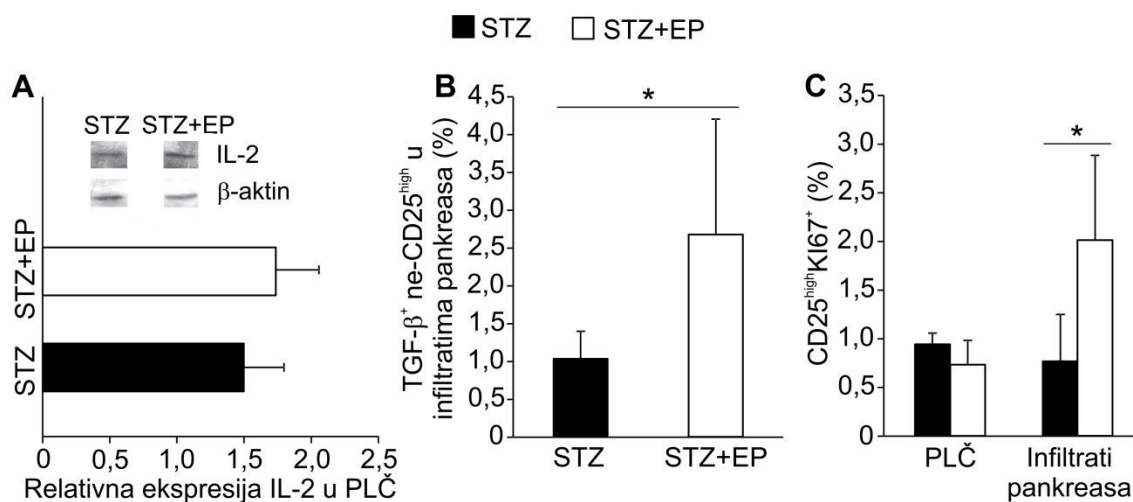


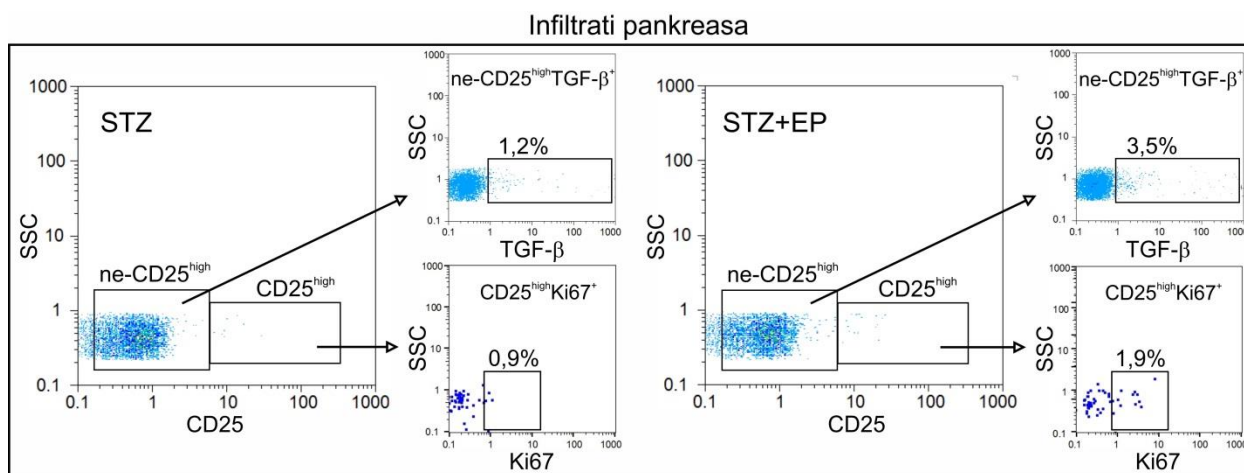
Sveukupno, ovi rezultati sugerišu da etil-piruvat promoviše supresivnu funkciju Treg ćelija kroz pojačavanje njihovog kapaciteta za inhibiciju konvencionalnih T limfocita, i kroz direktni ćelijski kontakt i kroz produkciju antiinflamacijskih citokina.

#### 4.2.4. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija u dijabetesu tipa 1

Primećeno povećanje zastupljenosti Treg ćelija nakon administracije etil-piruvata u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa bi se moglo objasniti ili pospešivanjem diferencijacije iz naivnih CD4<sup>+</sup> ćelija ili pojačavanjem proliferacije već postojećih Treg ćelija. Za diferencijaciju Treg ćelija na periferiji, CD4<sup>+</sup> T limfocitima su neophodni IL-2 i TGF-β (Horwitz i sar., 2008). Iako je prisustvo IL-2 u pankreasnim limfnim čvorovima nakon tretmana etil-piruvatom ostalo nepromenjeno (Slika 16A), zastupljenost ćelija koje nisu ispoljavale CD25<sup>high</sup> marker Treg ćelija a jesu ekspimirale TGF-β je bila značajno povećana u infiltratima pankreasa (Slika 16B). Ovi rezultati ukazuju na to da je etil-piruvat aktivirao signalne puteve posredovane sa TGF-β i time podržao diferencijaciju Treg ćelija.

Sa druge strane, etil-piruvat je iskazao pozitivno dejstvo i na proliferaciju Treg ćelija, sudeći po utvrđenom povećanom procentu Treg ćelija koje su ekspimirale marker proliferacije Ki67 u infiltratima pankreasa dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom u poređenju sa netretiranim dijabetičnim životinjama (Slika 16C).



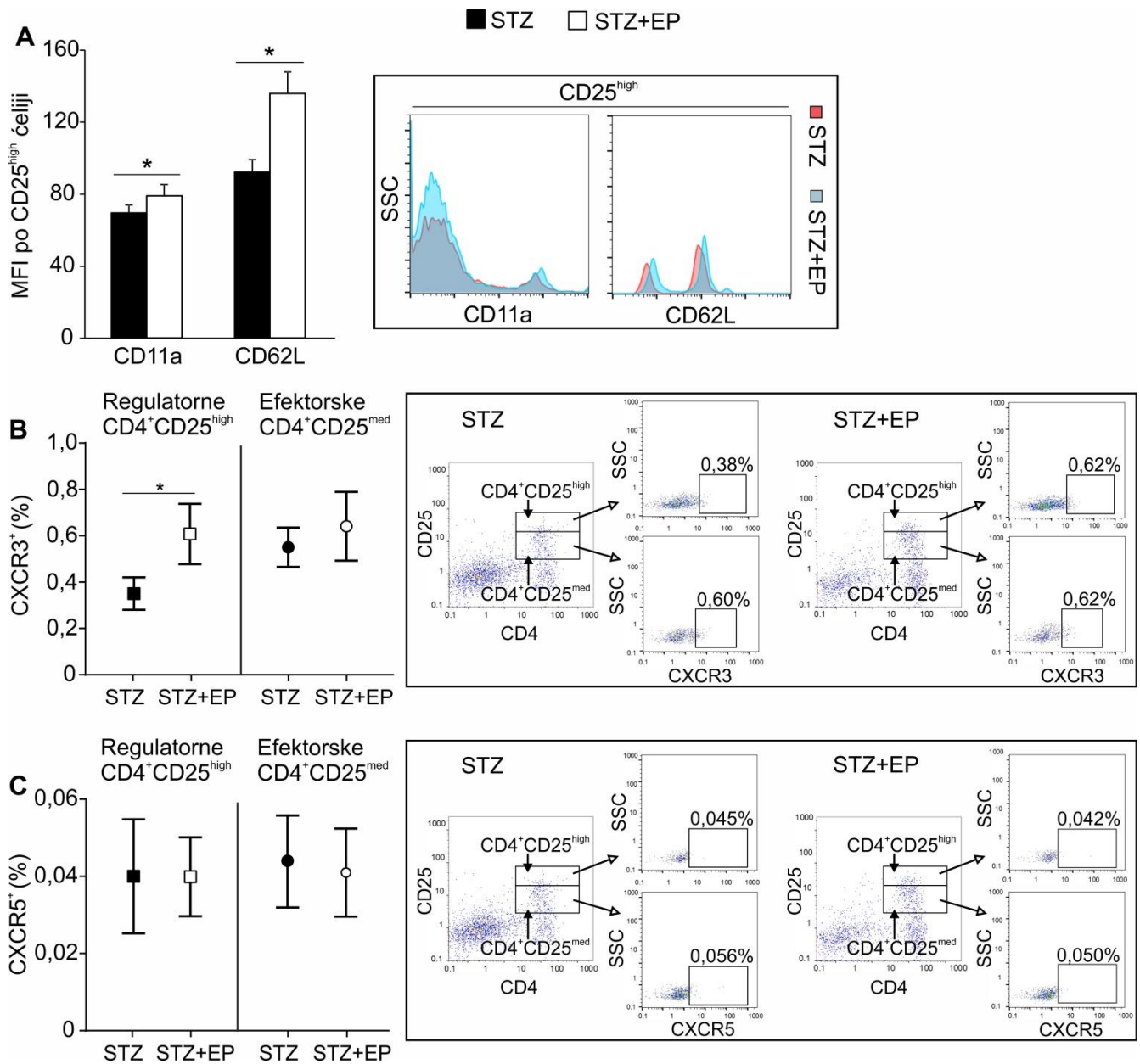


**Slika 16. Efekat etil-piruvata na diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija u *in vivo* uslovima.**

(A) Ekspresija IL-2 proteina u pankreasnim limfnim čvorovima (PLČ) netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP), normalizovana prema ekspresiji β-aktina, sa reprezentivnim proteinskim trakama detektovanim imunoblot metodom. (B) Procenat TGF-β<sup>+</sup> ćelija koje nisu ispoljavale CD25<sup>high</sup> izolovanih iz infiltrata pankreasa, utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije. (C) Procenat proliferišućih Treg ćelija (CD25<sup>high</sup>Ki67<sup>+</sup>) izolovanih iz PLČ i infiltrata pankreasa, utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentivni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazane sa donje strane. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

**4.2.5. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na migraciju Treg ćelija u dijabetesu tipa 1**

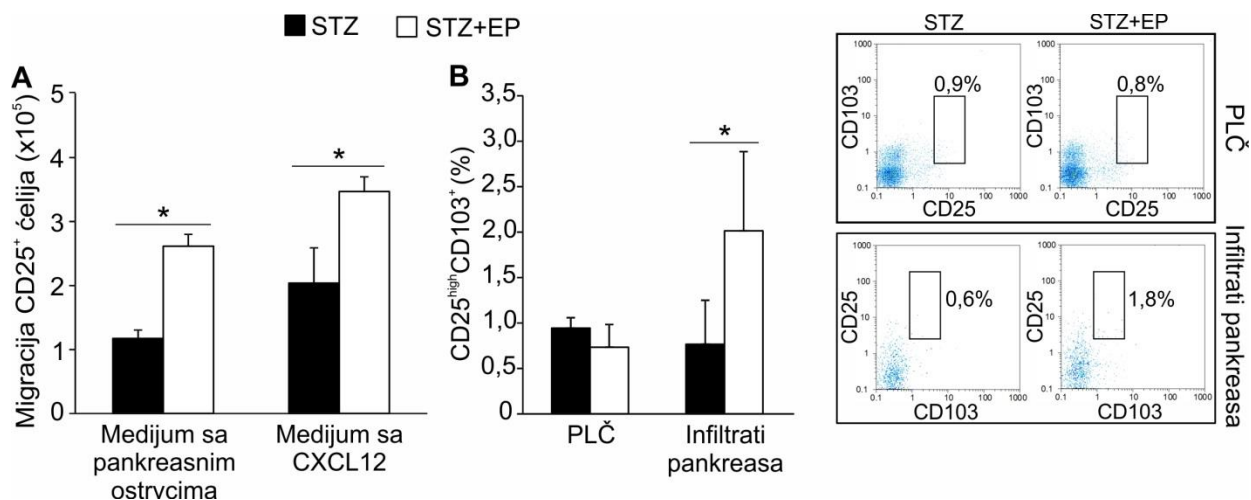
Kako bi se povećana zastupljenost Treg ćelija, sem kroz diferencijaciju i proliferaciju, mogla objasniti i njihovom povećanom migracijom, sledeće je ispitivana sposobnost migracije Treg ćelija. Rezultati su pokazali da je tretman etil-piruvatom doveo do povećane ekspresije CD11a (subjedinice LFA-1, integrina koji obezbeđuje čvrsto vezivanje za endotel krvnog suda) i CD62L (L-selektina, adhezivnog molekula koji omogućava transmigraciju kroz zid krvnog suda) na Treg ćelijama u pankreasnim limfnim čvorovima (Slika 17A). Uočen je i porast u zastupljenosti Treg ćelija koje su ekspimirale hemokinski receptor CXCR3 (Slika 17B), dok je procenat CXCR5<sup>+</sup> Treg ćelija bio nepromenjen pri poređenju netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (Slika 17C). U isto vreme, nije bilo promene u zastupljenosti efektorskih T limfocita (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) koji su ekspimirali ove hemokinske receptore.



**Slika 17. Efekat etil-piruvata na migratorni fenotip Treg ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima.** Ćelije izolovane iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Reprerzentativni histogram i dot plotovi, kao i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. (A) Ekspresija CD11a i CD62L po Treg ćeliji (CD25<sup>high</sup>), utvrđena merenjem prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI). (B) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) i efektorskih T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) ćelija koje su ekspimirale CXCR3. (C) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) i efektorskih T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) ćelija koje su ekspimirale CXCR5. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Ovi rezultati ukazuju da su Treg ćelije dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom imale veću sposobnost migracije u pankreas nego Treg ćelije netretiranih dijabetičnih miševa. Pošto se zna da  $\beta$  ćelije pankreasa mogu vršiti oslobađanje većeg broja hemokina (Sarkar i sar., 2012), u *ex vivo* testu hemotaksije je merena migratorna sposobnost Treg ćelija prema medijumu sa izolovanim pankreasnim ostrvcima ili prema gradijentu koncentracije hemokina CXCL12. Rezultati su pokazali da su CD25<sup>+</sup> ćelije izolovane iz dijabetičnih životinja tretiranih etil-piruvatom uspešnije migrirale i prema izolovanim ostrvcima i prema medijumu koji je sadržao CXCL12 u odnosu na Treg ćelije izolovane iz netretiranih dijabetičnih miševa (Slika 18A).

Finalno, tretman etil-piruvatom je u infiltratima pankreasa prouzrokovao povećanje procenta Treg ćelija koje su ispoljavale CD103 (Slika 18B), sugerišući povećano zadržavanje tih Treg ćelija na mestu inflamacije (Suffia i sar., 2005). Zastupljenost CD103<sup>+</sup> Treg ćelija se nije razlikovala između pankreasnih limfnih čvorova ispitivanih grupa životinja.

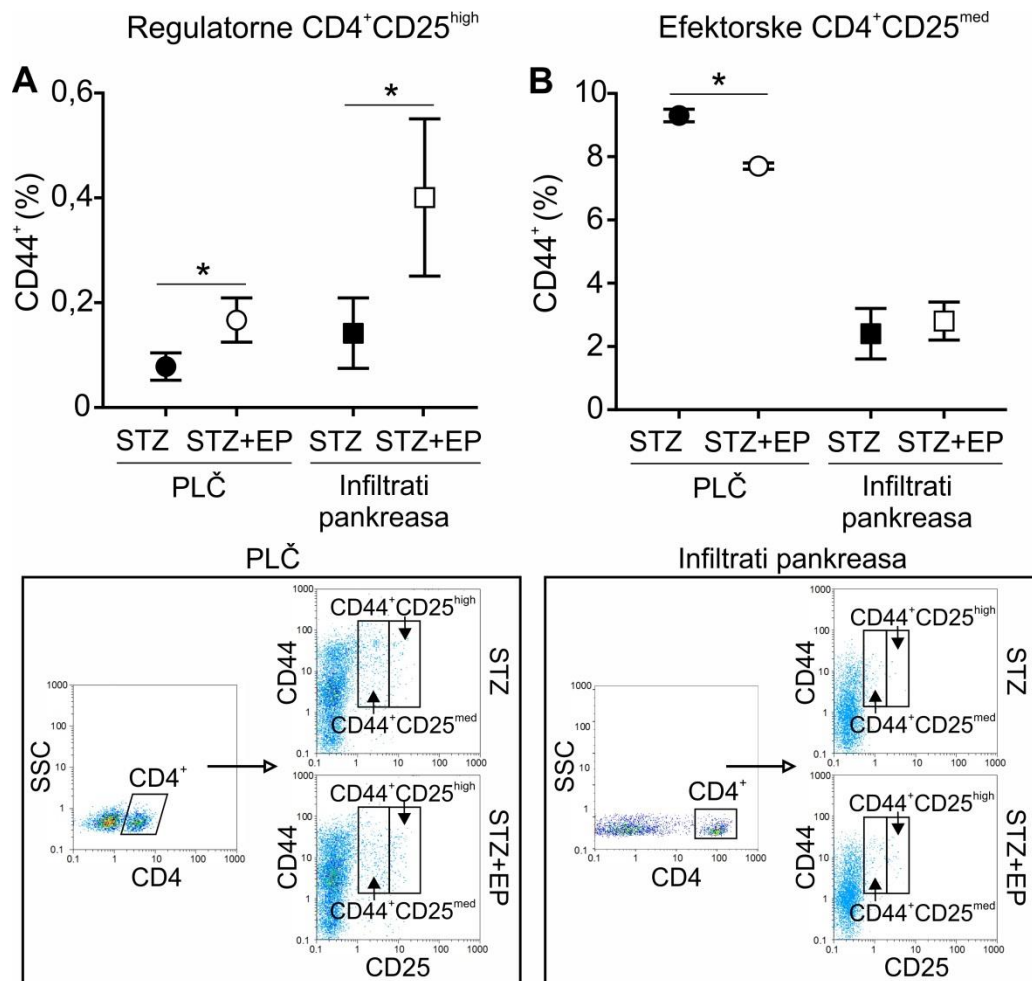


**Slika 18. Efekat etil-piruvata na migratorne sposobnosti Treg ćelija u *in vivo* uslovima.** (A) Migracija CD25<sup>+</sup> ćelija prečišćenih iz slezine netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) u testu hemotaksije prema medijumu koji je sadržao pankreasna ostrvca (20 po bunariću) ili CXCL12 (10 ng/ml). (B) Procenat CD103<sup>+</sup> Treg (CD25<sup>high</sup>) ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa, sa reprezentativnim dot plotovima. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

#### 4.2.6. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na aktivaciju Treg ćelija i njihovu supresiju Th1 i Th17 odgovora u dijabetesu tipa 1

Radi analiziranja aktivacionog statusa Treg ćelija, ispitivana je ekspresija CD44. Ovaj adhezivni receptor, sem što ima ulogu u migraciji T limfocita, smatra se i markerom aktiviranih T ćelija (Baaten i sar., 2010). Rezultati su pokazali da su u odnosu na netretirane dijabetične životinje, dijabetični miševi tretirani etil-piruvatom posedovali veći procenat Treg ćelija koje su ispoljavale CD44 u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa (Slika 19A),

sugerišući da su aktivirane, čime su i sa većim uspehom dovele do inhibicije aktivacije efektorskih T limfocita ( $CD4^+CD25^{med}$ ) (Slika 19B).

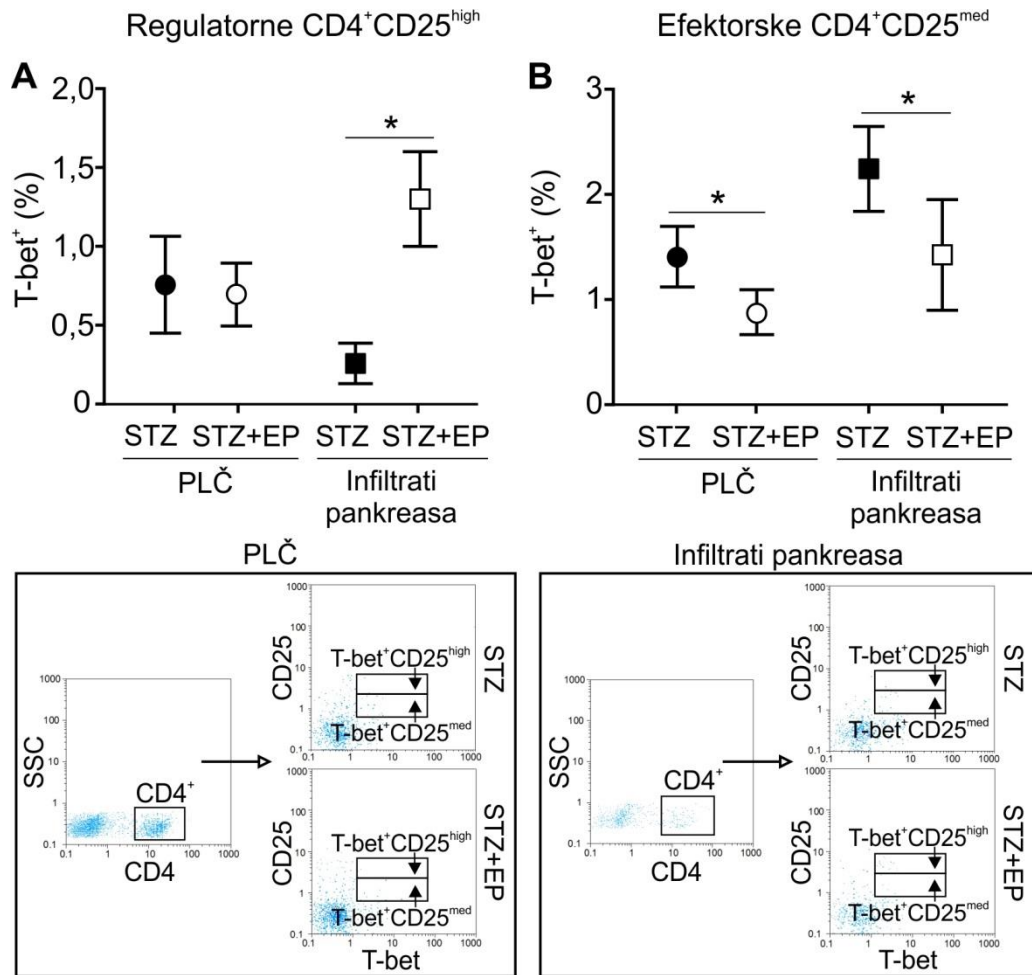


**Slika 19. Efekat etil-piruvata na aktivaciju Treg i efektorskih T ćelija u *in vivo* uslovima.** Procenti ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Procenat aktiviranih ( $CD44^+$ ) ćelija u okviru (A) Treg ( $CD4^+CD25^{high}$ ) ćelija ili (B) efektorske ( $CD4^+CD25^{med}$ ) T ćelijske populacije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

T-bet (engl. T-box transcription factor TBX21) se smatra ključnim transkripcionim faktorom Th1 subpopulacije  $CD4^+$  T limfocita. Treg ćelije indukovane na periferiji mogu eksprimirati T-bet, i za takve ćelije se smatra da specifično inhibiraju Th1 populaciju efektorskih T limfocita. Rezultati su pokazali da nakon tretmana etil-piruvatom u infiltratima pankreasa dolazi do porasta zastupljenosti  $T-bet^+$  Treg ćelijske populacije (Slika 20A), dok su procenti



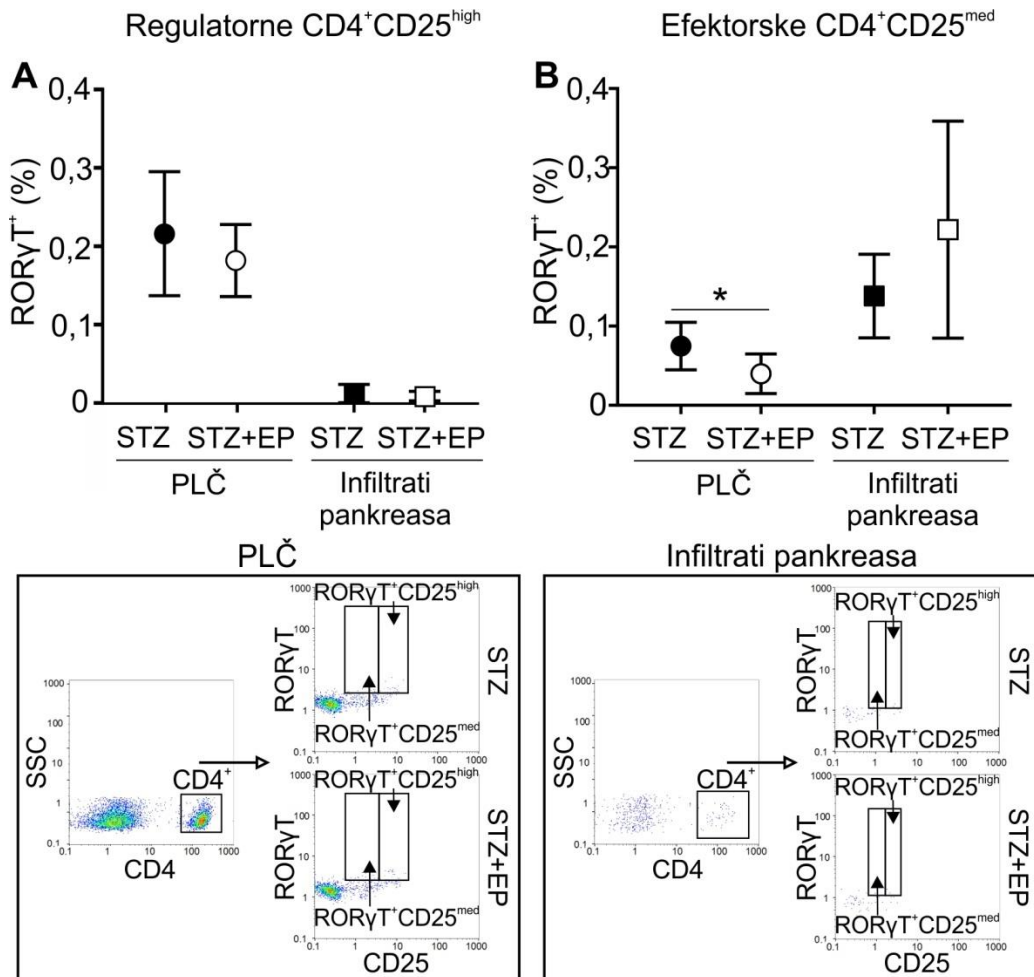
T-bet<sup>+</sup> efektorskih (Th1) ćelija bili smanjeni i u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa (Slika 20A).



