

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ НАСТАВНО НАУЧНОМ
ВЕЋУ**

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Александра Д. Бисенића, мастер биохемичара, пријављене под насловом:

**„Испитивање потенцијала анаеробних бактерија произвођача масних киселина
кратког ланца као неуробиотика у мишијем моделу мултипле склерозе“**

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације су анаеробне бактерије произвођачи масних киселина кратког ланца изоловане из фекалног материјала и испитивање њиховог потенцијала као неуробиотика за третирање мултипле склерозе.

Анаеробне бактерије ће бити изоловане из фекалног материјала здравих донора коришћењем посебних медијума, протокола и опреме за успостављање анаеробних услова, које ће потом бити идентификоване секвенцирањем дела гена за 16S rRNA.

Изоловане бактерије ће бити тестиране на продукцију масних киселина кратког ланца. Утицај на експресију протеина чврстих веза и антиинфламаторна својства одабраних изолата ће бити испитани на Caco-2 ћелијској линијикао моделу епитела црева и на моноклеарним ћелијама периферне крви као моделу имунских ћелија, док ће утицај изолата на нервни систем домаћина бити испитиван на *C. elegans* као моделу домаћина. Промене нивоа експресије протеина чврсте везе, IL-8 и одабраних гена повезаних са нервним системом ће служити као критеријуми за одабир изолата за *in vivo* испитивање потенцијала бактерија произвођача масних киселина кратког ланца као неуробиотика на мишијем моделу мултипле склерозе. Ово истраживање за циљ има развој иновативних приступа за третирање мултипле склерозе базираних на модификовању микробиоте, метаболома црева и имунског одговора.

3. Основе хипотезе

Микробиота црева представља заједницу микроорганизама (бактерија, гљива и вируса) који настајују лумен црева домаћина. Ови микроорганизми имају важан утицај на здравље домаћина, а најважније функције којима доприносе су метаболичка ефикасност у варењу хране, отпорност на патогене микроорганизме и регулација развоја и активности имунског система.

Промене у саставу и метаболизму микробиоте црева су доведене у везу са великим бројем патолошких стања повезаних са поремећеном функцијом имунског система, као што су алергије, тумори и аутоимунске болести. С обзиром на то да се учесталост обољења са аутоимунском компонентом повећава, нарочито у развијеним земљама, постоји повећана потреба за идентификацијом фактора одговорних за развој болести, као и нових стратегија превенције и терапија.

Мултипла склероза (МС) је аутоимунско обољење у којем долази до оштећења мијелинског омотача неурона централног нервног система (ЦНС). Последице могу да буду отежано или онемогућено спровођење сигнала у деловима ЦНС, што може довести до симптома попут слабљења мишића, отежане координације тела, губитка вида, умора и когнитивних проблема. Већа заступљеност симптома попут констипације, повећане пропустљивости и инфламације црева у особама које болују од МС (Buscarinu, 2017), заједно са чињеницом да бактерије црева могу да утичу на пропустљивост крвно-мождане баријере, указују на потенцијалну везу између ЦНС и црева. Веза између развоја МС и промена у микробиоти црева је додатно поткрепљена метагеномским и метаболомичким студијама. Бројни бактеријски родови су идентификовани као мање заступљени у пацијентима који болују од МС, од којих су неки: *Coprococcus*, *Butyricimonas* и *Prevotella* (Chen, 2016; Jangi, 2016; Zeng, 2019). Бактерије ових родова су познати произвођачи масних киселина кратког ланца (engl. Short Chain Fatty Acid – SCFA). Последично, концентрација већине SCFA у цревима је такође смањена у МС (Zeng, 2019).

SCFA представљају групу органских киселина са изузетно важном улогом у интеракцијама

микробиоте и домаћина. Настају ферментацијом комплексних полисахарида унетих исхраном од стране одређених бактерија микробиоте црева, већински у дебелом цреву. Домаћин SCFA препознаје преко рецептора спрегнутих са Г протеином (engl. G protein Coupled Receptor – GPCR). Најзаступљенији рецептори за SCFA у ћелијама домаћина су GPR43 и GPR41. Рецептор GPR43 се већински експримира у ћелијама епитела гастроинтестиналног тракта, имунским ћелијама и у мањој мери у адипоцитима. Са друге стране, GPR41 се експримира у већем броју различитих ћелија, попут епитела црева, адипоцита, слезине, лимфних чворова, полиморфонуклеарних леукоцита и ћелија периферног нервног система. Постоје и додатни мање распрострањени и мање специјализовани рецептори, као што су GPR109a/HCAR2 и GPR164, који такође могу да се активирају везивањем SCFA. (Corrêa-Oliveira, 2016)

