

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Radmila D. Miljković

**Profilaktičko dejstvo rekombinantne izoforme
lektina banane u zapaljenskim bolestima creva:
ispitivanje na modelu hemijski-indukovanog kolitisa
u miša**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Radmila D. Miljković

**Prophylactic effect of recombinant banana lectin in
inflammatory bowel diseases: evaluation in a murine
model of chemically induced colitis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

Dr Marijana Stojanović, naučni savetnik

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

Dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Predsednik komisije:

Dr Milica Popović, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Marijana Stojanović, naučni savetnik

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

Dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Marija Stojadinović, docent

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Ivana Prodić, viši naučni saradnik

Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Datum odbrane : _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Odseku za naučno-istraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Rezultati predstavljeni u ovoj tezi dobijeni su tokom istraživanja sprovedenim u okviru projekta „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Izradom ove doktorske disertacije rukovodila je dr Marijana Stojanović, naučni savetnik u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Mojoj mentorki dugujem ogromnu zahvalnost što mi je pružila šansu da se nađem na ovom naučnom putu time što me je primila u svoju istraživačku grupu, što mi je ukazala poverenje, veliko strpljenje, dragocenu stručnu pomoć, a najviše hvala na tome što me je usmeravala, povremeno me izvođeci iz zone komfora, ali istovremeno pružajući mi veliku količinu samostalnosti.

Prof dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu se naizmerno zahvaljujem na pomoći i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele konačnom formiranju ovog rada.

Beskrajno se zahvaljujem dr Aleksandri Inić-Kanadi na uvek pozitivnoj energiji i pomoći da jedan deo ove teze bude odrađen u njenoj laboratoriji u Centru za patofiziologiju, infektologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beču. Posebnu zahvalnost dugujem Evropskom udruženju biohemičara - FEBS koji su finansirali moj boravak u Austriji.

Veliku zahvalnost dugujem mojim dragim kolegicama i prijateljicama Ani Kovačević i Emiliji Marinković na nesebičnoj pomoći oko izrade teze, timskom radu, savetima, inspiraciji i na prijateljstvu koje smo izgradile. Naše razgovore u Bibi kafeu ću uvek pamtiti.

Zahvaljujem se i dr Ivani Prodić koja me je svojim pozitivnim stavom, energijom i savetima dodatno motivisala da ovu disertaciju privedem kraju. Hvala joj na prijateljstvu i podršci koju mi je nesebično pružila u poslednje dve godine kada mi je bilo najpotrebnije.

Najsrdanije se zahvaljujem i ostalim kolegama iz Odseka za naučno-istraživački rad Instituta „Torlak“: Ivani Č.; Ivani P.; Veljku, Ivani A.; Marku P.; Marku V.; Ireni Nj. i Luki koji su uvek bili raspoloženi da podele znanje, priteknu u pomoć i ulepšaju rad u laboratoriji.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici za pruženu bezgraničnu ljubav, razumevanje i podršku u svakom trenutku mog života. Hvala mom tati što je uvek znao da nađe reči utehe i razumevanja kad god mi je to bilo potrebno. Hvala mojoj mami na nesebičnoj podršci i uvek blagim rečima. Hvala mojoj Isidori, mom najboljem prijatelju, koja je uvek imala strpljenja da me sluša kad god mi je bilo teško na ovom putu.

Na kraju želim da se beskrajno zahvalim svom Nikoli koji mi je pored porodice bio najveća podrška još od studentskih dana. Hvala ti što si uvek na mojoj strani i što si mi vetar u leđa. Hvala mojim Vojinu i Veri što svaki dan čine neizmerno lepšim i lakšim.

Ovu doktorsku disertaciju bih posvetila mojoj baki Radmili, koja nije imala mogućnost da ispuni svoje želje i potencijale, zbog čega sam još zahvalnija na svim mogućnostima koje sam ja imala.

Profilaktičko dejstvo rekombinantne izoforme lektina banane u zapaljenjskim bolestima creva: ispitivanje na modelu hemijski-indukovanog kolitisa u miša

Sažetak

Inflamatorne bolesti creva (IBD), uključujući ulcerozni kolitis i Kronovu bolest, sve su učestalije širom sveta i značajno narušavaju kvalitet života obolelih. Patogeneza ovih bolesti rezultat je složene interakcije genetskih faktora, crevne mikrobiote i uticaja iz spoljašnje sredine. Cilj ove doktorske teze bio je da se ispita efekat rekombinantne izoforme lektina banane (rBanLec), poznatog po svojim imunomodulatornim svojstvima, u eksperimentalnom modelu 2,4,6-trinitrobenzen sulfonskom kiselinom-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu. rBanLec je primenjivan u dozama od 0,1, 1 i 10 µg/mL (100 µL) pre ili nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa. Težina bolesti procenjavana je na osnovu gubitka telesne težine, skraćanja dužine debelog creva, histopatoloških promena, citokinskog profila i parametara oksidativnog stresa u debelom crevu, kao i lokalnih promena u populaciji imunskih ćelija. Najpovoljniji efekat je postignut primenom 0,1 µg/mL rBanLec, kako jednokratno profilaktički tako i tokom bolesti. Pozitivan efekat primene rBanLec se ogledao u značajnom ublaženju kliničke slike u piku bolesti i ubrzavanju oporavka, a bio je povezan sa smanjenjem intenziteta histoloških promena, povećanjem lokalne koncentracije antiinflamatornih citokina i pojačanom aktivnošću antioksidativnih enzima u debelom crevu. Rezultati ukazuju da primena rBanLec u niskim doza može imati povoljno dejstvo u IBD putem modulacije oksidativnog stresa i imunskog odgovora, što dalje ukazuje na potencijalnu mogućnost primene u kontroli IBD.

Ključne reči: IBD, lektin banane (BanLec), imunomodulacija, antiinflamatorna aktivnost, debelo crevo, TNBS izazvani kolitis, citokini, antioksidativni enzimi, C57BL/6 miševi

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Imunologija

Prophylactic effect of recombinant banana lectin in inflammatory bowel diseases: evaluation in a murine model of chemically induced colitis

Abstract

The incidence of inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, continues to increase globally. Given the profound impact of IBDs on patient quality of life, the development of effective preventative and therapeutic strategies remains a critical priority. IBD develops through the combined influence of genetics, gut microbial composition, and environmental triggers. The study utilized a TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid)-induced colitis model in C57BL/6 mice to examine the effects of recombinant banana lectin (rBanLec), a mannose-specific lectin known for its immunomodulatory activity. Mice received rBanLec at concentrations of 0.1, 1, and 10 µg/mL (100 µL) prior or after to colitis induction. Disease severity was evaluated through parameters such as body weight loss, colon shortening, histopathological analysis, cytokine profiling, oxidative stress biomarker assessment and local changes in immune cell populations. Treatment with the lowest tested dose of rBanLec (0.1 µg/mL) led to a significant reduction in colitis severity, as evidenced by less weight loss, improved histological outcomes, and a shift toward an anti-inflammatory cytokine profile. Furthermore, rBanLec enhanced the activity of key antioxidant enzymes and lowered oxidative stress indicators during peak inflammation. These results suggest that low-dose rBanLec has a protective role in experimental colitis through its ability to attenuate oxidative damage and promote anti-inflammatory immune responses. This positions rBanLec as a promising candidate for future interventions in control of IBD pathology.

Key words: IBD, banana lectin (BanLec), immunomodulation, anti-inflammatory, colon, TNBS-induced colitis, cytokines, antioxidative enzymes, C57BL/6 mice

Scientific field: Biochemistry

Scientific subfield: Immunology

LISTA SKRAĆENICA

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije; engl. *Antigen-presenting Cells*
BanLec – lektin banane; engl. *Banana Lectin*
Caco-2 – ćelijska linija humanog kolorektalnog adenocarcinoma; engl. *Human Colorectal Adenocarcinoma Cells*
CAT – katalaza; engl. *Catalase*
CD – engl. *Cluster of Differentiation*
cDNK – komplementarna DNK; engl. *complementary DNA*
CHI – Histološki Indeks Kolitisa; engl. *Colitis Histology Index*
COX-2 – ciklooksigenaza-2; engl. *Cyclooxygenase-2*
CRD – strukture domena koji prepoznaju ugljene hidrate; engl. *Carbohydrate recognition domain*
DĆ – dendritske ćelije; engl. *Dendritic Cells*
DSS – natrijum dekstran sulfat; engl. *Dextran Sodium Sulphate*
FoxP3 – engl. *Forkhead box P3*
GALT – limfoidno tkivo povezano sa crevima; engl. *Gut-associated Lymphoid Tissue*
GAPDH – glicerinaldehid 3- fosfat dehidrogenaza; engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GIT – gastrointestinalni trakt; engl. *Gastrointestinal Tract*
GST – glutation-S-transferaza; engl. *Glutathione-S-Transpherase*
HIV – humani virus imunodeficijencije; engl. *Human Immunodeficiency Virus*
IBD – zapaljenska bolest creva; engl. *Inflammatory Bowel Disease*
IEĆ – intestinalne epitelne ćelije;
IFN – interferon; engl. *Interferon*
IL – interleukin; engl. *Interleukin*
KB – Kronova Bolest
KO – engl. „*knocked out*“
LDH – laktat dehidrogenaza; engl. *Lactate Dehydrogenase*
mLČ – mezenterični limfni čvorovi;
MPO – mijeloperoksidaza; engl. *Myeloperoxidase*
NF-κB – nuklearni faktor kapa B; engl. *Nuclear Factor kappa B*
NKĆ – urođenoubilačke ćelije; engl. *Natural killer cells*
NO – azot-oksid; engl. *Nitrite Oxide*
Pcc – Pirsonov koeficijent korelacije; engl. *Pearson's correlation coefficient*
PMBC – mononuklearne ćelije periferne krvi; engl. *Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PP – Pejerove ploče; engl. *Peyer's Patches*
qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu; engl. *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*
rBanLec – rekombinantni lektin banane; engl. *Recombinant banana lectin*
RNS – reaktivne vrste azota; engl. *Reactive Nitrogen Species*
ROS – reaktivne vrste kiseonika; engl. *Reactive Oxygen Species*
RT – reverzna transkripcija; engl. *Reverse Transcription*
SCFA – masne kiseline lakog lanca; engl. *Short Chain Fatty Acid*
SOD – superoksid dismutaza; engl. *Superoxide Dismutase*
T reg – regulatorne T ćelije; engl. *Regulatory T cells*
TGFβ – transformišući faktor rasta beta; engl. *Transforming Growth Factor beta*
Th – pomoćničke T ćelije; engl. *T helper cells*
TLR – receptor sličan Tollu; engl. *Toll-like Receptor 2*
TMB – 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin; engl. 3,3',5,5'- *tetramethylbenzidine*
TNBS – 2, 4, 6-trinitrobenzen sulfonska kiselina; engl. 2, 4, 6-*Trinitrobenzenesulfonic acid*
TNF– faktor nekroze tumora; engl. *Tumor Necrosis Factor*
UC – ulcerozni kolitis; engl. *Ulcerative colitis*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Lektini	1
1.1.1. Uloga lektina u imunskom sistemu	3
1.1.1.1. Proinflamatorni mehanizam delovanja biljnih lektina.....	5
1.1.1.2. Antiinflamatorni efekti biljnih lektina	6
1.1.2. Lektin Banane.....	6
1.1.2.1. Struktura lektina banane	6
1.1.2.2. Biološka uloga lektina banane	7
1.1.2.3. Rekombinantni Lektin Banane	8
1.2. Limfoidno tkivo u gastrointestinalnom traktu.....	9
1.2.1. Indukcija imunskog odgovora u GALT.....	11
1.2.2. Indukcija tolerogenog imunskog odgovora u GALT.....	12
1.3. Zapaljenske bolesti creva	12
1.3.1. Eksperimentalni modeli IBD	13
1.4. Uloga mikrobiote u patofiziologiji IBD	15
2. Ciljevi rada.....	17
3. Materijal i metode	19
3.1. Rekombinantni banana lektin (rBanLec)	19
3.2. <i>In vitro</i> stimulacija Caco-2 ćelija rBanLec.....	19
3.2.1. LDH test citotoksičnosti rBanLec na Caco-2 ćelijama.....	19
3.2.2. Analiza ekspresije NF- κ B i proizvodnje IL-10 u rBanLec-stimulisanim Caco-2 ćelijama	20
3.2.2.1. Analiza ekspresije gena koji kodira za transkripcioni faktor NF κ B	20
3.2.2.2. Određivanje koncentracije IL-10 u supernatantima Caco-2 ćelija	21
3.3. Eksperimenti na životinjama	22
3.3.1. Višednevni oralni tretman rBanLec	22
3.3.2. Jednokratni tretman rBanLec.....	22
3.3.3. Primena rBanLec kao imunomodulatora u TNBS-izazvanom kolitisu	23
3.3.4. Izazivanje kolitisa TNBS u eksperimentalnim uslovima.....	23
3.4. <i>Ex vivo</i> analize.....	24
3.4.1. Histološka analiza debelog creva	24
3.4.2. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom	24
3.4.3. Merenje aktivnosti enzima mijeloperoksidaze (MPO) u tkivu debelog creva	25
3.4.4. Priprema homogenata debelog creva	26
3.4.5. Određivanje koncentracije proteina.....	26
3.4.6. Određivanje proizvodnje azot oksida	26

3.4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	26
3.4.8. Određivanje koncentracije citokina	27
3.4.9. Izolacija genomske DNK iz fecesa	27
3.5. Statistička obrada rezultata.....	28
4. REZULTATI I DISKUSIJA	29
4.1. Imunomodulatorni efekat rBanLec u GIT C57BL/6 miša u fiziološkim uslovima	29
4.1.1. <i>In vitro</i> analiza uticaja rBanLec na Caco-2 ćelije.....	29
4.1.2. Imunomodulatorni uticaj višednevne oralne primene rBanLec kod C57BL/6 miša	31
4.1.3. Efekat jednokratnog lokalnog tretmana rBanLec na imunski milje u debelom crevu C57BL/6 miša.....	38
4.1.4. Imunomodulatorni efekat rBanLec u GIT u fiziološkim uslovima - diskusija.....	46
4.2. Evaluacija efekta jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu.....	49
4.2.1. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na opšte stanje C57BL/6 miševa tokom TNBS-izazvanog kolitisa.....	50
4.2.2. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na oksidativni status u debelom crevu C57BL/6 miša tokom TNBS-izazvanog kolitisa	53
4.2.3. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša tokom TNBS-izazvanog kolitisa	57
4.2.4. Procena profilaktičkog efekta jednokratne primene rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu- diskusija	59
4.3. Oralna primena rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu	61
4.3.1. Opšte stanje C57BL/6 miševa oralno tretiranih rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa	61
4.3.2. Aktivnost MPO i NO proizvodnja u debelom crevu C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa	64
4.3.3. Citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa.....	66
4.3.4. T ćelije u mLČ C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa.....	68
4.3.5. Oralna primena rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu- diskusija	70
5. Zaključci.....	72
6. Literatura.....	75

1. UVOD

Imunomodulatorni potencijal lektina otvara mogućnost za razvoj novih pristupa u kontroli zapaljenskih bolesti [1]. Trenutni tretmani zapaljenskih bolesti creva (engl. *Inflammatory Bowel Disease*; IBD) su uglavnom bazirani na korišćenju imunosupresivnih lekova kao što su kortikosteroidi, anti-TNF antitela, tiopurini i metotreksat. Korišćenje jakih imunosupresivnih lekova dovodi IBD pacijente u povišen rizik za nastanak kancera i infekcija [2]. IBD pacijenti koji se leče sistemskom kortikosteroidnom terapijom imaju povećan rizik od venske tromboembolije [3]. Dodatno, zbog imunosupresivne terapije, IBD pacijenti često imaju neadekvatan imunski odgovor na vakcinaciju, što ih čini podložnijim bolestima koje se mogu efikasno prevenirati vakcinacijom [4]. S obzirom na ozbiljne neželjene efekte postojećih terapija, očigledna je potreba za razvojem novih i bezbednijih pristupa u tretmanu IBD. Prezentovani rezultati otvaraju vrata novom smeru istraživanja povodom rBanLec i njegovog antioksidativnog i antiinflamatornog potencijala u IBD.

1.1. Lektini

Biljni lektini, drugačije nazvani i fito ili hemaglutinini, su prvi put opisani od strane Petera Hermana Stilmarka 1888. godine [5]. U sklopu svoje doktorske teze, on je izolovao ricin iz semena ricinusa (*Ricinus communis*) i primetio da se izolovani protein vezuje za površinu crvenih krvnih zrnaca i dovodi do njihovog zgrušavanja. Uočeni fenomen je postao predmet istraživanja tek 1898. godine, kada je Elfstrand ovu pojavu nazvao aglutinacija [6]. Ubrzo nakon ovog otkrića, otkiveni su i drugi proteini koji imaju sposobnost aglutinacije eritrocita a nemaju toksične osobine kao što su lektini iz semena mahunarki *Phaseolus vulgaris* (pasulj), *Pisum sativum* (grašak) i *Lens culinaris* (sočivo) [6,7].

Termin lektin (poreklo od latinske reči *legere*, što znači izabrati) je prvi put uveden od strane Boyd i Shapleigh 1954. godine i odnosio se na njihovu sposobnost da prepoznaju i vezuju određene ugljenohidratne strukture [7]. Lektini imaju sposobnost da vezuju ugljene hidrate, a naziv hemaglutinin se odnosi na onu grupu lektina za koju nije poznata ugljenohidratna specifičnost [8]. Imajući u vidu sve osobine lektina, Peumans i Van Dam su predložili definiciju lektina koja ih opisuje kao (gliko)proteine, koji poseduju makar jedan koji može da vezuje specifične mono ili oligosaharide i koji nema katalitičku funkciju [9]. Iako se znanje u ovoj oblasti povećava, ova definicija je prihvaćena i danas. Pored biljaka, lektini su opisani i u životinjskim sistemima i različitim mikroorganizmima [10].

Uzimajući u obzir da je 70-ih i 80-ih godina prošlog veka težište izučavanja lektina bilo pretežno vezano za njihovu karakterizaciju i određivanje specifičnosti prema ugljenim hidratima, usledila je klasifikacija lektina prema specifičnosti za različite saharidne strukture:

1. Glukozu (Glc)/manozu (Man)
2. Galaktozu (Gal) i N-acetil-D-galaktozamin (GalNac)
3. L-fukozu
4. Sijalinsku kiselinu

Prema poreklu lektini se mogu podeliti na:

1. Biljne lektine
2. Životinjske lektine
3. Bakterijske lektine
4. Lektine protozoa
5. Viralne hemaglutinine

Pažljivom analizom genoma i transkriptoma pokazano je da svi lektini mogu biti klasifikovani u 12 porodica. Ova podela je zasnovana na polipeptidnoj sekvenci i strukturi domena koji prepoznaje ugljenohidratne strukture (engl. *Carbohydrate recognition domain*; CRD) (**Tabela 1.**). Različiti CRD

se međusobno razlikuju u sekvencama ali postoji reaktivnost sa sličnim strukturama ugljenih hidrata, što ukazuje da specifičnost nije striktno vezana za pojedinačni CRD [11,12].

Tabela 1. Pregled domena biljnih lektina koji prepoznaju ugljenohidratne strukture [6].

Lektinski Domen	Karakteristika proteina	Specifičnost	Lokalizacija u biljnoj ćeliji
<i>Agaricus bisporus</i> homolog	Homodimer	N-glikan T antigen	Nukleus, citoplazma
Amaranthin domen	Homodimer	GalNAc T antigen	Nukleus, citoplazma
Homolog klasi V hitinaza	Homodimer	Manozom bogati N-glikani	Vakuole
Cijanovirin domen	Homodimer	Manozom bogati N- glikani	Vakuole
<i>Eunymus europaeus</i> lektinski domen	Homodimer	Galaktozidi, Manozom bogati N-glikani	Nukleus, citoplazma Vakuole
<i>Galanthus nivalis</i> aglutinin domen	Heterodimer	Manoza, oligomanozidi, Manozom bogati N-glikani, Kompleksi N-glikana	Vakuole Nukleus, citoplazma
Hevein domen	Heterodimer	GlcNAc	Vakuole, ćelijski zid
Žakalin domen	Heterodimer	Man Galaktoza	Nukleus, citoplazma Vakuole
Domen specifičan za familiju sočiva	Heterodimer	Man/Glc, Gal/GalNAc, fruktoza, Sia α 2,6Gal/GalNAc kompleks N glukana	Vakuole Citoplazma
Lys M domen	Heterodimer	(GlcNAc) _n	Vakuole Nukleus, citoplazma
Nictaba sličan domen	Homodimer	(GlcNAc) _n Manozom bogati N-glukani Kompleks N-glukana	Nukleus, citoplazma
Ricin B-domen	Heterodimer	Gal/GalNAc Sia α 2,6Gal/GalNAc	Vakuole Nukleus, citoplazma

Biljke su najbogatiji izvor lektina, i najčešće su se koristili njihovi vegetativni delovi i semena za izolovanje i analizu ovih molekula [13]. U poslednje dve decenije više pažnje se poklanja biljnim lektinima koji su u manjoj koncentraciji zastupljeni u delovima biljke kao što su list, koren i cvet. Bioinformatička analiza sekvenci svih poznatih lektina je pokazala da su neka ugljenohidrat-vezujuća mesta prisutna u više vrsta organizama (od biljaka i životinja do gljiva i bakterija), dok su druga mesta specifična samo za određenu vrstu biljaka [11]. Velika rasprostranjenost lektina u svim delovima biljke i njihovo prisustvo u biljnom svetu govore koliko ovi proteini imaju važnu ulogu. Jedna od mogućih fizioloških uloga je zaštita od fitopatogenih mikroorganizama, fitofagnih insekata i životinja koje se hrane biljkama [14-16]. Zaista, pokazano je da biljni lektini mogu imati citotoksično dejstvo, kao i toksično dejstvo na gljive, insekte, nematode i na neke više životinje [9,17,18]. Sa aspekta primene, među najbitnije osobine lektina spadaju izražena rezistentnost na enzimsku proteolizu i stabilnost u širokom opsegu pH. Nivo *in vivo* rezistencije lektina na degradaciju enzimima u gastrointestinalnom traktu (engl. *Gastrointestinal Tract*; GIT) je različit. U jednoj studiji u kojoj su eksperimentalne životinje hranjene čistim lektinima, u fecesu je pronađeno preko 90% ingestiranih lektina (konkavalin A, lektini iz biljaka kao što su *Phaseolus vulgaris* i *Galanthus nivalis*) u reaktivnoj formi prema zečjim anti-lektin antitelima [19].

Biljni lektini su klasifikovani u sedam familija proteina koji su srodni i strukturno i evoluciono:

1. Floemski lektini iz familije Cucurbitaceae [20]
2. Hitin-vezujući lektini koji sadrže hevein domen
3. Lektini mahunarki [21]
4. Ribozom-inaktivirajući protein 2 [22]
5. Lektini monokotiledonih biljaka koji vezuju Man
6. Žakalin i njemu slični lektini [23]
7. Familija amarantina

Poslednje tri navedene familije lektina dele slične strukturne karakteristike i poseduju samo sekundarnu strukturu β -nabranih ploča. Familija lektina mahunarki je najdetaljnije izučavana i okarakterisana.

Takođe, na osnovu strukture su definisane četiri klase biljnih lektina [9]:

1. Merolektini - mali monovalentni proteini koji poseduju samo jedno mesto za vezivanje ugljenih hidrata i samim tim ne mogu da aglutinišu eritrocite ili da precipitiraju glikokonjugate
2. Hololektini - lektini koji imaju dva ili više indentičnih mesta za vezivanje ugljenih hidrata, i stoga imaju sposobnost aglutinacije ćelija ili precipitacije glikokonjugata
3. Himerolektini - proteini nastali fuzijom, sadrže jedan domen koji vezuje ugljene hidrate a drugi domen poseduje katalitičku ili drugačiju biološku aktivnost
4. Superlektini - imaju sposobnost da vezuju više različitih ugljenih hidrata

1.1.1. Uloga lektina u imunskom sistemu

U proteklih deset godina, lektini su postali prepoznatljivi kao molekuli koji učestvuju u ćelijskom prepoznavanju u mnogim biološkim sistemima. Lektini ostvaruju različite efekte na ćelije kao što su aglutinacija, mitogena stimulacija, redistribucija komponenti na površini ćelije, modifikacija aktivnosti membranskih enzima, inhibicija rasta bakterija i gljiva, agregacija ćelija, toksičnost i imunomodulacija [24-29]. Lektini sintetisani u sisarskim ćelijama učestvuju u ključnim procesima, uključujući adheziju, mobilizaciju i aktivaciju ćelija, dok egzogeni lektini, poreklom iz biljaka i mikroorganizama, imaju sposobnost da modulišu funkcije sisarskih ćelija [30-35].