**Slika 20. Efekat etil-piruvata na ekspresiju T-bet u Treg i efektorskim T ćelijama u *in vivo* uslovima.** Procenti ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Procenat T-bet<sup>+</sup> ćelija u okviru (A) Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija ili (B) efektorske (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) T ćelijske populacije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Sa druge strane, RORγT (engl. RAR-related Orphan Receptor γT) se smatra ključnim transkripcionim faktorom Th17 subpopulacije CD4<sup>+</sup> T limfocita. Treg ćelije indukovane na periferiji mogu ekspimirati RORγT, i za takve ćelije se smatra da specifično inhibiraju Th17 populaciju efektorskih T limfocita. Rezultati su pokazali da su procenti RORγT<sup>+</sup> Treg ili RORγT<sup>+</sup> efektorskih (Th17) ćelija većinom bili slični između obe grupe životinja, sem efektorskih RORγT<sup>+</sup>

T limfocita koji su bili manje zastupljeni u pankreasnim limfnim čvorovima dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (Slika 21A,B).



**Slika 21. Efekat etil-piruvata na ekspresiju ROR $\gamma$ T u Treg i efektorskim T ćelijama u *in vivo* uslovima.** Procenti ćelija izolovanih iz pankreasnih limfnih čvorova (PLČ) i infiltrata pankreasa netretiranih dijabetičnih miševa (STZ) ili dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom (STZ+EP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Procenat ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> ćelija u okviru (A) Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija ili (B) efektorske (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) T ćelijske populacije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. Sva merenja su vršena na uzorcima od najmanje 7 životinja po grupi. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. STZ – streptozotocin; EP – etil-piruvat.

Sveukupno, ovi rezultati sugerišu da etil-piruvat obezbeđuje zaštitu od razvoja DT1 delom i kroz promovisanje proliferacije Treg ćelija i njihove migracije u pankreas, kao i kroz povećavanje njihove aktivacije i sposobnosti specifične supresije proinflamacijskog Th1 odgovora.

### 4.3. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na diferencijaciju imunskih ćelija

Nakon ispitivanja različitih efekata koje je etil-piruvat ispoljio pri *in vivo* tretmanu miševa kojima je indukovana DT1, sledeći korak istraživanja je podrazumevao detaljnije ispitivanje efekata koje bi etil-piruvat mogao imati na prečišćene CD4<sup>+</sup> T limfocite u *in vitro* uslovima.

Radi ispitivanja efekata etil-piruvata na diferencijaciju i fenotip podtipova T limfocita *in vitro*, vršena je diferencijacija naivnih T ćelija (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) prečišćenih magnetnom separacijom iz slezine zdravih miševa, usmerena ka Th1, Th17 ili Treg fenotipu. Sve ćelije su bile stimulirane preko T ćelijskog receptora pomoću mišjeg anti-CD3 antitela kojim su obloženi bunarići u kojima su ćelije kultivirane, a stimulacija je obezbeđena prisustvom mišjeg antitela specifičnog za CD28 u medijumu za T ćelije.

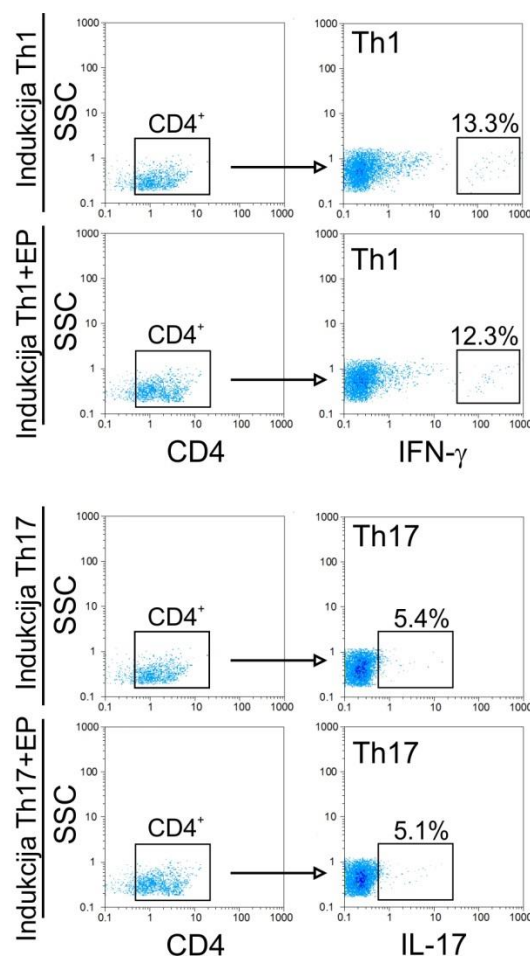
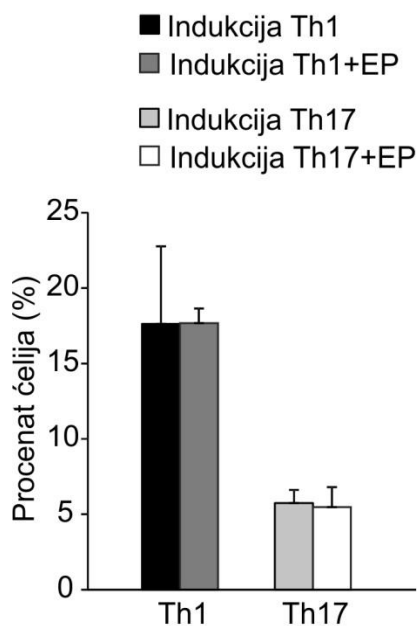
#### 4.3.1. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na diferencijaciju Th1 i Th17 podtipova T limfocita

Diferencijacija Th1 ćelija je ostvarivana *in vitro* primenom rekombinantnog citokina IL-12 i anti-IL-4 antitela. IL-12 aktivira transkripcioni faktor STAT4, koji ima bitnu ulogu u diferencijaciji Th1 fenotipa, dok sprečavanje signalne transdukcije posredovane sa IL-4 inhibira polarizaciju T limfocita ka Th2 fenotipu i time dodatno podržava razvoj Th1 ćelija (Mikhailkevich i sar., 2006).

*In vitro* diferencijacija Th17 ćelija je podržana kombinacijom citokina IL-6 i TGF- $\beta$ . IL-6 je odgovoran za aktivaciju ROR $\gamma$ T i STAT3, ključnih transkripcionih faktora za razvoj Th17 fenotipa. Sa STAT3, IL-6 aktivira i SOCS3 (engl. Suppressor Of Cytokine Signaling 3) koji je zaslužan za negativnu regulaciju STAT3 signalnog puta. TGF- $\beta$  dvojako pospešuje Th17 diferencijaciju: sa jedne strane, značajno pojačava ekspresiju ROR $\gamma$ T indukovanu IL-6, dok sa druge strane dovodi i do inhibicije SOCS3 i njime posredovane negativne povratne sprege (Qin i sar., 2009).

Radi testiranja efekta etil-piruvata na diferencijaciju ovih subpopulacija T limfocita, etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon postavljanja kulture, a analiza je vršena 72 h kasnije. Rezultati su pokazali da prisustvo etil-piruvata nije dovelo do promene zastupljenosti Th1 ili Th17 ćelija nakon ukupno 96 h inkubacije (Slika 22).





**Slika 22. *In vitro* efekat etil-piruvata na indukciju diferencijacije Th1 i Th17 ćelija.** Procenti Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) i Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) ćelija su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije nakon 96 h inkubacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija u prisustvu odgovarajućih faktora stimulacije diferencijacije (za Th1 su korišćeni IL-12 (20 ng/ml) i anti-IL-4 antitelo (10 ng/ml); za Th17 su korišćeni TGF- $\beta$  (10 ng/ml) i IL-6 (10 ng/ml)). Etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon postavljanja kulture. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. EP – etil-piruvat.

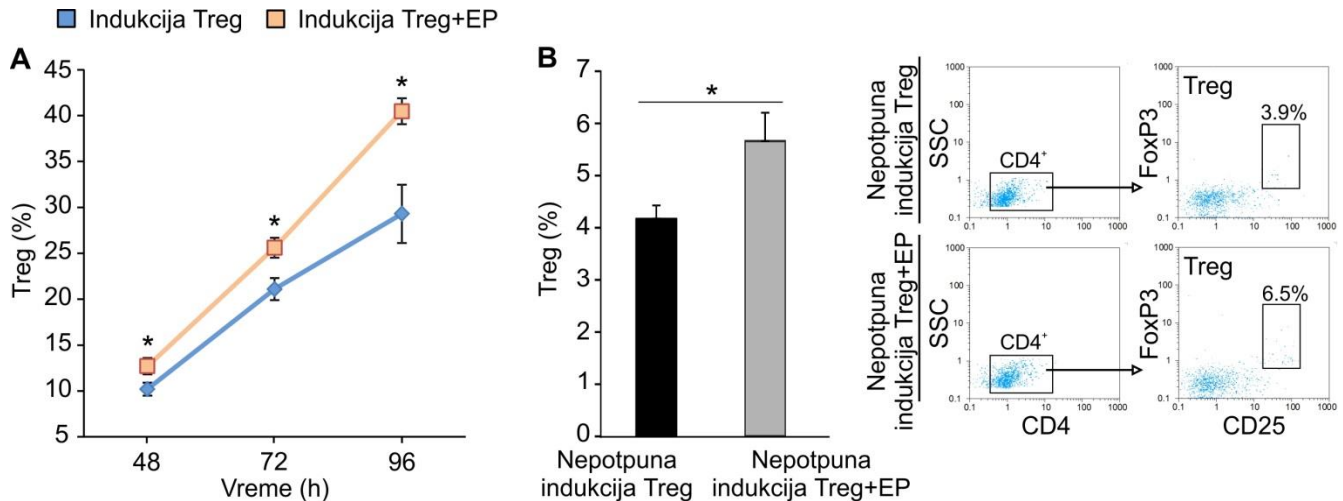
#### 4.3.2. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija

Radi diferencijacije Treg ćelija, u bunariće sa naivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima su dodavani TGF- $\beta$  i IL-2. Kao što je prethodno već pominjano, ta dva citokina su neophodna za diferencijaciju mišjih Treg ćelija. Dok TGF- $\beta$  samostalno indukuje prolaznu ekspresiju transkripcionog faktora Foxp3, prisustvo IL-2 omogućava da se ona zadrži (Horwitz i sar., 2008).

Dok su u konvencionalnoj Treg ćelijskoj kulturi naivni T limfociti bili izloženi ovoj potpunoj Treg stimulaciji, u drugu grupu bunarića je 24 h nakon postavljanja kulture dodavan i etil-piruvat (125  $\mu$ M). Nakon ukupno 96 h inkubacije, rezultati su pokazali da je prisustvo etil-piruvata dovelo do značajnog povećanja zastupljenosti Treg ćelija (Slika 23A). Radi analize vremenskog toka uočenog pozitivnog dejstva, ćelije su analizirane i 48 i 72 h nakon postavljanja

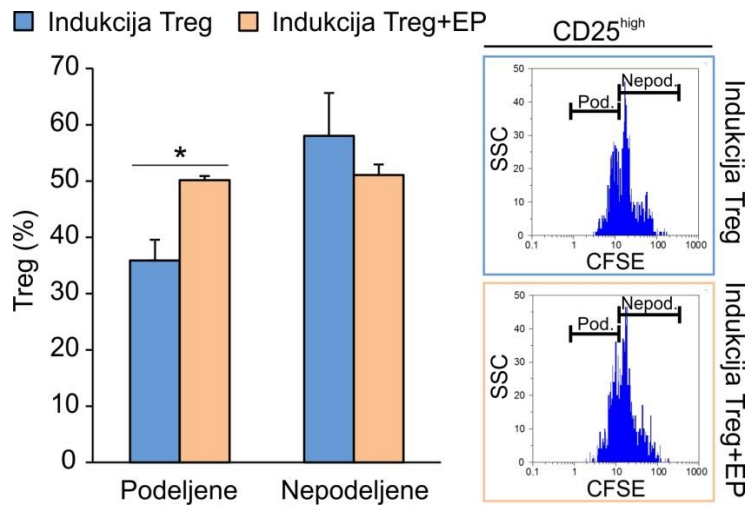
kulture, i utvrđeno je da je etil-piruvat stimulisao broj Treg ćelija čak i nakon što je bio prisutan u kulturi samo 24 h, iako u manjoj meri nego nakon ukupno 96 h (Slika 23A).

Etil-piruvat je takođe stimulisao diferencijaciju Treg ćelija kultivisanih u odsustvu TGF- $\beta$  (u uslovima nepotpune indukcije Treg ćelija) (Slika 23B). Ovi rezultati sugerišu da je etil-piruvat, makar delom, mogao stimulisati unutarćelijske signalne puteve koji su naličili onima koje inače pokreće TGF- $\beta$ .



**Slika 23. In vitro efekat etil-piruvata na indukciju diferencijacije Treg ćelija.** (A) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) ćelija je utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije nakon 48, 72 i 96 h inkubacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija (TGF- $\beta$  (2 ng/ml) i IL-2 (10 ng/ml)). Etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. (B) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) ćelija je utvrđivan nakon 96 h inkubacije CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ćelija u uslovima nepotpune indukcije Treg ćelija (samo IL-2 (10 ng/ml)). Etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvat, ili između nepotpuno stimulisanih Treg ćelija i nepotpuno stimulisanih Treg ćelija izloženih etil-piruvatu. EP – etil-piruvat.

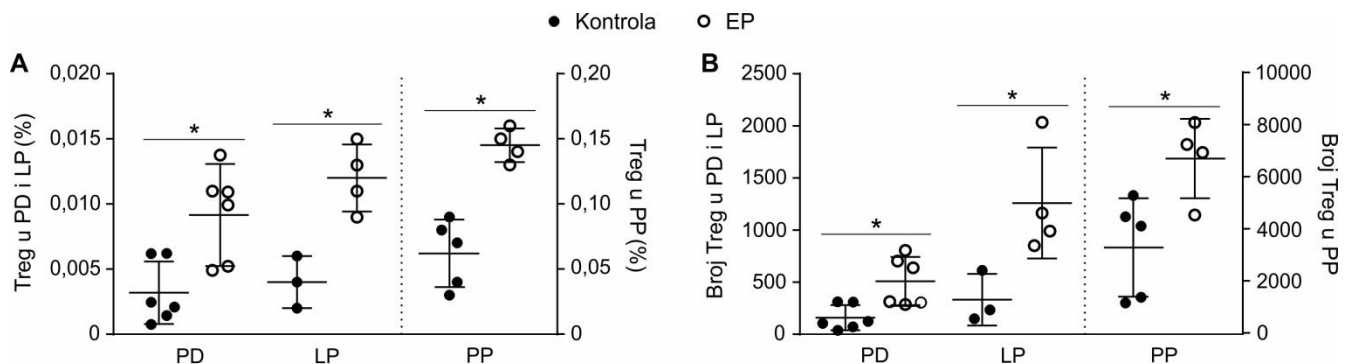
U potrazi za dodatnim objašnjenjem uočenog povećanja broja Treg ćelija, posmatrano je smanjenje fluorescence Treg ćelija obojenih pomoću CFSE koje bi ukazalo na njihovu proliferaciju. Sudeći po ovom testu, 48 h nakon dodavanja etil-piruvata, njegovo prisustvo je dovelo do značajno veće zastupljenosti Treg ćelija koje su prošle deobu (Slika 24). Ovi rezultati ukazuju na to da je povećano prisustvo Treg ćelija ipak najverovatnije bilo rezultat povišene proliferacije već diferenciranih Treg ćelija, a ne potencijalnog direktnog uticaja etil-piruvata na diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita ka Treg fenotipu.

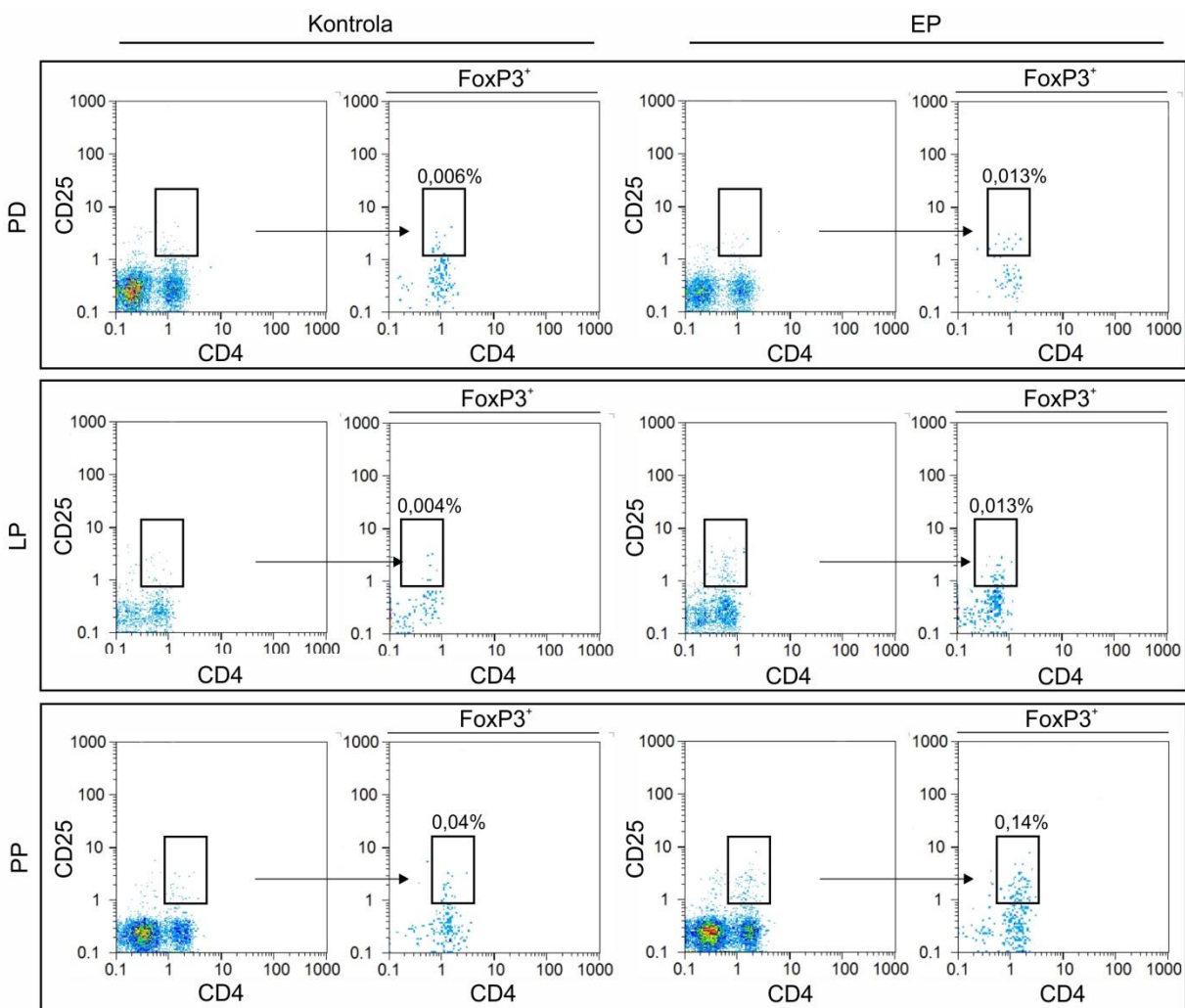


**Slika 24. *In vitro* efekat etil-piruvata na proliferaciju indukovanih Treg ćelija.** Proliferacija Treg (CD4+CD25<sup>high</sup>) ćelija merena kroz određivanje sekvencijalnog gubitka fluorescence CFSE 48 h nakon tretmana sa etil-piruvatom, sa reprezentativnim histogram plotovima sa desne strane (Nepod. – nepodeljene ćelije, Pod. – podeljene ćelije). CD4+CD25<sup>high</sup> ćelije su bile obojene pomoću CFSE pre postavljanja u kulturu. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom. EP – etil-piruvat.

#### 4.4. Uticaj *in vivo* tretmana etil-piruvatom na broj Treg ćelija u peritonealnoj duplji i crevima zdravih miševa

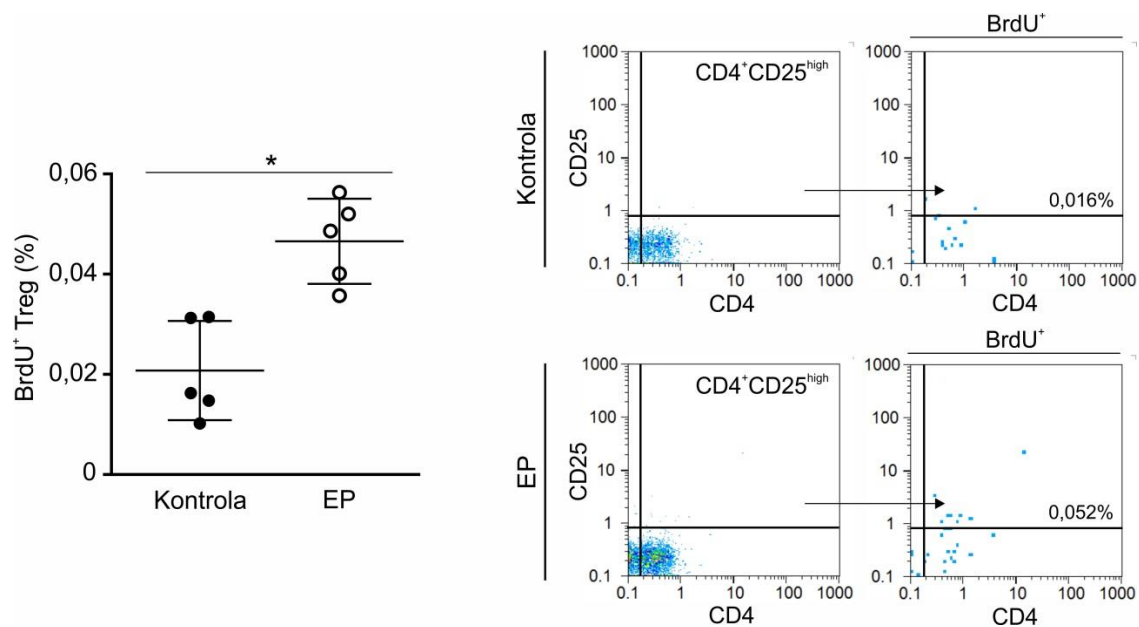
Prethodni rezultati su pokazali da etil-piruvat uzrokuje povećanje broja Treg ćelija i u kontekstu DT1 *in vivo* i u uslovima diferencijacije Treg ćelija *in vitro*. U cilju ispitivanja sposobnosti etil-piruvata da stimuliše Treg ćelije i u fiziološkim uslovima *in vivo*, etil-piruvat je davan intraperitonealnim ili oralnim putem zdravim C57BL/6 miševima. Rezultati su pokazali da je intraperitonealni tretman doveo do porasta kako zastupljenosti tako i broja Treg ćelija u peritonealnoj duplji (Slika 25A,B) nakon samo dve doze etil-piruvata. Takođe, oralna primena etil-piruvata u trajanju od sedam dana je uzrokovala porast i zastupljenosti i broja Treg ćelija, kako u lamini propriji tankog creva tako i u Pejerovim pločama C57BL/6 miševa (Slika 25A,B).