Масним киселинама кратког ланца се приписују бројна својства од користи по домаћина. Служе као важан извор енергије: бутират већински бива искоришћен од стране ћелија епитела дебелог црева, док се ацетат транспортује циркулацијом до јетре, где се користи у процесу глуконеогенезе. Повећањем нивоа експресије протеина чврстих међућелијских веза, SCFA доводе до смањења пропустљивости цревне баријере, даље смањујући вероватноћу транслокације бактерија црева у организам и настанка локалне или чак системске инфламације, повезане са бројним патолошким стањима (Peng, 2009).

Садржај SCFA у фецесу особа оболелих од МС је значајно смањен, у тој мери да их је у неким случајевима немогуће детектовати (Zeng, 2019). Садржај укупних и појединачних SCFA корелира и са тежином клиничке слике, па је релативна заступљеност бутерне и капронске киселине смањена, а релативна заступљеност сирћетне киселине повећана у фецесу пацијената са интензивнијим симптомима. Смањена концентрација SCFA је забележена и у серуму МС пацијената (Duscha, 2020). Поремећаји у концентрацијама SCFA утичу и на функцију имунског система. Показано је да смањена заступљеност Treg ћелија и повећана заступљеност Th17 ћелија у МС пацијентима корелира са променама у заступљености одређених бактеријских таксона у цревима, као и са концентрацијама SCFA у фецесу и серуму (Duscha, 2020; Zeng, 2019). Повезаност промена у заступљености чланова микробиоте који продукују SCFA и функцији имунских ћелија као што су дендритске

ћелије, макрофаги, супресорске ћелије мијелоидног порекла, Т лимфоцити и лимфоцити природне убице показана је и на пацовском моделу мултипле склерозе, односно експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (EAE) (Radojević, 2022). Показано је да инхибиција хистон деацетилазе (HDAC) под утицајем SCFA у моноклеарним ћелијама и неутрофилима доводи до инактивације NFκB и смањене експресије про-инфламаторних цитокина. Инхибиција деацетилације, која доводи до повећане експресије *foxp3*, је управо начин на који SCFA поспешују супресивну активност Treg ћелија (Тао, 2007). Још један вид модификације хистона релевантан за SCFA је кротонилација. У физиолошким условима, овај процес је најинтензивнији у цревима и мозгу, а замишљан је од SCFA, са бутиратом као главним инхибитором декротонилишуће активности HDAC (Fellows, 2018). Ова активност SCFA се приписује молекулима у циркулацији и пример је дисталних ефеката SCFA продукованих од стране микробиоте црева на мозак.

С обзиром на обим литературе која указује на значај интеракција микробиоте црева и домаћина, интервенције на нивоу микробиоте и метаболома црева представљају обећавајући приступ за развој нових терапеутских решења за третирање болести повезаних са неконтролисаним активацијом имунског система, као што је случај у мултиплој склерози.

Хипотезе:

1. Ниво продукције масних киселина кратког ланца доприноси потенцијалу бактерија изолованих из фекалног материјала здравих донора да очувају састав и функцију микробиоте, регулишу имунски одговор и очувају интегритет цревне баријере.
2. Применом бактерија произвођача масних киселина је могуће ублажити симптоме мултипле склерозе регулацијом осе микробиота-црева-имунски систем-мозак.

4. Циљеви истраживања и очекивани резултати

Главни циљ тезе

Циљ ове тезе је испитати потенцијал коришћења бактерија произвођача масних киселина кратког ланца из црева као специјализованих постбиотика за третирање мултипле склерозе.

Специфични циљеви тезе

1. Успостављање протокола за изоловање и култивацију стриктно анаеробних бактерија црева; карактеризација метаболичке активности селектованих сојева (продукција SCFA); испитивање вирулентног потенцијала одабраних сојева (резистенција на антибиотике, хемолитичка активност, желатиназна активност);
2. *In vitro* карактеризација одабраних изолата у кокултури са мононуклеарима периферне крви и епителним ћелијама црева (Caco-2 ћелијама) на којима ће бити испитана цитотоксичност изолата, имуномодулаторни ефекти и утицај на цревну баријеру;
3. *In vivo* испитивање потенцијала одабраних изолата да мењају експресију гена укључених у регулацију активности неурона на моделу *Caenorabditis elegans*, и потенцијала ових изолата за третирање мултипле склерозе коришћењем мишијег модела експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса.