Biljni lektini su poznati kao potentni imunomodulatorni posrednici koji ostvaruju efekte i u urođenom i u adaptivnom imunskom odgovoru. Lektini mogu da modulišu proizvodnju citokina i drugih medijatora imunskog odgovora kao što su reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*; ROS) i azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*; RNS) i time poboljšavaju odbranu organizama od patogena [36-38]. Nekoliko biotehnoloških primena je bazirano na interakcijama između lektina i ugljenih hidrata [39,40]. Imunomodulatorna aktivnost biljnih lektina zasniva se na njihovoj interakciji sa glikanima koji su prisutni na površini imunskih ćelija. Takve interakcije dovode do transdukcije signala koja za posledicu ima aktivaciju ćelijskih efektorskih mehanizama [36]. Imunomodulatorni efekat lektina je opisan od strane više autora pri različitim aktivnostima imunskog sistema, uključujući i kontrolu infekcija [36-38,41,42]. Pokazano je da neki lektini mogu da pojačaju proces fagocitoze i proizvodnju citokina u imunskim ćelijama i na taj način ostvare pozitivan imunomodulatorni efekat u kontroli bakterijskih infekcija [29,43].

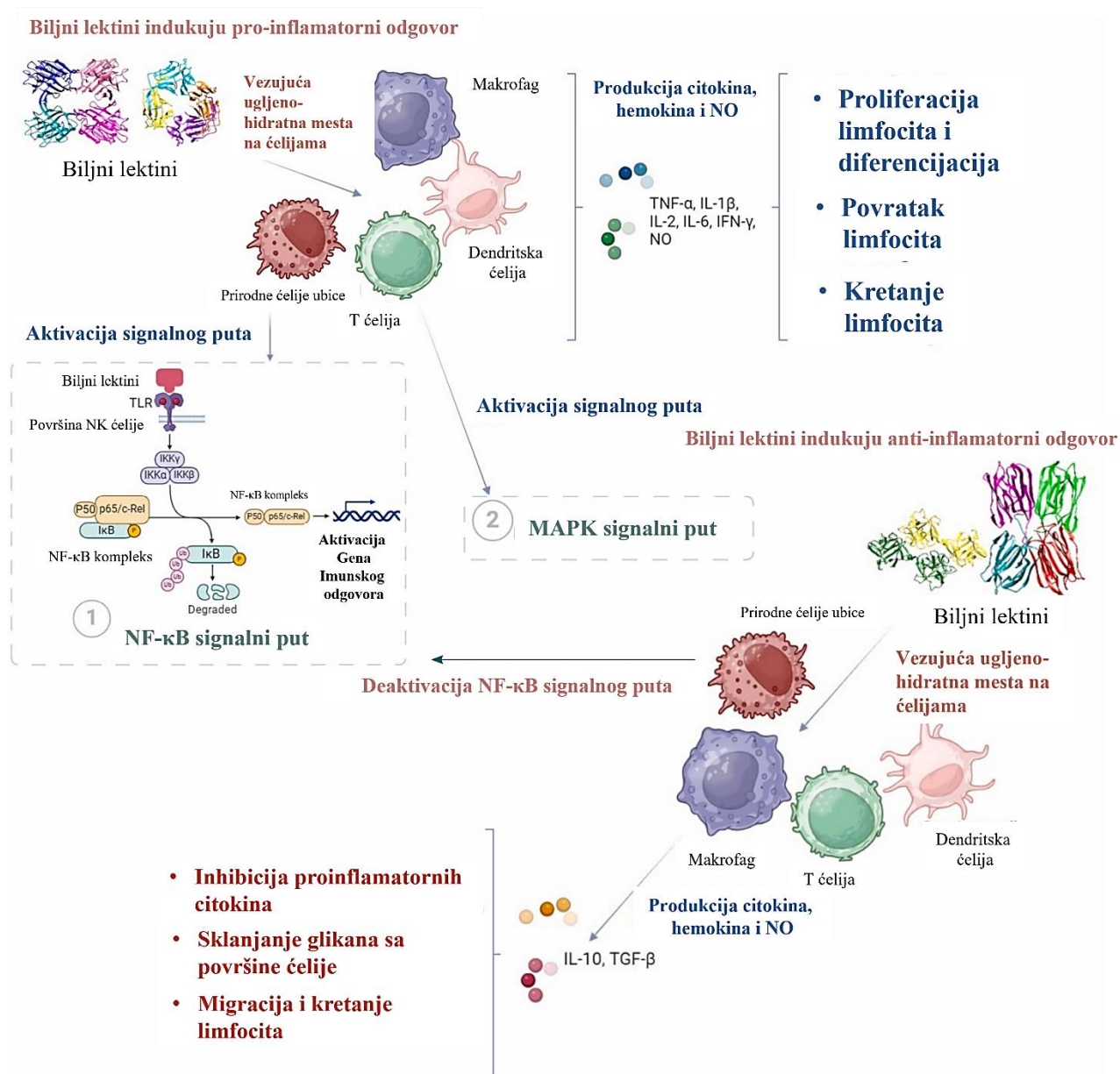
Brojni lektini, kada se konzumiraju u sirovoj formi, mogu da utiču na digestivni sistem i propustljivost mukoze vezujući se za glikokaliks na površini epitelnih ćelija u GIT [44]. Ipak, nemaju svi lektini negativno dejstvo na GIT. Većina biljnih lektina nije zastupljena u visokim koncentracijama u namernicama koje se koriste u ishrani čoveka, i mogu imati pozitivno dejstvo na transport hrane kroz GIT [45]. Primera radi, lektin iz pšenice (*Triticum vulgare*) potpomaže apsorpciju nutritivnih faktora kao što su flavonoidi i kalcijum [46]. Lektini poreklom iz belog luka (*Allium cepa*) stimulišu (i) aktivnost makrofaga koja se ogleda u porastu koncentracije azot-oksida (engl. *Nitrite Oxide*; NO) i ciklooksigenaze-2, (ii) proizvodnju proinflamatornih medijatora, uključujući i citokin faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*; TNF), kao i (iii) proizvodnju interleukina (IL)-10 [47]. Studije na životinjskim modelima su pokazale da se hranjenjem pacova ekstraktom belog luka pojačava njihov imunski odgovor usled povećanja brojnosti ćelija koje u njemu učestvuju i proizvodnje proinflamatornih citokina [48]. Lektini iz familije žakalina imaju imunomodulatorno dejstvo jer stimulišu mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*; PMBC) promovišući njihovu proliferaciju i proizvodnju citokina [49]. Lektin specifičan za N-acetil-D-glukozamin izolovan iz semena *Lonchocarpus araripensis* inhibira migraciju neutrofila indukovanu karagenanom i značajno smanjuje inflamatorni edem šapica kod miša [50]. Lektini mogu uticati na sekreciju inflamatornih medijatora i tako ostvarivati efekat antiinflamatornog agensa [51].

U **Tabeli 2.** su navedeni lektini iz hrane koji ispoljavaju pro- i antiinflamatorne efekte, zajedno sa informacijama o njihovoj molekularnoj strukturi i poreklu.

Tabela 2. Proinflamatorni i antiinflamatorni biljni lektini [52].

Latinsko ime	Familija	Organ biljke iz koje je izolovan	Ime lektina	Specifičnost lektina	Mr (kDa)	Imunomodulatorni odgovor	Tip odgovora	Ref.
<i>Allium cepa</i>	Liliaceae	Lukovica	ACA	Manoza	48	Indukuje: NO, TNF i IL-1, IFN γ i IL-2	Pro-inflamatorni	[47,53]
<i>Allium sativum</i>	Alliaceae	Lukovica	ASAI	Galaktoza/Manoza	25	Indukuje: NO, IFN γ	Pro-inflamatorni	[54]
<i>Alpinia purpurata</i>	Zingiberaceae	Cvast	ASAI i ApuL	Galaktoza/Manoza Fetuin/ovalbumin	34	IFN γ , TNF α , IL-6, IL-17A, NO i IL-10	Pro i Antiinflamatorni	[55]
<i>Arisaema erubescens</i>	Araceae	Lukovica	AEL	Asialofetuin	12	Migraciju neutrofila, proizvodnju NO, prostaglandina i TNF α	Pro-inflamatorni	[56]
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Moraceae	Rekomb.	ArtinM	Manoza	35	β -heksoaminidazu, Aktivaciju mast ćelija TNF α	Pro-inflamatorni	[57,58]
<i>Artocarpus hypargyreus</i>	Moraceae	Plod	AHL	Galaktoza	62.5	IFN γ , TNF α , IL-6, IL-12 i NO	Pro-inflamatorni	[59]
<i>Bauhinia bauhinioides</i>	Fabaceae	Seme	BBL	Galaktoza	28.3	TNF α i IL-1 β i inhibira migraciju neutrofila	Antiinflamatorni	[60]
<i>Canavalia oxyphylla</i>	Fabaceae	Seme	CoxyL	Manoza/glukoza	30	Migracija neutrofila	Antiinflamatorni	[61]
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Fabaceae	Seme	CTL	Manoza/glukoza	27.5	Migracija neutrofila posredstvom TNF α	Pro-inflamatorni	[58]
<i>Clitoria fairchildiana</i>	Fabaceae	Seme	CFAL	Kompleksni šećeri		Migracija neutrofila	Antiinflamatorni	[62]
<i>Colocasia esculenta</i>	Araceae	Lukovica	Tarin	Manozni N-glukan lanac	24.5	Stimulacija B-limfocita, leukopenija	Pro-inflamatorni	[63]
<i>Dioclea wilsonii</i>	Fabaceae	Seme	DwL	Manoza	25.6	Modulacija mast ćelija	/	[64]
<i>Fagopyrum tataricum</i>	Polygonaceae	Seme	TBL	/	65	TNF α , IL-10, IL-12, aktivacija dendritskih ćelija	Pro-inflamatorni	[65]
<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	Seme	WSMoL	Ovalbumin, Azokazein, Asialofetuin	60	TNF α , IL-2, IL-6, IL-10, NO, aktivacija CD8 $^{+}$ T ćelija	Pro-inflamatorni	[66,67]
<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	Pulpa	BanLec	Glukoza/manoza	15	IL-10, IL-17, TNF α , smanjuje IFN γ i IL-6, povećava CD4 $^{+}$ i smanjuje CD8 $^{+}$ T ćelije	Pro-inflamatorni	[68]
<i>Parkia biglobosa</i>	Fabaceae	Seme	PBL	Manoza/glukoza	98	Migracija neutrofila i proizvodnja citokina	Pro-inflamatorni	[69]
<i>Pinellia ternata</i>	Araceae	Lukovica	PTL	/	13	TNF α , IL-1 β , IL-6, ROS	Pro-inflamatorni	[70,71]
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Anacardiaceae	List	SteLL	N-acetil-glukozamin	14	Umanjuje IL-6, MCP-1, TNF α i VEGF	Antiinflamatorni	[72]
<i>Vatairea guianensis</i>	Fabaceae	Seme	VGL	Galaktoza		TNF α	Pro-inflamatorni	[73,74]
<i>Zizyphus oenoplia</i>	Rhamnaceae	Seme	ZOSL	Galaktoza	25	Anti-alergijski, antiinflamatorni	Antiinflamatorni	[66]

Biljni lektini mogu ostvariti i pro i antiinflamatorni efekat u zavisnosti od interakcije sa različitim komponentama imunskog sistema [75]. Oni mogu aktivirati imunske ćelije i stimulirati proizvodnju citokina, pojačavajući odbrambeni mehanizam protiv infekcija i olakšavajući obnavljanje i reparaciju tkiva. Suprotno, lektini mogu imati sposobnost modulacije imunskog odgovora ka redukciji inflamatornog odgovora, suprimirajući prekomernu imunološku aktivnost i promovirajući rezoluciju inflamacije. Ovakva dvojna sposobnost čini biljne lektine „svestranim“ regulatorima imunskog odgovora i zapaljenske reakcije. Na slici se vidi način na koji biljni lektini učestvuju u ovim mehanizmima [52] (**Slika 1.**).



Slika 1. Biljni lektini kao pro i antiinflamatorni agensi [52].

1.1.1.1. Proinflamatorni mehanizam delovanja biljnih lektina

Proinflamatorni imunski odgovor uključuje aktivaciju, regrutovanje imunskih ćelija, proizvodnju citokina i pokretanje različitih molekulskih mehanizama koji učestvuju u borbi protiv infekcija, obnavljanju oštećenog tkiva i odgovoru na povrede [75]. Dok su ovi mehanizmi ključni za odbranu i obnavljanje, nekad mogu dovesti i do hronične inflamacije i oštećenja tkiva ako nisu adekvatno regulisani. Biljni lektini indukuju inflamatorni imunski odgovor putem nekoliko mehanizama. Njihova interakcija sa ćelijama imunskog sistema i aktivacija inflamatornog signalnog puta igra bitnu ulogu u ovom procesu. Lektini se specifično vezuju za ugljenohidratne strukture glikoproteina i glikolipida prisutnih na površini imunskih ćelija kao što su makrofagi, dendritske ćelije (DC) i T ćelije. Ovo vezivanje može da započne ćelijsku aktivaciju i inflamatorni odgovor [76,77] (Slika 1.).

Biljni lektini mogu da aktiviraju signalni put zavisao od nuklearnog faktora kappa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*; NF- κ B), ključnog regulatora inflamatornog odgovora. Aktivacija NF- κ B dovodi do transkripcije gena koji kodiraju proinflamatorne citokine, hemokine i druge medijatore zapaljenske reakcije [78]. Aktivacija imunskih ćelija lektinima dovodi do oslobađanja različitih

proinflammatory citokina, uključujući TNF, IL-1 β , IL-6 i interferon γ (IFN γ). Ovi citokini pojačavaju zapaljenski odgovor regrutujući imunske ćelije i promovirajući dodatnu proizvodnju citokina [79]. Lektini mogu da utiču na pojačanu ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama i leukocitima, promovirajući tako adheziju imunskih ćelija na vaskularni endotelijum i njihovu migraciju u tkiva gde je zapaljenska reakcija prisutna [80]. Vezujući se za specifične šećerne strukture, lektini olakšavaju migraciju leukocita do mesta povrede, doprinoseći inflamatornom odgovoru [76]. Vezivanje lektina može da dovede i do proizvodnje ROS i RNS u imunskim ćelijama. Ovi molekuli igraju ključnu ulogu u eliminaciji patogena, ali takođe, ako se proizvode u većoj količini, doprinose oštećenju tkiva i nekontrolisanom širenju inflamacije [81] (**Slika 1.**).

1.1.1.2. Antiinflamatorni efekti biljnih lektina

Antiinflamatorni mehanizmi podrazumevaju mehanizme kojima se umanjuje proces inflamacije i sprečava preterana zapaljenska reakcija. Ovo uključuje supresiju proinflammatoryh signala, aktivaciju signalnih puteva koji dovode do prekida zapaljenske reakcije i promociju ozdravljenja i obnavljanja tkiva. Antiinflamatorni odgovor je ključan u održavanju homeostaze imunskog sistema, sprečavanju hronične inflamacije i izbegavanju oštećenja tkiva. Biljni lektini, iako često povezivani sa proinflammatorym odgovorom, mogu kroz različite mehanizme ispoljiti i antiinflamatorne efekte. Biljni lektini mogu uticati na povećanje brojnosti regulatornih T ćelija (Treg), što omogućava održavanje imunološke tolerancije i/ili supresiju preterane inflamacije usled pojačane proizvodnje regulatornih citokina kao što su IL-10 i transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor beta*; TGF β) [82]. Takođe, lektini mogu da promovišu polarizaciju makrofaga ka M2 tipu koji ima antiinflamatornu ulogu i pozitivno doprinosi obnovi tkiva [83]. Neki lektini, pored aktivacije, mogu i da inhibiraju NF- κ B signalni put što dovodi do inhibicije transkripcije gena koji kodiraju proinflammatoryne agense [84]. Takođe određeni biljni lektini ispoljavaju antioksidativno dejstvo, redukujući oksidativni stres i inflamaciju, povećavajući aktivnost antioksidativnih enzima i smanjujući proizvodnju ROS [85] (**Slika 1.**).

1.1.2. Lektin Banane

Tokom istraživanja humoralnog imunskog odgovora na različite komponente hrane, Koshte i saradnici su primetili vezivanje IgG4 za ekstrakt banane (*Musa paradisiaca*) [86]. Oni su opisali lektin banane (engl. *Banana Lectin*; BanLec) kao homodimerni protein koji vezuje manozu i oligosaharide koji u svom sastavu poseduju manozu i koji ima funkciju potentnog T-ćelijskog mitogena [87,88]. Kasnije su Peumans i saradnici klonirali i sekvencirali BanLec i potvrdili da se sastoji od dve identične subjedinice veličine 15 kDa koje imaju specifičnost vezivanja manoze. Imajući u vidu homologiju sekvence i predviđanje sekundarne strukture, klasifikovali su BanLec u familiju lektina sličnih žakalinu [89]. Ista grupa naučnika je identifikovala lektine predominantno locirane u pulpi banane (*Musa acuminata L.*) i sirovim zelenim bananama (*Musa spp.*) kao lektine. Identifikacija BanLec dokazuje da se lektini slični žakalinu mogu pronaći i u monokotiledonim vrstama i da su zastupljeni i u višim biljkama [89].

1.1.2.1. Struktura lektina banane

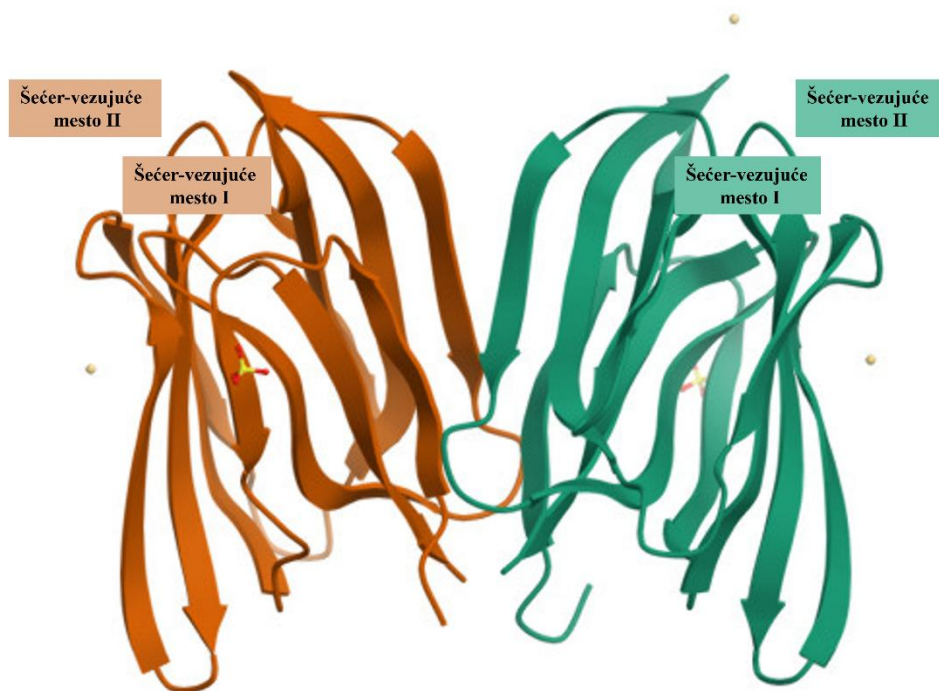
Kao što je ranije pomenuto, BanLec je dimerni protein koji se sastoji od dve identične subjedinice veličine 15 kDa, formirane od polipeptidnih lanaca koji sadrže 141 amino kiselinu. Nakon proizvodnje rekombinantnom DNK tehnologijom i istraživanja njegove strukture molekulskim

modelovanjem, pokazano je da BanLec ima sekvencu sličnu prethodno opisanim lektinima iz familije žakalinu sličnih lektina koji imaju isto savijanje i trodimenzionalnu strukturu [87]. Bazirano na kvaternarnoj strukturi, Raval i saradnici su žakalinu slične lektine klasifikovali u tri grupe [90]:

1. Prva grupa obuhvata žakalin i artokarpin
2. Druga grupa obuhvata kalsepu
3. Treća grupa obuhvata heltubu

Meagher i saradnici su predložili i četvrtu strukturnu grupu žakalinu sličnih lektina, koja bi obuhvatala i BanLec jer njegova kvaternarna struktura sadrži jedinstveni dimer [87]. Dimerni BanLec i kalsepa, tetramerni artokarpin i oktamerna heltuba spadaju u manozno-specifične lektine sa sekundarnim strukturama β -prizme i zaokretom koji zajedno formiraju skoro istu tercijarnu strukturu [91].

Predložena je struktura BanLec u obliku trake (homodimerski protein) [92], gde svaka subjedinica poseduje jedan triptofanski ostatak na poziciji 10. Takođe, svaka subjedinica sadrži dvanaest β ploča koje su raspoređene u formi β -prizma-I-okret. Najvažnije, kristalografijom uz pomoć X zraka je pokazano prisustvo drugog šećer-vezujućeg mesta na subjedinici BanLec. Time je BanLec jedini lektin sa strukturom β -prizma-I-okret koji poseduje više od jednog vezujućeg mesta po subjedinici. BanLec je jako stabilan protein i denaturiše se samo u prisustvu visokih koncentracija haotropnih molekula [93]. Glavni razlog stabilnosti BanLec može biti prisustvo jakih vodoničnih veza u dimeru uz prisustvo vodenih mostova [94] (**Slika 2**).



Slika 2. 3D struktura dimera lektina banane, na kojoj su označena šećer-vezujuća mesta na svakom monomeru (slika preuzeta sa <https://www wwptdb.org/>, pristupni broj 2BMY) [95].

Banana lektin, je manozno-specifičan lektin pulpe banane koji prepoznaje terminalne α -D-manozne/glikozidne grupe, unutrašnje α -1,3-manozne/glikozidne grupe i redukujuće terminalne β -1,3-glukozidne grupe kao što su one koje se pojavljuju u laminarinu, polisaharidu prisutnom u braon algama *Laminaria digitata*. Lektin se vezuje preko primarnog vezujućeg mesta za disaharide koji uključuju manozu ili glukozu na α -1,3 vezi prema neredukujućem kraju [94].

1.1.2.2. Biološka uloga lektina banane

BanLec se u prirodi može naći u više izoformi čija zastupljenost varira među vrstama banane i među kojima postoje diskretne razlike u specifičnosti i strukturi. Time se bar delom može objasniti određeni stepen nekonzistentnosti rezultata istraživanja u kojima su korišćeni BanLec izolovani iz prirodnih izvora [94] (**Tabela 3.**).

Tabela 3. Struktura opisanih BanLec [94].

Naziv	Poreklo	Struktura	Amino kiselinska sekvenca	Ref.
BanLec	<i>Musa paradisiac</i>	Homodimer, 13 kDa subjedinice	-	[86]
BanLec	<i>Musa acuminata L.</i>	Homodimer, 15 kDa subjedinice	141 aminokiselinska ostatka	[89]
BanLec	<i>Musa basjoo</i>	Homodimer, 15 kDa subjedinice	N-terminalna amino kiselinska sekvenca slična lektinima poreklom iz <i>Musa</i> vrste	[96]

BanLec je manozno-specifičan lektin koji ima sposobnost aglutinacije zečijih eritrocita, i ispoljava jaku mitogenu aktivnost prema humanim i mišijim T ćelijama [35,97]. Značaj mitogene aktivnosti BanLec u fiziološkom smislu i u smislu bezbednosti njegove konzumacije u sklopu ishrane je opisan i od strane drugih naučnika [89,98,99]. Takođe, otkriveno je da BanLec ima ulogu u inhibiciji replikacije virusa humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*; HIV). Pokazano je da BanLec ima sposobnost vezivanja manoznih struktura glikolizovanih proteina kapsida HIV-1, uključujući i gp120 protein, čime blokira ulazak virusa u ćeliju domaćina [100].