**Slika 25. Efekat etil-piruvata na zastupljenost i broj Treg ćelija zdravih miševa *in vivo*.** Etil-piruvat je zdravim C57BL/6 miševima davan intraperitonealno (u trajanju od jednog dana, u dve doze) ili oralnim putem (sedam dana), dok je druga grupa miševa primala odgovarajuće doze Hartmanovog rastvora kao rastvarača (Kontrola). (A) Procenat i (B) broj Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) ćelija izolovanih sledećeg dana iz peritonealne duplje (PD), lamine proprije tankog creva (LP) i Pejerovih ploča (PP) su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa donje strane. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između zdravih miševa koji su primali Hartmanov rastvor i zdravih miševa tretiranih etil-piruvat. EP – etil-piruvat.

Radi objašnjavanja porekla uočenog porasta broja Treg ćelija, izveden je *in vivo* test proliferacije. Zdravim miševima je instraperitonealno dat BrdU, koji se prilikom sinteze DNK inkorporirao u DNK umesto timidina. Detekcijom BrDU<sup>+</sup> Treg ćelija, pokazano je da porast broja etil-piruvatom stimulisanih Treg ćelija u peritonealnoj duplji makar delom proizilazi iz njihove povećane proliferacije (Slika 26).



**Slika 26. Efekat etil-piruvata na proliferaciju Treg ćelija zdravih miševa *in vivo*.** Etil-piruvat je zdravim C57BL/6 miševima davan intraperitonealno (u trajanju od dva dana, sa po dve doze), a druga grupa miševa je primala odgovarajuće doze Hartmanovog rastvora kao rastvarača (Kontrola). Procenat BrdU<sup>+</sup> Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija izolovanih sledećeg dana iz peritonealne duplje je utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja su prikazani sa desne strane. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između zdravih miševa koji su primali Hartmanov rastvor i zdravih miševa tretiranih etil-piruvat. EP – etil-piruvat.

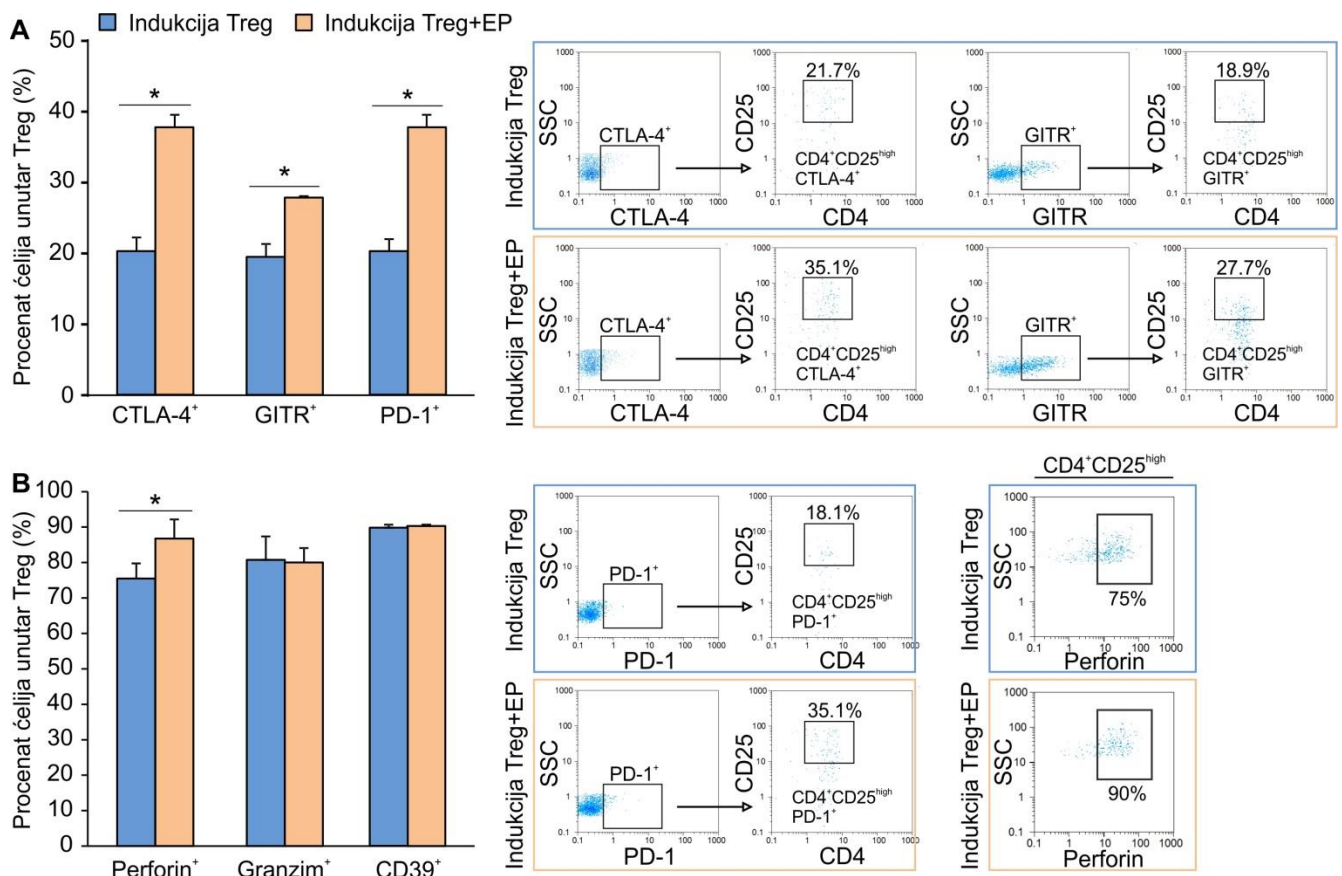
#### 4.5. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na fenotip Treg ćelija

Nakon otkrivanja da etil-piruvat pospešuje diferencijaciju Treg ćelija i kod zdravih miševa i u kulturi, analiziran je uticaj etil-piruvata na fenotip *in vitro* diferenciranih Treg ćelija. Utvrđeno je da prisustvo etil-piruvata dovodi do povećanja ekspresije CTLA-4, GITR i PD-1, supresivnih markera Treg ćelija (Slika 27A), ukazujući na potencijalno pojačavanje njihovih supresivnih sposobnosti.

Treg ćelije mogu ispoljiti svoja imunosupresivna svojstva i kroz oslobađanje granula koje sadrže perforine i granzime, slično citotoksičnim CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Još jedan vid kontrole imunskog odgovora pomoću Treg ćelija se zasniva na aktivnosti ekto-enzima CD39, koji vrši razgradnju ATP molekula do adenzin monofosfata (AMP). CD39 je visoko ekspimiran na površini Treg ćelija, a njegova ekspresija je pod kontrolom FoxP3. Delujući zajedno sa još jednim ekto-enzimom, CD73, koji nastali AMP dalje razgrađuje do adenzina, u ciljnoj ćeliji se inhibira ekspresija različitih gena sa proinflamacijskom ulogom (Arce-Sillas i sar., 2016).

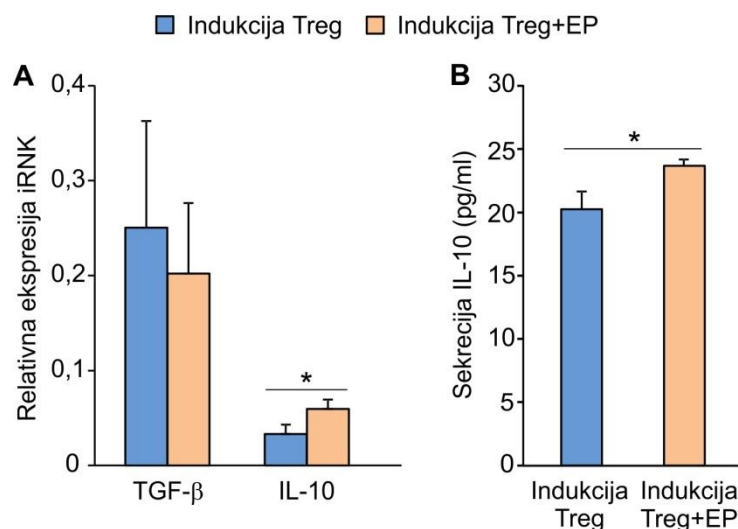
Zbog toga je potom analizirana ekspresija perforina, granzima i CD39 od strane konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvat. Rezultati su pokazali da je etil-piruvat doveo do povećanja zastupljenosti Treg ćelija koje su ekspimirale perforin, dok je produkcija granzima i ekspresija CD39 ostala nepromenjena (Slika 27B).





**Slika 27. *In vitro* efekat etil-piruvata na fenotip indukovanih Treg ćelija.** Naivni CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T limfociti su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125 μM) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. Procenti ćelija su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. Reprezentativni dot plotovi i odgovarajuće strategije ograničavanja za statistički značajne rezultate su prikazani sa desne strane. (A) Procentat CTLA-4<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup> i PD-1<sup>+</sup> Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija. (B) Procentat perforin<sup>+</sup>, granzim<sup>+</sup> i CD39<sup>+</sup> Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvat. EP – etil-piruvat.

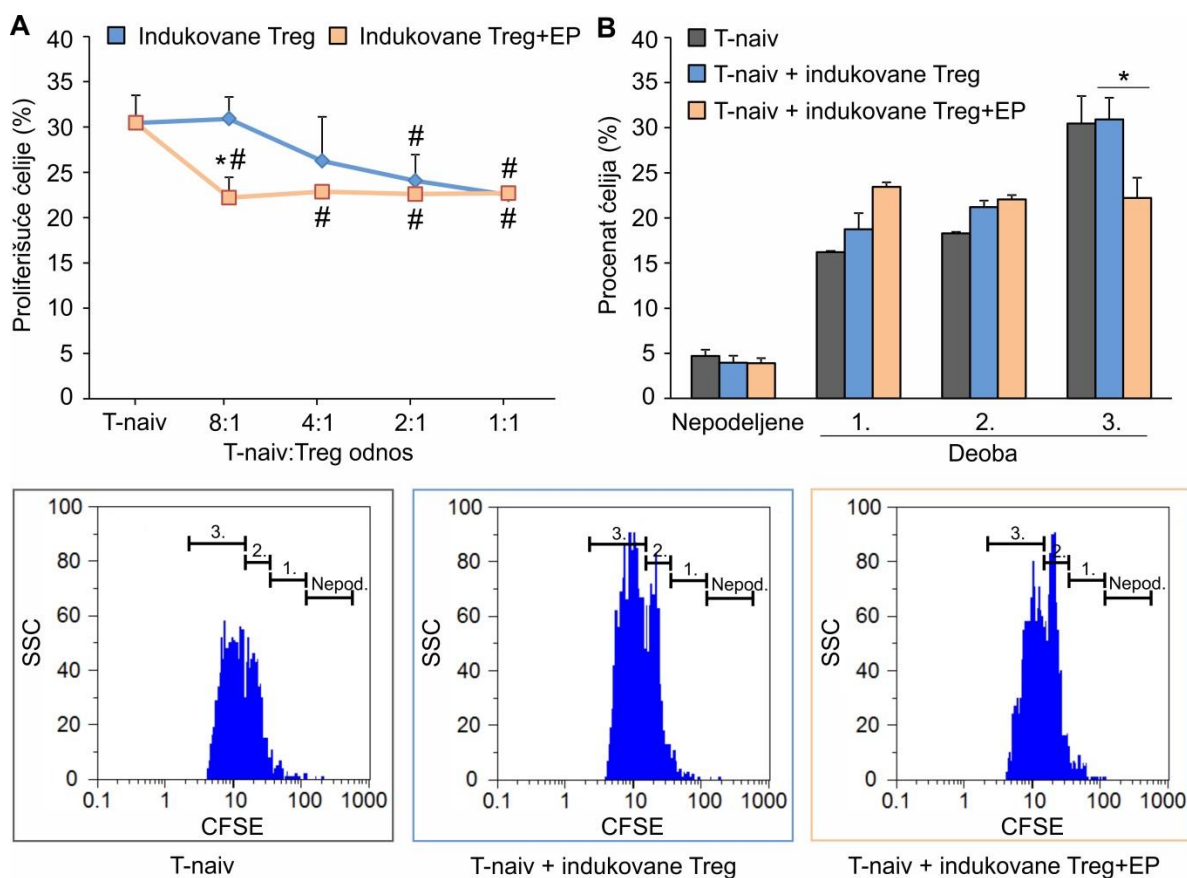
Dalje je metodom RT-qPCR testirana relativna promena ekspresije iRNK antiinflamacijskih citokina TGF-β i IL-10. Dok prisustvo etil-piruvata nije uzrokovalo promenu ekspresije TGF-β iRNK, ekspresija IL-10 iRNK je bila značajno veća kod Treg ćelija stimulisanih etil-piruvat u odnosu na konvencionalno indukovane Treg ćelje (Slika 28A). Potvrđeno je i povećanje produkcije IL-10, detektovanog testom ELISA iz supernatanta Treg ćelija izloženih etil-piruvatu (Slika 28B).



**Slika 28. *In vitro* efekat etil-piruvata na produkciju antiinflamacijskih citokina indukovanih Treg ćelija.** Naivni CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T limfociti su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125 μM) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. (A) Ekspresija TGF-β i IL-10 iRNK iz Treg ćelija 72 h nakon dodavanja etil-piruvata, utvrđivana metodom RT-qPCR. (B) Koncentracija IL-10 u supernatantima ćelijskih kultura konvencionalno indukovanih Treg ćelija ili Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom, merena metodom ELISA. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom. EP – etil-piruvat.

#### 4.5.1. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na sposobnost supresije Treg ćelija

Pošto su rezultati pokazali da etil-piruvat uzrokuje povišenu ekspresiju i produkciju većeg broja površinskih i sekretornih molekula Treg ćelija vezanih za njihovu supresivnu funkciju, izveden je *in vitro* test supresije proliferacije. U njemu je merena sposobnost Treg ćelija dobijenih u kulturi sa ili bez prisustva etil-piruvata da suprimiraju proliferaciju naivnih T limfocita obojenih pomoću CFSE. Nakon dva dana koinkubacije, Treg ćelije stimulisane etil-piruvatom su iskazale jači supresivni kapacitet u odnosu na konvencionalno diferencirane Treg ćelije (Slika 29A,B). Od značaja je i rezultat da su Treg ćelije dobijene u prisustvu etil-piruvata zadržale svoje supresivne osobine i u situaciji kada je njihov broj bio izrazito manji od broja naivnih T limfocita (odnos naivnih T limfocita i Treg ćelija=8:1) (Slika 29A,B).



**Slika 29. In vitro efekat etil-piruvata na supresivnu funkciju indukovanih Treg ćelija.** Naivni CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T limfociti su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125 μM) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. Nakon 96 h, Treg ćelije (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) su prečišćene pomoću ćelijskog sortera. Njihov supresivni potencijal na proliferaciju prečišćenih naivnih T limfocita (T-naiv, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) je procenjen u *in vitro* testu supresije merenjem sekvencijalnog gubitka fluorescencije CFSE naivnih T limfocita obojenih pomoću CFSE. (A) Procenat proliferišućih naivnih T ćelija u prisutvu ili odsustvu rastućeg broja Treg ćelija. (B) Procenat nepodeljenih i podeljenih naivnih T ćelija (1, 2, i 3. deoba) nakon kokulture sa 8 puta manjim brojem Treg ćelija, sa reprezentativnim histogram plotovima prikazanim sa donje strane (Nepod. – nepodeljene ćelije, i 1, 2, i 3. deoba). Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom, dok #p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između samih proliferišućih naivnih T limfocita i naivnih T limfocita koinkubiranih sa Treg ćelijama. EP – etil-piruvat.

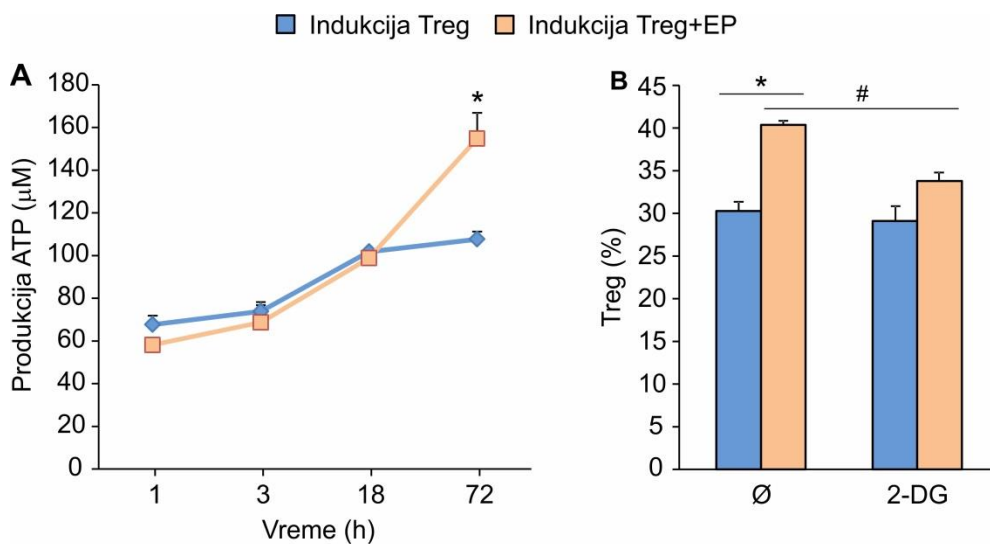
Sveukupno, ovi rezultati sugerišu da, kao i u *in vivo* uslovima, etil-piruvat pojačava inhibitornu funkciju *in vitro* generisanih Treg ćelija kroz pospešivanje produkcije antiinflamacijskih citokina i ispoljavanja molekula uključenih u supresiju posredovanu direktnim ćelijskim kontaktom.

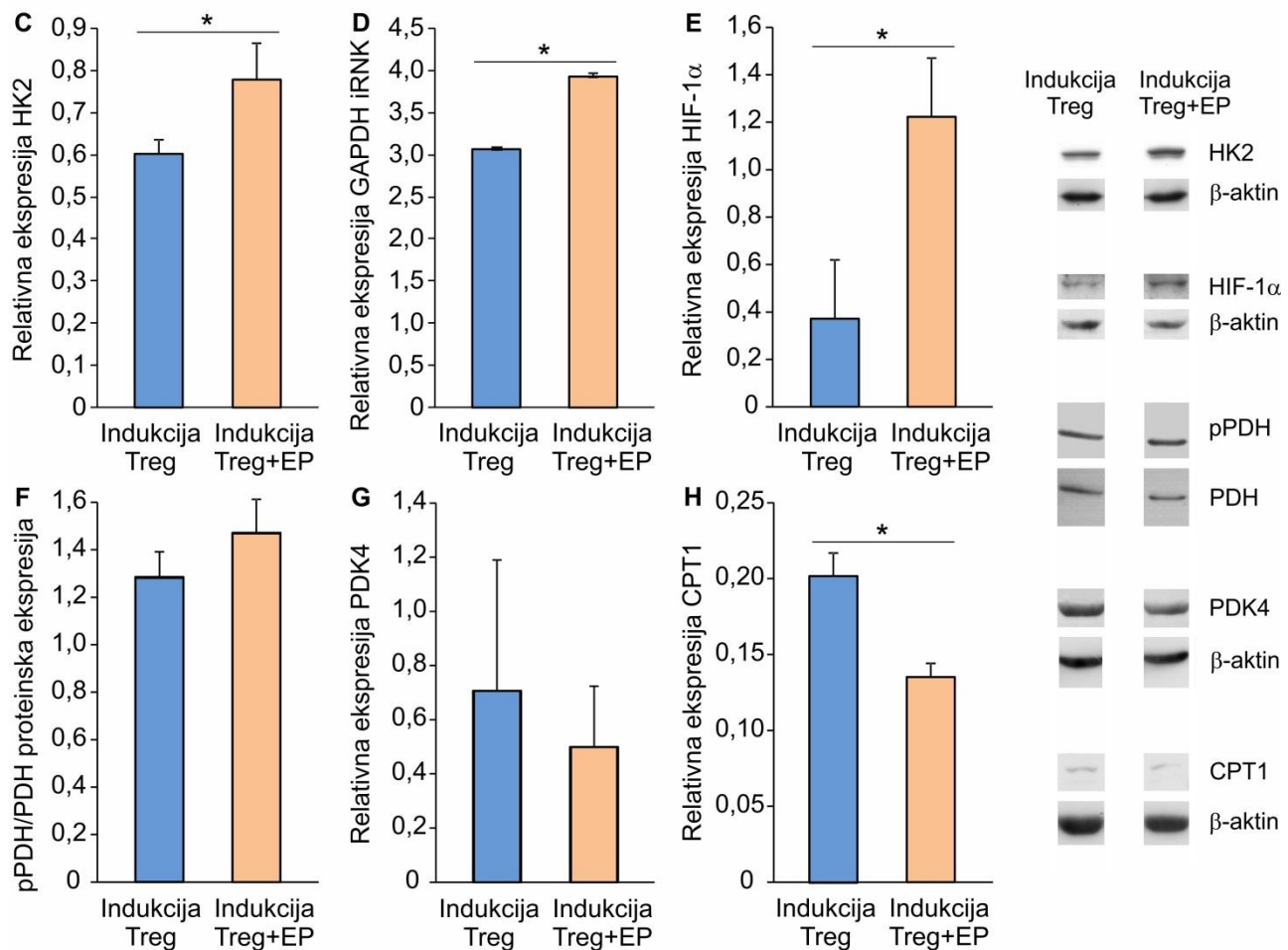


#### 4.5.2. Uticaj primene etil-piruvata na produkciju ATP u *in vitro* diferenciranim Treg ćelijama

Pored potenciranja proliferacije Treg ćelija i njihovog supresivnog fenotipa, etil-piruvat je stimulisao i ćelijsku produkciju energije, sudeći po detektovanom povećanju količine unutarćelijskog ATP (Slika 30A). Dalja istraživanja su bila usmerena na utvrđivanje koraka ćelijske metaboličke kaskade preko kojeg je etil-piruvat iskazao taj uticaj: preko glikolize, Krebsovog ciklusa (ciklusa trikarbonskih kiselina),  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina ili oksidativne fosforilacije.

Glikoliza predstavlja metabolički put tokom kojeg u citoplazmi, kroz niz hemijskih reakcija katalizovanih specifičnim enzimima, dolazi do prevođenja glukoze do piruvata, pri čemu se produkuje ATP. Rezultati su naizgled pokazali da je stimulacija proliferacije Treg ćelija pomoću etil-piruvata zavisila od funkcionalnog glikolitičkog puta. Tako je primena 2-DG, kompetitivnog inhibitora glikolize, umanjila etil-piruvatom pospešen porast zastupljenosti Treg ćelija u kulturi (Slika 30B). Dodatno, imunoblot metodom je utvrđeno da su u kulturama T limfocita izloženih etil-piruvatu Treg ćelije ekspimirale značajno više heksokinaze 2 (HK2), ključnog regulatornog glikolitičkog enzima koji katalizuje inicijalni korak fosforilacije glukoze radi produkcije glukozo-6-fosfata (Slika 30C). Etil-piruvat je doveo i do povećanja ekspresije iRNK gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), enzima koji tokom glikolize katalizuje konverziju gliceraldehid-3-fosfata do D-glicerat 1,3 bisfosfata (Slika 30D). Treg ćelije stimulisane etil-piruvatom su takođe ekspimirale značajno više HIF-1 $\alpha$  (engl. Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$ ) proteina, stimulatora glikolize, u odnosu na konvencionalno indukovane Treg ćelije (Slika 30E).