Очекивани резултати

Први резултати ове докторске тезе биће везани за изоловање стриктно анаеробних бактерија из фецеса здравих донора. Током овог истраживања биће успостављена колекција изолата бактерија идентификованих секвенцирањем дела гена за 16S rRNA, на основу којег ће се извршити иницијална селекција оних бактерија које би по литературним подацима могле да имају потенцијал за продукцију SCFA. Додатни критеријум за селекцију бактерија биће статус „некултивисане“ бактерије након 16S rRNA анализе. Користећи HPLC уређај опремљен UV детектором, биће могуће утврдити потенцијал селектованих изолата да продукују SCFA, као и факторе који утичу на ниво продукције SCFA у кораку оптимизације услова и састава медијума за култивисање бактерија. Резултат овог дела истраживања биће дефинисање састава медијума који подстичу продукцију SCFA од стране селектованих бактерија. Резултати добијени анализом метаболита у бактеријским културама масеном спектрометријом, заједно са резултатима са HPLC-UV о продукцији SCFA, ће омогућити интерпретацију резултата даљих експеримената у контексту метаболичког потенцијала испитиваних бактерија. Из дела истраживања у којима ће се испитивати интеракција изолата са Caco-2 ћелијама третираним проинфламаторним цитокинима као моделом инфламације црева домаћина, проистећи ће резултати који ће указати на утицај ових бактерија на интегритет цревне баријере и на продукцију проинфламаторних цитокина од стране ових ћелија. С обзиром на чињеницу да је интегритет цревне баријере нарушен код

МС пацијената као последица локалне инфламације (Buscarinu, 2017), а имајући у виду да студије указују на нарушену цревну баријеру као фактор који доприноси развоју бројних патолошких стања (дијабетес, гојазност итд.), ови резултати ће нам бити од изузетне важности у процени пробиотског потенцијала селектованих изолата. Улога имунског система у интеракцији бактерија са епителом црева ће бити моделована ко-култивацијом Сасо-2 ћелија са РВМС (енгл. Peripheral Blood Mononuclear Cells) коришћењем *transwell* инсерата. Резултат ових истраживања указаће на потенцијал испитиваних бактерија да деловањем на Сасо-2 ћелије утичу на активност РВМС. Утицај изолата на нервни систем ће бити испитан на *C. elegans* као моделу домаћина. Након третмана, из сакупљених *C. elegans* ће бити изолована RNA и методом qPCR ће бити испитан ниво експресије гена повезаних са неуропептидима, као и синтезом и ослобађањем неуротрансмитера за које је показано да су од значаја у неуродегенеративним болестима. Ослањајући се на резултате из горе наведених експеримената, у *in vivo* експериментима на C57BL/6 мишевима којима је изазван експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ), два изолата са највећим потенцијалом за примену у третирању МС биће понуђена животињама *ad libitum*. Експерименти на мишевима ће показати утицај испитиваних изолата на симптоме ЕАЕ. Анализом ткива узоркованих на врхунцу болести (мозак и кичмена мождина, слезина, лимфни чворови и Пејерове плоче, различити делови црева: дуоденум, јејунум, илеум, цекум и колон) ће бити испитан утицај бактерија на усмеравање имунског одговора, као и потенцијал бактерија да стимулишу регулаторне и имуносупресивне путеве повећањем заступљености и активности ћелија попут имуносупресивних ћелија мијелоидног порекла (толерогене дендритске ћелије, супресивне ћелије мијелоидног порекла, супресивни макрофаги), и регулаторних Т ћелија, кључних за ефикасну терапију аутоимунских обољења. Мерење концентрације SCFA и других метаболита у серумима третираних животиња ће помоћи у објашњавању потенцијалних дисталних ефеката примењених бактерија на централни нервни систем мишева. Услужно секвенцирање нове генерације (*shotgun* секвенцирање и секвенцирање дела гена за 16S rRNA) на платформи Illumina ће бити коришћено за одређивање таксономског састава и метаболичког потенцијала микробиоте из узорака фецеса прикупљених пре индукције болести и на врхунцу болести, као и садржаја различитих делова црева. Додатно, да би се урадила потпуна претрага генома одабраних изолата, на истој платформи урадиће се секвенцирање читавих генома изолата

од интереса.