Lektin izolovan iz Del Monte banane (*Musa acuminata*) stimuliše proizvodnju IFN γ , TNF i IL-2 u mišjim splenocitima i inhibira proliferaciju ćelija leukemije (L1210) i hepato-ćelija (HepG2) [101]. Za razliku od BanLec izolovanog iz „carske“ banane (*Musa basjoo*) koji je *in vitro* stimulisao makrofage da produkuju NO [102], pri stimulaciji lektinom izolovanim iz Del Monte banane porast NO proizvodnje je izostao [101]. Dalje, analizom seruma oralno tretiranih miševa BanLec je pokazano da se na sistemskom nivou menja proizvodnja citokina - smanjuje se proizvodnja IFN γ bez promene u proizvodnji IL-2 [68]. IgG4 antitela specifična za BanLec su takođe detektovana u serumu osoba koje konzumiraju banane u svakodnevnoj ishrani [88,103]. Sekretovana IgG4 antitela pojačano interaguju sa BanLec-1 uspostavljajući međusobnu interakciju koja u potpunosti isključuje interakciju šećer-vezujućeg mesta na lektinu i glikozidnog lanca na IgG4 antitelu. Čak ni prisustvo manoze nije narušilo ove interakcije [88].

1.1.2.3. Rekombinantni Lektin Banane

Rezultati istraživanja u kojima je korišćen BanLec iz prirodnih izvora su povećala interesovanje za ovaj protein, sugerišući njegovu potencijalnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora, uključujući i odgovore na infekcije i kancer [68,94]. Kako bi se dobio preparat BanLec konzistentnih funkcionalnih i strukturnih karakteristika, kao preduslov za njegovu širu primenu, korišćene su mogućnosti koje daje genetski inženjering i proizvedene su različite rekombinantne izoforme BanLec. Rekombinantne izoforme BanLec, iako hemijski i funkcionalno identične, mogu se razlikovati po hidrodinamičnoj zapremini u odnosu na BanLec iz prirodnog izvora, verovatno zbog toga što se rekombinantni BanLec drugačije savija u terciarnu strukturu u poređenju sa nativnim BanLec [104].

Genetskim inženjeringom je proizvedena H84T izoforma BanLec koja ne ispoljava mitogena svojstva ali pokazuje dobar potencijal za primenu u tretmanu virusnih infekcija, poput infekcija influenza A [105], herpes [106] i SARS-CoV-2/MERS-CoV virusima [107]. Taj potencijal se zasniva na imunomodulatornom dejstvu i/ili sposobnosti da blokira ulazak virusa u ćelije domaćina [108,109].

U našim prethodnim istraživanjima [35,110-113], kao i pri izradi ove teze, korišćen je rekombinantni BanLec (engl. *Recombinant Banana Lectin*; rBanLec) koji je proizveden u laboratoriji prof. dr Gavrović-Jankulović [103]. Komplementarna DNK (engl. *complementary DNA*; cDNK) koja kodira rBanLec (dužina 426 nukleotida) dobijena je reverznom transkripcijom RNK izolovane iz

banane *Musa acuminata*, Cavendish, i kloniran u *Escherichia coli*. rBanLec cDNA kodira protein dužine 141 amino kiselina, sa N-terminalnom sekvencom TGAIKVGA [103,113]. Molekulska masa i specifičnost vezivanja šećera rBanLec je uporediva sa prirodnim BanLec (**Tabela 3.**).

rBanLec je viđen kao koristan za primenu u glikoproteomici i kao molekul sa značajnim potencijalom modulacije imunskog odgovora (moćan modulator proliferativnog odgovora populacija PMBC koje ekspimiraju proteine, prema CD (engl. *Cluster of Differentiation*) nomenklaturi označene CD3, CD4, i CD8 [103]. Imunomodulatorna i imunostimulišuća aktivnost rBanLec je pokazana i u *in vitro* i u *in vivo* sistemima, sa identifikacijom receptora sličnog Toll-u 2 (engl. *Toll-like Receptor 2*; TLR2) kao jednog od važnih mesta za vezivanje rBanLec [35,110,111]. Pokazano je i *in vitro* i *in vivo* da rBanLec dozno-zavisno inicira proizvodnju proinflamatornih citokina koju prati i porast proizvodnje regulatornih citokina [110,111]. Efekat rBanLec na proizvodnju ROS i RNS molekula je takođe uočen u *in vitro* sistemu mišjih makrofaga [110]. Dimitrijević i saradnici su sprovedli studiju u simuliranim uslovima GIT gde su zaključili da je rBanLec odličan kandidat za transport baziran na lektinima kroz GIT jer je otporan na dejstvo enzima u GIT [113]. Takođe, pokazano je da rBanLec ima dejstvo mukoznog imunomodulatora *in vivo* u mišu [111,112], gde dolazi do interakcije sa mukoznom površinom koja se može inhibirati prisustvom glukoze [112].

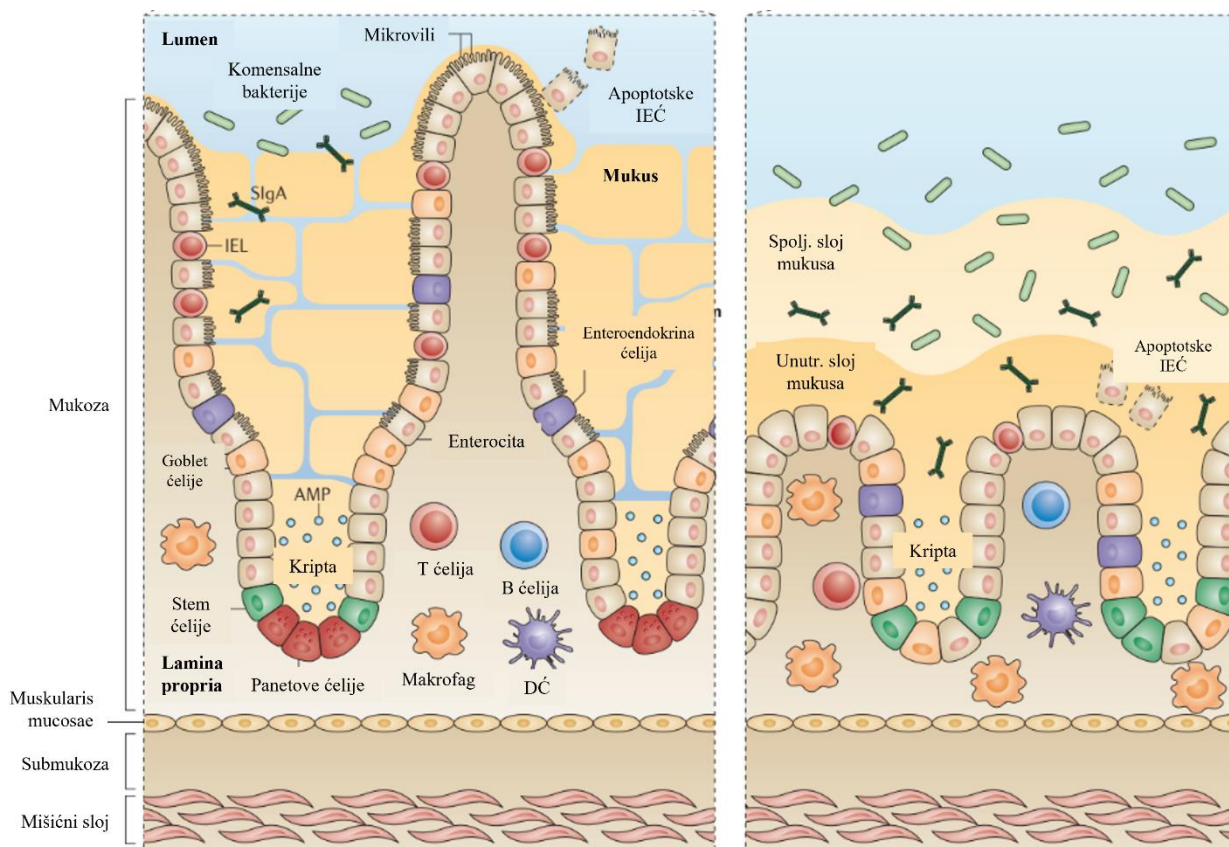
rBanLec i H84T izoforma su korišćeni i za pravljenje himernih molekula koji su potom testirani *in vitro* za potencijalnu primenu u tretmanu alergija na polen breze [108].

1.2. Limfoidno tkivo u gastrointestinalnom traktu

GIT predstavlja jedinstveni organ koji naseljavaju različite komensalne bakterije, dok je istovremeno svakodnevno izložen velikoj količini antigena poreklom iz hrane. GIT poseduje dve uloge – (i) digestija i apsorpcija hranljivih materija poreklom iz hrane i (ii) kompleksna uloga očuvanja homeostaze obezbeđujući ravnotežu između aktivnog i tolerogenog imunskog odgovora na antigene sa kojima dolazi u kontakt. Creva, kao deo GIT, predstavljaju organ sa najbrojnijim imunskim ćelijama u telu, i kontinuirano su izložena širokom spektru antigena i potencijalnim stimulusima imunskog sistema. Sve je više podataka koji idu u prilog tome da komensalne bakterije i hrana utiču na fiziološke i patološke procese u organizmu [114,115].

Intestinalni trakt se sastoji iz više regiona sa različitim anatomskim i fiziološkim karakteristikama [116]. Gornji delovi GIT poseduju vrlo malo limfoidnog tkiva u poređenju sa crevima. Tanko i debelo crevo formiraju kontinuiranu cev koja je prekrivena jednoslojnim epitelom i koja se prostire od kraja želudca do anusa. Tanko crevo je podeljeno na tri segmenta: duodenum (deo tankog creva najbliže želudcu), jejunum i ileum. Debelo crevo počinje cekumom, iza koga redom slede proksimalno debelo crevo, transvenzalno debelo crevo, distalno debelo crevo i rektum, i završava se anusom [116].

Limfoidno tkivo pridruženo GIT (engl. *Gut-associated Lymphoid Tissue*; GALT) čini najveći limfni organ u organizmu i obuhvata tri različita entiteta organizovanog limfoidnog tkiva koji uključuju Pejerove ploče (engl. *Peyer's Patches*; PP), izolovane limfne folikule i mezenterične limfne čvorove (mLČ), kao i difuzno raspoređene imunske ćelije u okviru crevnog epitela i *lamina propriae* [117]. Najveći deo imunoloških procesa se dešava u mukozi koja uključuje epitel, laminu propriu i tanki mišićni sloj ispod lamine proprie. Lamina propria se sastoji od gustog vezivnog tkiva koji pruža potporu resicama i sadrži krvne sudove i nervne završetke. Takođe sadrži i brojne ćelije urođenog i adaptivnog imunskog odgovora. Limfociti se nalaze i u epitelu. Iako su odvojeni samo tankom bazalnom membranom, lamina propria i epitel formiraju dve različite imunološke celine. Ispod mišićnog sloja je vezivno tkivo, submukoza, u kome se nalaze parasimpatički nervni završetci. Na submukozu naleže deblji mišićni sloj, i na kraju seroza koja razdvaja crevo od spoljašnje peritonealne šupljine [116] (**Slika 3.**).



Slika 3. Anatomija intestinalne mukoze i pridruženog imunskog sistema [116].

Intestinalni epitel spada u najveće mukozne površine u organizmu i sastoji se od jednog sloja intestinalnih epitelih ćelija (IEĆ) koji je organizovan u kripe i vile (**Slika 3.**). Epitel intestinuma ima sposobnost da se kontinuirano obnavlja zbog prisustva pluripotentnih intestinalnih epitelih stem ćelija koje se nalaze u samoj bazi kripti. Pored mukusa, IEĆ formiraju glavnu fizičku i biohemijsku barijeru koja razdvaja lumen creva od ćelija u lamini proprii [118]. Iako je njihova primarna uloga apsorpcija nutrijenata, u epitelu intestinuma se nalaze specijalizovane ćelije koje poseduju različite funkcije i igraju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora u GIT [118]. Intestinalnu barijeru čine enterociti, endokrine ćelije, M ćelije, peharaste ćelije i Panetove ćelije koje formiraju prvu liniju odbrane od antigena, toksina, patogena i mikrobiote. Istovremeno, intestinalna barijera je selektivno permeabilna čime se omogućava apsorpcija nutrijenata, elektrolita i vode [119-121].

Specijalizovane ćelije epitela kao što su peharaste ćelije i Panetove ćelije potpomažu u uspostavljanju fizičke barijere sekrecijom mucina i antimikrobnih peptida [118]. Mukus, u zavisnosti od dela GIT, je funkcionalno organizovan tako da učestvuje u prvoj liniji odbrane od mikroorganizama. Mukus u predelu tankog creva je u vidu tanjeg propustljivijeg sloja koji dopušta apsorpciju nutrijenata, dok se mukus koji je prisutan u debelom crevu sastoji od dva sloja od kojih je unutrašnji gušći i neprobojan za bakterije koje se nalaze u lumenu creva [122,123]. Panetove ćelije dalje pojačavaju fizičku barijeru sekretovanjem antimikrobnih proteina uključujući defenzine, katelicidine i lizosome. Sekretorne IEĆ zajedno učestvuju u ograničavanju brojnosti i raznolikosti bakterija koje dolaze u kontakt sa epitelom i mukozom ispod epitela [118].

Sloj vezivnog tkiva koji se nalazi ispod epitela, lamina propria, je deo gde se nalazi najveći deo intestinalnih imunskih ćelija, krvni sudovi, limfni sistem i nervni završetci. Lamina propria je bitno efektersko mesto mukoznog imunskog odgovora i samim tim ima veoma važnu ulogu u sprečavanju ulaska i prolaska patogena ka mukozu, kao i u uništavanju patogena u slučaju infekcije [124,125]. Slobodni limfociti u lamini proprii su uglavnom CD4⁺ T ćelije, CD8⁺ T ćelije, Treg ćelije i B ćelije koje se predominantno diferenciraju u IgA-sekretujuće plazma ćelije [116,124-126]. Lamina propria, pored epitela, predstavlja mesto sa najvećim brojem T ćelija u ljudskom organizmu. Većina ovih limfocita su antigenom aktivirani limfociti, tj. limfociti koji su bili u kontaktu sa antigenom na

induktivnim mestima u organizmu [127]. $CD4^+$ T ćelije koje se nalaze u lamini proprii obuhvataju $IFN\gamma^+$ i $IL-17^+$ pomoćničke T ćelije (engl. *T helper*; Th), kao i $FoxP3^+$ (engl. *Forkhead box P3*) Treg ćelije koje proizvode IL-10. Inverzna korelacija je primećena u broju i rasprostranjenosti Th17 i Treg ćelija u intestinumu miševa, gde broj Th17 značajno opada od duodenuma ka debelom crevu dok su Treg ćelije najbrojnije u debelom crevu [128]. Iako su $CD4^+$ T ćelije koje proizvode IL-10 u velikom broju prisutne u mukozi creva, najbrojnije su u debelom crevu [129]. Proizvodnji IL-10 u tankom crevu jednako doprinose i $FoxP3^-$ i $FoxP3^+$ $CD4^+$ T ćelije, dok su u debelom crevu dominantne IL-10 produkujuće $FoxP3^+$ Treg ćelije [129,130]. Dodatno, u lamini proprii se nalazi bogata mreža ćelija urođene imunosti kao što su DĆ, makrofagi, mast ćelije, eozinofili i limfoidne ćelije urođenog imunskog odgovora [126].

PP koje se tipično nalaze u distalnom ileumu (tanko crevo) smatraju se primarnim mestima indukcije mukoznog imunskog odgovora. PP su organizovane strukture koje se sastoje od velikih folikula B-ćelija sa manjim regijama gde se nalaze cirkulišuće T-ćelije. Sve ćelije neophodne za aktivaciju mukoznog imunskog odgovora su prisutne u PP, uključujući B ćelije, T ćelije, antigenprezentujuće ćelije (APĆ) i makrofage [127]. Za razliku od LČ, PP nisu inkapsulirane i ne poseduju aferentne limfne sudove. Samostalni limfni folikuli su slični PP ali su mnogo manji i nalaze se celom dužinom creva [131].

Limfni čvorovi sačinjeni su od parakorteksa, korteksa i medule, i dom su za veliki broj migrirajućih limfocita [132]. mLČ spadaju u najveće limfne čvorove u organizmu i glavna funkcija im je filtriranje limfne tečnosti poreklom iz creva i inicijacija imunskog odgovora na antigene koji se nalaze u slobodnoj formi ili su pristigli u mLČ uz pomoć DĆ koje su migrirale iz lamine propriae. Pored velikog broja limfocita u mLČ su prisutni i makrofazi, APĆ i u njima dolazi do interakcije APĆ sa naivnim ili aktiviranim limfocitima [132].

1.2.1. Indukcija imunskog odgovora u GALT

Ćelije urođenog imunskog odgovora u koje spadaju neutrofili, makrofazi, DĆ, urođenoubilačke ćelije (engl. *Natural killer cells*; NKĆ), eozinofili, bazofili i mast ćelije, formiraju prvu liniju odbrane u zaštiti organizma od različitih mikroorganizama i parazita. Prepoznavanje patogena dovodi do proizvodnje inflamatornih citokina, hemokina, antimikrobnih peptida, privlačenje drugih ćelija urođenog imunskog odgovora i aktiviranje DĆ [133]. DĆ, nakon kontakta sa molekulskim obrascima patogena i unošenjem antigena, postaju aktivirane potentne APĆ koje zatim migriraju u parakorteks, T ćelijsku zonu u limfnim čvorovima. Nakon dolaska u limfne čvorove, DĆ na svojoj površini, u kontekstu MHCI ili MHCII molekula, prezentuju antigen naivnim T ćelijama i time ih aktiviraju [127,132-134]. $CD8^+$ T ćelije prepoznaju intracelularne peptide prezentovane MHCI klasom molekula, dok $CD4^+$ T-ćelije interaguju sa antigenom prezentovanim u okviru MHC II klase molekula DĆ [135]. $CD4^+$ T ćelije mogu da se diferenciraju, u zavisnosti od karakteristika lokalnog citokinskog miljea, u Th1, Th2, Th17, folikulske Th ili Treg ćelije [127]. Diferencijacija Th1 ćelija je posredovana receptorima za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena uz uticaj IL-12 koga sekretuju DĆ. IL-12 spada u važne proinflamatorne citokine koji aktivira NKĆ i Th1 ćelije da proizvode $IFN\gamma$ i TNF [126,127]. $IFN\gamma$ spada u proinflamatorne citokine koji promovišu proizvodnju ROS i RNS u makrofazima, što ima veoma važnu ulogu u borbi protiv patogena [136]. TNF pomaže u aktivaciji makrofaga i na taj način pomaže u ubijanju intracelularnih patogena fagocitozom [127]. Th17 ćelije koje sintetišu IL-17 i IL-22, imaju važnu ulogu u mukoznom imunskom odgovoru na ekstracelularne patogene [118]. IL-17 pojačava proinflamatorni imunski odgovor tako što promoviše sintezu hemokina u epitelu i tako pojačava dolazak neutrofila u intestinalni trakt. Neutrofili, zahvaljujući svojoj antimikrobnoj funkciji baziranoj na oslobađanju enzima i antimikrobnih peptida, učestvuju u eliminaciji patogena u crevima [137], ali su bitni i u rezoluciji eventualne inflamacije [138,139]. Efektorske $CD8^+$ T ćelije, tj. citotoksični T limfociti, imaju važnu ulogu u odbrani od intracelularnih patogena uključujući, viruse i bakterije, tako što ubijaju inficirane ćelije. Ove ćelije

takođe sekretuju proinflamatorne citokine kao što su TNF i IFN γ , koji doprinose prethodno opisanoj aktivaciji makrofaga [135].

U lamini proprii se nalaze prethodno aktivirane CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije, u vidu dugoživećih memorijskih ćelija, i u kontaktu sa specifičnim antigenima u crevima dolazi do njihovog umnožavanja i aktivacije. Memorijske T ćelije imaju sposobnost da brzo reaguju na ćelije inficirane patogenom i tako spreče dalje širenje infekcije [127].

1.2.2. Indukcija tolerogenog imunskog odgovora u GALT

Imunski sistem u mukozi, iako ima sposobnost da zaštiti, ima veliku ulogu i u indukciji tolerogenog imunskog odgovora [140]. Imunosupresivni mehanizam koji je u osnovi tolerogenog odgovora razvio se kao zaštita od aktivnog imunskog odgovora ili nekontrolisane inflamatorne reakcije na bezopasne antigene hrane ili komensalne mikrobiote. Poremećaj u uspostavljanju tolerogenog imunskog odgovora može dovesti do različitih bolesti kao što su alergije na hranu, celijakija ili IBD [141,142]. Ključnu ulogu u uspostavljanju tolerogenog odgovora (oralne tolerance) imaju CD103⁺ DC koje, nakon preuzimanja antigena u lamini proprii, migriraju u mLČ gde stimulišu diferencijaciju antigen-specifičnih Treg [140]. Neke Treg ćelije imaju sposobnost izlaska iz GIT putem limfne tečnosti i tako promovišu sistemsku toleranciju na određeni antigen [140]. Mikrobnii antigeni koji se transportuju do GALT uz pomoć M-ćelija u epitelu debelog creva, indukuju tolerogeni imunski odgovor bez sistemskog odgovora [140]. Mukozna tolerancija na komensalne mikroorganizme je posredovana Treg ćelijama [141,142].

Na aktivnost DC, iako su centralni regulatori u održavanju homeostaze, utiču i druge imunske ćelije uključujući i epitelne ćelije. IEC proizvode brojne imunomodulatorne medijatore koji pomažu DC da održe tolerogeni odgovor na komensalne bakterije. U ove medijatore spadaju retinoična kiselina i TGF β koji učestvuju u promociji sazrevanja DC i makrofaga sa tolerogenim osobinama i koji dalje sintetišu IL-10 promovišući antiinflamatorni odgovor [118,143]. Ovakve DC promovišu diferencijaciju naivnih CD4⁺ T ćelija u Treg ćelije i sazrevanje B ćelija u IgA-sekretujuće plazma ćelije, doprinoseći tolerogenom imunskom odgovoru [117,144]. DC koje prezentuju antigene iz hrane, sopstvene antigene ili antigene poreklom od komensalnih bakterija, migriraju u mLČ uz pomoć različitih hemokina [144]. Migracija CD103⁺ DC u mLČ smatra se ključnom za održanje tolerogenosti na bezopasne antigene jer su one ključne u promociji umnožavanja, aktivacije i diferencijacije Treg ćelija [145].

Najvažnija T ćelijska populacija koja učestvuje u uspostavljanju tolerogenog imunskog odgovora je populacija Treg ćelija [146,147]. Treg predstavljaju subpopulaciju T ćelija koje imaju supresivnu ulogu i na taj način kontrolišu autoimunost, alergije i infekcije [148]. Treg ćelije su pretežno CD4⁺ i konstitutivno na svojoj površini ekspimiraju CD25 (IL-2 α receptor), citotoksični T-limfocitni antigen-4 (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4*), receptor glukokortikoidima-indukovanog faktora nekroze tumora (engl. *Glucocorticoid-induced TNF receptor*) i transkripcioni faktor FoxP3 [149]. Treg ćelije su po prirodi supresivne, učestvuju u inhibiciji funkcije efektorskih ćelija i *in vitro* i *in vivo*, proizvodeći suprimirajuće medijatore kao što su imunomodulatorni citokini IL-10 i TGF β [144]. Treg ćelije imaju važnu ulogu u patogenezi IBD [148,150]. Pored CD4⁺ Treg ćelija, regulatorne CD8⁺ T-ćelije su opisane kao bitna subpopulacija koja učestvuje u održanju homeostaze u crevima [149] i njihova deficijencija se dovodi u vezu sa nastankom IBD [151]. DC, u odgovoru na TGF β i retinoičnu kiselinu, aktiviraju CD8⁺ Treg ćelije.