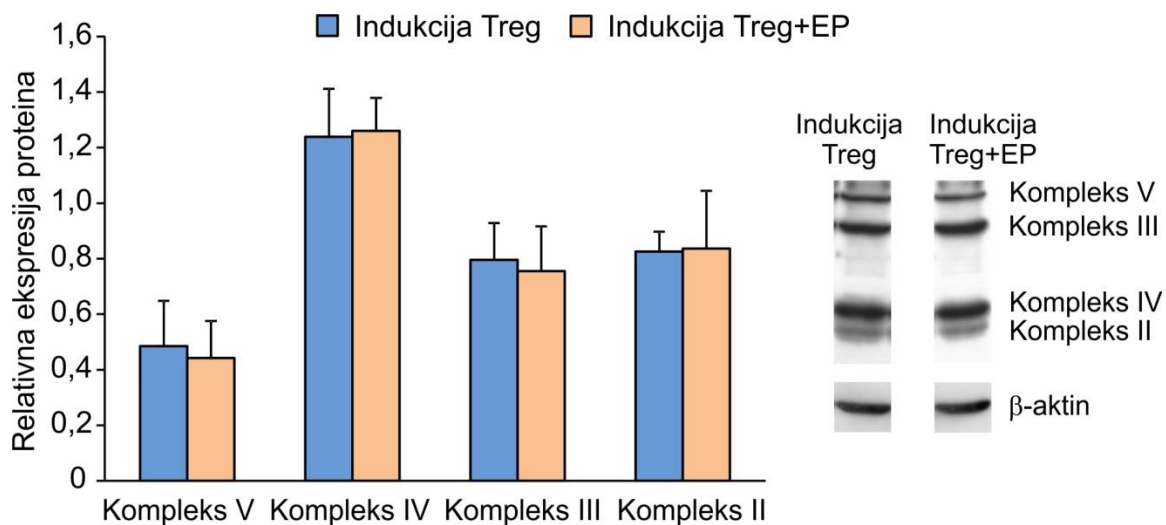
**Slika 30. *In vitro* efekat etil-piruvata na metaboličke puteve indukovanih Treg ćelija.** Naivni T limfociti ( $CD4^+CD25^-$ ) su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat ( $125 \mu M$ ) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. (A) Sadržaj ATP u ćelijama je meren testom bioluminiscencije ATP, 1, 3, 18 ili 72 h nakon izlaganja etil-piruvatu. (B) Efekat 2-Deoksi-D-glukoze (2-DG) na procenat Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) ćelija, utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije nakon ukupno 96 h kultivacije. 2-DG ( $40 \mu g/ml$ ) je dodavan u kulturu kada i etil-piruvat. Relativna ekspresija proteina (normalizovana prema ekspresiji ukupne proteinske forme ili prema ekspresiji  $\beta$ -aktina), utvrđivana nakon 96 h ćelijske kulture: (C) HK2, (E) HIF-1 $\alpha$ , (F) fosforilisana forma PDH (pPDH), (G) PDK4 i (H) CPT1. Reprezentativne proteinske trake detektovane imunoblot metodom su prikazane sa desne strane. (D) Ekspresija GAPDH iRNAK iz Treg ćelija, utvrđivana metodom RT-qPCR. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom, dok # $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom i dodatno tretiranih sa 2-DG. EP – etil-piruvat.

Krebsov ciklus funkcioniše kao centralni metabolički generator u ćeliji usled toga što u njemu mogu biti iskorišćeni raznoliki supstrati radi dobijanja energije. Nakon glikolize, nastali piruvat se oksiduje do acetil koenzima A (acetil CoA) koji biva iskorišćen kao prekursor Krebsovog ciklusa. Radi ispitivanja potencijalnog uticaja etil-piruvata na konverziju piruvata do acetil CoA, utvrđivana je proteinska ekspresija fosforilisane forme piruvat dehidrogenaze (pPDH). Dodatno, merena je i ekspresija kinaze piruvat dehidrogenaze 4 (PDK4) koja služi kao

negativni regulator aktivnosti PDH. Rezultati su pokazali da je PDH bila podjednako aktivirana (Slika 30F), a PDK4 podjednako eksprimirana (Slika 30G) u Treg ćelijama stimuliranim etil-piruvatom i u konvencionalno diferenciranim Treg ćelijama. Ovi rezultati sugeriraju da uočeno pospešenje produkcije ATP u prisustvu etil-piruvata nije bilo posledica njegovog efekta na funkcionisanje Krebsovog ciklusa.

$\beta$ -oksidacija masnih kiselina podrazumeva proces skraćivanja viših masnih kiselina u mitohondrijama pri čemu se generišu NADH, FADH<sub>2</sub> i acetil CoA, a nastali NADH i FADH<sub>2</sub> dalje bivaju iskorišćeni u respiratornom lancu transfera elektrona radi generisanja ATP. Pošto više masne kiseline nisu samostalno sposobne da iz citoplazme stignu do unutrašnje mitohondrijske membrane, to je omogućeno sistemom karnitin palmitoil-transferaza. Kako bi se proverila mogućnost da etil-piruvat modulira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, imunoblot metodom je procenjena ekspresija karnitin palmitoil-transferaze 1 (CPT1, engl. Carnitine Palmitoyltransferase 1), enzima zaslužnog za ključni korak  $\beta$ -oksidacije. Prisustvo etil-piruvata je uzrokovalo značajno smanjenje ekspresije CPT1 (Slika 30H). Ovi rezultati ukazuju da etil-piruvat u *in vitro* generiranim Treg ćelijama suprimira  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina.

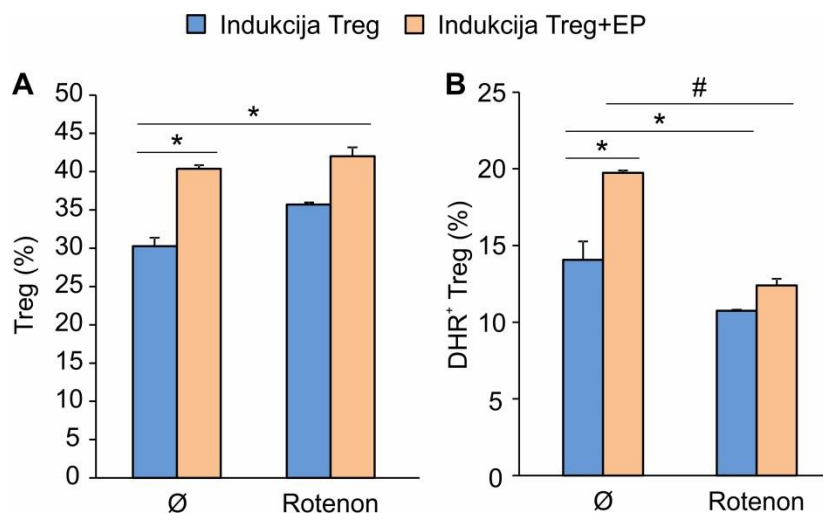
Oksidativna fosforilacija obezbeđuje najveći udeo ATP molekula proizvedenih u ćeliji. Unutrašnja membrana mitohondrija poseduje multienziomske komponente respiratornog lanca koji su zaslužni za transfer elektrona i generisanje energije. Radi provere mogućeg uticaja etil-piruvata na oksidativnu fosforilaciju, prvo je utvrđivana ekspresija mitohondrijskih kompleksa respiratornog lanca (Kompleksi II-IV) i ATP sintaze (Kompleks V). Rezultati su pokazali da je njihova ekspresija ostala slična u uslovima indukovanja Treg ćelija i u prisustvu i u odsustvu etil-piruvata (Slika 31).



**Slika 31. *In vitro* efekat etil-piruvata na ekspresiju mitohondrijskih proteina indukovanih Treg ćelija.** Naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. Relativna ekspresija proteinskih kompleksa koji učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji (normalizovana prema ekspresiji  $\beta$ -aktina), određivana je nakon 96 h ćelijske kulture, sa reprezentativnim proteinskim trakama detektovanim imunoblot metodom. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. EP – etil-piruvat.

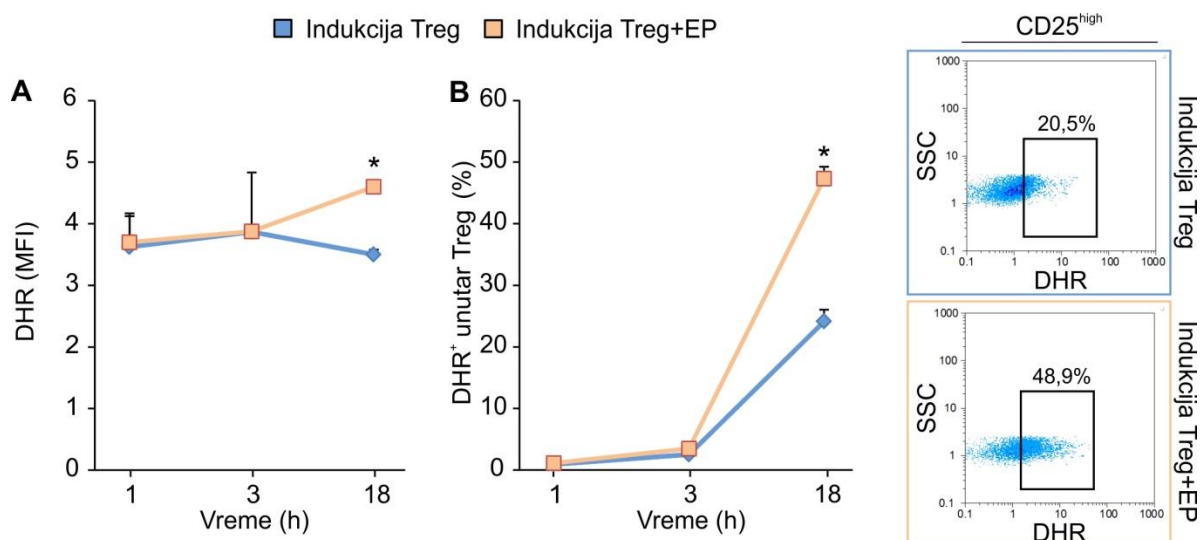
Još jedan pristup ispitivanju značaja oksidativne fosforilacije je bila upotreba rotenona, koji deluje kao inhibitor mitohondrijskog Kompleksa II. Rezultati su pokazali da dodavanje rotenona u ćelijsku kulturu nije imalo efekta na zastupljenost ni konvencionalno diferenciranih Treg ćelija niti Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom (Slika 32A).

Tokom transporta elektrona, kompleksi respiratornog lanca generišu i ROS. Ispitujući uticaj primene rotenona na produkciju ROS, utvrđeno je da rotenon dovodi do njene inhibicije u obe grupe ispitivanih Treg ćelija (Slika 32B). Takvi rezultati sugerišu da je oksidativna fosforilacija redundantna u uslovima *in vitro* diferencijacije Treg ćelija.



**Slika 32. *In vitro* efekat rotenona na indukovane Treg ćelije stimulisane etil-piruvatom.** Naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) su inkubirani 96 h u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125 μM i/ili rotenon (5 nM) su dodavani 24 h nakon započinjanja kultivacije. (A) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) ćelija utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije. (B) Produkcija ROS u Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelijama utvrđivana upotrebom DHR bojenja, merena 24 h nakon dodavanja etil-piruvata. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti ± SD. \*p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom ili tretiranih etil-piruvatom i rotenonom, dok #p < 0,05 predstavlja statistički značajnu razliku između Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom i Treg ćelija tretiranih etil-piruvatom i rotenonom. EP – etil-piruvat.

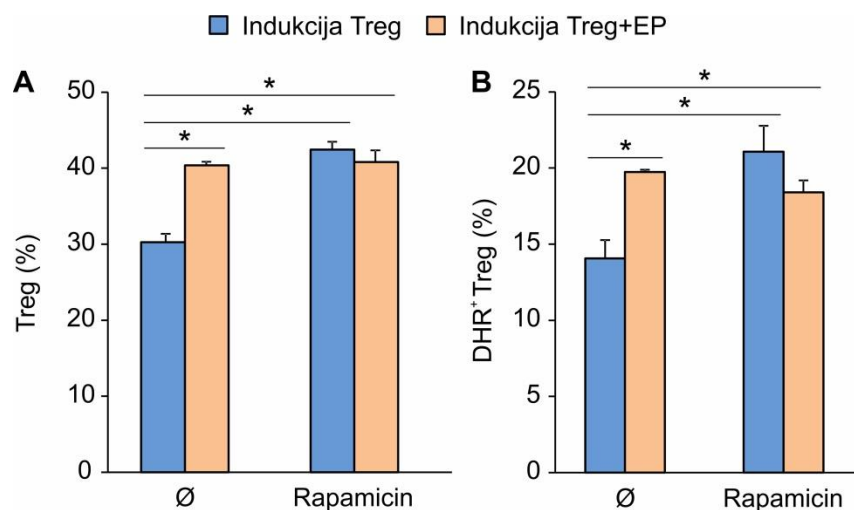
Pošto su rezultati pokazali da prisustvo etil-piruvata u ćelijskoj kulturi podiže zastupljenost ROS<sup>+</sup> Treg ćelija 24 h nakon njegovog dodavanja (Slika 32B), dalje je ispitivan vremenski tok produkcije ROS u Treg ćelijama. Ispitivanjem zastupljenosti Treg ćelija koje produkuju ROS i nivoa produkcije ROS po ćeliji 1 ili 3 h nakon dodavanja etil-piruvata u ćelijsku kulturu, pokazano je da u njima nije bilo promene (Slika 33A,B). Ipak, 18 h nakon dodavanja etil-piruvata, uočen je porast zastupljenosti ROS<sup>+</sup> Treg ćelija i sadržaja ROS po ćeliji (Slika 33A,B), ukazujući da je diferencijacija Treg ćelija stimulisana etil-piruvatom praćena porastom produkcije ROS.



**Slika 33. *In vitro* efekat etil-piruvata na produkciju ROS u indukovanim Treg ćelijama.** Naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) su inkubirani u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125  $\mu$ M) je dodavan 24 h nakon započinjanja kultivacije. Analize su vršene 1, 3 i 18 h nakon dodavanja etil-piruvata. (A) Produkcija ROS u Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelijama utvrđivana upotrebom DHR bojenja, detektovana merenjem prosečnog intenziteta fluorescencije (MFI). (B) Procenat ćelija koje proizvode ROS (DHR<sup>+</sup>) unutar Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija utvrđivan metodom protočne citofluorimetrije, sa reprezentativnim dot plotovima. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija stimuliranih etil-pirivatom. EP – etil-piruvat.

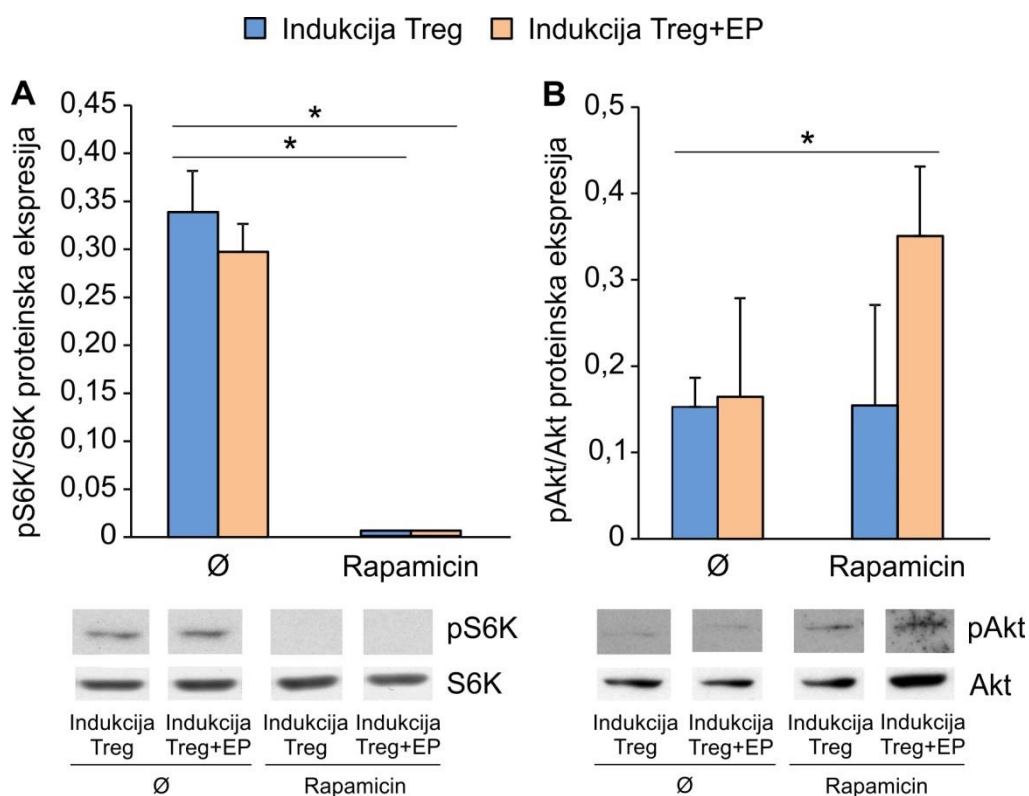
#### 4.5.3. Uticaj *in vitro* primene etil-piruvata na mTOR signalni put u Treg ćelijama

mTOR signalni put omogućava modulaciju ćelijskog metabolizma u odgovoru na integraciju brojnih sredinskih signala. mTOR je kinaza koja kroz povezivanje sa drugim proteinima može formirati dve vrste proteinskih kompleksa, mTORC1 i mTORC2, i čijim se delovanjem ostvaruje regulacija aktivacije, diferencijacije i funkcije T ćelija. Kako je prethodno pokazano da inhibicija mTOR signalnog puta može doprineti diferencijaciji Treg ćelija (Sun i sar., 2018), upoređeni su efekti primene etil-piruvata i primene rapamicina, inhibitora mTOR kinaze. Njihov uticaj na diferencijaciju Treg ćelija je bio sličan po uočenom porastu zastupljenosti Treg ćelija u kulturi (Slika 34A) i povećanju produkcije ROS (Slika 34B). Međutim, prilikom zajedničke primene, rapamicin i etil-piruvat nisu iskazali aditivni stimulatorni efekat (Slika 34A,B), sugerišući da bi etil-piruvat mogao remetiti slične signalne puteve kao rapamicin.



**Slika 34. *In vitro* efekat rapamicina na indukovane Treg ćelije stimulisane etil-piruvat.** Naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) su inkubirani u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125  $\mu$ M) i/ili rapamicin (100 ng/ml) su dodavani 24 h nakon započinjanja kultivacije. Sve analize su izvedene nakon 96 h kultivacije ćelija. Procenti ćelija su utvrđivani metodom protočne citofluorimetrije. (A) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) ćelija. (B) Procenat Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) ćelija koje su proizvele ROS (DHR<sup>+</sup>). Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija tretiranih etil-piruvat, rapamicinom, ili etil-piruvat i rapamicinom. EP – etil-piruvat.

Kako bi se ta mogućnost testirala, utvrđivan je aktivacioni status S6 kinaze (S6K, fosforilacija na poziciji treonin 389) koja biva aktivirana nizvodno od mTORC1, kao i aktivacioni status Akt kinaze (fosforilacija na poziciji serin 423) koja biva aktivirana nizvodno od mTORC2. Kako je i bilo očekivano, primena rapamicina je u potpunosti sprečila fosforilaciju S6K, dok dodavanje etil-piruvata na nju nije imalo efekta (Slika 35A). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da pokazani stimulatorni efekti etil-piruvata na Treg ćelije nisu bili posredovani ometanjem mTOR signalnog puta. Sa druge strane, ni rapamicin ni etil-piruvat zasebno nisu iskazali efekat na fosforilaciju Akt kinaze, dok je njihova istovremena primena dovela do njenog povećanja (Slika 35B).



**Slika 35. *In vitro* efekat rapamicina na mTOR aktivnost indukovanih Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom.** Naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) su inkubirani u prisustvu faktora stimulacije diferencijacije Treg ćelija. Etil-piruvat (125  $\mu$ M) i/ili rapamicin (100 ng/ml) su dodavani 24 h nakon započinjanja kultivacije. Sve analize su izvedene nakon 96 h kultivacije ćelija. Relativna ekspresija fosforilisanih proteina (normalizovana prema ekspresiji ukupne proteinske forme): (A) fosforilisana forma S6K (pS6K) i (B) fosforilisana forma Akt kinaze (pAkt). Reprezentativne proteinske trake detektovane imunoblot metodom su prikazane sa donje strane. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  predstavlja statistički značajnu razliku između konvencionalno indukovanih Treg ćelija i Treg ćelija tretiranih rapamicinom, ili etil-piruvatom i rapamicinom. EP – etil-piruvat.

Sveukupno, ovi rezultati sugerišu da etil-piruvat omogućava stimulisanu proliferaciju *in vitro* generisanih Treg ćelija kroz pospešivanje njihove produkcije ATP, a da je ovaj porast energije posredovan stimulisanjem glikolitičkog puta pomoću etil-piruvata. Primećeni efekti etil-piruvata su takođe uključivali i povećanu produkciju ROS u Treg ćelijama, kao i inhibiciju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina.



# 5. Diskusija



Rezultati ove doktorske disertacije su jasno ukazali na mogućnost sprečavanja razvoja DT1 u ranim fazama bolesti primenom etil-piruvata na životinjskom modelu bolesti. Etil-piruvat je svoj efekat iskazao prevashodno kroz modulaciju imunskog odgovora, kako u slezini (koja je indikator sistemskog imunskog odgovora), tako i u drenirajućim limfnim čvorovima i u tkivu pankreasa miševa kojima je indukovano DT1. Etil-piruvat je ovaj uticaj ostvario primarno preko stimulacije proliferacije, *de novo* diferencijacije i migracije Treg ćelija *in vivo*. Pored efekta na Treg ćelije tokom patološkog stanja tj. tokom DT1, etil-piruvat je stimulisao ove ćelije i u homeostatskim uslovima *in vivo*, u peritonealnoj duplji i crevima zdravih miševa, ali i *in vitro* gde je povećanjem procesa glikolize stimulisao proliferaciju Treg ćelija.

DT1 se najčešće javlja kod mlađih individua usled zajedničkih efekata genske predispozicije i izlaganja sredinskim faktorima. S obzirom da je u trenutku dijagnostikovanja bolesti većina  $\beta$  ćelija uništena posredstvom autoimunskog odgovora, cilj novih profilaktičkih terapija je njihova primena kod genski podložnih individua, tj. onih koji su u srodstvu sa obolelim osobama. Cilj takvog pristupa bi bio očuvanje postojećih  $\beta$  ćelija, pošto bi čak i mala količina sekretovanog insulina omogućila lakšu kontrolu potencijalne bolesti i umanjila komplikacije povezane sa neadekvatnom kontrolom glikemije (van Belle i sar., 2011; Castro i sar., 2010). U tom smislu, ispitivanje preventivnih pristupa je veoma korisno, te je u ovoj doktorskoj disertaciji opisan efekat primene etil-piruvata u trenutku izazivanja DT1 kod miševa.

Model DT1 na miševima koji je korišćen u ovoj studiji uključuje primenjivanje subdijabetogenih doza STZ koje u  $\beta$  ćelijama pankreasa pokreću procese koji posledično dovode do smrti  $\beta$  ćelija i oslobađanja autoantigena, nakon čega njihovom uništenju doprinosi specifični autoimunski odgovor. STZ u  $\beta$  ćelijama uzrokuje i formiranje ROS, a smatra se da time nastali oksidativni stres značajno doprinosi početnom uništavanju  $\beta$  ćelija (Nahdi i sar., 2017), imajući u vidu da  $\beta$  ćelije imaju slabo razvijene antioksidativne mehanizme (Padgett i sar., 2013). Pošto su brojna istraživanja pokazala da etil-piruvat poseduje antioksidativna svojstva, pri primeni STZ i etil-piruvata je pravljeno najmanje 3 h razmaka između injekcija kako bi se izbegla eventualna interferencija te dve supstance.