5. Методе истраживања

Микробиолошке методе:

1. При изради ове докторске дисертације биће изоловане стриктно анаеробне бактерије из фекалног материјала здравих особа. У ту сврху ће бити коришћени хранљиви медијуми ради повећања вероватноће изоловања мање заступљених бактеријских врста, као и посебне компоненте, протоколи и опрема за успостављање услова довољно ниског редукционог потенцијала и концентрације кисеоника за раст стриктно анаеробних бактерија црева. То подразумева рад у анаеро комори при условима атмосфере: $N_2:CO_2:H_2 = 80:10:10$, и температури од 36 °C.
2. Изучавање морфологије бактерија и разликовање Грам позитивних и Грам негативних бактерија на светлосном микроскопу – Бојење по Граму.
3. Мерење раста бактеријских култура (cfu/mL) методом серијских разблажења.
4. Испитивање антибиотских резистенција бактерија одређивањем МИС (енгл. Minimal Inhibitory Concentration).
5. Испитивање желатиназне активности култивацијом ћелија на чврстим подлогама са додатком желатина.
6. Испитивање хемолитичке активности култивацијом ћелија на чврстим подлогама са додатком крви.

Аналитичке методе:

1. Одређивање концентрације масних киселина кратког ланца у бактеријским културама помоћу HPLC (енгл. High Performance Liquid Chromatography).
2. Анализа метаболома бактеријских култура, мишијих серума, фецеса, бактеријских везикула помоћу HPLC-MS (енгл. High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry).

Методе култивације ћелија:

1. Култивисање Сасо-2 ћелија, имортализованих ћелија пореклом од хуманог колоректалног аденокарцинома, као модела епитела црева подразумева класичне методе ћелијске културе, попут пасажирања, пребројавања и стокирања ћелија. За

култивацију Сасо-2 ћелија ће се користити комерцијални медијум DMEM GlutaMAX са пируватом и високим садржајем глукозе. Комплетни медијум садржи 10% FCS (енгл. Fetal Calf Serum), као и пеницилин и стрептомицин. Ћелије се инкубирају на температури од 37 °C и концентрацији CO₂ од 5%.

2. Диференцирање Сасо-2 ћелија се изводи у плочама са 24 бунара са или без *transwell* инсерата редовном изменом медијума. Диференцијација траје 17 дана и почиње када ћелије постигну монослој.
3. Моделовање улоге имунског система у интеракцијама бактерија са епителом црева се постиже ко-култивацијом Сасо-2 ћелија са РВМС. РВМС се изолују из крви здравих донора методом градијента густине. Ко-култивација се постиже коришћењем *transwell* инсерата, са тим да се Сасо-2 ћелије узгајају изнад порозне мембране инсерата, а РВМС испод мембране, на дну бунара.

Имунохемијске методе:

1. Квантификација цитокина продукованих од стране РВМС ко-култивисаних са Сасо-2 ћелијама третираним бактеријским културама помоћу ELISA.
2. Одређивање нивоа експресије протеина (чврсте међућелијске везе, аутофагија, транскрипциони фактори) у различитим узорцима (Сасо-2 ћелије, ткива узоркована од мишева) методом Western Blot.
3. Анализа ћелијских инфилтрата у кичменој моздини, мозгу и цревима изолованим из мишева којима је изазиван ЕАЕ или су служили као контроле, као и морфологија чврстих веза у цревима на пресецима ових ткива након бојења хематоксилин-еозин и имунохистохемијског обележавања антигена од интереса комерцијалним антителима. Овако обележени пресеци ткива биће анализирани на светлосном односно флуоресцентном микроскопу.
4. Имунофенотипизација ћелија ткива у суспензији изолованих из мишева којима је изазиван ЕАЕ или су служили као контроле биће урађена коришћењем комерцијалних антитета и узорци ће бити анализирани помоћу проточног цитометра и одговарајућих програма за обраду података (FlowJo, FCS express).