1.3. Zapaljenske bolesti creva

IBD su hronično, zapaljensko stanje GIT koje obuhvataju dva glavna klinička entiteta: Kronovu bolest (KB) i ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative colitis*; UC). Učestalost i rasprostranjenost IBD raste globalno, sa najvećom stopom u Severnoj Americi i Evropi [152]. Nekada se smatralo da

IBD predstavljaju problem samo u zemljama zapadnog sveta, ali njihova regionalna učestalost danas ukazuje na globalnu pandemiju IBD. Prethodnih godina visoka učestalost IBD je uočena i u novo-industrijalizovanim zemljama [153]. Iako su u prošlosti KB i UC izučavani zajedno zbog toga što imaju zajedničke karakteristike (simptomi, strukturna oštećenja i terapija) danas je jasno da predstavljaju dva različita patofiziološka entiteta [154]. KB karakteriše transmuralna inflamacija koja može zahvatiti bilo koji deo creva, dok UC uobičajeno zahvata debelo crevo i rektum sa inflamacijom u mukoznom sloju tkiva [155]. I KB i UC su usko povezani sa mnogim patogenim faktorima koji uključuju promene u spoljašnjoj sredini, genski polimorfizam, kvalitativne i kvantitativne promene u mikrobioti creva i poremećaj u imunskom odgovoru. Bez obzira na sve veći broj saznanja o faktorima koji uzrokuju IBD, potpuno razumevanje kompleksne patogeneze IBD još uvek nije postignuto. Kao posledica, aktuelni terapijski postupci imaju određena ograničenja i postoji potreba za njihovim unapređenjem [154].

Na nastanak IBD utiču genetski faktori, sa preko 200 otkivenih lokusa koji su podložni promeni [156]. Određene varijante gena za Nod2, ATG16L1 i IL23R povezuju se sa poremećajem u regulaciji imunskog odgovora i smanjenjem funkcije mukozne barijere u IBD [155]. Mikrobiota creva je takođe značajan faktor - kod IBD pacijenata su zapažene različite promene i disbalans u mikrobiotskoj raznovrsnosti [157].

U odgovoru na mikrobne antigene, urođene imunske ćelije sekretuju proinflamatorne citokine i hemokine kao što je ranije navedeno. Ova pojava regrutuje i aktivira ćelije adaptivnog imunskog odgovora koje imaju ključnu ulogu u nastanku IBD tako što sekretuju proinflamatorne citokine poput IFN γ i IL-17 [158]. Neadekvatan regulatorni imunski odgovor dovodi do perzistentne inflamacije koja je prisutna kod IBD. Regulatorne T i B-ćelije učestvuju u održanju imonološke tolerancije i sprečavaju preteranu inflamaciju. U IBD, disfunkcija ili smanjenje ovih regulatornih ćelijskih populacija doprinosi produženoj zapaljenskoj reakciji i oštećenju tkiva [159]. Promene u intestinalnoj epitelnoj barijeri i mukoznom sloju takođe doprinose nastanku IBD. Poremećaji u proizvodnji proteina koji učestvuju u stvaranju čvrstih veza unutar epitela, sintezi mucina i sekreciji antimikrobnih peptida slabe barijeru, dopuštajući luminalnim antigenima da interaguju sa imunskim ćelijama i aktivirajući zapaljenski imunski odgovor [160]. Kod IBD pacijenata disbalans postoji i na nivou proizvodnja ROS i RNS vs. aktivnost endogenih antioksidativnih enzima kao što su glutathion-S-transferaza (engl. *Glutathione-S-Transpherase*, GST), katalaza (engl. *Catalase*; CAT) i superoksid dismutaza (engl. *Superoxide Dismutase*; SOD), što rezultuje oksidativnim stresom [161].

Zbog toga što je uzrok nastanka IBD preterana i tkivno-razarajuća zapaljenska reakcija u samom zidu creva, regulacija imunskog odgovora ima veliku ulogu u obnavljanju i oporavku oštećene mukoze. U trenutnoj farmakoterapiji se najčešće koriste pristupi kojima se utiče na neutrofile, citokine, adhezivne molekule i ROS/RNS proizvodnju. Terapija najčešće uključuje primenu kortikosteroida, aminosalicilata, imunomodulatora, antibiotika i probiotika, kao i primenu agenasa poput anti-TNF monoklonskih antitela (Infliximab) i rekombinantnih antiinflamatornih citokina, ili specifične genske terapije [155]. Dizajniranje novih ciljno orijentisanih agenasa omogućava uspostavljanje se efikasnijih i manje štetnih pristupa u lečenju IBD, ali su neophodne dodatne eksperimentalne i kliničke studije da bi se potvrdila efikasnost ovih terapijskih pristupa.

1.3.1. Eksperimentalni modeli IBD

Zahvaljujući razvoju novih životinjskih modela, razumevanje mehanizama koji leže u osnovi IBD je značajno napredovalo. Iz rezultata dosadašnjih istraživanja proizilazi da je IBD rezultat konvergencije genetičke osnove, disfunkcije imunskog sistema, spoljašnjih faktora i promena u mikrobioti creva [162]. Zbog multifaktorijalne etiopatogeneze IBD, koriste se različiti životinjski modeli da bi se istražili mehanizmi nastanka bolesti i da bi se razvile potencijalne terapijske strategije.

Životinjski modeli IBD se mogu podeliti na 5 grupa, u zavisnosti od toga na koji način se bolest izaziva:

1. model spontanog kolitisa
2. genetski modifikovan eksperimentalni model
3. model kolitisa izazvan adoptivnim T-ćelijskim transferom
4. model kolitisa izazvan mikrobiotom
5. model hemijski izazvanog kolitisa

Modeli spontanog kolitisa se mogu podeliti na dve podgrupe: model u kome se spontano razvija mukozna inflamacija i model u kojem defekt gena izaziva neodgovarajući mukozni imunski odgovor [163]. Ovaj tip modela predstavlja jedan od korisnijih model sistema za proučavanje zapaljenske reakcije u crevima jer je jako sličan bolesti koja se javlja kod ljudi – bolest se javlja bez i jedne očigledne spoljašnje manipulacije. C3H/HeJBir predstavlja mišji model kolitisa koji se karakteriše spontanom i hroničnom fokalnom zapaljenskom reakcijom u debelom crevu i regionu cekuma [164]. SAMP1/Yit mišji model je odličan eksperimentalni model za proučavanje KB - ozbiljna zapaljenska reakcija se javlja spontano i vrlo je izražena u terminalnom ileumu koji predstavlja primarnu lokaciju lezija u KB [165].

Genetski modifikovan eksperimentalni modeli predstavljaju „knocked-out“ (engl. *Knocked-out*; KO) modele u kojima je postojeći gen inaktivisan i/ili zamenjen veštačkim DNK fragmentom. Ova genska izmena može biti prisutna u svim ćelijama ili, ako je reč o uslovno transgenim životinjama (engl. *conditional transgenic animals*), samo u određenoj populaciji ćelija [166]. Jedan od najpoznatijih modela iz ove grupe su miševi sa IL-10 deficijencijom [167]. Ovim modelom je potvrđen antiinflamatorni potencijal regulatornog citokina IL-10 i njegov značaj u kontroli IBD. Pokazano je da gen koji kodira IL-10 ima važnu ulogu u regulaciji upalnih procesa u crevima, a njegov funkcionalni nedostatak, usled delecije ili mutacije, može doprineti nastanku IBD. IL-10 KO miševi spontano razvijaju kolitis u prva 3 meseca života [168,169].

Modeli kolitisa izazvan adoptivnim T-ćelijskim transferom podrazumevaju indukciju inflamacije creva u imunokompromitovanoj životinji selektivnim transferom određene populacije T ćelija. Primenom ovih modela su otkriveni mnogi imunološki i genetski faktori koji doprinose nastanku IBD i dobijena su nova saznanja o važnoj ulozi T-ćelija u regulaciji mukoznog imunskog odgovora [170].

Model kolitisa izazvan mikrobiotom se zasniva na indukciji bolesti izmenom karakteristika crevne mikrobiote tj. inflamacija creva se indukuje inokulacijom specifičnih bakterija ili bakterijskih mešavina. Podaci dobijeni korišćenjem ovog modela su pokazali značajnu ulogu mikrobiote u inicijaciji zapaljenske reakcije slične IBD [171,172].

Modeli hemijski izazvanog kolitisa se često koriste u istraživanju IBD. Za razliku od prethodno pomenutih, u ovim modelima se za izazivanje IBD koriste hemijski agensi kao što su 2, 4, 6 - trinitrobenzen sulfonska kiselina (engl. *2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid*; TNBS), natrijum dekstran sulfat (engl. *Dextran Sodium Sulphate*; DSS), oksazon, sirćetna kiselina, karagenan i peptidoglikan-polisaharid [173-178]. Modeli hemijski izazvanog kolitisa se često koriste zbog dobre reproducibilnosti i jednostavnog načina izazivanja bolesti [179].

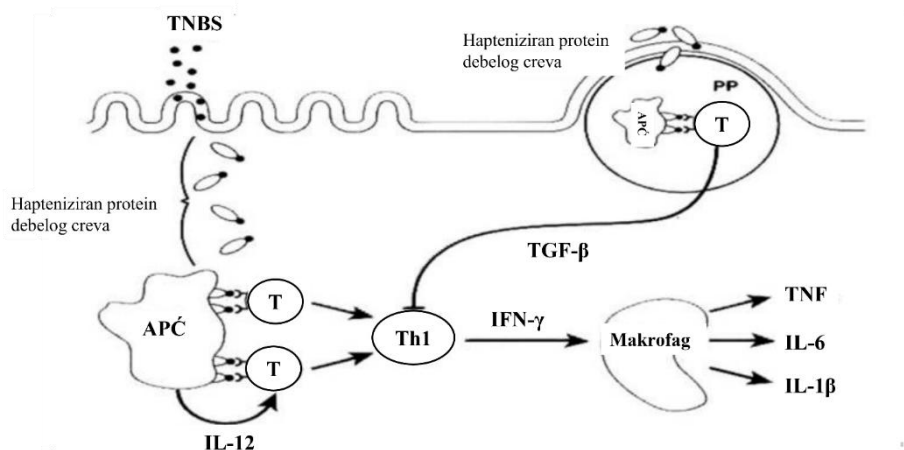
1.3.1.1. Životinjski model kolitisa izazvanog TNBS

Životinjski model kolitisa izazvanog TNBS se široko primenjuje za proučavanje imunoloških aspekata kolitisa i u prekliničkim ispitivanjima budući da simptomi koji se javljaju nakon tretmana TNBS (jednokratna intrarektalna aplikacija) jako liče na simptome KB [180].

Eksperimentalno, TNBS se primenjuje intrarektalno u vidu etanolno/vodenog rastvora. Etanol, pored uloge rastvarača, potpomaže nastanak intestinalne inflamacije tako što narušava epitelnu barijeru mukoze [180]. Pored miševa SJL/J soja koji su veoma osetljivi na izazivanje kolitisa TNBS, koriste se i miševi sojeva BALB/c i C57BL/6.

Intrarektalna primena TNBS miševima indukuje tzv. transmuralni kolitis koji je većinski posredovan Th1 imunskim odgovorom [162]. Karakteriše ga lokalna masivna infiltracija T ćelija, neutrofila i makrofaga u laminu propriu, kao i specifična klinička slika (dijareja, gubitak na telesnoj težini i prolapsom rektuma) [181]. TNBS takođe indukuje značajne promene u morfologiji i mehaničkim osobinama mišićnog sloja distalnog debelog creva, i na taj način dovodi do pojave patologije slične UC [182]. Do infiltracije inflamatornih ćelija dolazi u roku od 2h nakon administracije TNBS, ali tipični znaci inflamacije se razviju posle 48h [182].

TNBS je mali haptenezirajući molekul koji po svojim svojstvima nije antigen, ali vezujući se za proteine domaćina čini ih imunogenim i tako indukuje imunski odgovor. TNBS je derivat pikrinske kiseline koji uz pomoć trinitrofenil grupe haptenezuje autologne proteine debelog creva indukujući IL-12 posredovan Th1 T-ćelijski transmuralni kolitis [183] (Slika 4.).



Slika 4. Šematski prikaz mehanizma delovanja 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kiseline u nastanku zapaljenske reakcije u debelom crevu [184].

1.4. Uloga mikrobiote u patofiziologiji IBD

Mikrobiota kod ljudi obuhvata između 10-100 triliona mikroorganizama uključujući bakterije, viruse, protozoe i gljive. Bakterije su najzastupljenije u crevnoj mikrobioti, sa brojem i do 10^{11} - 10^{12} ćel/mL. Više od 99% bakterija u crevima pripada redovima *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteus* i *Actinomycetes*, gde su kod zdravog domaćina najrasprostranjenije bakterije iz reda *Firmicutes* i *Bacteroides* [185]. Preko 1000 vrsta bakterija u GIT ima značajnu ulogu u obezbeđivanju homeostaze domaćina, utičući na ishranu, imunski odgovor, metabolizam i kontrolu patogena [185]. Dobroćudne bakterije u crevima mogu imati imunosupresivnu ulogu regulišući aktivnost imunskih ćelija domaćina [185], dok štetne bakterije mogu indukovati proizvodnju inflamatornih citokina od strane imunskih ćelija ili njihovi metaboliti mogu promovisati oštećenje epitela creva [186].

Sastav i raznolikost mikrobiote u crevima su važni faktori koji utiču na nastanak IBD [187]. Sastav mikrobiote creva se može promeniti i u ranim fazama bolesti. Promene u sastavu mikrobiote kod pacijenata sa IBD su veće nego kod zdravih individua [188]. Neke studije su pokazale da je stepen disbalansa u sastavu mikrobiote veći kod pacijenata sa KB nego kod pacijenata sa UC [185]. U poređenju sa zdravim osobama, nivoi *Bifidobacterium*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis*, i drugih dobroćudnih bakterija su značajno niži, dok je relativna zastupljenost štetnih bakterija povišena u crevnoj mikrobioti IBD pacijenata [189].

Pojačana sinteza antitela i T-ćelijski odgovor na mikrobne antigene su česti kod pacijenata sa IBD [190]. Crevna mikrobiota može da indukuje diferencijaciju Th17 ćelija u lamina propriu, koje će sekrecijom IL-17 i IL-22 dalje promovisati inflamaciju. Bakterije crevne mikrobiote takođe imaju sposobnost aktivacije Treg ćelija [191]. Kolonizacija creva bakterijom *Clostridium* spp. je rezultovala povećanjem FoxP3⁺ Treg ćelija [192].

Veza između nastanka IBD i disbalansa mikrobiote je kompleksna i nije samo uzročno-posledična [193]. Ishrana ima ključnu ulogu u oblikovanju sastava mikrobiote i može regulisati simptome IBD. Ishrana ostvaruje višestruki efekat. Prvo, neki tipovi ishrane mogu da promene sastav intestinalnog mikrookruženja i metaboličke funkcije, indirektno utičući i na funkciju imunskog sistema u crevima. Drugo, neke komponente iz hrane mogu direktno uticati na barijeru epitela creva i indukovati poremećaj u urođenom imunskom odgovoru mukoze.

2. CILJEVI RADA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je imunomodulatorni uticaj rBanLec u GIT C57BL/6 miševa, uključujući uticaj pri različitim režimima primene u fiziološkim uslovima i uticaj primene tokom lokalno uspostavljenog inflamatornog procesa, kako bi se stekao uvid u mogućnost primene rBanLec u kontroli zapaljenskih bolesti creva.

Osnov za ispitivanje imunomodulatornog efekta rBanLec u GIT, kao preduslova za njegovu primenu u kontroli zapaljenskih bolesti creva, proizilazi iz rezultata koji pokazuju:

1. da je rBanLec stabilan u uslovima GIT [113]
2. da rBanLec ima sposobnost vezivanja za mukozni epitel creva i prolazi do limfoidnog tkiva pridruženog crevnoj mukozi [112]
3. da rBanLec *in vitro* modulise funkcije izolovanih APC i efektorskih ćelija imunskog sistema [35,110]
4. da rBanLec promoviše balansiran proinflamatorni odgovor u debelom crevu BALB/c miša [111]

Preduslov za bezbednu široku primenu određene bioaktivne supstance je, između ostalog, sticanje detaljnog uvida u fine specifičnosti imunskog odgovora koji ona pokreće. S obzirom da imunski odgovor na određeni stimulus nije nužno jednoznačan u organizmima sa različitom genetskom osnovom, kao i da su dosadašnja ispitivanja imunomodulatornog potencijala rBanLec u fiziološkim uslovima dominantno rađena u miševima BALB/c soja [111], istraživanja u okviru ove disertacije biće rađena na miševima C57BL/6 soja. Kako bi se stekao uvid u mogućnost primene rBanLec u kontroli zapaljenskih bolesti creva, istraživanje je podeljeno u tri faze čiji su ciljevi bili:

1. Analiza imunomodulatornog uticaja rBanLec u GIT u fiziološkim uslovima

U okviru prve faze, imunomodulatorni uticaj rBanLec će biti analiziran (i) *in vitro* u kulturi Caco-2 ćelija, često korišćenom model sistemu za izučavanje funkcija crevnog epitela, i (ii) *in vivo* u C57BL/6 miševima (iia) nakon višednevne oralne primene i (iib) nakon jednokratne primene. Pored analize bezbednosti primene rBanLec, *in vivo* eksperimenti će uključivati analizu uticaja specifičnih rBanLec tretmana na imunološke parameter u limfoidnom tkivu pridruženom GIT, kao i analizu uticaja višednevne oralne primene rBanLec na crevnu mikrobiotu.

2. Analiza efekata jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu

Drugim setom eksperimenata će biti utvrđeno u kojoj meri funkcionalne karakteristike lokalnog imunskog miljea uspostavljenog nakon jednokratnog tretmana rBanLec utiču na indukciju, težinu i tok TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu. Imajući u vidu istraživanja na BALB/c miševima gde je pokazano da rBanLec pokreće dinamične promene u limfoidnom tkivu pridruženom GIT i da se razlikuju karakteristike lokalnog imunskog miljea uspostavljenog 24h i 48h nakon tretmana [111], biće analizirani efekti jednokratnih tretmana različitim dozama rBanLec urađenim 24h ili 48h pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa. Opšte stanje životinja i karakteristike imunskog miljea u debelom crevu biće analizirani u piku bolesti i tokom faze oporavka.

3. Analiza efekata primene rBanLec kao imunomodulatora u TNBS-izazvanom kolitisu u C57BL/6 mišu

Treći set eksperimenata će biti fokusiran na evaluaciju imunomodulatornog efekta rBanLec oralno apliciranog tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu. rBanLec, u različitim koncentracijama, biće oralno primenjivan na dnevnoj bazi. Opšte stanje životinja i karakteristike imunskog miljea u debelom crevu biće analizirani u piku bolesti i tokom faze oporavka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Rekombinantni banana lektin (rBanLec)

Za *in vitro* i *in vivo* ispitivanja prikazana u ovoj disertaciji korišćen je rBanLec proizveden rekombinantnom DNK tehnologijom u *E. coli* SG13009 [pREP4] transformisanoj ekspresionim vektorom pQE70 (QIAGEN, Hilden, Germany) koji sadrži BanLec-kodirajući segment (GenBank accession number EU055641). BanLec-kodirajući segment dobijen je reverznom transkripcijom totalne RNK iz ploda banane (*Musa acuminata*, Cavendish) i amplifikacijom cDNK u prisustvu specifičnih prajmera [103]. Proizvodnja i prečišćavanje je urađena po protokolu opisanom u radu Gavrović-Jankulović et al. [103]. Ukratko, rBanLec je proizveden kao 6His-tagovana varijanta u soju *E. Coli* SG12009. Proces prečišćavanja sastojao se od hromatografije afiniteta na imobilisanim metalnim jonima (elucija sa 0,25 M imidazolom), nakon čega je usledila afinitetna hromatografija na Sephadex G-50 koloni (elucija sa 0,5 M glukozom), korišćenjem komercijalno dostupnih kolona (Pharmacia, Upsala, Švedska). Oba hromatografska koraka bila su praćena dijalizom u odnosu na PBS. Svi rastvori rBanLec su testirani na prisustvo endotoksina LAL testom (engl. *Limulus Amoebocyte Lysate*, Charles River Laboratories, Vilmington, SAD). Sadržaj endotoksina bio je manji od 0,5 ng/mL a čistoća je proverena elektroforezom (zabeležena je jedna proteinska traka na približno 15 kDa).

3.2. *In vitro* stimulacija Caco-2 ćelija rBanLec

In vitro analize efekata stimulacije rBanLec rađena su u kulturi Caco-2 ćelija (engl. *human Colorectal Adenocarcinoma Cells*; Caco-2). Caco-2 je humana epitelna ćelijska linija izvedena iz uzorka kolorektalnog adenokarcinoma. Caco-2 ćelije su gajene u DMEM medijumu (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; DMEM) suplementiranim sa 10% FCS (engl. *Fetal calf serum*) i antibioticima (1% penicilin / streptomycin), sa i bez rBanLec koji je korišćen kao stimulator. Sve inkubacije su rađene na 37°C, 5% CO₂.

3.2.1. LDH test citotoksičnosti rBanLec na Caco-2 ćelijama

Laktatdehidrogenaza (engl. *Lactate Dehydrogenase*; LDH) test je metoda koja se koristi za analizu citotoksičnosti supstanci. Bazira se na merenju aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze u supernatantu kulture ćelija stimulisanih supstancom koja se testira. Enzim se detektuje u supernatantu ukoliko dođe do smrti ćelija usled čega se ćelijski sadržaj oslobađa u supernatant. Za određivanje citotoksičnosti rBanLec korišćen je LDH Cytotoxicity kit II (BioVision, Milpitas, SAD).

Caco-2 ćelije u DMEM su zasejane u ploču od 96 bunara (MaxiSorp; Nunc, Roskild, Danska) u gustini od 40 000 ćelija po bunaru. Ćelije su inkubirane 24h na 37°C/5% CO₂. Nakon toga su ćelije stimulisane rBanLec rastvorenim u suplementiranom DMEM medijumu (finalne koncentracije rBanLec 0,1 µg/mL, 1 µg/mL i 10 µg/mL) u trajanju od 2, 24 i 48h na 37°C/5% CO₂. Pored toga, pod istim uslovima su inkubirane i Caco-2 ćelije u suplementiranom DMEM medijumu koje su korišćene kao kontrole - negativna kontrola (Clow) i kontrola maksimalne količine LDH koja se oslobađa iz navedenog broja ćelija (Chigh). Neposredno pre uzorkovanja supernatanta, u bunare za Chigh kontrolu je dodat rastvor za lizu ćelija (10 µl po bunaru) koji je sastavni deo seta.

U naznačenim vremenskim tačkama je uzeto 10 µl supernatanta inkubiranih ćelija i prebačeno u novu ploču od 96 bunara. U bunare je potom dodat LDH pufer koji je sastavni deo kita (100 µl po

bunaru). Takođe, pozitivna kontrola (PK) testa koja je sastavni deo kita je istovremeno procesuirana prema uputstvu proizvođača. Ploča je inkubirana 30 min u mraku i apsorbanca je očitana na 450 nm i na 650 nm kao referentnoj talasnoj dužini ($A_{450/650}$).

3.2.2. Analiza ekspresije NF- κ B i proizvodnje IL-10 u rBanLec-stimulisanim Caco-2 ćelijama

Caco-2 ćelije su zasejane u ploče od 24 bunara u gustini od $1,5 \times 10^5$ ćelija po bunaru i ostavljene preko noći na 37°C u inkubatoru. Sutradan su ćelije stimulise različitim koncentracijama rBanLec (0,1 μ L/mL, 1 μ L/mL, i 10 μ L/mL) pripremljenim u suplementiranom DMEM medijumu i inkubirane 24h ili 48h na 37°C, 5% CO₂. Kao negativna kontrola su korišćene nestimulise Caco-2 ćelije koje su inkubirane u suplementiranom DMEM medijumu pod istim uslovima. Supernatanti stimulisanih Caco-2 ćelija su korišćeni za analizu proizvodnje citokina, dok su ćelije korišćene za analizu ekspresiju gena koji kodira za transkripcioni faktor NF- κ B.