Nakon inicijalnog uništavanja  $\beta$  ćelija posredovanog ROS u modelu DT1 uzrokovanog upotrebom STZ, imunske ćelije infiltriraju pankreasna ostrvca, a snažna proinflamacijska aktivnost uzrokuje dalje uništenje  $\beta$  ćelija. U posmatranom modelu DT1, hiperglikemija se razvija oko 14 dana nakon početka indukcije bolesti (Nikolic i sar., 2015; Vujicic i sar., 2018). Merenjima nivoa glukoze u krvi je utvrđeno da su se do 28 dana nakon početka indukcije bolesti miševi tretirani etil-piruvatom odlikovali značajno manjom incidencom bolesti u odnosu na netretiranu grupu životinja kojima je indukovano DT1. Slične efekte etil-piruvat je imao u nekoliko životinjskih modela bolesti u kojima patogenezi doprinosi jak inflamacijski odgovor, kao na primer u eksperimentalnom kolitisu (Guo i sar., 2015) i autoimunskom encefalomijelitisu (Miljković i sar., 2015; Djedović i sar., 2017). Pored glikemije, vrlo važan indikator uspešnosti terapije u DT1 je prisustvo ketona u urinu (Mediani i sar., 2018). Tretman etil-piruvatom uzrokovao je da manji procenat miševa ima ketone u urinu, što sugeriše da je kod ovih životinja prisustvo insulina u krvi bilo dovoljno da se ne pokrene razgradnja masnog tkiva i oksidacija masnih kiselina do ketona kao alternativnih izvora energije.

Kao što je već rečeno, autoimunski odgovor kod ljudi i miševa vodi oštećenju  $\beta$  ćelija pankreasa koje umiru nekrozom ili apoptozom, a poznato je da tokom svoje smrti  $\beta$  ćelije oslobađaju alarmine u koje spada i HMGB1. Slično kao kod NOD miševa kod kojih je pokazano da je progresija DT1 asocirana sa povišenom ekspresijom HMGB1 (Li i sar., 2012), i pankreasna ostrvca dijabetičnih C57BL/6 miševa su se odlikovala povećanim prisustvom HMGB1 u odnosu na pankreasna ostrvca zdravih životinja. Etil-piruvat se generalno definiše kao inhibitor HMGB1 (Kao i Fink, 2010), pa je u skladu sa time tretman dijabetičnih miševa etil-pirivatom nesumnjivo doveo do smanjenja prisustva HMGB1 u  $\beta$  ćelijama pankreasa u poređenju sa netretiranim dijabetičnim miševima. Osim što se HMGB1 pasivno oslobađa iz oštećenih  $\beta$  ćelija NOD miševa, može biti i sekretovan iz makrofaga i dendritskih ćelija koje su infiltrirale pankreasna ostrvca, nakon čega vanćelijski HMGB1 potentno indukuje sazrevanje i aktivaciju ovih imunskih ćelija (Zhang i sar., 2009; Han i sar., 2008). Shodno tome, tretman NOD miševa neutrališućim anti-HMGB1 antitelom doveo je do odlaganja razvoja DT1 (Zhang i sar., 2009; Zhang i sar., 2020). Neutralizacija HMGB1 je u određenom broju NOD miševa sa novorazvijenom bolešću doprinela normalizaciji glikemije, a ovi miševi su se odlikovali smanjenim insulitisom i očuvanom produkcijom insulina u  $\beta$  ćelijama (Zhang i sar., 2020). Navedeni podaci su u skladu sa rezultatima ove disertacije, u kojoj je uočena inhibicija oslobađanja HMGB1 u pankreasnim ostrvcima nakon primene etil-piruvata bila praćena očuvanom produkcijom insulina u odnosu na ekspresiju insulina u pankreasnim ostrvcima netretiranih dijabetičnih miševa. Inhibicija HMGB1 primenom etil-piruvata bi mogla da utiče i na sam imunski odgovor, tj. aktivaciju i migraciju imunskih ćelija. Naime, HMGB1 oslobođen iz oštećenih ćelija se može vezati za RAGE (engl. Receptor for Advanced Glycation End products) ćelijski receptor i time pojačati inflamaciju generisanjem ili proliferacijom ćelija urođene ili adaptivne imunosti. Još jedan proinflamacijski efekat HMGB1 bi mogla biti aktivacija receptora sličnog Tollu (TLR, engl. Toll-Like Receptor) 4. Tako na primer, povišena ekspresija HMGB1 u  $\beta$  ćelijama kod NOD miševa se podudara sa povišenom ekspresijom TLR4 na membrani  $\beta$  ćelija (Li i sar., 2012). Ispoljavanje ovog receptora je potvrđeno i na  $\beta$  ćelijama pankreasa čoveka (Garay-Malpartida i sar., 2011). Aktivacija TLR4 može pokrenuti prenos signala u okviru NF- $\kappa$ B signalnog puta, uzrokujući ekspresiju proinflamacijskih citokina i povišenu ekspresiju adhezivnih molekula na leukocitima, time doprinoseći inflamaciji i oštećenju pankreasa (van Beijnum i sar., 2008; Nogueira-Machado i sar., 2017). U skladu sa ovim podacima, očuvanje funkcije  $\beta$  ćelija nakon tretmana etil-pirivatom se može objasniti i uočenim smanjenim stepenom infiltracije imunskih ćelija u pankreasna ostrvca.

Kinetika ulaska imunskih ćelija u pankreas je detaljno opisana u različitim modelima DT1. U modelu bolesti indukovane primenom STZ u pankreasna ostrvca prvo ulaze ćelije urođenog imunskog odgovora, makrofagi i dendritske ćelije, a tek nakon njih dolaze CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfociti (Luo i sar., 2019). Nakon tretmana etil-pirivatom sastav infiltrata pankreasa uglavnom ostaje nepromenjen, kada je u pitanju zastupljenost M1 i M2 populacija makrofaga, citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita, podgrupa efektorskih CD4<sup>+</sup> T limfocita (Th1, Th2 i Th17 ćelija), kao i B limfocita. Ipak, primećene su dve značajne razlike između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-pirivatom. Prva razlika nakon tretmana etil-pirivatom je bila u većem prisustvu tolerogenih dendritskih ćelija u infiltratima pankreasa, a druga u povećanoj zastupljenosti Treg ćelija u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa. Kako neutralisanje autoimunskog odgovora u DT1 predstavlja najsigurniji terapijski pristup ovoj bolesti, jedan od

pristupa koji bi iskazao ovaj efekat je stimulisanje tolerancije kroz indukciju nastanka tolerogenih dendritskih ćelija i Treg ćelija.

Dijabetični miševi tretirani etil-piruvatom su se odlikovali većim udelom tolerogenih dendritskih ćelija u tkivu pankreasa u odnosu na netretirane dijabetične životinje, a posedovali su manju zastupljenost ovih ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima. Ovaj efekat etil-piruvata bi se makar delom mogao pripisati neutralizaciji HMGB1, pošto je pokazano da vanćelijski HMGB1 stimuliše sazrevanje dendritskih ćelija i njihov odlazak u limfne čvorove *in vivo* (Manfredi i sar., 2008). Prilikom fagocitoze mrtvih ćelija, dendritske ćelije u nedostatku aktivacionih signala poprimaju tolerogeni fenotip, smanjuju sekreciju proinflamacijskih citokina i ekspresiju MHC II i kostimulatornih molekula, a povećavaju produkciju antiinflamacijskih citokina (Gleisner i sar., 2011; Takenaka i Quintana, 2017). Dendritske ćelije mogu prepoznati HMGB1 posredstvom TLR4, a značaj ovog procesa za DT1 je pokazan kada je je tretman NOD miševa neutrališućim anti-TLR4 antitelom doveo do izlečenja miševa sa novorazvijenom bolešću, a taj fenomen je bio posredovan indukcijom nastanka tolerogenih dendritskih ćelija i povećanjem broja Treg ćelija u pankreasnim ostrvcima (Bednar i sar., 2015). Primećeni stimulatorni efekat etil-piruvata na diferencijaciju tolerogenih dendritskih ćelija je potvrđen i u *in vitro* ispitivanjima u kojima je etil-piruvat značajno doprineo njihovoj diferencijaciji iz prekursora iz kostne srži (Djedovic i sar., 2019; Chakhtoura i sar., 2019). Povećano prisustvo tolerogenih dendritskih ćelija u infiltratima pankreasa ne mora se objasniti samo njihovom *de novo* diferencijacijom iz nezrelih dendritskih ćelija, već je moguće da je tretman etil-piruvatom pospešio migraciju tolerogenih dendritskih ćelija iz pankreasnih limfnih čvorova u kojima je uočen smanjen broj ovih ćelija. Tolerogene dendritske ćelije različitim mehanizmima ograničavaju aktivaciju efektorskih T limfocita na periferiji, između ostalog oslobađanjem IL-10 i TGF- $\beta$  (Takenaka i Quintana, 2017). Ove dendritske ćelije takođe pružaju nedovoljno stimulatornih signala T limfocitima i time usmeravaju diferencijaciju naivnih T limfocita ka Treg fenotipu umesto ka efektorskom fenotipu (Raker i sar., 2015). Dodatno, pokazano je da tolerogene dendritske ćelije mogu biti sposobne da indukuju i konverziju efektorskih T limfocita u Treg ćelije (Huang i sar., 2010).

Uprkos tome što HMGB1 stimuliše diferencijaciju M1 makrofaga, inhibicija HMGB1 posredstvom etil-piruvata nije iskazala uticaj na odnos između M1 i M2 makrofaga. Dodatno, ekspresija kostimulatornih molekula CD80 i CD86 od strane antigen-prezentujućih MHC II<sup>+</sup> ćelija, koja bi ukazala na njihovu aktivaciju, ostala je nepromenjena nakon tretmana dijabetičnih miševa etil-piruvatom. Sa druge strane, produkcija antiinflamacijskog IL-10 je bila povećana od strane antigen-prezentujućih ćelija u infiltratima pankreasa, ukazujući na povećanje njihove supresivne moći. Taj rezultat može biti od značaja i ako se uzme u obzir da su istraživanja na mišjem modelu autoimunskog kolitisa pokazala da je IL-10 oslobođen iz antigen-prezentujućih ćelija bitan za održavanje ekspresije FoxP3 u Treg ćelijama (Murai i sar., 2009), a da IL-10 svojim dejstvom na Treg ćelije može uzrokovati i povećanje produkcije ovog antiinflamacijskog citokina (Chaudhry i sar., 2011).

Sem što deluje kao alarmin, HMGB1 bi mogao biti štetan po  $\beta$  ćelije jer je sposoban da indukuje stvaranje ROS putem stimulisanja NADPH oksidaze (Lee i sar., 2010). Prema tome, moguće je da je redukcija HMGB1 u  $\beta$  ćelijama uzrokovana etil-piruvatom doprinela zaštiti  $\beta$  ćelija od apoptoze koju su indukovale ROS. Etil-piruvat, iako generalno smatran antioksidansom,

iznenadujuće nije sprečio produkciju ROS u fagocitnim ćelijama koje su infiltrirale pankreasna ostrvca, sugerirajući da je ta funkcija antigen-prezentujućih ćelija otporna na uticaj etil-piruvata.

U uslovima inflamacije tokom razvoja DT1, etil-piruvat je doveo do povećanja broja Treg ćelija u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa, kao i do poboljšanja njihovih suprimirajućih funkcija. Uočeno povećanje zastupljenosti Treg ćelija bi moglo biti rezultat njihove povišene proliferacije ili *de novo* diferencijacije. Dobijeni rezultati su obezbedili samo posredne dokaze da etil-piruvat podstiče diferencijaciju Treg ćelija. Na primer, u infiltratima pankreasa je nakon tretmana etil-piruvatom porasla zastupljenost ćelija koje nisu ispoljavale CD25<sup>high</sup> marker Treg ćelija a produkovala su TGF- $\beta$ . U ove ćelije bi mogle spadati Tr1 ćelije, netradicionalne Treg ćelije koje ne eksprimiraju ni CD25 ni FoxP3, a odlikuju se produkcijom TGF- $\beta$  (Zeng i sar., 2015). Kako je TGF- $\beta$  neophodan za *de novo* diferencijaciju Treg ćelija i u timusu i na periferiji, kao i za održavanje ekspresije FoxP3, ključnog transkripcionog faktora Treg ćelija (Chen i Konkel, 2015; Sanjabi i sar., 2017), etil-piruvat bi ovim efektom mogao doprinositi povećanoj diferencijaciji Treg ćelija. Značaj TGF- $\beta$  po razvoj DT1 je pokazan i u studiji koju su sprovedli Singh i saradnici (2018), u kojoj je imunizacija NOD miševa epitopima različitih autoantigena  $\beta$  ćelija zaštitila životinje od razvoja bolesti, a autori su zaključili da je to postignuto pomoću Tr1 ćelija indukovanih imunizacijom i da su te ćelije produkcijom TGF- $\beta$  omogućile diferencijaciju Treg ćelija na periferiji. Dodatno, etil-piruvat je stimulisao diferencijaciju Treg ćelija u *in vitro* uslovima suboptimalne stimulacije (u odsustvu TGF- $\beta$ ), sugerirajući da etil-piruvat može aktivirati iste signalne puteve kao i TGF- $\beta$  u naivnim CD4<sup>+</sup> T limfocitima.

Poznato je da i Treg ćelije eksprimiraju TLR4. Pokazano je da prisustvo HMGB1 u *in vitro* uslovima može inhibirati funkciju Treg ćelija uzrokovanjem smanjenja ekspresije FoxP3 i inhibitornih molekula CTLA-4 i IL-10, a Treg ćelije su u prisustvu HMGB1 ispoljile i manju sposobnost supresije proliferacije efektorskih T limfocita (Zhang i sar., 2011). Sem posredstvom TLR4, različite imunske ćelije mogu prepoznati HMGB1 pomoću TLR2 (Park i sar., 2004; Park i sar., 2006), a pokazano je da prepoznavanje određenih liganada ovog receptora na Treg ćelijama može umanjiti njihovu sposobnost supresije (Sutmuller i sar., 2006). Najnovija istraživanja su pokazala da uticaj HMGB1 na Treg ćelije u kontekstu DT1 ima bitnu ulogu u patogenezi ove bolesti. Tretman dijabetičnih NOD miševa neutrališućim anti-HMGB1 antitelom je, pored smanjenja razvoja bolesti, doveo do porasta zastupljenosti Treg ćelija u slezini i pankreasnim limfnim čvorovima (Zhang i sar., 2020). U ovim limfnim čvorovima je primećen i povećan procenat Th1 ćelija, što je autore navelo da zakluče da je blokiranje HMGB1 umanjilo migraciju efektorskih T limfocita iz pankreasnih limfnih čvorova u pankreasna ostrvca. U ovoj studiji je testiran i uticaj dodavanja HMGB1 u kulturu *in vitro* diferenciranih Treg ćelija, a njihovi rezultati su pokazali da je HMGB1 uzrokuje slabljenje funkcija i stabilnosti Treg ćelija, dovodeći do smanjenog oslobađanja antiinflamacijskih IL-10 i TGF- $\beta$ , kao i do smanjenja ekspresije FoxP3 (Zhang i sar., 2020).

Imajući ovo u vidu, rezultati dobijeni nakon primene etil-piruvata *in vivo* i *in vitro* se podudaraju sa inhibicijom HMGB1 primećenom u pankreasnim ostrvcima nakon tretmana etil-piruvatom. Tretman dijabetičnih C57BL/6 miševa etil-piruvatom je na Treg ćelijama doveo do povećane ekspresije CTLA-4, koji je vezivanjem CD80 i/ili CD86 na antigen-prezentujućim ćelijama verovatno inhibirao njihovu aktivaciju (Spence i Tang, 2016). Tretman etil-piruvatom je

takođe povećao zastupljenost TGF- $\beta$ <sup>+</sup> i IL-10<sup>+</sup> Treg ćelija u infiltratima pankreasa, time značajno pojačavajući njihovu sposobnost imunosupresije. To je i potvrđeno njihovom potentnijom inhibicijom proliferacije naivnih T limfocita, u poređenju sa Treg ćelijama izolovanim iz netretiranih dijabetičnih miševa.

U odgovoru na tretman dijabetičnih miševa etil-piruvat, Treg ćelije su se u infiltratima pankreasa odlikovale i povećanom proliferacijom, sudeći po markeru proliferacije Ki67, što može sugerisati da su ove Treg ćelije takozvane indukovane tj. periferne Treg ćelije, koje za svoje energetske potrebe u Krebsovom ciklusu koriste egzogene lipide i piruvat (Newton i sar., 2016). Etil-piruvat može ući u ćeliju bez potrebe za transmembranskim transporterima i u ćeliji se konvertovati u piruvat. Dobijeni piruvat može ući u Krebsov ciklus, što sugeriše da etil-piruvat može biti iskorišćen za generisanje energije u ćeliji (Zeng i sar., 2007; Fink, 2008). Dakle, moguće je da je prisustvo stabilne forme piruvata pomoglo diferencijaciju i proliferaciju perifernih Treg ćelija i kroz uticaj na metabolički put, što je i potvrđeno *in vitro* ispitivanjima.

Iako smo uvećanu zastupljenost Treg ćelija u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa objasnili njihovom većom proliferacijom nakon tretmana dijabetičnih miševa etil-piruvat u odnosu na netretirane dijabetične životinje, veća migracija Treg ćelija u pankreasna ostrvca bi takođe mogla biti razlog uočenog fenomena. U prilog ovome govore rezultati koji pokazuju da Treg ćelije u pankreasnim limfnim čvorovima dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvat ispoljavaju više CD11a i CD62L. CD11a, subjedinica LFA-1, je integrin koji nakon što T limfocit prepozna različite hemokine poprima konformaciju sa visokim afinitetom za svoje ligande i u takvoj formi je zaslužan za čvrsto vezivanje za endotel krvnog suda. Sa druge strane, CD62L, ili L-selektin, je adhezivni molekul na T limfocitima koji prepoznaje svoje ligande na vaskularnom endotelu, što predstavlja početni stupanj transmigracije T limfocita kroz zid krvnog suda na mestu inflamacije (Sandor i sar., 2019). Zanimljivo je i da je u transgenom NOD mišjem modelu pokazano da CD4<sup>+</sup> T limfociti koji se odlikuju visokom ekspresijom CD62L ispoljavaju regulatorne funkcije u pankreasnim ostrvcima (You i sar., 2004).

Tretman etil-piruvat nije doveo do promene zastupljenosti CD44<sup>+</sup> citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita u infiltratima pankreasa, ali je u pankreasnim limfnim čvorovima smanjio prisustvo CD44<sup>+</sup> efektorskih T limfocita. CD44 je adhezivni protein koji funkcioniše kao receptor za hijaluronan i značajan je za jaku adheziju T limfocita za endotel krvnih sudova i proteine vanćelijskog matriksa i dalje korake ekstravazacije, a predstavlja jedan od markera aktiviranih T limfocita (Savinov i Strongin, 2007). Ekspresija hijaluronana na mikrovaskularnim endotelnim ćelijama biva povećana u inflamacijskoj sredini, a ekspresija CD44 može biti povećana nakon antigenske stimulacije T limfocita i smatra se da je taj proces prisutan pri razvoju autoimunskih bolesti (Johnson i Ruffell, 2009; Savinov i Burn, 2010).

Sa druge strane, rezultati ove disertacije su pokazali da se dijabetični miševi tretirani etil-piruvat odlikuju povećanim prisustvom CD44<sup>+</sup> Treg ćelija i u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa u odnosu na netretirane dijabetične životinje. Ovaj efekat etil-piruvata može biti od značaja po funkcionalne karakteristike Treg ćelija ako se uzme u obzir da su studije pokazale da je ekspresija CD44 na Treg ćelijama u snažnoj korelaciji sa ekspresijom FoxP3 i da CD44<sup>+</sup> Treg ćelije ekspimiraju više IL-10 i potentnije suprimiraju proliferaciju T limfocita *in vitro* u odnosu na Treg ćelije koje ne ispoljavaju CD44 (Liu i sar., 2009). Sem toga, pokazano je i da

kostimulacija CD44 na aktiviranim Treg ćelijama u *in vitro* uslovima promoviše ekspresiju FoxP3 i produkciju IL-2 i TGF- $\beta$  (Bollyky i sar., 2009).

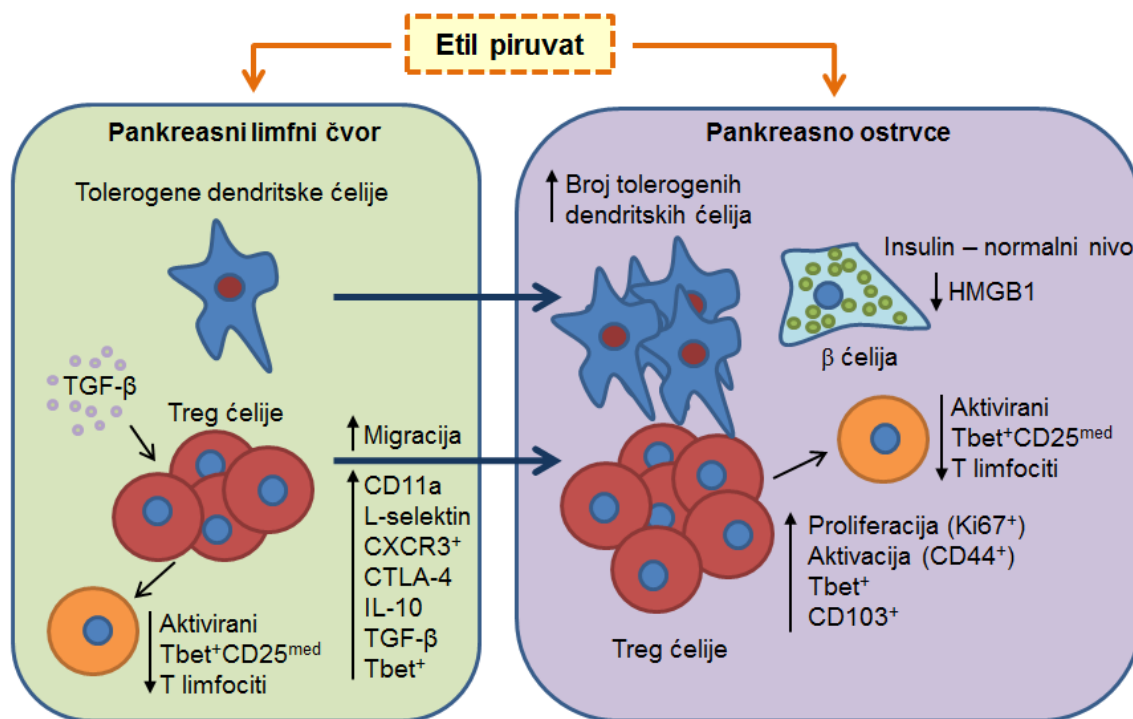
U skladu sa uočenom povećanom ekspresijom različitih adhezivnih molekula na Treg ćelijama nakon tretmana etil-piruvatom su i rezultati *ex vivo* testa hemotaksije. On je podrazumevao merenje *in vitro* migracije Treg ćelija ka medijumu sa izolovanim pankreasnim ostrvcima, jer je poznato da  $\beta$  ćelije iz pankreasnih ostrvaca mogu oslobađati veći broj hemokina (Frigerio i sar., 2002; Sarkar i sar., 2012), kao i prema gradijentu koncentracije CXCL12. Prepoznavanje ovog hemokina posredstvom CXCR4 hemokinskog receptora na T limfocitima je kod NOD miševa povezano sa zaštitom od razvoja bolesti (Aboumrad i sar., 2007). Rezultati testa su pokazali da su Treg ćelije izolovane iz dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom uspešnije migrirale ka medijumu koji je sadržao izolovana pankreasna ostrvca ili CXCL12 u poređenju sa Treg ćelijama poreklom iz netretiranih dijabetičnih miševa, što je još jedan dokaz koji ide u prilog tome da etil-piruvat stimuliše migraciju Treg ćelija na mesto inflamacije tokom DT1.