In vitro методе испитивања интеракција бактерија са домаћином:

1. Третирање Сасо-2 ћелија као модела епитела црева домаћина бактеријским културама и/или ванћелијским везикулама бактерија.
2. Одређивање цитотоксичности бактерија на Сасо-2 ћелијама коришћењем комерцијалних китова за мерење активности лактат дехидрогеназе.
3. Мерење нивоа експресије гена од интереса на нивоу информационе RNA (чврсте међућелијске везе, гени повезани са функцијом нервног система и инфламацијом) у различитим узорцима (Сасо-2 ћелије третиране бактеријама, *C. elegans*, ткива узоркована од мишева) методом qPCR (енгл. Quantitative Polymerase Chain Reaction).
4. Квантификација ефекта бактерија на интегритет цревне баријере у култури диференцираних Сасо-2 ћелија коришћењем уређаја за мерење TEER.

Изоловање и пречишћавање ванћелијских везикула бактерија:

1. Изоловање бактеријских везикула коришћењем ултрацентрифуге и градијента густине.
2. Пречишћавање бактеријских везикула коришћењем SEC (енгл. Size Exclusion Chromatography).

Мишији модел мултипле склерозе:

1. *In vivo* тестирање ефеката бактерија на C57BL/6 мишевима којима је изазван ЕАЕ као модел мултипле склерозе у мишевима (праћење симптома ЕАЕ, узорковање фецеса, садржаја и ткива различитих делова црева, као и ткива слезине, мозга, кичмене мождине, лимфних чворова, Пејерових плоча). Индукција ЕАЕ инјекцијом фрагмента мијелин олигодендроцитног протеина у комбинацији са комплетним Freund-ovim адјувансом и токсином *Bordetella pertussis*. Третирање мишева потенцијалним неуробиотицима конзумирањем бактеријских култура *ad libitum*.

NGS (енгл. Next Generation Sequencing) и биоинформатичке методе:

1. Идентификација изолата секвенцирањем дела гена за 16S rRNA и поређењем секвенци са секвенцама из NCBI базе података помоћу BLAST алата.
2. Анализа *short-* и *long-read* података добијених методом WGS (енгл. Whole Genome Sequencing) на различитим платформама (Illumina, Oxford Nanopore Technologies). Обрада сирових података и анализа генома ће подразумевати следеће алате: FastQC (провера квалитета сирових података), fastp (уклањање индекс секвенци, адаптера и

секвенци loшег квалитета), SPAdes (*de novo* склапање генома), Kraken (таксономске анализе) и Prokka (функционална анотација генома), али и друге биоинформатичке и статистичке методе.

3. Анализа података добијених методом *shotgun* метагеномског секвенцирања и секвенцирањем дела гена за 16S rRNA на платформи Illumina са циљем одређивања таксономског састава и метаболичког потенцијала фекалне микробиоте. Обрада сирових података и анализа метагенома добијених секвенцирањем дела гена за 16S rRNA ће подразумевати следеће алате: QIIME2, LEfSe, PICRUSt2 и R скрипте. Обрада *shotgun* метагеномских података ће подразумевати коришћење FastQC, KneadData, Kraken, Bracken и HUMAnN алата, као и R скрипти. Додатни статистички тестови, као и графички приказ резултата ће бити урађени коришћењем GraphPad Prism.

6. Литература

- 1) Buscarinu, M. C., Cerasoli, B., Annibali, V., Policano, C., Lionetto, L., Capi, M., ... & Ristori, G. (2017). Altered intestinal permeability in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(3), 442-446.
- 2) Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Paz Soldan, M. M., ... & Mangalam, A. K. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- 3) Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., ... & Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature communications*, 7(1), 12015.
- 4) Zeng, Q., Gong, J., Liu, X., Chen, C., Sun, X., Li, H., ... & Lu, Y. (2019). Gut dysbiosis and lack of short chain fatty acids in a Chinese cohort of patients with multiple sclerosis. *Neurochemistry international*, 129, 104468.
- 5) Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e73.
- 6) Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1619-1625.
- 7) Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Dawin, E., ... & Haghikia,

A. (2020). Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism. *Cell*, 180(6), 1067-1080.

8) Radojević, D., Bekić, M., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Dinić, M., Bisenić, A., ... & Tomić, S. (2022). Myeloid-derived suppressor cells prevent disruption of the gut barrier, preserve microbiota composition, and potentiate immunoregulatory pathways in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Gut Microbes*, 14(1), 2127455.

9) Tao, R., De Zoeten, E. F., Özkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P. M., ... & Hancock, W. W. (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature medicine*, 13(11), 1299-1307.

10) Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., ... & Varga-Weisz, P. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nature communications*, 9(1), 105.