3.2.2.1. Analiza ekspresije gena koji kodira za transkripcioni faktor NF κ B

Ekspresija gena za transkripcioni faktor NF- κ B analizirana je metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*, qPCR), kombinovanom sa reverznom transkripcijom (engl. *Reverse Transcription*, RT). Kao matrica za amplifikaciju NF- κ B gena u qPCR korišćena je cDNK generisana RT. Određivanje ekspresije NF- κ B u rBanLec-stimulisanim ćelijama obuhvatalo je sledeće korake:

a) Izolovanje RNK iz Caco-2 ćelija

Izolacija RNK molekula urađena je prema uputstvu definisanim od strane proizvođača korišćenjem kompleta za izolaciju RNK (RNeasy Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Nemačka). Postupak izolacije i prečišćavanja RNK urađen je na koloni sa membranom koja selektivno adsorbuje nukleinske kiseline (RNA Purification column, Qiagen, Hilden, Nemačka), koristeći rastvore koji ulaze u sastav kompleta. Ćelije su prebačene u mikrotube u koje je dodato 400 μ L RLT pufera i vorteksovane 5 min. Nakon vorteksovanja, na ćelije je dodato 400 μ L 70% rastvora etanola radi grube ekstrakcije nukleinskih kiselina. Uzorak (700 μ L) je nanet na kolonu, koja je zatim zajedno sa mikrotubom centrifugirana na 9500 x g, 15s, a eluat je odbačen. Nakon toga je usledilo ispiranje zaostalih molekula koji ne pripadaju molekulu RNK korišćenjem pufera za ispiranje iz kita prema uputstvu proizvođača (700 μ L RW1 pufera), 15 s na 9500 x g; 2 x 500 μ L RPE pufer, 2 min na 9500 x g. Na ispranu kolonu je potom naneto 25 μ L vode koja ne sadrži RNaze (engl. *Rnase-free water*) i RNK je eluirana centrifugiranjem (1 min, 9500 x g) u novu tubu. Ovako izolovana RNK je stavljena na -80°C do dalje analize.

b) Reverzna transkripcija

Uzorci izolovane RNK (3 μ g) su tretirani DNazom (3 μ L) pripremljenom u 2,4 μ L odgovarajućeg pufera (engl. *DNase buffer*) kako bi se uklonili tragovi DNK molekula (30 min, 37°C). Nakon toga, aktivnost DNaze je prekinuta dodatkom 2,4 μ L 50 mM EDTA (10 min, sobna temperatura). Količina izolovane RNK određena je spektrofotometrijski aparatom NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Valtam, SAD). Reakcija reverzne transkripcije urađena je uz upotrebu kompleta pod nazivom ThermoScript Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Valtam, SAD) prema

preporukama proizvođača. Prethodno pripremljen rastvor (50 μ M oligo(dT) prajmera, 5 x cDNA pufer za sintezu, 10 mM dNTPs, 40 U/ μ L RNase Out i 15 U/ μ L ThermoScript RT) pomešan je sa uzorkom koji sadrži RNK u zapreminskom odnosu 1:1. Ova reakciona smeša je prvo inkubirana 10 min na 24°C, zatim 50 min na 55°C i finalno 5 min na 85°C. Uzorak koji sadrži cDNK je zamrznut na -20°C do dalje upotrebe.

c) qPCR

Ekspresija gena za transkripcioni faktor NF- κ B kvantifikovana je qPCR metodom praćenom komparativnom ddCt analizom [194]. NF- κ B gen iz pripremljene cDNK je umnožen korišćenjem Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipsvič, SAD) i odgovarajućih prajmera (**Tabela 4.**). Komponente reakcione smeše su prikazane u **Tabeli 5.** Kao referentni, za normalizaciju ekspresije NF- κ B gena korišćen je GAPDH (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) gen.

Tabela 4. Sekvence prajmera korišćene za RT-PCR

Ciljni gen	Prajmeri
NF- κ B	Forward: 5'-CTGAACCAGGGCATACCTGT-3'
	Reverse: 5'-GAGAAGTCCATGTCCGCAAT-3'
GAPDH	Forward: 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'
	Reverse: 5'-GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'

Tabela 5. Reakciona smeša za PCR

Komponente	Reakciona smeša (do 20 μ L)
Luna Universal qPCR Master Mix	10 μ L
Forward primer (10 μ M)	0,5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0,5 μ L
Template DNA	1 μ L
Voda bez nukleaza	6 μ L

qPCR je izveden na aparatu Rotorgene 3000 (Corbett Life Science, Mortlejk, Australija) po sledećem termalnom profilu:

- 50°C 2 min, 1 ciklus
- 95°C 5 min, 1 ciklus
- 95°C 10 s / 64°C 30 s / 72°C 30 s, 40 ciklusa

Svi uzorci su analizirani u triplicatu.

3.2.2.2. Određivanje koncentracije IL-10 u supernatantima Caco-2 ćelija

Određivanje koncentracije IL-10 u supernatantima Caco-2 ćelija rađeno je ELISA testom. U bunare mikrotitarskih ploča od 96 bunara (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark) naneto je monoklonsko antitelo specifično za humani IL-10 (BioLegend, San Dijego, SAD). Nakon prekonoćne adsorpcije antitela na 4°C, bunari su zasićeni rastvorom 1% BSA/PBS (2h na sobnoj temperaturi), u cilju izbegavanja nespecifičnog vezivanja. Nakon saturacije, kao i nakon svakog narednog koraka inkubacije, bunari su isprani rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 μ L/ bunar). U narednom koraku su naneti nerazblaženi uzorci (supernatanti kultura stimulisanih i nestimulisanih Caco-2 ćelija) i standard citokina u serijskim razblaženjima (1h, sobna temperatura). Potom je u bunare dodato odgovarajuće anti-humano IL-10 antitelo obeleženo biotinom (BioLegend, San Dijego, SAD) pripremljeno u 1% BSA/PBS i inkubirano 1h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, u bunare je nanet rastvor extraAvidin-peroksidaze pripremljene (Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD) pripremljene u 1% BSA/PBS (1h na sobnoj temperaturi). Za detekciju je korišćen rastvor enzimskog

supstrata TMB (engl. 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine, eBioscience, San Dijego, SAD). Nakon prekidanja enzimske reakcije dodatkom 1M fosforne kiseline, očitana je apsorbanca na 450 nm (A₄₅₀)(Multiscan Ascent, Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD).

3.3. Eksperimenti na životinjama

Za sve eksperimentalne protokole rađene na životinjama, na osnovu zahteva koji je uputila Etička komisije za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, dobijena je dozvola Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (dozvole br. 323-07-01577/2016-05/11 i br. 323-07-12928/2022-05/2). Eksperimenti su dizajnirani u skladu sa principom 3R (engl. *Replace, Reduce and Refine*). Princip 3R promoviše primenu alternativnih *in vitro* metoda testiranja u cilju smanjenja upotrebe životinja u istraživanjima, kao i sprovođenje istraživanja na način koji izaziva najmanju moguću neprijatnost kod životinja. U svim ispitivanjima su korišćene ženke C57BL/6 miševa, starosti između 8-10 nedelja, težine 20 ± 2 g, koje su gajene u kontrolisanim uslovima vivarijuma Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Sve životinje su pre početka eksperimenta bile nedelju dana u izolaciji, kada je njihovo opšte zdravstveno stanje kontrolisano od strane stručnog osoblja Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. Tokom perioda izolacije i izvođenja eksperimenta životinje su čuvane u kontrolisanim uslovima (21°C, 12 h svetlost/mrak ciklus) i sa pristupom hrani i vodi *ad libitum*. Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom (20 µL/g telesne mase) mešavinom ketamina (10 mg/mL) i ksilazina (1 mg/mL) u PBS, a zatim im je intrarektalno aplikovan rastvor rBanLec (100 µL), TNBS ili 50% etanola kateterom dužine 4 cm. U zavisnosti od eksperimenta, životinje su posle određenog vremenskog perioda žrtvovane cerebralnom dislokacijom radi uzimanja bioloških uzoraka (debelo crevo, slezina, mLČ) za dalje analize.

3.3.1. Višednevni oralni tretman rBanLec

Višednevni oralni tretman podrazumevao je svakodnevnu oralnu aplikaciju, pomoću sonde, 100 µL rastvora 100 µg/mL rBanLec/PBS tokom 30 dana. Dnevna doza rBanLec koju su dobijali miševi tokom ovog tretmana ekvivalentna je dozi BanLec koju bi odrastao čovek, telesne težine 60 kg, uneo konzumacijom polovine banane dnevno [195]. Pored miševa koji su svakodnevno hranjeni rBanLec (rBL grupa, n = 5), formirana je i kontrolna grupa (zdravi miševi odgovarajuće starosti; NK grupa, n = 5) kojoj je svakodnevno, pomoću sonde, oralno aplicirano 100 µL PBS.

Životinjama je merena telesna težina (TT) pre početka (dan 0), na polovini (dan 15) i na kraju (dan 30). Na kraju tretmana (dan 30) sakupljeni su uzorci fecesa koji su korišćeni za analizu sastava mikrobiote. Nakon eutanazije (cervikalna dislokacija, dan 30) uzeti su biološki uzorci za dalje analize: debelo crevo (pogledati 3.4.1, 3.4.3, 3.4.7. i 3.4.8.), slezina (pogledati 3.4.2.), mLČ (pogledati 3.4.2.) i feces (pogledati 3.4.9.).

3.3.2. Jednokratni tretman rBanLec

Pre primene rBanLec miševima nije davana hrana tokom noći, dok je pristup vodi bio neograničen. Koncentracije rastvora rBanLec koje su aplicirane intrarektalno bile su 0,1 µg/mL rBanLec/PBS (doza 0,5 µg rBanLec/kg TT), 1 µg/mL rBanLec/PBS (doza 5 µg rBanLec/kg TT) i 10 µg/mL rBanLec/PBS (doza 50 µg rBanLec/kg TT). Posle intrarektalnog tretmana sve životinje su držane u vertikalnom položaju oko 2 minuta kako bi se sprečilo izlivanje rastvora rBanLec/PBS.

Jednokratni tretman je primenjivan:

- a) kako bi se ispitala dinamika promena u GALT nakon stimulacije određenom dozom rBanLec u fiziološkim uslovima
Miševi su raspoređeni u grupe koje su tretirane definisanom dozom rBanLec i eutanazirani 24h (0.1rBL24, 1rBL24 i 10rBL24; n = 5) ili 48h (0.1rBL48, 1rBL48 i 10rBL48; n = 5). Zdravi miševi odgovarajuće starosti koji nisu tretirani rBanLec (n = 5) su bili referentni. Nakon eutanazije uzeti su biološki uzorci za dalje analize: debelo crevo (pogledati 3.4.3, 3.4.4, 3.4.6. i 3.4.8.) i mLČ (pogledati 3.4.2.).
- b) kako bi se ispitao profilaktički uticaj jednokratne primene rBanLec u definisanoj dozi
Profilaktički efekat jednokratne primene rBanLec je ispitan u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu (poglavlje 4.2.). Eksperimentalni kolitis je izazvan 24h ili 48h nakon jednokratnog tretmana definisanom dozom rBanLec (dan 0). Na osnovu doze rBanLec i vremena izazivanja eksperimentalnog kolitisa miševi su podeljeni u grupe 24rBL0.1, 24rBL1, 24rBL10, 48rBL0.1, 48rBL1 i 48rBL10 (n = 14). Kao referentne, formirane su grupa miševa odgovarajuće starosti kod kojih je eksperimentalni kolitis izazvan bez rBanLec pretretmana (PK grupa, n = 14) i grupa kojoj nije izazvan eksperimentalni kolitis niti je tretirana rBanLec (NK grupa, n = 14). Polovina svake grupe (nasumičan izbor) je žrtvovana u piku bolesti (dan 2) i u fazi oporavka (dan 7). Životinje su praćene svakog dana i tokom tog perioda praćene su promene telesne težine. Nakon eutanazije cerebralnom dislokacijom uzeta su debela crevaradi dalje analize (pogledati 3.4.1.; 3.4.3.; 3.4.6.; 3.4.7. i 3.4.8.).

3.3.3. Primena rBanLec kao imunomodulatora u TNBS-izazvanom kolitisu

Nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa TNBS (poglavlje 3.3.4.) miševi su svakodnevno, od dana 0 (3h nakon tretmana TNBS) do dana 7, oralnim putem tretirani (100 μ L) rastvorom rBanLec/PBS koncentracija 0,1 μ g/mL (doza 0,5 μ g rBanLec/kg TT), 1 μ g/mL (doza 5 μ g rBanLec/kg TT) ili 10 μ g/mL (doza 50 μ g rBanLec/kg TT). Zavisno od koncentracije rBanLec koja je korišćena za tretman, miševi su podeljeni u grupe TrBL0.1, TrBL1 i TrBL10 (n = 15). Kao referentne, formirane su grupa miševa odgovarajuće starosti kod kojih nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa nije tretman rBanLec (PK grupa, n = 15) i grupa u kojoj nije izazvan eksperimentalni kolitis niti je tretirana rBanLec (NK grupa, n = 15). Životinje su praćene svakog dana i tokom tog perioda praćene su promene telesne težine. Iz svake grupe je nasumično izabrano 5 životinja koje su eutanazirane u piku bolesti (dan 2), dok je ostalih 10 životinja iz grupe praćeno do 7 dana kada su eutanazirane. Nakon eutanazije cerebralnom dislokacijom uzeti su biološki uzorci za dalje analize: debelo crevo (pogledati 3.4.1, 3.4.3, 3.4.6. i 3.4.8.) i mLČ (pogledati 3.4.2.).

3.3.4. Izazivanje kolitisa TNBS u eksperimentalnim uslovima

Eksperimentalni kolitis je izazvan u C57BL/6 miševima jednokratnom intrarektalnom primenom rastvora TNBS (Sigma Life Sciences, Burlington, SAD) u 50% etanolu. Pre aplikovanja etanolnog rastvora TNBS (25 mg/mL; 2,5 mg TNBS po dozi) miševima nije davana hrana tokom noći, dok je pristup vodi bio neograničen. Životinje su anestetizirane (poglavlje 3.3.) a zatim im je intrarektalno aplikovan etanolni rastvor TNBS (100 μ L) kateterom dužine 4 cm (dan 0). Tretirani miševi su posle apliciranja rastvora držani u vertikalnom položaju oko 2 min da bi se rastvor ravnomerno rasporedio unutar debelog creva. Istovremeno, miševima kod kojih nije hemijski izazvan kolitis (NK grupa) je apliciran samo 50% etanol.

3.4. *Ex vivo* analize

3.4.1. Histološka analiza debelog creva

Uzorci tkiva debelog creva su očišćeni od fecesa, isprani hladnim PBS (pH 7,4) i fiksirani u 4% formalinu. Fiksirani uzorci tkiva debelog creva su dehidratirani u seriji rastvora etanola (75% (8h), 86% (18h), 96% (2h), 100% (2h), isprani ksilolom (1h) i ukalupljeni u parafin prethodno zagrejan na 55°C. Preseci (debljine 5 µm) su isečeni na mikrotomu Leica RM 2155 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nusloh, Nemačka) i montirani na mikroskopske pločice (Superfrost glass slides, Thermo Scientific, Valtam, SAD).

Histološke analize su rađene na preparatima koji su obojeni hematoksilin i eozin bojama u skladu sa standardnom procedurom:

- Deparafinizacija zagrevanjem na 37°C preko noći ili 30 min na 58°C
- Ispiranje ksilolom 2 x 2 min
- Rehidratacija u seriji vodenih rastvora etanola, redom 100% (2 x 2 min), 70% (2 min)
- Ispiranje vodom, 1 min
- Bojenje hematoksilinom, 3 min
- Ispiranje vodom, 4 min
- Bojenje eozinom, 30 sek
- Ispiranje preseka u česmenskoj vodi, 4 min
- Dehidratacija u seriji vodenih rastvora etanola, redom 70% (1 min), 96% (3 min), 100% (3 min)
- Ispiranje ksilolom, 2 x 1 min
- Sušenje
- Nakapavanje kanada balzama i stavljanje pokrovnog stakla

Preseci obojeni hematoksilin i eozin bojama su analizirani na Olympus BH2-RFL svetlosnom mikroskopu (Olympus Optica Ltd, Tokio, Japan) kamerom visoke rezolucije (High Resolution Digital Camera (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Minster, Nemačka). Sve preparate je analizirao iskusni patolog koji nije bio upoznat sa eksperimentalnim grupama. Ocenjivanje Histološkog Indeksa Kolutisa (engl. *Colitis Histology Index*, CHI) se izvršilo po protokolu opisanom u publikaciji Koelink *et al* [196].

3.4.2. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom

Analize protočnom citofluorimetrijom su rađene u suspenziji ćelija izolovanih iz mLČ i slezine. Slezina i mLČ su mehanički dezintegrisani u RPMI1640 medijumu u koji je dodat 5% FCS. Oslobođene ćelije su pasažirane kroz najlonsku mrežicu sa porama veličine 70 µm, kako bi se uklonili komadići dezintegrisanog tkiva. Izolovane ćelije su zatim isprane rastvorom 2% BSA/0.01% NaN₃/PBS (10 min, 1200 rpm; 3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka). Na isti način su rađeni i svi naredni koraci ispiranja. Ćelije su alikvotirane za bojenje tako da bude 1 x 10⁶ ćelija po uzorku. Ćelije su najpre inkubirane sa anti-CD16/32 antitelom (30 min, 4°C). Nakon ispiranja, ćelije su inkubirane (30 minuta u mraku, 4°C) sa fluorohromom obeleženim antitelima specifičnim za površinske markere CD4, CD11b, CD11c, CD25 i/ili CD103 (**Tabela 6.**). Radna razblaženja svih antitela su pripremljena u 2% BSA/0.001%/NaN₃/PBS.

Nakon ispiranja, uzorci u kojima je analizirana ekspresija FoxP3 transkripcionog faktora ili IFN γ su dalje procesuirani. Ćelije su fiksirane i permeabilizovane primenom rastvora iz komercijalno dostupnih kitova FoxP3/transkripcioni Faktor set za bojenje ćelija (eBioscience, San Dijego, SAD) ili BD Cytotfix/Cytoperm Plus Permeabilization Kit (BD Life Sciences, San Hose, SAD), prema

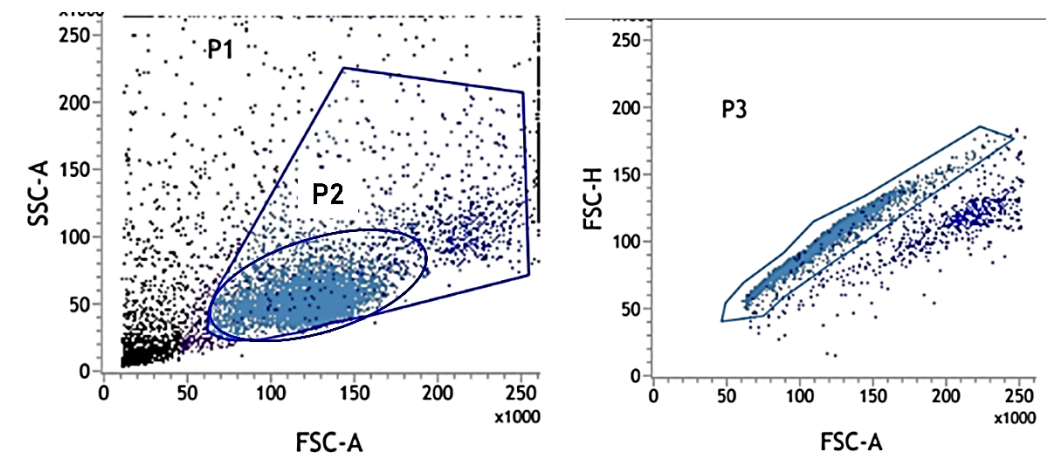
uputstvima proizvođača. Ekspresija FoxP3 i proizvodnja IFN γ su detektovane specifičnim fluorohromom obeleženim monoklonskim antitelima (**Tabela 6**).

Tabela 6. Monoklonska antitela korišćena za citofluorimetrijsku analizu

Poreklo antitela (životinja)	Antigen	Proizvođač (kataloški broj)
Pacov	Purified Anti-mouse CD16/32	eBioscience, San Dijego, SAD
Pacov	PE-Cy5.5, Anti-Mouse CD4	Life Technologies, Karlsbad, SAD
Pacov	PE, Anti-Mouse CD11b	BioLegend, San Dijego, SAD
Hrčak	FITC Anti-Mouse CD11c	BioLegend, San Dijego, SAD
Hrčak	APC Anti-mouse CD103 Antibody	BioLegend, San Dijego, SAD
Pacov	FITC FoxP3 Monoclonal Antibody	eBioscience, San Dijego, SAD
Pacov	FITC Anti-mouse IFN γ	BioLegend, San Dijego, SAD

Skraćenice: FITC, fluorescein-izotiocijanat; PE, fikoeritrin; APC, alofikocijanin (engl. Allophycocyanin).

Obojene ćelije su analizirane protočnim citofluorimetrom BD FACSVersetm flow cytometer (BD Bioscience, San Hose, SAD), primenom softvera v1.0.5.3841. Primarna analiza ćelija obuhvatala je selekciju vijabilnih ćelija i/ili selekciju ćelija na osnovu njihove veličine (engl. *Forward Side Scatter*; FSC) i stepena granularnosti (engl. *Side Scatter*; SSC), i u okviru ovih populacija selekciju pojedinačnih ćelija (**Slika 5**). Pored procentualne zastupljenosti ćelija, analizirana je i količina ekspresije određenih molekula na/unutar ćelija gde su rezultati predstavljeni kao srednja vrednost MFI (engl. *Mean Fluorescence Intensity*).



Slika 5. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profil *ex vivo* ćelija izolovanih iz mLČ i SL gde su izdvojene vijabilne ćelije (P1), limfociti (P2) i u okvir njih pojedinačne neslepljene ćelije (P3).

3.4.3. Merenje aktivnosti enzima mijeloperoksidaze (MPO) u tkivu debelog creva

Uzorak debelog creva (~100 mg) je izmeren i usitnjen makazama. Tkivo je homogenizovano u rastvoru 0,5% heksadeciltrimetilamonium bromida u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu, pH 6.0. Uzorci su zatim cetrifugirani na 800 g, 30 min na 4°C. Supernatanti su uzeti i opet cetrifugirani na 13000 g, 20 min na 4°C. Za određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (engl. *Myeloperoxidase*; MPO), uzete su iste zapremine supernatanta i rastvora 1 mg/mL orto-fenilendiamin (OPD) u 50 mM citratnom puferu, pH 5,0, i pomešane u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunara (Nunc MicroWell 96-well Microplates, Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD). Reakcija je inicirana dodavanjem 0,01% vodonik peroksida. Reakcija je prekidana u više vremenskih tački dodavanjem 2M H₂SO₄ i apsorbancija je izmerena spektrofotometrijski na 492 nm, sa referentnom vrednošću izmerenom na 620 nm ($A_{492/620}$). Aktivnost MPO enzima je izračunata korišćenjem formule opisane u radu Dodda *et al* [197]. Aktivnost MPO enzima je predstavljena kao broj jedinica aktivnosti na 1mg tkiva debelog creva ili kao apsorbancija ($A_{492/620}$).

$$\text{MPO aktivnost} \left(\frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right) = 1000x \frac{x}{\text{težina uzetog tkiva(mg)}}$$

$$X = 10x \frac{\text{Promena apsorbance po minutu}}{\text{Zapremina supernatanta uzeta u finalnoj reakciji}}$$

3.4.4. Priprema homogenata debelog creva

Izolovana debela creva su isprana hladnim rastvorom PBS, i mehanički homogenizovana keramičkim kuglicama na aparatu Minilys Personal Homogenizer (Bertin Technologies SAS, Francuska) u hladnom puferu za homogenizaciju (PBS (pH 7,4) suplementiran sa 1mM EDTA, 0,1% NP-40, 1% Triton X-100 i 1% proteaznih inhibitora). Homogenizovana creva su centrifugirana na 14000 rpm, 10 min na 4°C (3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka). Supernatanti su skupljeni i čuvani na -80°C do analize. Koncentracija proteina u supernatantima homogenizovanih creva je izmerena kolorimetrijskom Bradford metodom [198], zatim su u supernatantima određeni: 1) koncentracija NO; 2) koncentracija citokina; 3) ekspresija transkripcionih faktora; 4) aktivnost antioksidativnih enzima.

3.4.5. Određivanje koncentracije proteina

Za merenje proteinske koncentracije u supernatantu homogenizovanog debelog creva korišćena je Bredfordova metoda [198]. U svaki bazen mikrotitarske ploče dodato je 10 µL (razblaženog) uzorka, nakon čega je dodato 200 µL Bradford rastvora (priprema radnog rastvora: 15mL štoka Bradfordove boje + 85 mL destilovane vode; štok Bradfordove boje je dobijen rastvaranjem 100 mg Comassie Brilliant Blue G-250 u 50 mL 95% etanola i dodavanjem 100 mL 85% fosforne kiseline, nakon čega je rastvor filtriran). Za izradu standardne krive korišćen je goveđi serum albumin (BSA) u koncentracijama 31,25 µg/mL, 65,2 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL i 500 µg/mL. Rastvori BSA su obrađeni istovremeno, na identičan način kao i uzorci homogenata. Nakon 5 min inkubacije apsorbance je merena na 580 nm (A_{580}). Koncentracija proteina u supernatantu homogenata debelog creva određena je na osnovu standardne krive $A_{580} = f(\text{koncentracija BSA})$.