Dodatno, ove Treg ćelije iz pankreasnih limfnih čvorova su ispoljavale više CXCR3, hemokinskog receptora koji ima sposobnost prepoznavanja i reagovanja na hemokine CXCL9, CXCL10 i CXCL11, nakon čega vodi ćelije ka mestu inflamacije (Groom i Luster, 2011), u ovom slučaju ka pankreasnim ostrvcima. Iako eksprimiran na većem broju različitih ćelija, CXCR3 se većinski ispoljava na proinflamacijskim Th1 ćelijama, koje imaju ključnu ulogu u imunopatogenezi DT1. Sa druge strane, pokazano je da se NOD miševi kojima je uklonjen gen za CXCR3 odlikuju ubrzanim razvojem bolesti, najverovatnije usled toga što ne poseduju CXCR3<sup>+</sup> Treg ćelije koje bi efikasno migrirale u pankreasna ostrvca i regulisale Th1 inflamacijski odgovor (Yamada i sar., 2012). I druga istraživanja su potvrdila zastupljenost CXCR3<sup>+</sup> Treg ćelija u pankreasnim ostrvcima i njihov značaj za imunoregulaciju prilikom razvoja DT1 (Kornete i sar., 2015; Tan i sar., 2016). Dodatno, Treg ćelije su se uspešnije zadržavale u pankreasnim ostrvcima dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom, sudeći po povećanoj ekspresiji CD103 (Suffia i sar., 2005). Zastupljenost CXCR5<sup>+</sup> Treg ćelija (folikularnih Treg ćelija) u pankreasnim limfnim čvorovima se nije razlikovala između netretiranih dijabetičnih miševa i dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom, što sugeriše da etil-piruvat nije doprineo upućivanju Treg ćelija u germinativne centre pankreasnih limfnih čvorova gde bi one mogle podržati diferencijaciju Breg ćelija (Wang i sar., 2018). U skladu sa ovim rezultatom, jednaki nivoi Breg ćelija su detektovani i u pankreasnim limfnim čvorovima i u infiltratima pankreasa obe grupe miševa.

Generalno se smatra da određene Treg ćelije eksprimiraju specifične transkripcione faktore različitih proinflamacijskih podtipova T limfocita, što im omogućava veću specifičnost supresije tih podtipova ćelija (Koch i sar., 2009; Yang i sar., 2016b). Kako je T-bet transkripcioni faktor ključan za razvoj i funkciju Th1 subpopulacije efektorskih CD4<sup>+</sup> T limfocita, ispitan je uticaj tretmana etil-piruvatom na zastupljenost T-bet<sup>+</sup> Treg ćelija. Rezultati su pokazali da je prisustvo etil-piruvata dovelo do povećanja zastupljenosti ove podgrupe Treg ćelija (T-bet<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) u infiltratima pankreasa. Dodatnu podršku ovom rezultatu daju istraživanja koja su pokazala da specifično ukidanje ekspresije gena za T-bet u Treg ćelijama u NOD mišjem modelu ubrzava razvoj DT1 i pojačava proinflamacijske karakteristike ćelija koje su infiltrirale pankreasna ostrvca (Tan i sar., 2016). U isto vreme, zastupljenost aktiviranih T limfocita (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>med</sup>) koji su eksprimirali T-bet je bila smanjena i u pankreasnim limfnim

čvorovima i u infiltratima pankreasa. Neslaganje između ovog rezultata i uočenih jednakih nivoa Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>) ćelija u netretiranim dijabetičnim miševima i dijabetičnim miševima tretiranim etil-piruvatom bi se moglo objasniti činjenicom da Th1 ćelije koje nisu aktivirane ne moraju ispoljavati receptor za IL-2 (CD25). Još jedan nivo supresije tip 1 imunskog odgovora posredstvom etil-piruvata je predstavljala smanjena zastupljenost ćelija koje su produkovale IFN-γ i koje nisu eksprimirale CD4. Ove ćelije mogu predstavljati CD8<sup>+</sup> citotoksični T limfociti ili NK ćelije, jedni od glavnih producenata IFN-γ (Schoenborn i Wilson, 2007). Taj efekat etil-piruvata može biti od značaja ako se ima u vidu da je IFN-γ asociran sa patogeneom DT1 (Schoenborn i Wilson, 2007), i to delom kroz povećavanje regrutovanja aktiviranih limfocita u tkivo pankreasa (Savinov i sar., 2001).

Primena etil-piruvata je uzrokovala samo ograničeno umanjeње Th17 odgovora, što je zaključeno na osnovu manjeg prisustva efektorskih T ćelija koje su eksprimirale RORγT, ključni transkripcioni faktor Th17 subpopulacije CD4<sup>+</sup> T limfocita, u pankreasnim limfnim čvorovima dijabetičnih miševa tretiranih etil-piruvatom. Sa druge strane, u infiltratima pankreasa obe grupe životinja su uočeni jednaki nivoi RORγT<sup>+</sup> aktiviranih efektorskih T ćelija, a RORγT<sup>+</sup> Treg ćelije su bile podjednako zastupljene u oba ispitivana tkiva. Dok različite studije ukazuju da HMGB1 doprinosi razvoju Th17 odgovora i da taj odgovor može biti suprimiran neutralizacijom HMGB1 (Duan i sar., 2011; Su i sar., 2011), kao i da RORγT<sup>+</sup> Treg ćelije mogu učestvovati u supresiji autoimunskog odgovora u pankreasu prilikom DT1 (Tartar i sar., 2010), rezultati ove disertacije ukazuju da inhibicija HMGB1 usled aktivnosti etil-piruvata nije ostvarila velik efekat na mehanizme kontrole Th17 odgovora.



**Slika 36.** Pretpostavljeni mehanizmi dejstva etil-piruvata koji su omogućili sprečavanje razvoja dijabetesa tipa 1 u ovoj disertaciji.

Primena etil-piruvata na T limfocite *in vitro* koji su polarizovani ka Treg fenotipu dovela je do značajnog povećanja zastupljenosti Treg ćelija u kulturi već nakon 48 h inkubacije, a ovaj efekat je bio ispoljen i nakon 72 i 96 h kultivacije ćelija. Rezultati ukazuju da je etil-piruvat pre stimulisao proliferaciju Treg ćelija nego njihovu diferencijaciju, a ovaj zaključak se može izvesti iz uočenog porasta broja podeljenih Treg ćelija nakon dodavanja etil-piruvata, dok je broj nepodeljenih Treg ćelija bio sličan kao u konvencionalnoj Treg ćelijskoj kulturi nakon 72 h inkubacije. Deluje da etil-piruvat ovaj efekat ispoljava specifično na Treg ćelije, pošto pri indukciji diferencijacije naivnih T limfocita ka Th1 ili Th17 fenotipu dodavanje etil-piruvata nije promenilo finalnu zastupljenost ovih subpopulacija ćelija.

Posebno zanimljiv efekat etil-piruvata je bila njegova stimulacija Treg ćelija *in vivo* u homeostatskim uslovima. Nakon što je etil-piruvat oralno dat zdravim miševima, stabilan je stigao do creva i, slično svom *in vitro* efektu, doveo do povećanja zastupljenosti i broja Treg ćelija i u lamini proprijii tankog creva i u Pejerovim pločama. Takođe, kratkotrajni intraperitonealni tretman zdravih miševa etil-piruvatom je značajno povećao broj i zastupljenost Treg ćelija i njihovu proliferaciju u peritonealnoj duplji, što sugeriše da etil-piruvat uspešno stimuliše ekspanziju Treg ćelija i u odsustvu inflamacije.

Iako se moglo očekivati da etil-piruvat služi kao supstrat za nastanak piruvata u ćeliji i kao takav se koristi u Krebsovom ciklusu, dobijeni rezultati sugerišu da etil-piruvat potencira glikolizu u proliferišućim Treg ćelijama. Generalno se smatra da aktivirani efektorski T limfociti pre svega dobijaju energiju glikolizom (Chang i sar., 2013; Macintyre i sar., 2014). Pri aktivaciji mirujućeg T limfocita, ćelija razvija veliku potrebu za energijom u procesu inicijacije proliferacije i produkcije citokina, a T limfocit udvostručuje svoju veličinu i započinje brzu proliferaciju i diferencijaciju iz mirujuće forme u visoko sekretornu ćeliju (Frauwirth i sar., 2002). Neproliferišuće ćelije metabolišu glukozu do piruvata koji dalje ulazi u Krebsov ciklus u mitohondrijama, a pri čemu pored ATP bivaju generisani i NADH i FADH<sub>2</sub>, koji su neophodni za transfer elektrona i produkciju ATP procesom oksidativne fosforilacije. Sa druge strane, proliferišuće ćelije, kao što su aktivirani T limfociti, nastali piruvat u citoplazmi fermentišu do laktata (Chang i sar., 2013; Martínez-Reyes i Chandel, 2020). Radi ispunjavanja bioenergetskih i biosintetskih zahteva proliferacije, T limfociti reprogramiraju svoj ćelijski metabolizam i povećavaju glikolizu, a smanjuju β-oksidaciju masnih kiselina i oksidaciju piruvata u Krebsovom ciklusu (Wang i sar., 2011). Od jednog molekula glukoze se u glikolizi dobija po dva molekula ATP, NADH i piruvata. Finalno konvertovanje piruvata u laktat omogućava recikliranje NADH natrag do NAD<sup>+</sup> i njegovog ponovnog korišćenja u glikolizi. Iako je energetske prinos glikolize mnogo manji od oksidativne fosforilacije, u uslovima neograničenog prisustva glukoze, glikoliza značajno brže produkuje ATP (Jones i Thompson, 2007). Sa druge strane, smatra se da korišćenje glikolize radi dobijanja energije može obezbediti određene prednosti prilikom proliferacije, pošto su se proliferišuće ćelije adaptirale da olakšaju preuzimanje i ugrađivanje nutrijenata u biomasu neophodnu za stvaranje ćerke ćelije (Chang i sar., 2013). U skladu s time, metabolizmom glukoze nastaju intermedijerni molekuli koji mogu biti iskorišćeni u biosintezi nukleotida, NADPH, lipida ili proteina (Jones i Thompson, 2007).

Sa druge strane, za Treg ćelije se pre svega smatra da im glavni metabolički put za dobijanje energije predstavlja oksidacija lipida i piruvata u mitohondrijama (Beier i sar., 2015;



Gerriets i sar., 2015; Shi i sar., 2011; Michalek i sar., 2011). Iako je pokazano da se *in vitro* diferencirani podtipovi efektorskih T limfocita odlikuju većom stopom glikolize u odnosu na diferencirane Treg ćelije, i same Treg ćelije su bile više glikolitičke u odnosu na naivne T limfocite (MacIver i sar., 2013). Dodatno, skorašnje studije su istakle da je glikoliza neophodna za aktivaciju i proliferaciju Treg ćelija (Procaccini i sar., 2016; Cluxton i sar., 2019). Tako su se *ex vivo* izolovane humane Treg ćelije koje su inkubirane u kulturi u prisustvu anti-CD3 antitela, ozračenih antigen-prezentujućih ćelija i IL-2 odlikovale povišenom glikolizom u odnosu na konvencionalne T limfocite (Cluxton i sar., 2019). Pokazano je i da generisanje humanih Treg ćelija u *in vitro* uslovima suboptimalne stimulacije T ćelijskog receptora zavisi od glikolize (De Rosa i sar., 2015). Kako se naivni T limfociti (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) poreklom iz osoba sa DT1 odlikuju defektnom glikolizom, Treg ćelije *in vitro* generisane iz ovih naivnih T limfocita eksprimiraju manje FoxP3 i inhibitornih molekula CTLA-4, PD-1 i GITR (De Rosa i sar., 2015), što dodatno ukazuje na značaj glikolize za nastanak i funkciju Treg ćelija u DT1. Deluje da je stimulišući efekat koji je etil-piruvat imao na Treg ćelije bio posredovan povećanom ekspresijom glikolitičkih enzima, HK2 i GAPDH, a u skladu sa time je detektovano i povećanje produkcije ATP u Treg ćelijama 72 h nakon primene etil-piruvata. Slični efekti etil-piruvata su uočeni i u bubrežnim tubularnim endotelnim ćelijama u kojim je etil-piruvat sprečio smanjenje aktivnosti heksokinaze i produkcije ATP uzrokovano vodonik-peroksidom (Bloom i sar., 2019).

Treg ćelije diferencirane u prisustvu etil-piruvata su produkovale više HIF-1 $\alpha$ , transkripcionog faktora koji stimuliše ekspresiju većine glikolitičkih enzima i transportera za glukozu kao što je GLUT1 (Galgani i sar., 2016). Ovi rezultati sugerišu da je etil-piruvat u Treg ćelijama stimulisao glikolizu, što je u skladu i sa utvrđenim porastom proliferacije ovih ćelija nakon dodavanja etil-piruvata u ćelijsku kulturu. Do sada je pokazano da je etil-piruvat sposoban da poveća produkciju HIF-1 $\alpha$  i glikolizu u ćelijskoj liniji humanog hepatocelularnog kancera (Kim i sar., 2010), što dodatno potkrepljuje rezultate ove disertacije. Dodatno, primena 2-DG, inhibitora ključnih enzima glikolitičkog puta u koje spada i heksokinaza (Pajak i sar., 2019), sprečila je povećanje broja Treg ćelija uzrokovano etil-piruvatom, što dalje potvrđuje ulogu glikolize u Treg ćelijskoj proliferaciji pospešenoj etil-piruvatom. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima Shi i saradnika (2011), po kojima je upotreba 2-DG promovisala generisanje Treg ćelija u kulturi, a odsustvo HIF-1 $\alpha$  doprinelo diferencijaciji Treg ćelija. Sa druge strane, u prilog rezultatima ove disertacije idu i rezultati do kojih su došli Brucklacher-Waldert i saradnici (2017), koji su pokazali da je prisustvo 2-DG u kulturi naivnih T limfocita diferenciranih ka Treg fenotipu dovelo do inhibicije diferencijacije Treg ćelija. Zanimljivo je da Treg ćelije diferencirane u prisustvu etil-piruvata metabolički nalikuju Treg ćelijama koje se razvijaju u timusu po tome što zavise od glikolize za dobijanje energije (Priyadharshini i sar., 2018). Povrh toga, noviji podaci sugerišu da *in vitro* diferencijacija Treg ćelija zavisi i od glikolize i od  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (Procaccini i sar., 2016). Kako se pri konverziji piruvata u laktat NADH transformiše u NAD<sup>+</sup>, time uspostavljajući visok NAD<sup>+</sup>/NADH odnos neophodan za održavanje glikolize (Rogatzki i sar., 2015), a etil-piruvat se nakon ulaska u ćeliju lako može konvertovati u piruvat, uočeno povećanje glikolize u Treg ćelijama bi se moglo objasniti tim procesom. Rezultati ove disertacije su u suprotnosti sa nalazima Chakhtoura i saradnika (2019), čiji rezultati sugerišu da etil-piruvat umanjuje glikolizu u dendritskim ćelijama *in vitro*. Ta razlika bi se mogla objasniti različitim proliferativnim kapacitetom dendritskih ćelija i Treg ćelija. Nakon aktivacije dendritskih ćelija

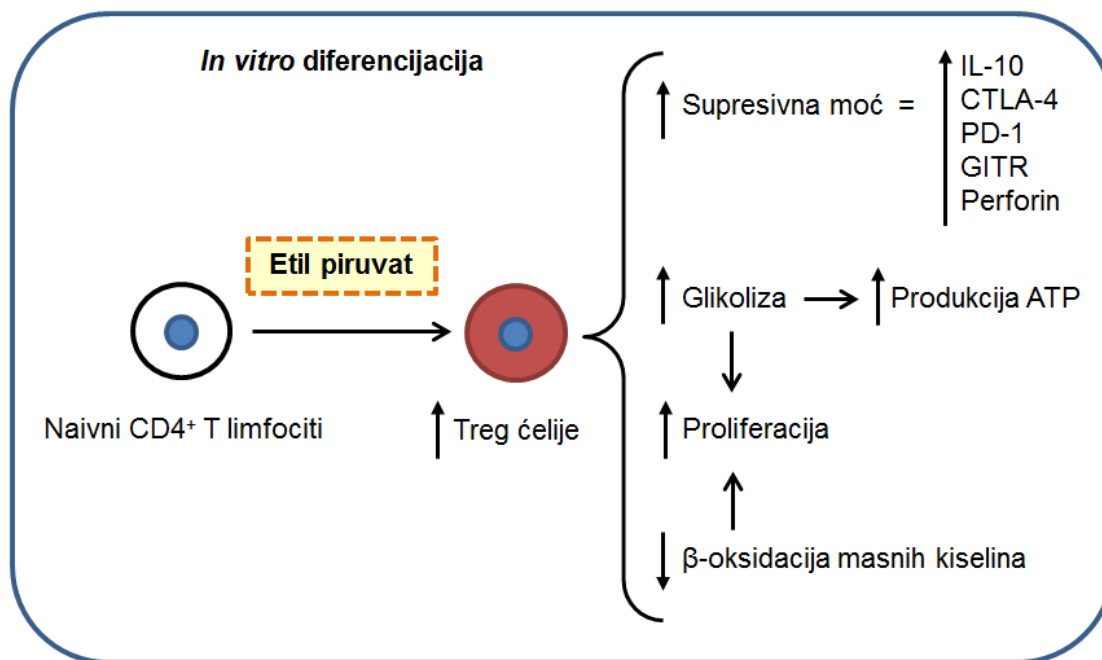
pomoću LPS, ove ćelije prelaze sa oksidativne fosforilacije na glikolizu, ali ne proliferišu (Krawczyk i sar., 2010). Chakhtoura i saradnici (2019) su pokazali da je etil-piruvat inhibirao glikolizu kada je primenjen u kulturi diferenciranih dendritskih ćelija aktiviranih pomoću LPS, koje su većinom u stanju mirovanja. Ako je glikoliza neophodan deo aktivacije i sazrevanja dendritskih ćelija, njena inhibicija pomoću etil-piruvata bi mogla biti jedan od mehanizama kojim etil-piruvat favorizuje tolerogeni fenotip ovih ćelija (Djedovic i sar., 2019; Chakhtoura i sar., 2019). Suprotno tome, etil-piruvat je stimulisao glikolizu u proliferišućim Treg ćelijama, što sugeriše da etil-piruvat deluje na različite signalne puteve u zavisnosti od tipa ćelija i njihovog stadijuma deobe.

ROS se generišu tokom oksidativne fosforilacije i veći broj studija je pokazao da je prisustvo ROS u Treg ćelijama značajno veće u odnosu na druge podtipove T limfocita i kod miševa i kod ljudi (Beier i sar., 2015; Angelin i sar., 2017; Howie i sar., 2017; Anupam i sar., 2018), a Treg ćelije ispoljavaju i veću otpornost na oksidativni stres (Mougiakakos i sar., 2009). Ipak, svi podtipovi T limfocita nakon aktivacije T ćelijskog receptora generalno povećavaju nastanak ROS (Yarosz i Chang, 2019). Pokazano je i da je prisustvo ROS potrebno za diferencijaciju naivnih T limfocita u indukovane Treg ćelije (Kraaij i sar., 2011; Mougiakakos i sar., 2009). Uočeni porast produkcije ROS nakon dodavanja etil-piruvata u ćelijsku kulturu se podudara sa povećanjem zastupljenosti Treg ćelija. Ipak, ROS nisu bile od značaja za utvrđenu stimulaciju proliferacije Treg ćelija etil-piruvatom, pošto je prilikom inhibicije oksidativne fosforilacije upotrebom rotenona broj Treg ćelija ostao nepromenjen. Produkcija ROS se nije povećala odmah nakon primene etil-piruvata, već sa značajnim zakašnjenjem, što ukazuje da je ovaj efekat verovatno odraz povećanja broja Treg ćelija uzrokovanog etil-piruvatom. Sa druge strane, povećanje nivoa ROS bi moglo da doprinosi stabilizaciji ekspresije FoxP3, pošto je aktivnost nuklearnog faktora aktiviranih T limfocita (NFAT) zavisna od ROS, a NFAT je sposoban da se veže za FoxP3 promotorski region (Newton i sar., 2016). Iako je uočeno povećanje ROS kod Treg ćelija u suprotnosti sa generalno podrazumevanom sposobnošću etil-piruvata da neutrališe ROS, za etil-piruvat je i ranije pokazano da može pospešiti produkciju ROS kroz stimulaciju glikolize, makar u ćelijskoj liniji hepatocelularnog kancera (Kim i sar., 2010). Povećano prisustvo ROS nije bilo posledica povećanja broja mitohondrija, pošto je ekspresija mitohondrijskih kompleksa respiratornog lanca bila ista i u konvencionalno indukovanim Treg ćelijama i u Treg ćelijama stimulisanim etil-piruvatom. Moguće je da je primećen višak ROS nastalo kroz oksidativnu fosforilaciju, pošto je pri inhibiciji funkcionisanja respiratornog lanca u prisustvu rotenona formiranje ROS bilo smanjeno i kod konvencionalno indukovanih Treg ćelija i kod Treg ćelija stimulisanih etil-piruvatom.

Efekat koji je etil-piruvat ispoljio na proliferaciju Treg ćelija bi mogao biti u direktnoj vezi sa inhibicijom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina. Dok  $\beta$ -oksidacija omogućava generisanje ATP postepenim razlaganjem viših masnih kiselina, tokom proliferacije ćelija raste potreba za lipidima i masnim kiselinama za izgradnju ćelijske membrane, pa je favorizovana sinteza masnih kiselina (Wang i sar., 2011). U skladu sa time, ekspresija CPT1, ključnog enzima u  $\beta$ -oksidaciji, u prisustvu etil-piruvata bila je smanjena, što bi moglo biti povezano sa uočenim povećanjem proliferacije Treg ćelija.

Kao što je već pominjano, sposobnost supresije Treg ćelija zavisi od njihove produkcije raznolikih inhibitornih medijatora i inhibicije aktivacije T limfocita putem direktnog međućelijskog kontakta (Sojka i sar., 2008). Etil-piruvat je na *in vitro* indukovanim Treg ćelijama stimulisao ekspresiju CTLA-4, PD-1 i GITR, kao i produkciju IL-10 i perforina. Kada je testiran kapacitet *in vitro* generisanih Treg ćelija da suprimiraju proliferaciju naivnih T limfocita, Treg ćelije dobijene u prisustvu etil-piruvata su bile vrlo slične konvencionalno indukovanim Treg ćelijama, sem u odnosu 8:1 u korist naivnih T limfocita. U takvim uslovima Treg ćelije tretirane etil-piruvatom su uspele da inhibiraju deobu naivnih T limfocita, dok konvencionalno indukovane Treg ćelije nisu mogle da ispolje svoju sposobnost supresije usled prekomernog broja naivnih T limfocita. Ovi rezultati bi mogli da ukažu da su za utvrđenu supresiju odgovorni solubilni molekuli, a ne inhibicija zavisna od direktnog ćelijskog kontakta. U ovom slučaju, uočena inhibicija bi se mogla pripisati delovanju antiinflamacijskog IL-10 koji suprimira aktivnost Th1 i Th17 ćelija. Povećano prisustvo Treg ćelija koje produkuju perforin bi moglo dodatno objasniti uočenu supresivnu aktivnost Treg ćelija generisanih u prisustvu etil-piruvata. Finalno, povećano oslobađanje ROS iz Treg ćelija bi moglo da suprimira preživljavanje efektorskih T limfocita (Frossi i sar., 2008; Fu i sar., 2017).