3.4.6. Određivanje proizvodnje azot oksida

Kao indikator proizvodnje azot oksida (NO), u homogenatima debelog creva merena je koncentracija nitrita (NO_2^-). U svaki bunar mikrotitarske ploče od 96 otvora dodato je 50 µL nakon čega je dodata ista zapremina Grisovog reagensa (Griess reagent: 1% sulfanilamid i 0,1% N-(-1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorid u 5% H_3PO_4) i inkubirani su na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Apsorbance su izmerene na talasnoj dužini od 545 nm (A_{545}). Kao standard korišćen je natrijum nitrit (NaNO_2) u dvostrukim serijskim razblaženjima od 1 µM do 80 µM. Rastvori NaNO_2 su procesuirani istovremeno, na identičan način kao i uzorci homogenata. Apsorbance je očitana na talasnoj dužini od 545 nm (A_{545}). Koncentracije NO_2^- u uzorcima su preračunate na osnovu standardne krive $A_{545} = f(\text{koncentracija } \text{NO}_2^-)$ i potom izražene kao količina (µM) NO_2^- po 1 mg proteina u supernatantu debelog creva.

3.4.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i GST) je određivana u supernatantima homogenata debelih creva (pogledati poglavlje 3.4.4.) i merena spektrofotometrijski na adekvatnim talasnim dužinama. Aktivnost svih enzima je izražena kao broj jedinica aktivnosti (U) po 1 mg proteina supernatanta.

SOD aktivnost je određena epinefrinskom metodom [199]. Oksidacija epinefrina je praćena merenjem apsorbance na 480 nm. CAT aktivnost je određena merenjem nivoa razlaganja vodonik peroksida na sobnoj temperaturi [200], primenom Catalase Activity Assay Kit (ElabScience, Vuhan, Kina). Razlaganje vodonik peroksida je praćeno spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 240 nm. GST aktivnosti je određena merenjem proizvodnje 1-hloro-2,4-dinitrobenzen-glutathionskog kompleksa na talasnoj dužini od 340 nm [201]. Za merenje aktivnosti GST korišćen je Glutathione-S-Transferase (GST) Activity Assay Kit (ElabScience, Vuhan, Kina).

3.4.8. Određivanje koncentracije citokina

Koncentracije citokina IL-10, TGF β , IL-12, TNF, IL-4, GM-CSF, INF γ i IL-17 u supernatantima homogenata debelih creva određivane su ELISA testom.

U odgovarajuće bunare mikrotitarskih ploča od 96 otvora (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Danska) naneta su neobeležena monoklonska antitela specifična za IL-10 (BioLegend, San Dijego, SAD), IL-12 (BioLegend), TNF (BioLegend), INF γ (eBioscience, San Dijego, SAD), IL-17 (BioLegend) ili GM-CSF (BioLegend), zavisno od citokina čija koncentracija je merena. Radna razblaženja antitela, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača, su pripremljena u PBS i naneta u zapremini 50 μ L/bunar. Nakon prekonoćne adsorpcije antitela na 4°C, bunari su zasićeni rastvorom 1% BSA/PBS (200 μ L/bunar, 2h na sobnoj temperaturi), kako bi se minimizovalo nespecifično vezivanje. Nakon saturacije, bunari su isprani rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 μ L/bunar; sva naredna ispiranja su urađena na isti način). U sledećem koraku su naneti nerazblaženi uzorci / standardi citokina (50 μ L/bunar) i ploče su inkubirane 1h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, ploče su nalivene odgovarajućim anti-citokinskim antitelima obeleženim biotinom (proizvođač anti-IL-10, anti-IL-12, anti-TNF, anti-IL-17A i anti-GM-CSF antitela je BioLegend, dok je anti-INF γ antitelo proizveo eBioscience). Radna razblaženja biotinom obeleženih antitela, u koncentraciji preporučenoj od strane proizvođača, su pripremljena u 1% BSA/PBS, naneta u zapremini 50 μ L/bunar i inkubirane 1h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, u bunare je nanet (50 μ L/bunar) rastvor extrAvidin-peroksidaze (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD) u 1% BSA/PBS. Ploče su inkubirane 1h na sobnoj temperaturi i potom isprane. Za detekciju je korišćen rastvor 1 mg/mL OPD / 0,01% H₂O₂ / 50 mM citratni pufer, pH = 5 (50 μ L/bunar). Reakcija je prekinuta dodavanjem 2M H₂SO₄ (50 μ L/bunar), nakon čega je izmerena apsorbance na 492/620 nm (Multiscan Ascent, Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD).

Koncentracija TGF β i IL-1 β u supernatantima homogenata debelog creva je određivana ELISA kitom TGF β ELISA Ready-SET, GO! Kit (eBioscience) i Mouse IL-1 β ELISA Kit (Elabscience, Hjuston, SAD).

Nivo citokina je predstavljen kao količina određenog citokina po 1 mg proteina u supernatantu homogenata debelog creva.

3.4.9. Izolacija genomske DNK iz fecesa

Uzorci fecesa su skupljeni nakon završetka višednevnog oralnog tretmana rBanLec (pogledati 3.3.1.) i odmah stavljeni na -80°C, gde su čuvani do analize. Fecesi svih životinja su skupljeni u istom delu dana.

Za izolaciju genomske DNK je korišćen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, izmereni fecesi (~200 mg težine fecesa) su stavljeni u tube od 2 mL (na ledu) i dodato im je 1 mL InhibitEX pufera. Uzoci su homogenizovani

u Bertin Mylles aparatu (Bertin Technologies, Pariz, Francuska), centrifugirani 1 min na 14000 rpm (3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka) na sobnoj temperaturi i sakupljeni su supernatanti koji su dalje procesuirani. Supernatanti su inkubirani 5 min na temperaturi 70°C.

U nove tube od 1,5 mL je dodato 15 µL Proteinaze K, 200 µL supernatanta i 200 µL Pufera AL. Tube su inkubirane 10 min na 70°C. Posle inkubacije u tube je dodato 200 µL 96-100% etanola, 600 µL novodobijenog rastvora je preneto na QIAamp spin kolone i kolone su centrifugirane 1 min na 14000 rpm (3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka). Zatim su spin kolone isprane dva puta Puferom za ispiranje (500 µL, 14000rpm 1 min, 3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka) kako bi se uklonio nespecifično zaostali materijal. Posle ispiranja spin kolone su prebačene u nove tube i direktno na membranu je stavljeno 22 µL ATE pufera. Inkubacija sa ATE puferom je trajala 1 min, nakon čega su kolone centrifugirane 1 min na 14000 rpm (3K18 Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode na Harcu, Nemačka).

Uzorci su poslani na metagenomsku analizu 16S analizu u Novogene GmbH (Minhen, Nemačka). Analiza je obuhvatala sledeće korake:

1. Provera kvaliteta uzoraka
2. Priprema amplikona - Geni 16S rRNA/18S rRNA/ITS regiona (16SV4/16SV3/16SV3-V4/16SV4-V5, 18SV4/18SV9, ITS1/ITS2, ArcV4) su umnoženi korišćenjem specifičnih prajmera obeleženih barkodovima. Sastav reakcionih PCR smeša je prikazan u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Reakciona smeša za PCR

Komponente	Reakciona smeša (do 20 µL)
Phusion High-Fidelity PCR Master Mix	15 µL
Forward primer	0.2 µM
Reverse primer	0.2 µM
Template DNA	10 ng

PCR reakcija je urađena prema sledećem termalnom profilu:

- 98°C 1 min, 1 ciklus
- 98°C 10 s / 50°C 30 s / 72°C 30 s / 72°C 5 min, 40 ciklusa

3. Određivanje količine i kvaliteta PCR produkata
4. Priprema biblioteke za sekvenciranje - Napravljene su biblioteke za sekvenciranje i proverene i kvantifikovane na Qubit i RT-PCR. Prebrojene biblioteke su pulovane i sekvencirane na Illumina (Illumina, San Dijego, SAD) platformama.
5. Bioinformatička analiza dobijenih rezultata sekvenciranja

3.5. Statistička obrada rezultata

Procena statističke značajnosti uočenih razlika među dobijenim rezultatima određena je Welch-ovim t-testom za nezavisne grupe i one-way ANOVA testom praćenim Bonferroni testom višestrukog poređenja (GraphPad Prism 8, San Dijego, SAD). Dodatno, korišćen je Pirsonov bivarijantni test korelacije da bi se odredio Pirsonov koeficijent korelacije (engl. *Pearson's correlation coefficient*; Pcc) i značajnost korelacije. Granična vrednost verovatnoće (p) od 0,05 je uzeta kao statistička značajnost u svim testovima.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U skladu sa postavljenim ciljevima doktorske teze, eksperimentalni deo je bio podeljen u tri faze:

1. Analiza imunomodulatornog efekta rBanLec u GIT C57BL/6 miša u fiziološkim uslovima (Poglavlje 4.1.)
2. Evaluacija efekta jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec u modelu izazvanog kolitisa TNBS u C57BL/6 mišu (Poglavlje 4.2.)
3. Analiza efekata oralne primene rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu (Poglavlje 4.3.)

4.1. Imunomodulatorni efekat rBanLec u GIT C57BL/6 miša u fiziološkim uslovima

Imunomodulatorni uticaj rBanLec je analiziran (i) *in vitro* u kulturi Caco-2 ćelija, često korišćenom model sistemu za izučavanje funkcija crevnog epitela, i (ii) *in vivo* u C57BL/6 miševima (iia) nakon višednevne oralne primene i (iib) nakon jednokratne primene.

4.1.1. *In vitro* analiza uticaja rBanLec na Caco-2 ćelije

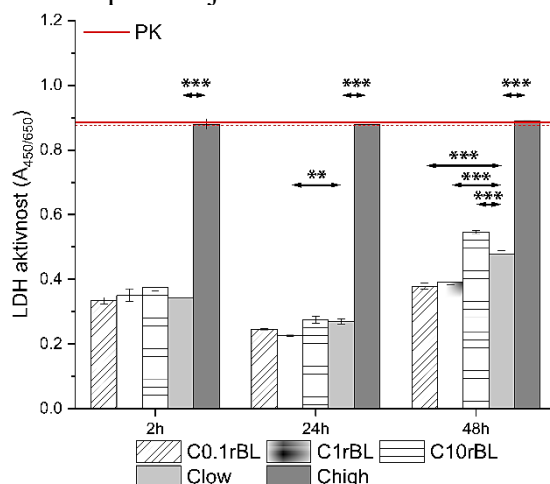
S obzirom da prvi kontakt potencijalnih imunomodulatora i GIT podrazumeva interakciju sa ćelijama crevnog epitela, inicijalna testiranja su bila usmerena na evaluaciju uticaja rBanLec na ćelije epitela creva. Ova istraživanja su urađena *in vitro*, u kulturi Caco-2 ćelija koje predstavljaju jedan od najčešćih model sistema za ispitivanje uticaja biološki aktivnih supstanci na GIT [202]. Konkretno, analizirana je citotoksičnost rBanLec, njegov uticaj na ekspresiju NF- κ B transkripcionog faktora koji kontroliše aktivnost medijatora inflamacije, i uticaj na proizvodnju IL-10 koji je neophodan za kontrolu inflamatorne reakcije [203,204].

Citotoksični uticaj rBanLec na Caco-2 ćelije procenjen je merenjem aktivnosti LDH u supernatantima kultura rBanLec stimulisanih Caco-2 ćelija. Naime, LDH je citoplazmatski enzim koji se oslobađa u supernatant ćelijske kulture kada je ćelijska membrana oštećena. Zbog relativno lakog izvođenja i niske cene, za procenu citotoksičnog efekta supstanci tj. vijabilnosti ćelija nakon tretmana određenom supstancom, u praksi se često koriste testovi zasnovani na redukciji tetrazolijum soli do obojenih formazanskih jedinjenja. Međutim, ovi testovi prvenstveno ukazuju na intenzitet metaboličke aktivnosti ćelije koji može, ali ne mora nužno, korelirati sa vijabilnošću ćelija [205]. Za razliku od ovih testova, oslobađanje LDH u ekstracelularni prostor direktno ukazuje na narušeni integritet ćelije.

Poređenje aktivnosti LDH u supernatantima nestimulisanih (Clow) i rBanLec-stimulisanih Caco-2 ćelija sa aktivnošću LDH nakon potpune lize ćelija (Chigh) ukazuje na dobru vijabilnost kako stimulisanih tako i nestimulisanih ćelija ($p < 0,001$ za sve uzorke) u svim mernim tačkama. Takođe, poređenje Clow/Chigh odnosa ukazuje da u periodu 24 – 48h dolazi do spontanog odumiranja određenog broja ćelija, nezavisno od rBanLec stimulacije (**Slika 6.**).

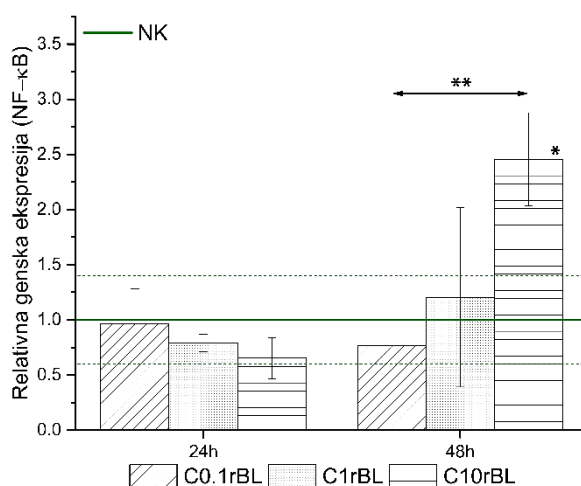
Dvočasovna stimulacija rBanLec u koncentracijama 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (C0.1rBL), 1 $\mu\text{g/mL}$ (C1rBL) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (C10rBL) nije značajno uticala na oslobađanje LDH iz Caco-2 ćelija (Clow vs. C0.1rBL, C1rBL i C10rBL $p > 0,05$). Nakon 24h, aktivnost LDH u supernatantu C10rBL bila je u nivou, dok je u supernatantima C1rBL (C1rBL vs. Clow i C10rBL $p < 0,01$) i C0.1rBL bila niža u poređenju sa kontrolnim nestimulisanim ćelijama, Clow. Nakon 48h stimulacije, u supernatantu C10rBL izmerena

je značajno veća ($p < 0,001$), a u supernatantima C1rBL ($p < 0,001$) i C0.1rBL ($p < 0,001$) izmerena je značajno manja aktivnost LDH u poređenju sa nestimulisanim Caco-2 ćelijama (**Slika 6.**).



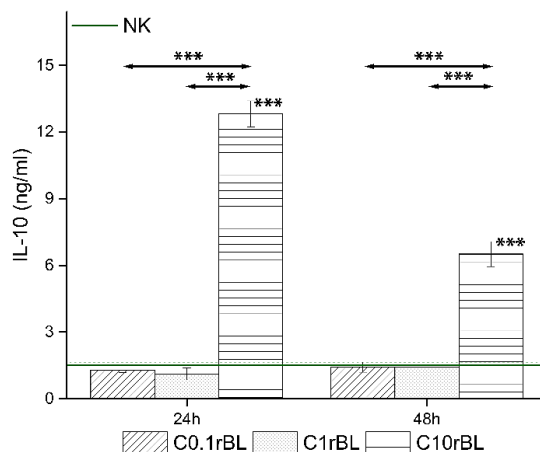
Slika 6. Aktivnost LDH u supernatantima Caco-2 ćelija stimuliranih rBanLec u periodu od 2h, 24h i 48h. Koncentracija rBanLec bila je 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (C0.1rBL), 1 $\mu\text{g/mL}$ (C1rBL) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (C10rBL). Na grafiku je predstavljena srednja vrednost izmerenih na $A_{450/650} \pm \text{SE}$ ($n = 5$). Prikazana je i maksimalna aktivnost LDH koja se može postići u analiziranom broju ćelija (Chigh), kao i aktivnost LDH oslobođene iz nestimulisanih ćelija (Clow). Srednja vrednost pozitivne kontrole testa (komercijalni reagens koji ulazi u sastav kita) je prikazana punom crvenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je Clow korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Statistički značajna razlika između stimuliranih ćelija rBanLec i Clow uzoraka je predstavljena strelicama.

U kulturi Caco-2 ćelija stimuliranih rBanLec izmerene su promene u relativnoj ekspresiji NF- κB . U Caco-2 ćelijama koje su stimulirane koncentracijama 1 i 10 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec u trajanju od 24h uočeno je blago smanjenje relativne ekspresije NF- κB gena u poređenju sa relativnom ekspresijom izmerenom u nestimulisanim ćelijama. U C0.1rBL i C1rBL kulturama ni nakon 48h nije uočena statistički značajna promena ekspresije NF- κB u poređenju sa nestimulisanim Caco-2 ćelijama. Međutim, u C10rBL kulturi nakon 48h stimulacije ekspresija NF- κB je bila statistički značajno veća u poređenju sa nestimulisanim Caco-2 ćelijama ($p = 0,017$), kao i u poređenju ekspresijom u C10rBL kulturi 24h ranije ($p = 0,002$; **Slika 7.**).



Slika 7. Relativna genska ekspresija NF- κB u kulturi Caco-2 ćelija stimuliranih rBanLec u periodu od 24 i 48h. Koncentracija rBanLec bila je 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (C0.1rBL), 1 $\mu\text{g/mL}$ (C1rBL) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (C10rBL). Na grafiku je predstavljena srednja vrednost relativne genske ekspresije NF- κB gena normalizovane u odnosu na GAPDH gen $\pm \text{SE}$ ($n = 3$). Srednja vrednost relativne genske ekspresije NF- κB nestimulisanih ćelija je prikazana punom zelenom linijom (NK), a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Statistički značajna razlika je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su nestimulisane ćelije korišćene kao referentne ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Statistički značajna razlika među rBanLec stimuliranim uzorcima je predstavljena strelicama.

Pored promena u ekspresiji NF- κ B, pokazano je da rBanLec pokreće proizvodnju IL-10 u Caco-2 ćelijama. U supernatantima Caco-2 ćelija stimulisanih sa 10 μ g/mL rBanLec nakon 24 i 48h je izmereno značajno povećanje ($p < 0,001$) koncentracije IL-10 u poređenju sa supernatantima ćelija stimulisanih sa 0,1 i 1 μ g/mL rBanLec i nestimulisanih ćelija. Koncentracija IL-10 u supernatantima Caco-2 ćelija koje su stimulisane koncentracijama 0,1 i 1 μ g/mL rBanLec nije se značajno razlikovala od koncentracije IL-10 izmerene u supernatantu nestimulisanih ćelija (Slika 8.).



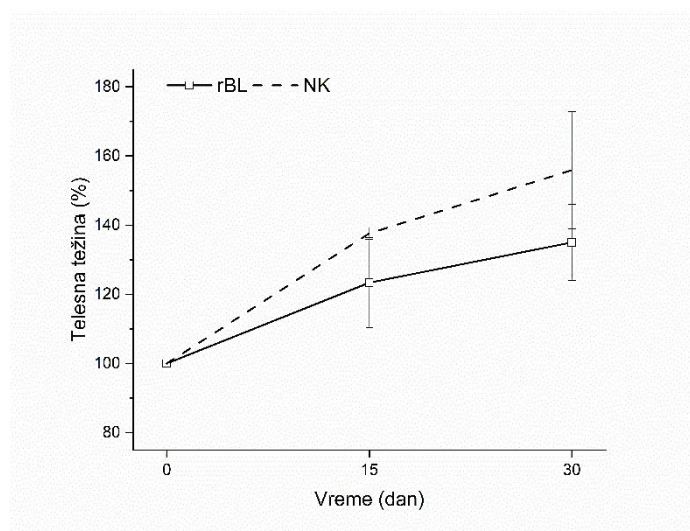
Slika 8. Koncentracija IL-10 u supernatantima Caco-2 ćelija stimulisanih rBanLec u trajanju od 24h i 48h. Koncentracija rBanLec bila je 0,1 μ g/mL (C0.1rBL), 1 μ g/mL (C1rBL) i 10 μ g/mL (C10rBL). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije IL-10 $\pm$ SE ($n = 5$). Srednja vrednost koncentracije IL-10 u supernatantu nestimulisanih ćelija je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Statistički značajna razlika je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su nestimulisane ćelije korišćene kao referentne ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Statistički značajna razlika među rBanLec stimulisanim uzorcima je predstavljena strelicama.

4.1.2. Imunomodulatorni uticaj višednevne oralne primene rBanLec kod C57BL/6 miša

Imajući u vidu široku primenu banane u ljudskoj ishrani i prisustvo brojnih fiziološki aktivnih jedinjenja u njenom plodu, kao početni korak smo želeli da ispitamo lokalne efekte dugoročne primene rBanLec. Kako bismo procenili potencijalnu lokalnu ulogu njegovog dugoročnog delovanja u fiziološkim uslovima, eksperimentalni model je obuhvatio ženke miševa soja C57BL/6, stare približno tri nedelje kojima je svakodnevno u periodu od 30 dana oralno davano 100 μ l rastvora 0,1 μ g/mL rBanLec (rBL grupa, $n = 5$). Kao referentni korišćeni su miševi C57BL/6 iste starosti, pola i okota (NK grupa, $n = 5$).

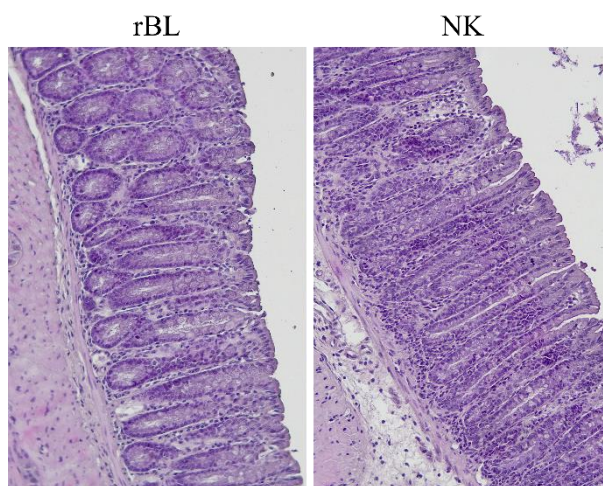
4.1.2.1. Uticaj kontinuirane višednevne oralne primene rBanLec na opšte stanje eksperimentalnih životinja

Tokom tridesetodavnog tretmana uočen je konstantan porast telesne težine kod miševa rBL grupe, ali je on bio blaži u poređenju sa miševima NK grupe. Makroskopski i miševi rBL i miševi NK grupe su bili dobrog zdravstvenog stanja, pokretni i sa redovnom konzistentnom stolicom. Nije primećena nikakva makroskopska razlika među miševima rBL i NK grupa (Slika 9.).



Slika 9. Promene u telesnoj težini tokom kontinuirane višednevne oralne primene rBanLec u zdravim C57BL/6 miševima. Koncentracija rBanLec bila je 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (rBL). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost telesne težine (%) $\pm$ SE (n = 5). Miševi iste starosti koji nisu tretirani rBanLec su obeleženi kao NK grupa.

Histološkom analizom tkivnih preseka debelih creva uzetih nakon tridesetodnevno tretmana utvrđeno je da u grupi tretiranoj rBanLec nije došlo do značajnog oštećenja strukture tkiva. U tkivnom preseku debelog creva rBanLec-tretiranih miševa uočeni su infiltrati polimorfonuklearnih ćelija u mukozu i submukozu. Takođe, uočena je pojačana metabolička aktivnost ćelija bazalnog sloja kripti sa tendencijom regeneracije u oblastima infiltracije. Očekivano, u histološkim presecima tkiva grupe NK nisu uočeni znaci zapaljenja ili oštećenja tkiva. Na NK presecima se uočavaju kripe u nastajanju i blagi infiltrati polimorfonuklearnih ćelija kao i kripe sa napupelim peharastim metaboličko-aktivnim ćelijama (**Slika 10.**).

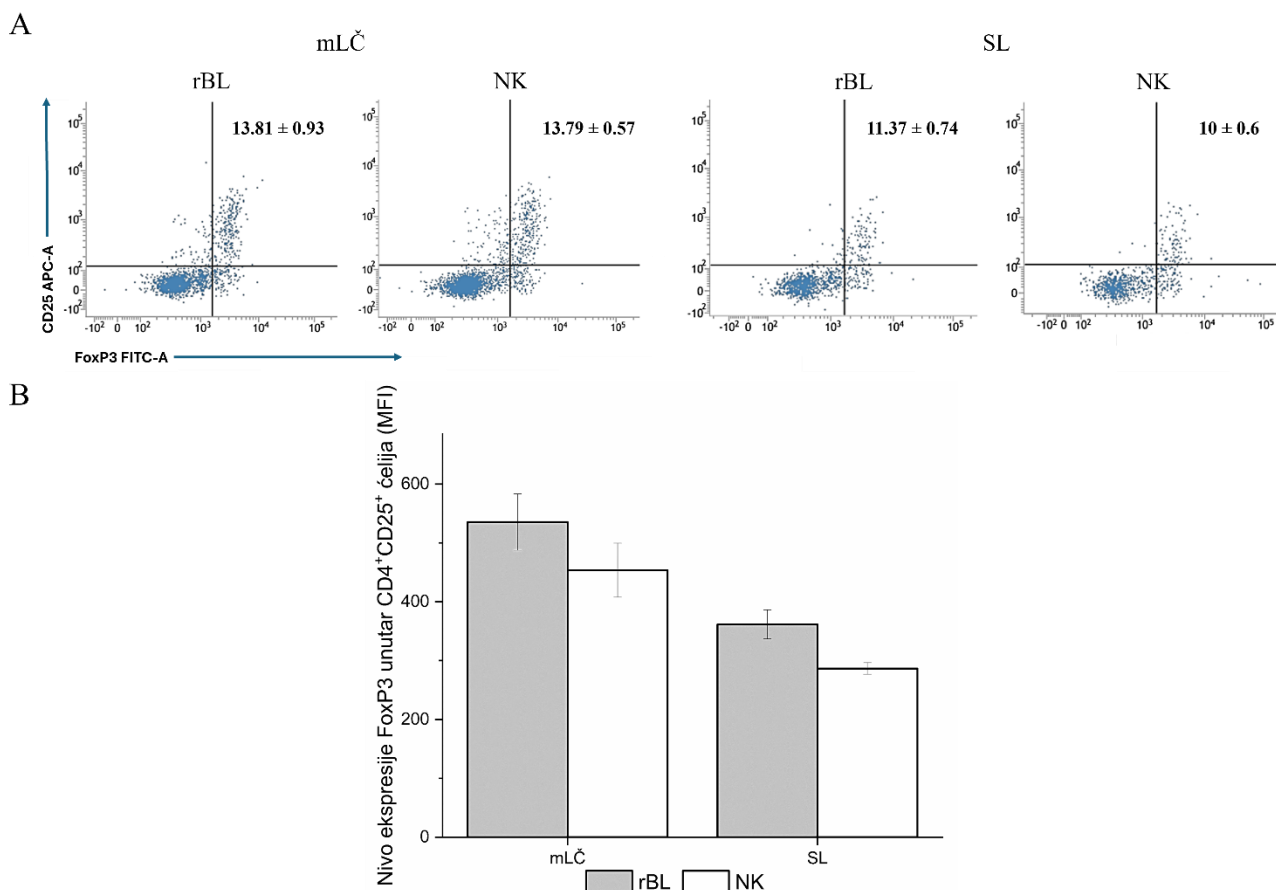


Slika 10. Presek debelog creva C57BL/6 miša nakon tridesetodnevno oralnog tretmana rBanLec. Tkivni preseci (debljina 5 μm) debelih creva su bojeni H&E (pogledati poglavlje 3.4.1.) i pregledani sa uvećanjem od 20X Olympus BH2-RFL svetlosnim mikroskopom (Olympus Optica Ltd., Tokio, Japan) koji je povezan sa digitalnom kamerom visoke rezolucije (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Nemačka). Tkivni preseci su pravljani od uzoraka debelog creva (n = 5 uzoraka / grupa) uzetih od C57BL/6 miševa neposredno nakon završetka oralnog tretmana (0,01 $\mu\text{g/dan}$, 30 dana) rBanLec (rBL) i od C57BL/6 miševa iste starosti koji nisu tretirani rBanLec (NK). Prikazani su reprezentativni preseci.

4.1.2.2. Uticaj višednevno oralnog tretmana rBanLec na procentualnu zastupljenost Treg ćelija u mŁČ i slezini C57BL/6 miša

S obzirom na značaj Treg ćelija za održavanje imunske homeostaze, analiziran je uticaj višednevnog oralnog tretmana rBanLec na populaciju Treg kako na lokalnom (mLČ) tako i na sistemskom (SL) nivou [206]. Neposredno nakon završetka tridesetodnevnog oralnog tretmana rBanLec, protočnom citofluorimetrijom analizirana je zastupljenost Treg, definisane kao $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, u populaciji $CD4^+$ limfocita u mLČ i SL miševa rBL i NK grupe (**Slika 11. A**). Rezultati analize su pokazali da tridesetodnevni oralni tretman rBanLec ne dovodi do značajnih promena u okviru Treg pula kako na lokalnom tako i na sistemskom nivou. Ni u mLČ ni u SL rBL i NK miševa nije uočena značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti Treg u pulu $CD4^+$ limfocita.

Analizom gustine eksprimiranog FoxP3, u mLČ i u SL je uočen trend porasta ekspresije FoxP3 u Treg rBL miševa, ali on nije bio statistički značajan u poređenju sa NK (**Slika 11. B**).

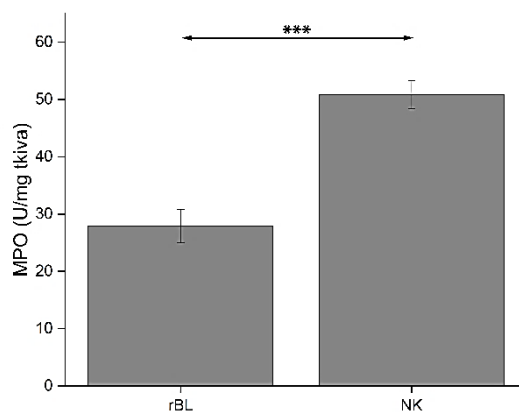


Slika 11. Procentualna zastupljenost $CD25^+FoxP3^+$ ćelija u okviru $CD4^+$ limfocita u mLČ i SL C57BL/6 miševa nakon tridesetodnevnog oralnog tretmana rBanLec u fiziološkim uslovima. Svakodnevno je oralno aplicirano 100 μ L rastvora rBanLec koncentracije je 0,1 μ g/mL (rBL). (A) Prikazani su reprezentativni plotovi kao i srednja vrednost procentualne zastupljenosti $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ćelija u limfocitnom okviru (%) $\pm$ SE (n = 5). (B) Na grafiku je predstavljena srednja vrednost ekspresije FoxP3 transkripcionog faktora unutar $CD4^+CD25^+$ ćelija (MFI). Miševi iste starosti koji nisu tretirani rBanLec (NK) su bili referentni.

4.1.2.3. Uticaj višednevnog oralnog tretmana rBanLec na oksidativni status u debelom crevu C57BL/6 miša

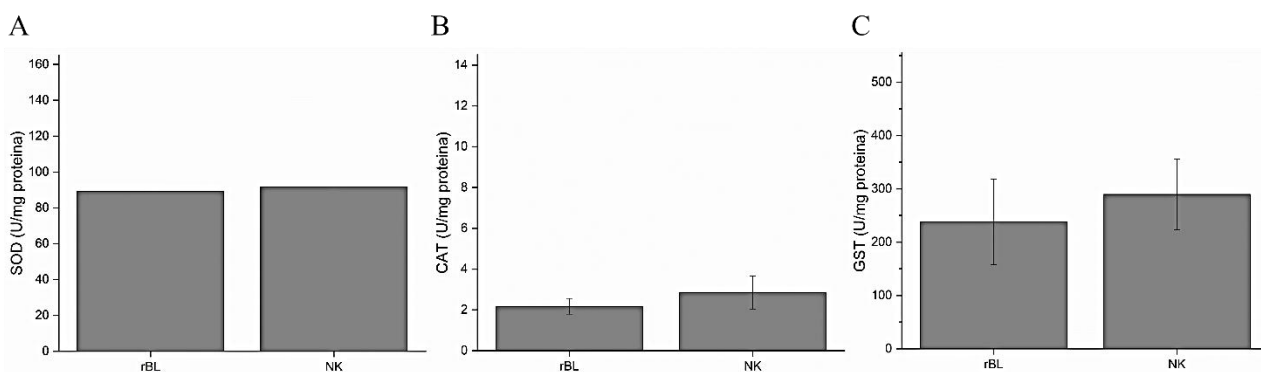
U cilju definisanja lokalnog oksidativnog statusa u debelom crevu C57BL/6 miševa rBL i NK grupa, urađena je analiza aktivnosti enzima koji generalno ispoljava prooksidativno dejstvo doprinoseći stvaranju ROS i RNS (MPO) i enzima koji ispoljavaju anti-oksidativnu ulogu (SOD, CAT i GST).

Dnevna primena rBanLec u koncentraciji 0,1 μ g/mL tokom 30 dana (rBL grupa), dovela je do značajnog smanjenja lokalne aktivnosti MPO u debelom crevu u poređenju sa miševima NK grupe ($p < 0,001$) (**Slika 12**).



Slika 12. Aktivnost MPO u debelom crevu miševa nakon tridesetodnevne oralne primene rBanLec u fiziološkim uslovima. Svakodnevno je oralno aplicirano 100 µL rastvora rBanLec koncentracije je 0,1 µg/mL (rBL). Lokalna aktivnost MPO je predstavljena kao srednja vrednost aktivnosti (U) po mg tkiva ± SE (n = 5). Statistička značajnost procenjena je korišćenjem *t*-nezavisnog testa po Welch-ovoj korekciji ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Miševi iste starosti koji nisu tretirani rBanLec (NK) su bili referentni.

Tridesetodnevni oralni tretman rBanLec, sa druge strane, nije značajno uticao na aktivnost SOD, CAT i GST u debelom crevu C57BL/6 miševa (Slika 13.).

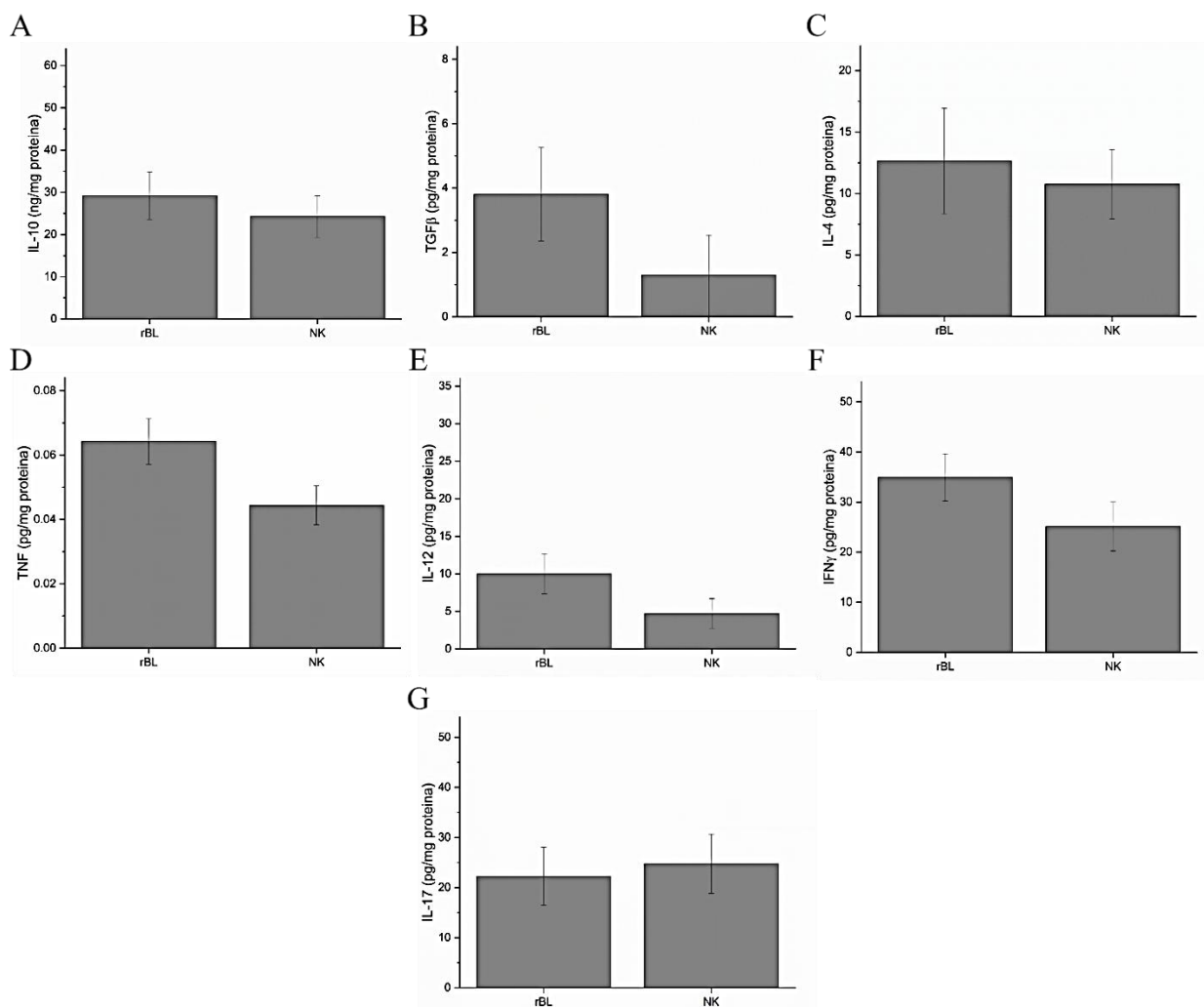


Slika 13. Aktivnost antioksidativnih enzima u debelom crevu miševa nakon tridesetodnevne oralne primene rBanLec fiziološkim uslovima. Svakodnevno je oralno aplicirano 100 µL rastvora rBanLec koncentracije je 0,1 µg/mL (rBL). Na grafiku su prikazane lokalne aktivnosti SOD (A), CAT (B) i GST (C) koje su predstavljene kao srednja aktivnost enzima (U) po miligramu proteina ± SE (n = 5). Miševi iste starosti koji nisu tretirani rBanLec (NK) su bili referentni.

4.1.2.4. Uticaj višednevnog oralnog tretmana rBanLec na citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša

U cilju karakterizacije lokalnog citokinskog miljea nakon tridesetodnevnog oralnog tretmana rBanLec, u debelom crevu C57BL/6 miševa analizirana je proizvodnja citokina koji ispoljavaju dominantno imunoregulatornu ulogu (IL-10, TGFβ) i utiču na efektorske karakteristike imunskih ćelija (IL-4, TNF, IL-12, IFNγ i IL-17).

Višednevna oralna primena rBanLec ne dovodi do značajnih promena u proizvodnji analiziranih citokina u debelom crevu C57BL/6 miševa. U poređenju sa bazalnim nivoima izmerenim u NK grupi, prosečne lokalne koncentracije TGFβ, citokina koji promovišu Th1 tip imunskog odgovora (IL-12, IFNγ) i TNF nisu bile statistički značajno povišene u debelom crevu miševa rBL grupe (Slika 14. B, E, F i D). Između rBL i NK grupe nisu uočene razlike u lokalnoj proizvodnji IL-10, IL-4 i IL-17 (Slika 14. A, C i G).

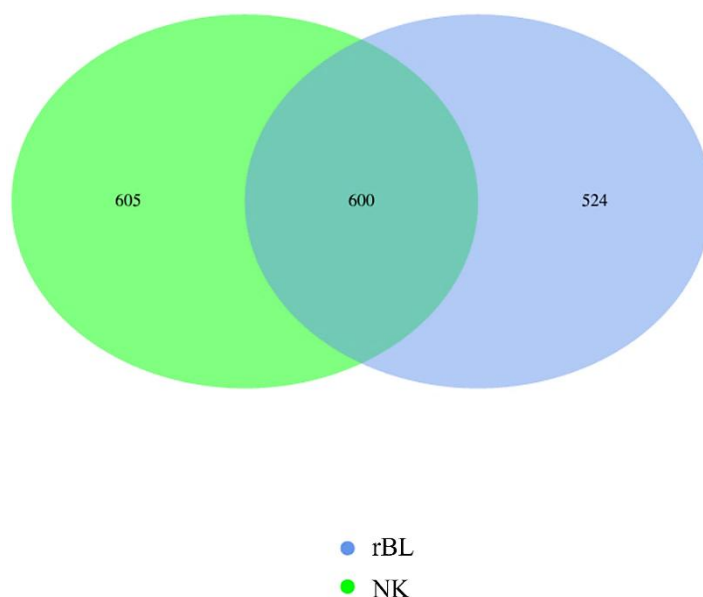


Slika 14. Koncentracija IL-10, TGFβ, IL-4, TNF, IL-12, IFNγ i IL-17 u debelom crevu miševa nakon tridesetodnevnog oralnog tretmana rBanLec. Svakodnevno je oralno aplicirano 100 µL rastvora rBanLec koncentracije je 0,1 µg/mL (rBL). Na grafiku su predstavljene koncentracije (A) IL-10, (B) TGFβ, (C) IL-4 citokina, (D) TNF, (E) IL-12, (F) IFNγ i (G) IL-17 citokina. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina izražene u pg/ng po miligramu proteina supernatanta ± SE (n = 5). Miševi iste starosti koji nisu tretirani rBanLec su obeleženi kao (NK) su bili referentni.

4.1.2.5. Efekat oralnog tretmana rBanLec na sastav mikrobiote u debelom crevu C57BL/6 miševa

Pored direktnog imunomodulatornog uticaja, lektini, interagujući sa oligosaharidnim strukturama bakterija, mogu ispoljiti i indirektan imunomodulatorni uticaj. Brojni podaci ukazuju da sastav crevne mikrobiote u značajnoj meri utiče kako na karakteristike imunskog odgovora kako na lokalnom, u GIT, tako i na sistemskom nivou [207].

U cilju identifikacije i procene zastupljenosti pojedinačnih bakterijskih vrsta u crevnoj mikrobioti, urađeno je sekvenciranje gena koji kodira 16S rRNK bakterija iz fecesa miševa NK grupe i rBL miševa posle 30 dana tretmana rBanLec. Venovim dijagramom je predstavljena razlika između rBL i NK grupa u broju identifikovanih vrsta bakterija (Slika 15.). Pokazano da postoji 600 bakterijskih vrsta koje su identifikovane kod obe grupe. Pored njih, kod rBanLec tretiranih miševa identifikovano je još 524, a kod NK grupe još 605 bakterijskih vrsta. Ovaj podatak ukazuje da je tridesetodnevni tretman rBanLec doveo do smanjenja raznolikosti u crevnoj mikrobioti C57BL/6 miševa.



Slika 15. Uticaj tridesetodnevnog oralnog tretmana rBanLec na broj i raznolikost bakterijskih vrsta koje ulaze u sastav mikrobiote C57BL/6 miševa. Venovim dijagramom je predstavljen broj zajedničkih i različitih vrsta bakterija detektovanih u fecesu C57BL/6 miševa nakon 30 dana oralnog tretmana (100 µL/dan) rastvorom 0,1 µg/mL rBanLec (rBL) i netretiranih miševa iste starosti i pola (NK). Identifikacija bakterijskih vrsta urađena je sekvencioniranjem gena koji kodira 16s rRNK bakterija iz fecesa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost broja bakterijskih vrsta koje su detektovane u fecesima miševa iste grupe (n = 5).

Takođe, uočene su fine razlike u relativnoj zastupljenosti određenih bakterijskih familija u fecesu rBanLec-tretiranih i NK miševa (**Tabela 8.**).

Tabela 8. Relativna rasprostranjenost bakterijskih familija detektovanih u fecesu C57BL/6 miševa nakon tridesetodnevnog oralnog tretmana rastvorom 0,1 µg/mL rBanLec (rBL) i netretiranih miševa iste starosti i pola (NK)

	Naziv familije	rBL	NK	Detalji taksonomije
1	Lachnospiraceae	0,287496	0,347439	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;
2	Muribaculaceae	0,276933	0,313370	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Muribaculaceae;
3	Oscillospiraceae	0,090515	0,122297	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Oscillospiraceae;
4	Helicobacteraceae	0,070942	0,026688	k__Bacteria;p__Campylobacterota;c__Campylobacteriia;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae;
5	Bacteroidaceae	0,044310	0,012412	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;
6	Prevotellaceae	0,037476	0,038964	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;
7	Rikenellaceae	0,035739	0,021734	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;
8	Deferribacteraceae	0,030095	0,008087	k__Bacteria;p__Deferribacterota;c__Deferribacteres;o__Deferribacteriales;f__Deferribacteraceae;
9	Desulfovibrionaceae	0,028144	0,016319	k__Bacteria;p__Desulfobacterota;c__Desulfovibrionia;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;
10	Tannerellaceae	0,012729	0,007219	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae;
11	Ruminococcaceae	0,009485	0,005082	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;

12	Marinifilaceae	0,006666	0,020772	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Marinifilaceae;
13	Acholeplasmataceae	0,005516	0,001013	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Acholeplasmatales;f__Acholeplasmataceae;
14	Sutterellaceae	0,005200	0,006810	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Sutterellaceae;
15	unidentified_Gastranaerophilales	0,002585	0,002222	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Vampirivibrionia;o__Gastranaerophilales;f__unidentified_Gastranaerophilales;
16	Saccharimonadaceae	0,001915	0,000962	k__Bacteria;p__Patescibacteria;c__Saccharimonadia;o__Saccharimonadales;f__Saccharimonadaceae;
17	Butyricicoccaceae	0,001737	0,002213	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__Butyricicoccaceae;
18	Anaerovoracaceae	0,001701	0,001830	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptostreptococcales-Tissierellales;f__Anaerovoracaceae;
19	Peptococcaceae	0,001165	0,001345	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptococcales;f__Peptococcaceae;
20	Rs-E47_termite_group	0,000587	0,005772	k__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rs-E47_termite_group;
21	unidentified_Rhodospirillales	0,000541	0,000187	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__unidentified_Rhodospirillales;
22	Lactobacillaceae	0,000388	0,000017	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;
23	Mycoplasmataceae	0,000312	0,000094	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Mycoplasmatales;f__Mycoplasmataceae;
24	Erysipelotrichaceae	0,000245	0,000306	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;
25	Monoglobaceae	0,000230	0,000494	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Monoglobales;f__Monoglobaceae;
26	Ruminococcaceae_	0,000209	0,000102	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__unidentified_Firmicutes;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae;
27	[Clostridium]_methylpentosum_group	0,000209	0,000000	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__[Clostridium]_methylpentosum_group;
28	Eggerthellaceae	0,000189	0,000111	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Eggerthellaceae;
29	UCG-010	0,000189	0,000409	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__UCG-010;
30	[Eubacterium]_coprostanoligenes_group	0,000169	0,000468	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__[Eubacterium]_coprostanoligenes_group;
31	Clostridiaceae	0,000158	0,000051	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;
32	Akkermansiaceae	0,000056	0,000315	k__Bacteria;p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Akkermansiaceae;
33	Christensenellaceae	0,000026	0,000341	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Christensenellales;f__Christensenellaceae;
34	Erysipelatoclostridiaceae	0,000015	0,000026	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelatoclostridiaceae;
35	Propionibacteriaceae	0,000015	0,000000	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Propionibacteriales;f__Propionibacteriaceae;
36	Defluviitaleaceae	0,000010	0,000034	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Lachnospirales;f__Defluviitaleaceae;