Etil-piruvat je omogućio povećanu proliferaciju Treg ćelija u kulturi bez inhibicije mTOR signalnog puta. Pokazano je da inhibicija mTOR puta služi kao pozitivni signal za ekspresiju FoxP3 i doprinosi diferencijaciji Treg ćelija (Chapman i Chi, 2014; Sun i sar., 2018). Kako su i rapamicin i etil-piruvat iskazali slične efekte na povećanje zastupljenosti Treg ćelija *in vitro*, a njihova zajednička primena nije imala aditivni efekat, ispitano je da li i etil-piruvat ima sposobnost remećenja mTOR signalnog puta. Dok je primena rapamicina u potpunosti sprečila fosforilaciju S6 kinaze (nizvodno od mTORC1), Treg ćelije stimulisane etil-piruvatom su imale sličan nivo fosforilacije S6 kinaze kao konvencionalno diferencirane Treg ćelije, što sugeriše da etil-piruvat nije bio uključen u inhibiciju mTOR signalnog puta prilikom promocije Treg ćelijske proliferacije. Prisustvo aktivnosti mTORC1 je u korelaciji sa utvrđenom neophodnošću glikolize za konvencionalnu diferencijaciju Treg ćelija ili diferencijaciju Treg ćelija stimulisanu etil-piruvatom. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima da je aktivnost mTORC1 neophodna za održavanje visokog nivoa aerobne glikolize (Finlay i sar., 2012; Hukelmann i sar., 2016). Iako to obično važi u slučaju efektorskih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita, u ovde korišćenom protokolu za *in vitro* diferencijaciju Treg ćelija deluje da glikoliza služi kao glavni izvor energije koja je neophodna za diferencijaciju i proliferaciju Treg ćelija.



**Slika 37. Pretpostavljeni mehanizmi *in vitro* delovanja etil-piruvata na Treg ćelije utvrđeni u ovoj disertaciji.**

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je tretman etil-piruvatom ispoljio specifične efekte na regulatornu granu imunskog odgovora i time sprečio razvoj DT1 kod C57BL/6 miševa kojima je bolest indukovana primenom STZ. Tretman etil-piruvatom je promovisao tolerogene dendritske ćelije u pankreasu i uticao na Treg ćelije *in vivo* na više načina: stimulisao je njihovu proliferaciju i *de novo* diferencijaciju, povećao njihovu ekspresiju antiinflamacijskih molekula kao što su CTLA-4, TGF- $\beta$  i IL-10 i time učinio Treg ćelije više supresivnim, a uvećao je i njihovu migraciju i zadržavanje na mestu inflamacije, tj. u pankreasu. Tolerogene dendritske ćelije imaju sposobnost da indukuju razvoj Treg ćelija, a Treg ćelije mogu zauzvrat uticati na razvoj dendritskih ćelija, sprečavajući njihovo sazrevanje (Mahnke i sar., 2007). Zbog toga u prilog efikasnosti etil-piruvata u podsticanju imunske tolerancije govore i rezultati Djedovic i saradnika (2019) koji su pokazali da etil-piruvat stimuliše *in vitro* diferencijaciju tolerogenih dendritskih ćelija. Dalje, etil-piruvat je doveo do povećanja broja Treg ćelija *in vivo* i kod zdravih miševa kratkotrajno tretiranih intraperitonealnim ili oralnim putem. *In vitro* ispitivanja izvršena u okviru ove disertacije su pokazala da etil-piruvat povećava proliferaciju i supresivna svojstva Treg ćelija tokom njihove diferencijacije iz naivnih CD4+ T limfocita kroz stimulisanje glikolize. Ovi rezultati sugerišu da se koncept stroge dihotomije između glikolize i oksidativne fosforilacije kao glavnih izvora energije efektorskih T limfocita i Treg ćelija može shvatiti kao previše uprošćen, pa da se pospešivanje glikolitičkog puta pomoću etil-piruvata radi ekspanzije i uvećanja supresivnih funkcija Treg ćelija može pokazati korisnim.

Uprkos tome što je prošao skoro ceo vek od razvoja insulinske terapije i što je proizvodnja insulina s vremenom unapređena, i dalje je teško postići kontrolu glikemije kod pacijenata sa DT1, a komplikacije koje nastaju usled slabo kontrolisanog nivoa šećera u krvi su česte (Wållberg

i Cooke, 2013). Zbog toga kontrolisanje mehanizma nastanka bolesti, a ne samo njenog krajnjeg ishoda, predstavlja najodrživiji pristup terapiji DT1. Kako su istraživanja pokazala da su prisustvo Treg ćelija i koncentracija TGF- $\beta$  u serumu smanjeni kod obolelih od DT1 (Qiao i sar., 2016), pokazani efekti etil-piruvata bi mogli biti od izrazitog značaja. Dodatno, dosadašnja testiranja na čoveku sugerišu da potencijalna primena etil-piruvata u terapiji ne bi imala negativne posledice (Fink, 2008; Yang i sar., 2016a). Sveukupno, rezultati ove disertacije ukazuju na potencijal upotrebe etil-piruvata u podržavanju terapije DT1 ili drugih autoimunskih ili imunoinflamacijskih bolesti u kojim bi se očekivalo da uvećano prisustvo i poboljšane supresivne funkcije Treg ćelija umanje aktivnost i progresiju bolesti. Potencijalnu primenu etil-piruvata u terapiji ovakvih bolesti bi moglo predstavljati i kultivisanje tolerogenih dendritskih ili Treg ćelija u prisustvu etil-piruvata radi poboljšavanja njihovog generisanja i tolerogenih svojstava, nakon čega bi te ćelije bile upotrebljene u ćelijskoj imunoterapiji.

# 6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

**1. *In vivo* tretman etil-piruvatom je uzrokovao smanjenje incidence DT1 kod C57BL/6 miševa kojima je bolest indukovana primenom STZ, koje se ogledalo u:**

- Ublažavanju kliničkih simptoma bolesti
- Smanjenju infiltracije imunskih ćelija u pankreasna ostrvca
- Očuvanju funkcije pankreasnih ostrvaca, sa  $\beta$  ćelijama koje su ispoljavale manje HMGB1 i eksprimirale više insulina
- Povećanom prisustvu tolerogenih dendritskih ćelija u infiltratima pankreasa
- Povećanoj zastupljenosti Treg ćelija u slezini, pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa
- Uspešnijoj supresiji proliferacije efektorskih T limfocita posredstvom Treg ćelija direktnim ćelijskim kontaktom i oslobađanjem antiinflamacijskih citokina
- Povećanju proliferacije Treg ćelija u infiltratima pankreasa
- Pospešivanju migracije Treg ćelija na mesto inflamacije
- Većoj aktivaciji Treg ćelija i njihovoj sposobnosti supresije proinflamacijskog Th1 odgovora u pankreasnim limfnim čvorovima i infiltratima pankreasa

**2. *In vivo* tretman etil-piruvatom je doveo do povećanog prisustva Treg ćelija kod zdravih C57BL/6 miševa u peritonealnoj duplji i crevima, koje je u peritonealnoj duplji delom omogućeno povećanom proliferacijom Treg ćelija.**

**3. *In vitro* primena etil-piruvata je ispoljila pozitivne efekte na broj i supresivne funkcije Treg ćelija diferenciranih od naivnih CD4<sup>+</sup> T limfocita izolovanih iz slezine zdravih C57BL/6 miševa, kroz:**

- Pospešivanje diferencijacije i proliferacije Treg ćelija, a bez uticaja na diferencijaciju Th1 ili Th17 ćelija
- Povećanu ekspresiju supresivnih molekula i antiinflamacijskih citokina
- Povećanje produkcije ATP, što je bila posledica povećane glikolize
- Supresiju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina

*Na osnovu iznetih konkretnih zaključaka može se izvesti opšti zaključak da tretman etil-piruvatom sprečava uništenje  $\beta$  ćelija pankreasa i štiti miševе od DT1 uzrokovanog primenom STZ podržavajući antiinflamacijsku stranu imunskog odgovora, pre svega kroz povećavanje broja, proliferacije i supresivnih odlika Treg ćelija. Dok deo zasluge za protektivni efekat etil-piruvata sigurno leži u njegovoj inhibiciji HMGB1, pokazalo se da je od značaja i njegovo pospešivanje glikolitičkog metaboličkog puta u Treg ćelijama čime je energetski podržana njihova proliferacija.*

# **7. Literatura**



1. Aboumrad E, Madec AM, Thivolet C. The CXCR4/CXCL12 (SDF-1) signalling pathway protects non-obese diabetic mouse from autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(3):432-439. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03370.x.
2. Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding type 1 diabetes: etiology and models. *Can J Diabetes.* 2013;37(4):269-276. doi:10.1016/j.jcjd.2013.05.001.
3. Akkoc H, Kelle I, Tunik S, et al. Protective effect of ethyl pyruvate on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012;75(3):336-341.
4. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
5. Angelin A, Gil-de-Gómez L, Dahiya S, et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* 2017;25(6):1282-1293.e7. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.018.
6. Anupam K, Kaushal J, Prabhakar N, Bhatnagar A. Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes. *Immunobiology.* 2018;223(10):586-597. doi:10.1016/j.imbio.2018.07.004.
7. Arce-Sillas A, Álvarez-Luquín DD, Tamaya-Domínguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-García A, Melo-Salas M, Cárdenas G, Rodríguez-Ramírez J, Adalid-Peralta L. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J Immunol Res.* 2016;2016:1720827. doi:10.1155/2016/1720827.
8. Arif S, Moore F, Marks K, Bouckenooghe T, Dayan CM, Planas R, Vives-Pi M, Powrie J, Tree T, Marchetti P, Huang GC, Gurzov EN, Pujol-Borrell R, Eizirik DL, Peakman M. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated  $\beta$ -cell death. *Diabetes.* 2011;60(8):2112-9. doi:10.2337/db10-1643.
9. Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest.* 2004;113(3):451-63.
10. Aslani F, Schuppe HC, Guazzone VA, et al. Targeting high mobility group box protein 1 ameliorates testicular inflammation in experimental autoimmune orchitis. *Hum Reprod.* 2015;30(2):417-431. doi:10.1093/humrep/deu320.
11. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014;383(9911):69-82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7.

12. Baaten BJ, Li CR, Bradley LM. Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol.* 2010;3(6):508-12. doi:10.4161/cib.3.6.13495.
13. Bednar KJ, Tsukamoto H, Kachapati K, et al. Reversal of New-Onset Type 1 Diabetes With an Agonistic TLR4/MD-2 Monoclonal Antibody. *Diabetes.* 2015;64(10):3614-3626. doi:10.2337/db14-1868.
14. Beier UH, Angelin A, Akimova T, et al. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cell function and allograft survival. *FASEB J.* 2015;29(6):2315-2326. doi:10.1096/fj.14-268409.
15. Bloom J, Patel N, Wagmaister J, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Prophylactic effect of ethyl pyruvate on renal ischemia/reperfusion injury mediated through oxidative stress. *Int Urol Nephrol.* 2019;51(1):85-92. doi:10.1007/s11255-018-2020-9.
16. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(315):315ra189. doi:10.1126/scitranslmed.aad4134.
17. Bollyky PL, Falk BA, Long SA, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol.* 2009;183(4):2232-2241. doi:10.4049/jimmunol.0900191.
18. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002;512(2-3):121-134. doi:10.1016/s1383-5742(02)00044-3.
19. Brucklacher-Waldert V, Ferreira C, Stebegg M, et al. Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- $\beta$ -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Rep.* 2017;19(11):2357-2370. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.052.
20. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007;27(4):635-646. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014.
21. Castro CN, Barcala Tabarrosi AE, Noguerol MA, et al. Disease-modifying immunotherapy for the management of autoimmune diabetes. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(3):173-176. doi:10.1159/000258716.
22. Chakhtoura M, Chain RW, Sato PY, et al. Ethyl Pyruvate Modulates Murine Dendritic Cell Activation and Survival Through Their Immunometabolism. *Front Immunol.* 2019;10:30. doi:10.3389/fimmu.2019.00030.
23. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB Jr, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 2013;153(6):1239-1251. doi:10.1016/j.cell.2013.05.016.

24. Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1295-1311. doi:10.2217/imt.14.84.
25. Chatenoud L. Immune therapy for type 1 diabetes mellitus-what is unique about anti-CD3 antibodies? *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(3):149-57. doi:10.1038/nrendo.2009.275.
26. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*. 2011;34(4):566-578. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.018.
27. Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, et al. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim*. 2013;47(4):257-265. doi:10.1177/0023677213489548.
28. Chen W, Konkel JE. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- $\beta$  matters. *Eur J Immunol*. 2015;45(4):958-965. doi:10.1002/eji.201444999.
29. Christoffersson G, Rodriguez-Calvo T, von Herrath M. Recent advances in understanding Type 1 Diabetes. *F1000Res*. 2016;5. pii: F1000 Faculty Rev-110. doi:10.12688/f1000research.7356.1.
30. Clark M, Kroger CJ, Tisch RM. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. *Front Immunol*. 2017;8:1898. doi:10.3389/fimmu.2017.01898.
31. Cluxton D, Petrasca A, Moran B, Fletcher JM. Differential Regulation of Human Treg and Th17 Cells by Fatty Acid Synthesis and Glycolysis. *Front Immunol*. 2019;10:115. doi:10.3389/fimmu.2019.00115.
32. Davé SH, Tilstra JS, Matsuoka K, et al. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):633-643. doi:10.1189/jlb.1008662.
33. Djedovic N, Mansilla MJ, Jevtić B, et al. Ethyl Pyruvate Induces Tolerogenic Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2019;10:157. doi:10.3389/fimmu.2019.00157.
34. Djedović N, Stanisavljevic S, Jevtić B, Momčilović M, Lavrnja I, Miljković D. Anti-encephalitogenic effects of ethyl pyruvate are reflected in the central nervous system and the gut. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:78-85. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.110.
35. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Methods*. (2012) 9:690–6. doi:10.1038/nmeth.2075.
36. De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, et al. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol*. 2015;16(11):1174-1184. doi:10.1038/ni.3269.

37. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-2462. doi:10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
38. Ding L, Xu Y, Liu S, Bi Y, Xu Y. Hemoglobin A1c and diagnosis of diabetes. *J Diabetes*. 2018;10(5):365-372. doi:10.1111/1753-0407.12640.
39. Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1764. doi:10.3389/fimmu.2017.01764.
40. Duan L, Wang CY, Chen J, et al. High-mobility group box 1 promotes early acute allograft rejection by enhancing IL-6-dependent Th17 alloreactive response. *Lab Invest*. 2011;91(1):43-53. doi:10.1038/labinvest.2010.141.
41. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
42. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219-26. doi:10.1038/nrendo.2009.21.
43. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol*. 2017;198(4):1387-1394. doi:10.4049/jimmunol.1601520.
44. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009;58(6):1302-11. doi:10.2337/db08-1113.
45. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, Nano R, Olek S, Maffi P, Scavini M, Secchi A, Staudacher C, Bonifacio E, Battaglia M. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(11):2903-13. doi:10.2337/db11-0090.
46. Fernandez I, Zeiser R, Karsunky H, Kambham N, Beilhack A, Soderstrom K, Negrin RS, Engleman E. CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2007;179(5):2808-14.
47. Ferris ST, Carrero JA, Unanue ER. Antigen presentation events during the initiation of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun*. 2016;71:19-25. doi:10.1016/j.jaut.2016.03.007.
48. Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(2):167-174. doi:10.1097/00075197-200203000-00009.

49. Fink MP. Ethyl pyruvate. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008;21(2):160-167. doi:10.1097/ACO.0b013e3282f63c2e.
50. Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, et al. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2012;209(13):2441-2453. doi:10.1084/jem.20112607.
51. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
52. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity.* 2002;16(6):769-777. doi:10.1016/s1074-7613(02)00323-0.
53. Frigerio S, Junt T, Lu B, et al. Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat Med.* 2002;8(12):1414-1420. doi:10.1038/nm1202-792.
54. Frossi B, De Carli M, Piemonte M, Pucillo C. Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells. *Mol Immunol.* 2008;45(1):58-64. doi:10.1016/j.molimm.2007.05.008.
55. Frumento D, Ben Nasr M, El Essawy B, D'Addio F, Zuccotti GV, Fiorina P. Immunotherapy for type 1 diabetes. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(8):803-814. doi:10.1007/s40618-017-0641-y.
56. Fu G, Xu Q, Qiu Y, et al. Suppression of Th17 cell differentiation by misshapen/NIK-related kinase MINK1. *J Exp Med.* 2017;214(5):1453-1469. doi:10.1084/jem.20161120.
57. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5.47.1-5.47.20. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70.
58. Galgani M, De Rosa V, La Cava A, Matarese G. Role of Metabolism in the Immunobiology of Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2016;197(7):2567-2575. doi:10.4049/jimmunol.1600242.
59. Garay-Malpartida HM, Mourão RF, Mantovani M, Santos IA, Sogayar MC, Goldberg AC. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol.* 2011;12:18. doi:10.1186/1471-2172-12-18.
60. Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest.* 2015;125(1):194-207. doi:10.1172/JCI76012.
61. Gholizadeh P, Mahallei M, Pormohammad A, et al. Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease. *Microb Pathog.* 2019;127:48-55. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.031.

62. Gleisner MA, Roseblatt M, Fierro JA, Bono MR. Delivery of alloantigens via apoptotic cells generates dendritic cells with an immature tolerogenic phenotype. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2325-2333. doi:10.1016/j.transproceed.2011.06.007.
63. Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Semin Immunopathol.* 2019;41(3):301-314. doi:10.1007/s00281-019-00741-8.
64. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):353-63. doi:10.1038/nri2545.
65. Greenbaum C, VanBuecken D, Lord S. Disease-Modifying Therapies in Type 1 Diabetes: A Look into the Future of Diabetes Practice. *Drugs.* 2019;79(1):43-61. doi:10.1007/s40265-018-1035-y.
66. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):620-631. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017.
67. Guo X, Guo R, Luo X, Zhou L. Ethyl pyruvate ameliorates experimental colitis in mice by inhibiting the HMGB1-Th17 and Th1/Tc1 responses. *Int Immunopharmacol.* 2015;29(2):454-461. doi:10.1016/j.intimp.2015.10.015.
68. Haller MJ, Long SA, Blanchfield JL, et al. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA1c, and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data. *Diabetes.* 2019;68(6):1267-1276. doi:10.2337/db19-0057.
69. Han J, Zhong J, Wei W, Wang Y, Huang Y, Yang P, Purohit S, Dong Z, Wang MH, She JX, Gong F, Stern DM, Wang CY. Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes.* 2008;57(8):2118-27. doi:10.2337/db07-1499.
70. Haskins K, Cooke A. CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(6):739-45. doi:10.1016/j.coi.2011.08.004.
71. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, Gitelman SE, Gottlieb PA, Krischer JP, Linsley PS, Marks JB, Moore W, Moran A, Rodriguez H, Russell WE, Schatz D, Skyler JS, Tsalikian E, Wherrett DK, Ziegler AG, Greenbaum CJ; Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2019b;381(7):603-613. doi:10.1056/NEJMoa1902226.
72. Herold Z, Doleschall M, Kovesdi A, Patocs A, Somogyi A. Chromogranin A and its role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Endokrynol Pol.* 2018;69(5):598-610. doi:10.5603/EP.a2018.0052.
73. Herold Z, Herold M, Nagy P, Patocs A, Doleschall M, Somogyi A. Serum chromogranin A level continuously rises with the progression of type 1 diabetes, and indicates the

- presence of both enterochromaffin-like cell hyperplasia and autoimmune gastritis. *J Diabetes Investig.* 2019a;11(4):865-873. doi:10.1111/jdi.13203.
74. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T, Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010;185(3):1959-67. doi:10.4049/jimmunol.1000788.
75. Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):912-5. doi:10.1002/eji.200738109.
76. Howie D, Cobbold SP, Adams E, et al. Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight.* 2017;2(3):e89160. doi:10.1172/jci.insight.89160.
77. Huang H, Dawicki W, Zhang X, Town J, Gordon JR. Tolerogenic dendritic cells induce CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cell differentiation from CD4+CD25-/loFoxp3- effector T cells. *J Immunol.* 2010;185(9):5003-5010. doi:10.4049/jimmunol.0903446.
78. Hukelmann JL, Anderson KE, Sinclair LV, et al. The cytotoxic T cell proteome and its shaping by the kinase mTOR. *Nat Immunol.* 2016;17(1):104-112. doi:10.1038/ni.3314.
79. Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012;61(1):14-22. doi:10.2337/db11-1213.
80. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(11):635-650. doi:10.1038/s41574-019-0254-y.
81. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Herold KC, Krischer JP, Lernmark Å, Ratner RE, Rewers MJ, Schatz DA, Skyler JS, Sosenko JM, Ziegler AG. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2015;38(10):1964-74. doi:10.2337/dc15-1419.
82. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* Brussels, Belgium: 2019. Available at: <https://www.diabetesatlas.org>
83. Itoh T, Takita M, SoRelle JA, Shimoda M, Sugimoto K, Chujo D, Qin H, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S. Correlation of released HMGB1 levels with the degree of islet damage in mice and humans and with the outcomes of islet transplantation in mice. *Cell Transplant.* 2012;21(7):1371-81.
84. Jang IS, Park MY, Shin IW, Sohn JT, Lee HK, Chung YK. Ethyl pyruvate has antiinflammatory and delayed myocardial protective effects after regional ischemia/reperfusion injury. *Yonsei Med J.* 2010;51(6):838-844. doi:10.3349/ymj.2010.51.6.838.

85. Jarchum I, Nichol L, Trucco M, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients. *Clin Immunol.* 2008;127(3):359-65. doi:10.1016/j.clim.2008.01.015.
86. Jayasimhan A, Mansour KP, Slattery RM. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin Sci (Lond)* 2014;126(1):1-18. doi:10.1042/CS20120627.
87. Ji J, Fu T, Dong C, et al. Targeting HMGB1 by ethyl pyruvate ameliorates systemic lupus erythematosus and reverses the senescent phenotype of bone marrow-mesenchymal stem cells. *Aging (Albany NY).* 2019;11(13):4338-4353. doi:10.18632/aging.102052.
88. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009;8(3):208-220. doi:10.2174/187152809788680994.
89. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity.* 2007;27(2):173-178. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.008.
90. Jovanović Stojanov S, Martinović V, Bogojević D, et al. Modulation of diabetes-related liver injury by the HMGB1/TLR4 inflammatory pathway. *J Physiol Biochem.* 2018;74(2):345-358. doi:10.1007/s13105-018-0626-0.
91. Ju KD, Shin EK, Cho EJ, et al. Ethyl pyruvate ameliorates albuminuria and glomerular injury in the animal model of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(5):F606-F613. doi:10.1152/ajprenal.00415.2011.
92. Jung SM, Lee J, Baek SY, et al. Ethyl pyruvate ameliorates inflammatory arthritis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2017;52:333-341. doi:10.1016/j.intimp.2017.09.027.
93. Kalariya NM, Reddy AB, Ansari NH, VanKuijk FJ, Ramana KV. Preventive effects of ethyl pyruvate on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(8):5144-5152. doi:10.1167/iovs.10-7047.
94. Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the antiinflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(2):151-159. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.007.
95. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17016. doi:10.1038/nrdp.2017.16.
96. Kim SY, Choi JS, Park C, Jeong JW. Ethyl pyruvate stabilizes hypoxia-inducible factor 1 alpha via stimulation of the TCA cycle. *Cancer Lett.* 2010;295(2):236-241. doi:10.1016/j.canlet.2010.03.006.
97. Kim YM, Park EJ, Kim JH, Park SW, Kim HJ, Chang KC. Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated



- RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2016;41:98-105. doi:10.1016/j.intimp.2016.11.002.
98. Kleffel S, Vergani A, Tezza S, Ben Nasr M, Niewczasz MA, Wong S, Bassi R, D'Addio F, Schatton T, Abdi R, Atkinson M, Sayegh MH, Wen L, Wasserfall CH, O'Connor KC, Fiorina P. Interleukin-10<sup>+</sup> regulatory B cells arise within antigen-experienced CD40<sup>+</sup> B cells to maintain tolerance to islet autoantigens. *Diabetes*. 2015;64(1):158-71. doi:10.2337/db13-1639.
99. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(3):154-67. doi:10.1038/nrendo.2015.218.
100. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10(6):595-602. doi:10.1038/ni.1731.
101. Kornete M, Mason ES, Girouard J, Lafferty EI, Qureshi S, Piccirillo CA. Th1-Like ICOS<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg Cells Preferentially Express CXCR3 and Home to  $\beta$ -Islets during Pre-Diabetes in BDC2.5 NOD Mice. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126311. doi:10.1371/journal.pone.0126311.
102. Kraaij MD, van der Kooij SW, Reinders ME, et al. Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by antiinflammatory macrophages. *Mol Immunol*. 2011;49(3):549-557. doi:10.1016/j.molimm.2011.10.002.
103. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 2010;115(23):4742-4749. doi:10.1182/blood-2009-10-249540.
104. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109(1):131-40.
105. Lee BW, Chae HY, Kwon SJ, Park SY, Ihm J, Ihm SH. RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic  $\beta$ -cells via oxidative stress. *Int J Mol Med*. 2010;26(6):813-818.
106. Lee LF, Xu B, Michie SA, Beilhack GF, Warganich T, Turley S, McDevitt HO. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44):15995-6000.
107. Lee YM, Kim J, Jo K, et al. Ethyl pyruvate inhibits retinal pathogenic neovascularization by downregulating HMGB1 expression. *J Diabetes Res*. 2013;2013:245271. doi:10.1155/2013/245271.
108. Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):501-13. doi:10.1038/nri2787.

109. Leiter EH, Schile A. Genetic and Pharmacologic Models for Type 1 Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2013;3(1):9-19. doi:10.1002/9780470942390.mo120154.
110. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216-26. doi:10.1007/s00125-007-0886-7.
111. Lenzen S. Animal models of human type 1 diabetes for evaluating combination therapies and successful translation to the patient with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33(7). doi:10.1002/dmrr.2915.
112. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(6):383-96. doi:10.1038/nrm3351.
113. Li M, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Toll-like receptor 4 on islet  $\beta$  cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp Mol Med.* 2012;44(4):260-7. doi:10.3858/emm.2012.44.4.021.
114. Li M, Song LJ, Qin XY. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J Cell Mol Med.* 2014;18(5):749-58. doi:10.1111/jcmm.12270.
115. Li Q, Xu B, Michie SA, Rubins KH, Schreiber RD, McDevitt HO. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(34):12439-44. doi:10.1073/pnas.0806439105.
116. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(1):92-9.
117. Liu M, Li S, Li MO. TGF- $\beta$  Control of Adaptive Immune Tolerance: A Break From Treg Cells. *Bioessays.* 2018;40(11):e1800063. doi:10.1002/bies.201800063.
118. Liu T, Soong L, Liu G, König R, Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biol Direct.* 2009;4:40. doi:10.1186/1745-6150-4-40.
119. Long SA, Rieck M, Sanda S, et al. Rapamycin/IL-2 combination therapy in patients with type 1 diabetes augments Tregs yet transiently impairs  $\beta$ -cell function. *Diabetes.* 2012;61(9):2340-2348. doi:10.2337/db12-0049.
120. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology.* 2020;9(3):e1122. doi:10.1002/cti2.1122.
121. Ludvigsson J. Therapies to Preserve  $\beta$ -Cell Function in Type 1 Diabetes. *Drugs.* 2016;76(2):169-85. doi:10.1007/s40265-015-0511-x.

122. Lukić ML, Stosić-Grujčić S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol.* 1998;6(1-2):119-28. doi:10.1155/1998/92198.
123. Luo Z, Soläng C, Mejia-Cordova M, et al. Kinetics of immune cell responses in the multiple low-dose streptozotocin mouse model of type 1 diabetes. *FASEB Bioadv.* 2019;1(9):538-549. doi:10.1096/fba.2019-00031.
124. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* 2014;20(1):61-72. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.004.
125. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259-283. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095956.
126. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes.* 2001;50(8):1683-90. doi:10.2337/diabetes.50.8.1683.
127. Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci.* 2007;46(3):159-167. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.03.002.
128. Mallone R, Brezar V, Boitard C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:513210. doi:10.1155/2011/513210.
129. Manoylov IK, Boneva GV, Doytchinova IA, Mihaylova NM, Tchorbanov AI. Suppression of Disease-Associated B Lymphocytes by GAD65 Epitope-Carrying Protein-Engineered Molecules in a Streptozotocin-Induced Mouse Model of Diabetes. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2019;38(5):201-208. doi:10.1089/mab.2019.0030.
130. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3.
131. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, Xu L, Priatel JJ, Levings MK, Tan R. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010;185(7):3814-8. doi:10.4049/jimmunol.1001860.
132. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, et al. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol.* 2008;180(4):2270-2275. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2270.
133. Mannering SI, Pang SH, Williamson NA, Naselli G, Reynolds EC, O'Brien-Simpson NM, Purcell AW, Harrison LC. The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes

- in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(2):226-31. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03907.x.
134. Marrack P, Kappler JW. Do MHCII-presented neoantigens drive type 1 diabetes and other autoimmune diseases? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9):a007765. doi:10.1101/cshperspect.a007765.
  135. Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albini C, Fournier S, Quattrin T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care.* 2009;32(7):1244-9. doi:10.2337/dc09-0054.
  136. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, Mera T, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(3):735-43. doi:10.1172/JCI41360.
  137. Mediani A, Abas F, Maulidiani M, et al. Metabolomic analysis and biochemical changes in the urine and serum of streptozotocin-induced normal- and obese-diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2018;74(3):403-416. doi:10.1007/s13105-018-0631-3.
  138. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol.* 2011;186(6):3299-3303. doi:10.4049/jimmunol.1003613.
  139. Miljković D, Blaževski J, Petković F, et al. A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant antiinflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. *J Immunol.* 2015;194(6):2493-2503. doi:10.4049/jimmunol.1402302.
  140. Mikhalkovich N, Becknell B, Caligiuri MA, Bates MD, Harvey R, Zheng WP. Responsiveness of naive CD4 T cells to polarizing cytokine determines the ratio of Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol.* 2006;176(3):1553-60.
  141. Monti P, Scirpoli M, Maffi P, et al. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells. *Diabetes.* 2008;57(9):2341-2347. doi:10.2337/db08-0138.
  142. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
  143. Moran A, Bundy B, Becker DJ, et al. Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet.* 2013;381(9881):1905-1915. doi:10.1016/S0140-6736(13)60023-9.
  144. Mougiakakos D, Johansson CC, Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood.* 2009;113(15):3542-3545. doi:10.1182/blood-2008-09-181040.

145. Murai M, Turovskaya O, Kim G, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol.* 2009;10(11):1178-1184. doi:10.1038/ni.1791.
146. Musumeci D, Roviello GN, Montesarchio D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol Ther.* 2014;141(3):347-357. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.001.
147. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* 2010;140(5):619-30. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014.
148. Nahdi AMTA, John A, Raza H. Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7054272. doi:10.1155/2017/7054272.
149. Newton R, Priyadharshini B, Turka LA. Immunometabolism of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2016;17(6):618-625. doi:10.1038/ni.3466.
150. Nikolic I, Saksida T, Vujicic M, Stojanovic I, Stosic-Grujicic S. Anti-diabetic actions of carbon monoxide-releasing molecule (CORM)-A1: Immunomodulation and regeneration of islet beta cells. *Immunol Lett.* 2015;165(1):39-46. doi:10.1016/j.imlet.2015.03.009.
151. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:101-12. doi:10.1016/j.jaut.2015.07.014.
152. Nogueira-Machado JA, Volpe CM, Veloso CA, Chaves MM. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* 2011;15(8):1023-1035. doi:10.1517/14728222.2011.575360.
153. O'Brien BA, Fieldus WE, Field CJ, Finegood DT. Clearance of apoptotic beta-cells is reduced in neonatal autoimmune diabetes-prone rats. *Cell Death Differ.* 2002;9(4):457-64.
154. O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT, Dutz JP. A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J Autoimmun.* 2006;26(2):104-15.
155. Orban T, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Marks JB, Monzavi R, Moran A, Raskin P, Rodriguez H, Russell WE, Schatz D, Wherrett D, Wilson DM, Krischer JP, Skyler JS; Type 1 Diabetes TrialNet Abatacept Study Group. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011;378(9789):412-9. doi:10.1016/S0140-6736(11)60886-6.

156. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1281:16-35. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06826.x.
157. Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, et al. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):234. doi:10.3390/ijms21010234.
158. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol.* 2011;12(9):870-8. doi:10.1038/ni.2077.
159. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(3):C917-C924. doi:10.1152/ajpcell.00401.2005.
160. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004;279(9):7370-7377. doi:10.1074/jbc.M306793200.
161. Parsa R, Andresen P, Gillett A, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2012;61(11):2881-2892. doi:10.2337/db11-1635.
162. Phillips JE, Couper JJ, Penno MAS, Harrison LC; ENDIA Study Group. Type 1 diabetes: a disease of developmental origins. *Pediatr Diabetes.* 2017;18(6):417-421. doi:10.1111/pedi.12425.
163. Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, De La Peña H, Cooke A. Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *Rev Diabet Stud.* 2009;6(2):97-103. doi:10.1900/RDS.2009.6.97.
164. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2016;66:76-88. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.019.
165. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, Raskin P, Rodriguez H, Schatz DA, Wherrett D, Wilson DM, Lachin JM, Skyler JS; Type 1 Diabetes TrialNet Anti-CD20 Study Group. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* 2009;361(22):2143-52. doi:10.1056/NEJMoa0904452.

166. Peters L, Posgai A, Brusko TM. Islet-immune interactions in type 1 diabetes: the nexus of beta cell destruction. *Clin Exp Immunol.* 2019;198(3):326-340. doi:10.1111/cei.13349.
167. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(51):18425-30.
168. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun.* 2002;3(5):235-49.
169. Priyadharshini B, Loschi M, Newton RH, et al. Cutting Edge: TGF- $\beta$  and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals Modulate Distinct Metabolism of Regulatory T Cell Subsets. *J Immunol.* 2018;201(8):2215-2219. doi:10.4049/jimmunol.1800311.
170. Procaccini C, Carbone F, Di Silvestre D, et al. The Proteomic Landscape of Human Ex Vivo Regulatory and Conventional T Cells Reveals Specific Metabolic Requirements [published correction appears in *Immunity.* 2016;44(3):712]. *Immunity.* 2016;44(2):406-421. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.028.
171. Pujol-Autonell I, Ampudia RM, Planas R, Marin-Gallen S, Carrascal J, Sanchez A, Marin A, Puig-Domingo M, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. Efferocytosis promotes suppressive effects on dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity. *PLoS One.* 2013;8(5):e63296. doi:10.1371/journal.pone.0063296.
172. Qiao YC, Shen J, Hong XZ, et al. Changes of regulatory T cells, transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Immunol.* 2016;170:61-69. doi:10.1016/j.clim.2016.08.004.
173. Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, Benveniste EN, Cong Y. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol.* 2009;183(1):97-105. doi:10.4049/jimmunol.0801986.
174. Qiu X, Cheng X, Zhang J, Yuan C, Zhao M, Yang X. Ethyl pyruvate confers protection against endotoxemia and sepsis by inhibiting caspase-11-dependent cell pyroptosis. *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106016. doi:10.1016/j.intimp.2019.106016.
175. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shapiro AM, Rajotte RV, Power R. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2002;51(3):638-645. doi:10.2337/diabetes.51.3.638.

176. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;78:13-31. doi:10.1016/j.vascn.2015.11.004.
177. Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(3):158-172. doi:10.1038/s41577-019-0232-6.
178. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol*. 2015;6:569. doi:10.3389/fimmu.2015.00569.
179. Regnell SE, Lernmark Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(8):1370-1381. doi:10.1007/s00125-017-4308-1.
180. Rhee KJ, Lee CG, Kim SW, Gim DH, Kim HC, Jung BD. Extract of Ginkgo Biloba Ameliorates Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus and High-Fat Diet-Induced Type 2 Diabetes Mellitus in Mice. *Int J Med Sci*. 2015;12(12):987-94. doi:10.7150/ijms.13339.
181. Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML, Gladden LB. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci*. 2015;9:22. doi:10.3389/fnins.2015.00022.
182. Ronchetti S, Ricci E, Petrillo MG, Cari L, Migliorati G, Nocentini G, Riccardi C. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells. *J Immunol Res*. 2015;2015:171520. doi:10.1155/2015/171520.
183. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*. 2016;48:e219. doi:10.1038/emm.2016.6. Review. PubMed PMID: 26964835; PubMed Central PMCID: PMC4892884.
184. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, Leslie C, Shaffer SA, Goodlett DR, Rudensky AY. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol*. 2012;13(10):1010-9. doi:10.1038/ni.2402.
185. Rydén A, Faresjö M. Altered immune profile from pre-diabetes to manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013;100(1):74-84. doi:10.1016/j.diabres.2013.01.014.
186. Sandor AM, Jacobelli J, Friedman RS. Immune cell trafficking to the islets during type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2019;198(3):314-325. doi:10.1111/cei.13353.
187. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(6):a022236. doi:10.1101/cshperspect.a022236.



188. Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, Burrack A, Eberlein J, Hildemann SK, Homann D. Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(2):436-46. doi:10.2337/db11-0853.
189. Savinov AY, Burn P. Interference with islet-specific homing of autoreactive T cells: an emerging therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Drug Discov Today*. 2010;15(13-14):531-539. doi:10.1016/j.drudis.2010.05.013.
190. Savinov AY, Strongin AY. Defining the roles of T cell membrane proteinase and CD44 in type 1 diabetes. *IUBMB Life*. 2007;59(1):6-13. doi:10.1080/15216540601187795.
191. Savinov AY, Wong FS, Chervonsky AV. IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells. *J Immunol*. 2001;167(11):6637-6643. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6637.
192. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad AR. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27-34. doi:10.1016/j.cyto.2014.10.031.
193. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. (2012) 9:676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.
194. Schneider DA, Kretowicz AM, von Herrath MG. Emerging immune therapies in type 1 diabetes and pancreatic islet transplantation. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15(7):581-592. doi:10.1111/dom.12046.
195. Seelig E, Howlett J, Porter L, et al. The DILfrequency study is an adaptive trial to identify optimal IL-2 dosing in patients with type 1 diabetes. *JCI Insight*. 2018;3(19):e99306. doi:10.1172/jci.insight.99306.
196. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429.
197. Shi LZ, Wang R, Huang G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1367-1376. doi:10.1084/jem.20110278.
198. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2.

199. Singh B, Krawetz MD, De Lima RM, et al. Role of TGF- $\beta$  in Self-Peptide Regulation of Autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(1):11-19. doi:10.1007/s00005-017-0482-6.
200. Sipetic S, Maksimovic J, Vlajinac H, Ratkov I, Sajic S, Zdravkovic D, Sipetic T. Rising incidence of type 1 diabetes in Belgrade children aged 0-14 years in the period from 1982 to 2005. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(5):307-12. doi:10.3275/8619.
201. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x.
202. Spence A, Tang Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2016;16(11):110. doi:10.1007/s11892-016-0807-6.
203. Steer SA, Scarim AL, Chambers KT, Corbett JA. Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med*. 2006;3(2):e17. doi:10.1371/journal.pmed.0030017.
204. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):411-6. doi:10.1084/jem.191.3.411.
205. Stirban A, Rösen P, Tschoepe D. Complications of type 1 diabetes: new molecular findings. *Mt Sinai J Med*. 2008;75(4):328-51. doi:10.1002/msj.20057.
206. Su Z, Sun C, Zhou C, et al. HMGB1 blockade attenuates experimental autoimmune myocarditis and suppresses Th17-cell expansion. *Eur J Immunol*. 2011;41(12):3586-3595. doi:10.1002/eji.201141879.
207. Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2005;174(9):5444-55. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5444.
208. Sun IH, Oh MH, Zhao L, Patel CH, Arwood ML, Xu W, Tam AJ, Blosser RL, Wen J, Powell JD. mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3(+) Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2018;201(2):481-492. doi:10.4049/jimmunol.1701477.
209. Suttmüller RP, den Brok MH, Kramer M, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006;116(2):485-494. doi:10.1172/JCI25439.
210. Takenaka MC, Quintana FJ. Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol*. 2017;39(2):113-120. doi:10.1007/s00281-016-0587-8.

211. Tan TG, Mathis D, Benoist C. Singular role for T-BET+CXCR3+ regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(49):14103-14108. doi:10.1073/pnas.1616710113.
212. Tang CL, Zou JN, Zhang RH, Liu ZM, Mao CL. Helminths protect against type 1 diabetes: effects and mechanisms. *Parasitol Res.* 2019;118(4):1087-1094. doi:10.1007/s00436-019-06247-4.
213. Tartar DM, VanMorlan AM, Wan X, et al. FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J Immunol.* 2010;184(7):3377-3385. doi:10.4049/jimmunol.0903324.
214. Tree TI, Lawson J, Edwards H, Skowera A, Arif S, Roep BO, Peakman M. Naturally arising human CD4 T-cells that recognize islet autoantigens and secrete interleukin-10 regulate proinflammatory T-cell responses via linked suppression. *Diabetes.* 2010;59(6):1451-60. doi:10.2337/db09-0503.
215. Umpierrez G, Korytkowski M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):222-32. doi:10.1038/nrendo.2016.15.
216. Vaarala O. Gut and the induction of immune tolerance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999;15(5):353-61. doi:10.1002/(sici)1520-7560(199909/10)15:5<353::aid-dmrr59>3.0.co;2-4.
217. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011;91(1):79-118. doi:10.1152/physrev.00003.2010.
218. van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008;11(1):91-99. doi:10.1007/s10456-008-9093-5.
219. Varela-Calvino R, Sgarbi G, Arif S, Peakman M. T-Cell reactivity to the P2C nonstructural protein of a diabetogenic strain of coxsackievirus B4. *Virology.* 2000;274(1):56-64. doi:10.1006/viro.2000.0446.
220. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(6):1053-67. doi:10.1093/ajcn/78.6.1053.
221. Vives-Pi M, Rodríguez-Fernández S, Pujol-Autonell I. How apoptotic  $\beta$ -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis.* 2015;20(3):263-72. doi:10.1007/s10495-015-1090-8.

222. von Herrath M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes*. 2009;58(1):2-11. doi:10.2337/db08-9027.
223. von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):988-94. doi:10.1038/nri2192.
224. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):388-400. doi:10.1038/nri3839.
225. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, Blagojevic D, Stosic-Grujicic S, Tzakos AG, Stojanovic I. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. *Br J Nutr*. 2015;113(5):770-82. doi:10.1017/S0007114514004048.
226. Vujicic M, Saksida T, Mostarica Stojkovic M, Djedovic N, Stojanovic I, Stosic-Grujicic S. Protective effects of carbonyl iron against multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in rodents. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4990-5001. doi:10.1002/jcp.26338.
227. Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*. 2004;255(3):320-31. doi:10.1111/j.1365-2796.2003.01302.x.
228. Wang R, Xie R, Song Z. Circulating regulatory Tfh cells are enriched in patients with chronic hepatitis B infection and induce the differentiation of regulatory B cells. *Exp Cell Res*. 2018;365(2):171-176. doi:10.1016/j.yexcr.2018.02.031.
229. Wällberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol*. 2013;34(12):583-91. doi:10.1016/j.it.2013.08.005.
230. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 2011;35(6):871-882. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.021.
231. Wang X, Sterr M, Ansarullah, et al. Point mutations in the PDX1 transactivation domain impair human  $\beta$ -cell development and function. *Mol Metab*. 2019;24:80-97. doi:10.1016/j.molmet.2019.03.006.
232. Wilkin TJ. The convergence of type 1 and type 2 diabetes in childhood: the accelerator hypothesis. *Pediatr Diabetes*. 2012;13(4):334-9. doi:10.1111/j.1399-5448.2011.00831.x.
233. Xia Y, Xie Z, Huang G, Zhou Z. Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35(1):e3075. doi:10.1002/dmrr.3075.

234. Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, et al. Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice. *Diabetologia*. 2012;55(8):2238-2245. doi:10.1007/s00125-012-2547-8.
235. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol*. 2011;23(6):424-30. doi:10.1016/j.smim.2011.10.002.
236. Yang BH, Hagemann S, Mamareli P, et al. Foxp3(+) T cells expressing ROR $\gamma$ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2016b;9(2):444-457. doi:10.1038/mi.2015.74.
237. Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front Immunol*. 2020;11:484. doi:10.3389/fimmu.2020.00484.
238. Yang R, Zhu S, Tonnessen TI. Ethyl pyruvate is a novel antiinflammatory agent to treat multiple inflammatory organ injuries. *J Inflamm (Lond)*. 2016a;13:37. 2016a; doi:10.1186/s12950-016-0144-1.
239. Yao L, Cheng C, Yang X, et al. Ethyl pyruvate and analogs as potential treatments for acute pancreatitis: A review of in vitro and in vivo studies. *Pancreatol*. 2019;19(2):209-216. doi:10.1016/j.pan.2018.12.007.
240. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw*. 2018;18(1):e14. doi:10.4110/in.2018.18.e14.
241. You S, Slehoffer G, Barriot S, Bach JF, Chatenoud L. Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 Suppl 2(Suppl 2):14580-14585. doi:10.1073/pnas.0404870101.
242. Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. 2018;153(2):161-170. doi:10.1111/imm.12867.
243. Zacccone P, Cooke A. Infectious triggers protect from autoimmunity. *Semin Immunol*. 2011;23(2):122-9. doi:10.1016/j.smim.2011.01.013.
244. Zacccone P, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, Bendtzen K, Cooke A, Nicoletti F. Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 1999;48(8):1522-8. doi:10.2337/diabetes.48.8.1522.
245. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):566-571. doi:10.1038/cmi.2015.44.

246. Zeng J, Liu J, Yang GY, Kelly MJ, James TL, Litt L. Exogenous ethyl pyruvate versus pyruvate during metabolic recovery after oxidative stress in neonatal rat cerebrocortical slices. *Anesthesiology*. 2007;107(4):630-640. doi:10.1097/01.anes.0000281898.01966.1e.
247. Zhang J, Chen L, Wang F, et al. Extracellular HMGB1 exacerbates autoimmune progression and recurrence of type 1 diabetes by impairing regulatory T cell stability. *Diabetologia*. 2020;63(5):987-1001. doi:10.1007/s00125-020-05105-8.
248. Zhang S, Zhong J, Yang P, Gong F, Wang CY. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;3(1):24-38.
249. Zhang Y, Yao YM, Huang LF, Dong N, Yu Y, Sheng ZY. The potential effect and mechanism of high-mobility group box 1 protein on regulatory T cell-mediated immunosuppression. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(2):249-257. doi:10.1089/jir.2010.0019.
250. Zheng P, Li Z, Zhou Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018;34(7):e3043. doi:10.1002/dmrr.3043.
251. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(9):1000-7. doi:10.1038/ni.1774.
252. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):240. doi:10.1186/s13287-017-0694-z.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Ivan Koprivica je rođen 27. avgusta 1991. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2010/2011. godine, studijsku grupu Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne akademske studije je završio 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,43. Master studije na smeru Imunobiologija, upisane školske 2014/2015. godine na Biološkom fakultetu univerziteta u Beogradu završio je 2016. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad pod naslovom: „Efekat povrede femoralnog nerva na funkciju peritonealnih makrofaga i gustinu ćelijskih jedara u mišiću i području nerva pacova“, pod mentorstvom dr Biljane Božić Nedeljković na Vojnomedicinskoj akademiji, odbranio je sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Imunobiologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu je upisao 2016/2017. godine, i položio sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,82.

Ivan se u januaru 2018. godine zaposlio kao istraživač-pripravnik na Odeljenju za Imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI173013) pod rukovodstvom dr Danijele Maksimović-Ivanić. Od momenta upisa doktorskih studija do zasnivanja radnog odnosa volontirao je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Zvanje istraživač-saradnik stiče u januaru 2020. godine.

Član je Društva imunologa Srbije, Srpskog biohemijskog društva, Srpskog društva za molekularnu biologiju, a ovim putem i Evropske federacije imunoloških društava (European Federation of Immunological Societies, EFIS) i Federacije evropskih biohemijskih društava (Federation of European Biochemical Societies, FEBS).

Ivan Koprivica je do sada učestvovao kao autor/koautor na osam radova u međunarodnim časopisima, ima četiri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i jedno saopštenje na skupovima nacionalnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Иван Копривица \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3020/2016 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

\_\_\_\_\_ „Ефекат примене етил-пирувата на развој дијабетеса типа 1 код C57BL/6 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, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Копривица

Број индекса Б3020/2016

Студијски програм Биологија-имунобиологија

Наслов рада „Ефекат примене етил-пирувата на развој дијабетеса типа 1 код C57BL/6 мишева“

Ментор др Ивана Стојановић, др Биљана Божић Недељковић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

„Ефекат примене етил-пирувата на развој дијабетеса типа 1 код C57BL/6 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.