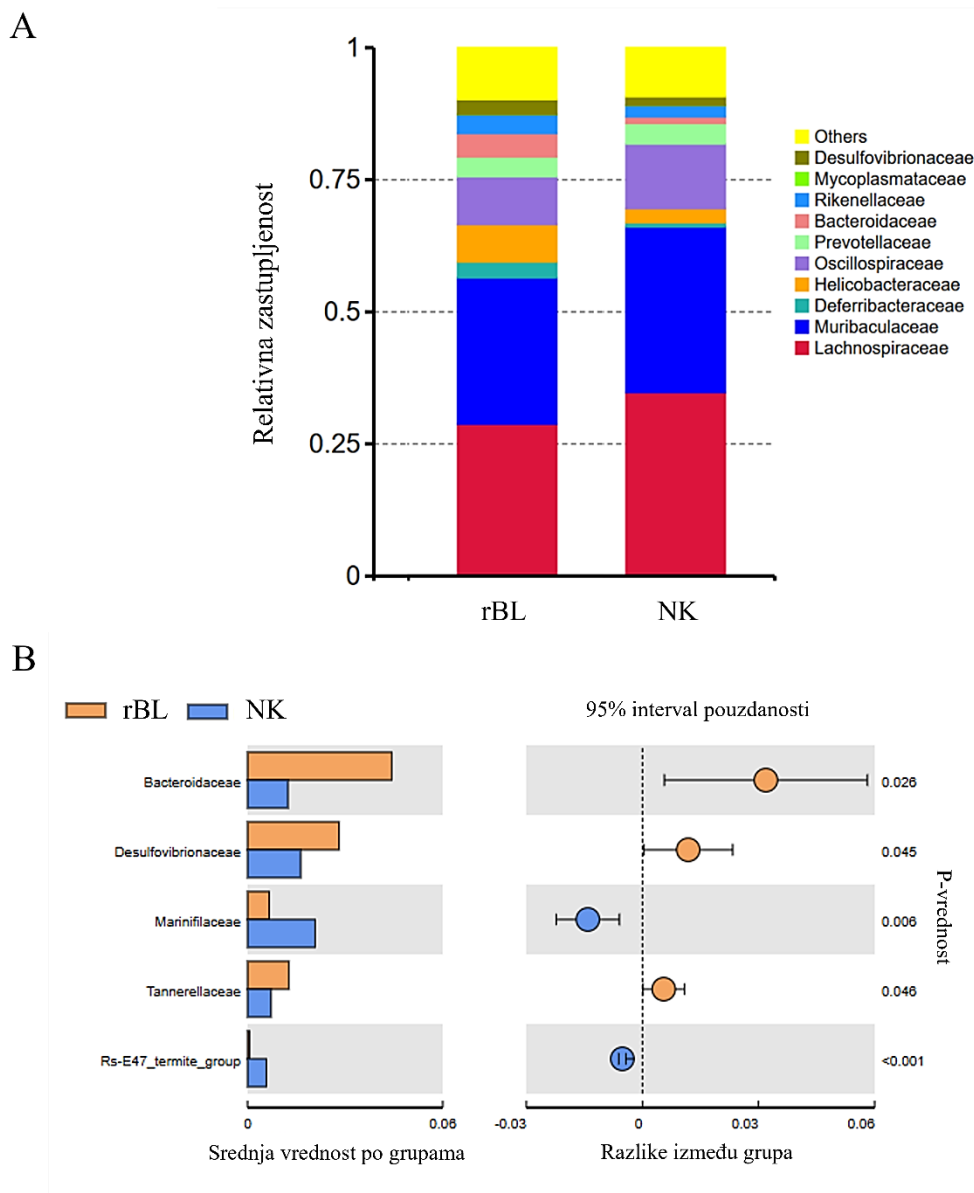
37	Streptococcaceae	0,000010	0,000000	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Streptococcaceae;
38	Gemellaceae	0,000010	0,000000	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Staphylococcales;f__Gemellaceae;
39	Peptostreptococcaceae	0,000005	0,000043	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Peptostreptococcales-Tissierellales;f__Peptostreptococcaceae;
40	Enterobacteriaceae	0,000000	0,000017	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacterales;f__Enterobacteriaceae;
41	Veillonellaceae	0,000000	0,000000	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Negativicutes;o__Veillonellales-Selenomonadales;f__Veillonellaceae;
42	Pasteurellaceae	0,000000	0,000000	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacterales;f__Pasteurellaceae;
43	Bifidobacteriaceae	0,000000	0,000017	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__Bifidobacteriaceae;
44	Coriobacteriaceae	0,000000	0,000000	k__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;
45	unidentified_Oscillospirales	0,000000	0,000017	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Oscillospirales;f__unidentified_Oscillospirales;
46	Vibrionaceae	0,000000	0,000017	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacterales;f__Vibrionaceae;
47	Microbulbiferaceae	0,000000	0,000000	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Microbulbiferaceae;
48	Xanthomonadaceae	0,000000	0,000000	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;
49	Others	0,046077	0,034384	Others

Najveće razlike u zastupljenosti uočene su za familije *Lachnospiraceae*, *Deferribacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Tannerellaceae*, *Marinifilaceae*, *Rs-E47_termite_group*, *Oscillospiraceae* i *Bacteroidaceae*. U poređenju sa NK grupom, u fecesima miševa rBL grupe došlo je do povećanja relativne zastupljenosti bakterija iz familije *Bacteroidaceae*, *Deferribacteraceae*, *Desulfovibrionaceae* i *Tannerellaceae* i smanjenja zastupljenosti bakterija iz familija *Lachnospiraceae* i *Oscillospiraceae* (Slika 16. A i Tabela 9.).

Statistički značajna razlika u relativnoj zastupljenosti u fecesima miševa rBL i NK grupa je pokazana za 5 bakterijskih familija. Familije *Bacteroidaceae* ($p = 0,026$), *Desulfovibrionaceae* ($p = 0,045$) i *Tannerellaceae* ($p = 0,046$) su bile značajno zastupljenije u fecesima miševa rBL grupe, dok su *Marinifilaceae* ($p = 0,008$) i *Rs-E47_termite_group* ($p < 0,001$) bile značajno zastupljenije u fecesima miševa NK grupe (Slika 16. B).

4.1.3. Efekat jednokratnog lokalnog tretmana rBanLec na imunski milje u debelom crevu C57BL/6 miša

U cilju dubljeg razumevanja imunomodulatornog uticaja rBanLec u debelom crevu C57BL/6 miša u fiziološkim uslovima, rBanLec je jednokratno rektalno apliciran kako bi se izbeglo njegovo „rasipanje“ duž GIT i tako omogućilo sticanje preciznijeg uvida u povezanost imunomodulatornog efekta i lokalne koncentracije imunomodulatora rBanLec. Ispitivanje lokalnog efekta rBanLec u debelom crevu C57BL/6 miša sprovedeno je u dve vremenske tačke, 24h i 48h nakon tretmana. rBanLec je dat u koncentracijama 0,1 µg/mL (0.1rBL24 i 0.1rBL48 grupe), 1 µg/mL (1rBL24 i 1rBL48 grupe) i 10 µg/mL (10rBL24 i 10rBL48 grupe).



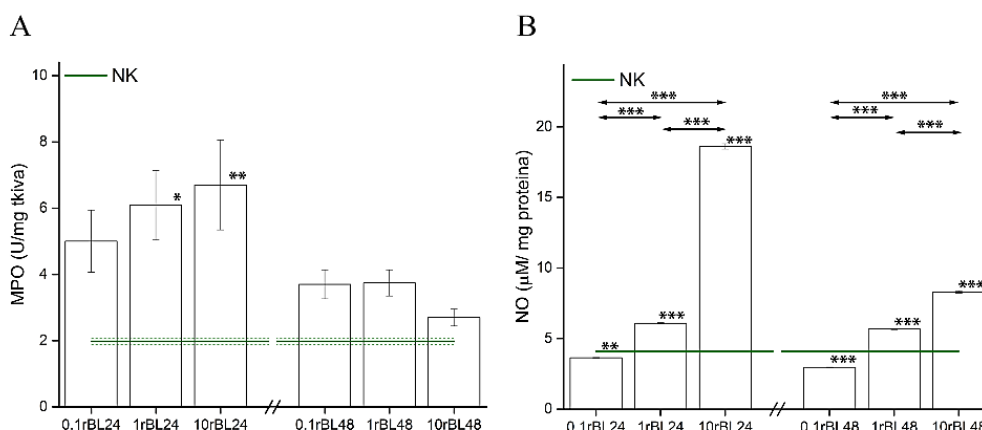
Slika 16. Uticaj tridesetodnevog oralnog tretmana rBanLec na relativnu zastupljenost bakterijskih familija u sastav mikrobiota C57BL/6 miševa. Rezultati su predstavljeni kao srednja relativna zastupljenost bakterijskih familija koje su detektovane u fecesima miševa iste grupe ($n = 5$). **(A)** Relativna zastupljenost bakterijskih familija u fecesu C57BL/6 miševa nakon 30 dana oralnog tretmana (100 μ L) rastvorom 0,1 μ g/mL rBanLec (rBL) i netretiranih miševa iste starosti i pola (NK); **(B)** Relativna zastupljenost bakterijskih familija za koje je pokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti u fecesu rBL i NK grupa (panel levo), sa naznačenim intervalom poverenja za varijacije među grupama i statističkom značajnošću procenjenom t-testom (panel desno; centar kruga predstavlja razliku u srednjoj vrednosti, dok boja kruga predstavlja grupu u kojoj je srednja vrednost relativne zastupljenosti bakterijske familije veća).

4.1.3.1. Uticaj jednokratnog intrarektalnog tretmana rBanLec na aktivnost MPO i proizvodnju NO u debelom crevu C57BL/6 miša

Visok nivo aktivnosti enzima MPO odlikuje prvenstveno neutrofile u kojima je MPO dominantno lociran u azurofilnim granulama. Stoga lokalna aktivnost MPO uglavnom pozitivno korelira sa brojem neutrofila u histološkim preparatima GIT i smatra se jednim od biomarkera neutrofilne infiltracije u tkivo [208]. Analiza aktivnosti MPO u debelom crevu C57BL/6 miševa ukazala je na njen prolazni rast 24h nakon tretmana rBanLec, pogotovo u 1rBL24 ($p < 0,05$ u odnosu

na NK) i 10rBL24 ($p < 0,005$ u odnosu na NK) grupama. Naime, u poređenju sa lokalnom aktivnošću izmerenom 24h nakon tretmana, lokalna aktivnost MPO je bila značajno niža 48h nakon tretmana (10rBL24 vs. 10rBL48 $p < 0,05$). Takođe, 24h nakon rBanLec tretmana uočena je izvesna dozna zavisnost lokalne aktivnosti MPO od koncentracije rBanLec u jednokratnom tretmanu ($P_{cc} = 0,823$; $p = 0,381$). Lokalna aktivnost MPO 48h nakon rBanLec tretmana, nezavisno od koncentracije rBanLec, nije bila statistički značajno veća od MPO aktivnosti izmerene u NK grupi (Slika 17. A).

Procena lokalne aktivnosti iNOS, zasnovana na nivou proizvodnje NO, je pokazala da je koncentracija NO u debelom crevu miševa jednokratno tretiranih sa 1 i 10 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec, nezavisno od vremenske tačke u kojoj je merena (24h ili 48h), značajno veća od lokalne NO koncentracije netretiranih miševa. Sa druge strane, kod miševa tretiranih sa 0,1 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec lokalna proizvodnja NO u obe vremenske tačke je bila niža u poređenju sa NK grupom (Slika 17. B). Najveća lokalna koncentracija NO izmerena je u grupi 10rBL24 i bila je značajno viša u poređenju sa svim ostalim rBanLec-tretiranim grupama ($p < 0,001$ za sve grupe). Pored toga, u obe vremenske tačke uočena je dozna zavisnost između lokalne koncentracije NO i koncentracije rBanLec u jednokratnom tretmanu (za 24h pretretman rBanLec $P_{cc} = 0,997$, $p = 0,044$; za 48h pretretman rBanLec $P_{cc} = 0,900$, $p = 0,286$).



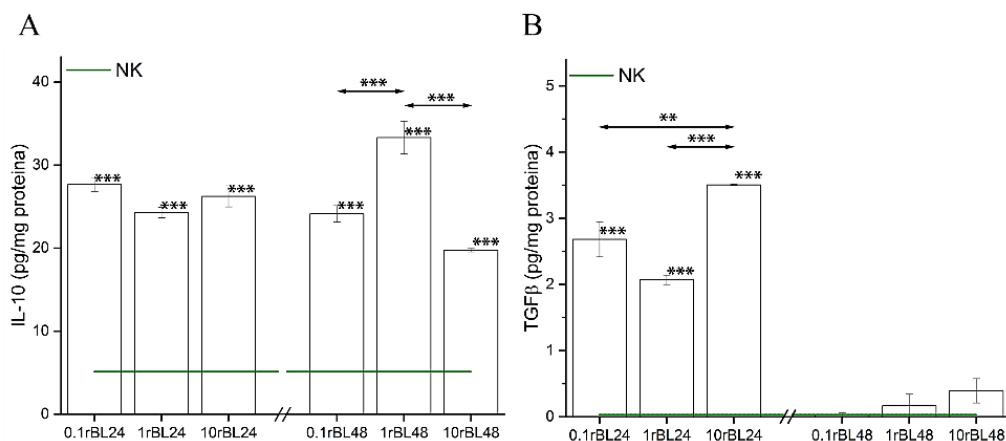
Slika 17. Aktivnost MPO i koncentracija NO u debelom crevu C57BL/6 miša 24h i 48h nakon intrarektalnog tretmana rBanLec. rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 $\mu\text{g/mL}$ (1rBL24 i 1rBL48) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (10rBL24 i 10rBL48). Na grafiku (A) je predstavljena MPO aktivnost, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost U aktivnosti MPO po miligramu tkiva debelog creva $\pm$ SE ($n = 5$), (B) je predstavljena koncentracija NO, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije NO izražene u μM po miligramu proteina $\pm$ SE ($n = 5$). Miševi iste starosti tretirani samo PBS (NK) su bili referentni. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je NK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Statistika među rBanLec tretiranim grupama je predstavljena strelicama. Srednja vrednost MPO aktivnosti i koncentracije NO u netretiranoj grupi je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom.

4.1.3.2. Uticaj jednokratnog intrarektalnog tretmana rBanLec na citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša

Analiza citokinskog miljea u debelom crevu rBanLec tretiranih C57BL/6 miševa obuhvatala je merenje lokalnih koncentracija IL-10, TGF β , IL-12, IFN γ , TNF, IL-6, IL-17 i GM-CSF (Slika 18. i 19.).

Dobijeni rezultati su pokazali da je koncentracija regulatornog citokina IL-10 u debelom crevu svih rBanLec-tretiranih miševa značajno uvećana u poređenju sa grupom NK ($p < 0,001$ za sve rBanLec-tretirane grupe). Među rBanLec-tretiranim grupama nije uočena značajna razlika lokalnih koncentracija IL-10 24h nakon tretmana, dok je 48h nakon tretmana koncentracija IL-10 u debelom crevu 1rBL48 miševa bila značajno veća u poređenju sa koncentracijama izmerenim u debelom crevu miševa grupa 0.1rBL48 i 10rBL48 ($p < 0,001$ za obe grupe) (Slika 18. A).

Koncentracija drugog analiziranog regulatornog citokina, TGF β , je 24h nakon tretmana značajno bila povećana u debelom crevu svih rBanLec-tretiranih miševa u poređenju sa grupom NK ($p < 0,001$). U debelom crevu miševa grupe 10rBL24 izmereno je značajno uvećanje koncentracije TGF β u poređenju sa 0.1rBL24 ($p < 0,01$) i 1rBL24 ($p < 0,001$) grupama. U debelom crevu grupa koje su tretirane rBanLec 48h ranije nije izmerena nikakva promena u koncentraciji TGF β citokina u poređenju sa NK grupom (Slika 18. B).



Slika 18. Koncentracija IL-10 i TGF β u debelom crevu C57BL/6 miša 24h i 48h nakon intrarektalnog tretmana rBanLec. rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 μ g/mL (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 μ g/mL (1rBL24 i 1rBL48) i 10 μ g/mL (10rBL24 i 10rBL48). Na grafiku (A) je predstavljena koncentracija IL-10, na grafiku (B) je predstavljena koncentracija TGF β . Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije IL-10 i TGF β izražene u pg po miligramu proteina $\pm$ SE ($n = 5$). Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je NK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Srednja vrednost koncentracija IL-10 i TGF β u netretiranoj grupi je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Miševi iste starosti tretirani samo PBS su označeni kao NK grupa. Statistika među rBanLec tretiranim grupama je predstavljena strelicama.

S obzirom da IL-12 spada u proinflamatorne citokine, između ostalog promovišući proizvodnju IFN γ i time podstičući imunski odgovor Th1 tipa, određivanje njegove lokalne koncentracije je od velikog značaja [209]. Dobijeni rezultati su pokazali da je, i 24h i 48h nakon tretmana, lokalna proizvodnja IL-12 u debelom crevu svih rBanLec-tretiranih grupa bila značajno uvećana u poređenju sa grupom NK ($p < 0,01$ za 0.1rBL24 grupu; $p < 0,001$ za sve ostale grupe). Nakon 24h od tretmana rBanLec, najmanja lokalna proizvodnja IL-12 je izmerena u debelom crevu miševa 0.1rBL24 grupe ($p < 0,05$ vs. 1rBL24; $p < 0,001$ vs. 10rBL24). Nakon 48h od rBanLec tretmana, iako dobijeni rezultati ukazuju na pozitivnu korelaciju između lokalne koncentracije IL-12 i stimulatorne koncentracije rBanLec, nije uočena statistički značajna razlika u lokalnoj koncentraciji IL-12 među rBanLec-tretiranim grupama (Slika 19. A).

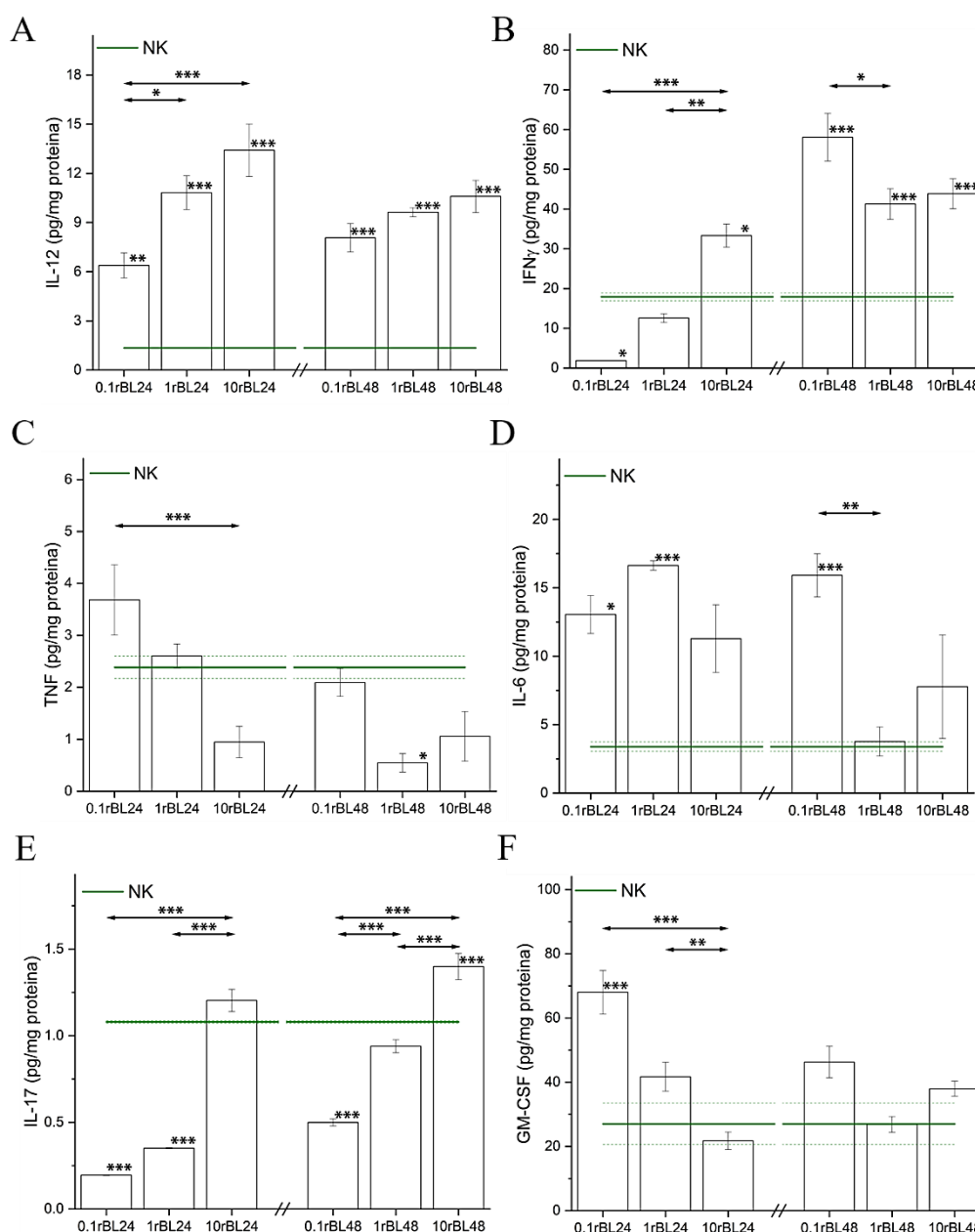
Dobijeni rezultati pokazuju da povećana lokalna proizvodnja IFN γ ne korelira nužno sa uočenim porastom proizvodnje IL-12 nakon jednokratnog rBanLec tretmana, što ukazuje da tretman rBanLec aktivira dodatne mehanizme koji utiču na proizvodnju IFN γ . U debelom crevu 0.1rBL24 ($p < 0,05$) i 1rBL24 miševa proizvodnja IFN γ je bila niža nego u NK grupi, dok je u 10rBL24 grupi bila značajno veća u poređenju sa NK grupom ($p < 0,05$). Drugim rečima, koncentracija IFN γ izmerena u debelom crevu miševa grupe 10rBL24 bila je značajno veća nego u 0.1rBL24 ($p < 0,001$) i 1rBL24 ($p < 0,01$) grupama. Nakon 48h od tretmana, u poređenju sa grupom NK, lokalna koncentracija IFN γ je bila značajno povećana u svim rBanLec-tretiranim grupama ($p < 0,001$ za sve grupe). Najveća koncentracija IFN γ je izmerena u debelom crevu 0.1rBL48 miševa ($p < 0,05$ u poređenju sa 1rBL48 grupom) (Slika 19. B).

U slobodnom opisu, proizvodnja TNF u debelom crevu rBanLec-tretiranih miševa (Slika 19. C) bila je komplementarna proizvodnji IFN γ (Slika 19. B). Tako je 24h nakon rBanLec tretmana koncentracijama TNF u debelom crevu miševa 0.1rBL24 bila je značajno veća u poređenju sa 10rBL24 grupom ($p < 0,001$). Takođe, u poređenju sa NK grupom, lokalna proizvodnja TNF je bila snižena u svim rBanLec-tretiranim grupama 48h nakon tretmana ($p < 0,05$ za 1rBL24) (Slika 19. C).

Stimulacija rBanLec je dovela i do porasta lokalne proizvodnje još jednog proinflatornog citokina, IL-6. Ovaj porast je bio naročito izražen 24h nakon tretmana ($p < 0,05$ za 0.1rBL24; $p < 0,001$ za 1rBL24 i 0.1rBL48). 48h nakon rBanLec tretmana, najveća lokalna koncentracija IL-6 izmerena je u 0.1rBL48 grupi i bila je statistički značajno veća od lokalne koncentracije IL-6 u NK grupi ($p < 0,001$) (**Slika 19. D**).

Doprinos Th17 usmerenog imunskog odgovora u razvoju patologije GIT je dokumentovan u brojnim radovima [210,211]. Stoga je određivanje lokalne koncentracije IL-17, marker citokina Th17 odgovora, od velikog značaja. Jednokratni rektalni tretman rBanLec u koncentraciji 0,1 i 1 $\mu\text{g/mL}$, doveo je do značajnog smanjenja lokalne koncentracije IL-17, i 24h i 48h nakon tretmana ($p < 0,001$ za 0.1rBL24, 1rBL24, 0.1rBL48 i 10rBL48 u poređenju sa NK grupom). U obe kontrolne tačke (24h i 48h), među rBanLec-tretiranim grupama najveće lokalne koncentracije IL-17 izmerene su u grupama tretiranim sa 10 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec (NK vs. 10rBL48 $p < 0,001$, 10rBL24 vs. 0.1rBL24, 1rBL24 $p < 0,001$, 10rBL48 vs. 0.1rBL48, 1rBL48 $p < 0,001$). Takođe, u obe merne tačke primećena je pozitivna dozna zavisnost lokalne proizvodnje IL-17 od doze rBanLec korišćene za tretman (za pretretman 24h rBanLec $P_{cc} = 0,998$; $p = 0,039$; za pretretman 48h rBanLec $P_{cc} = 0,909$; $p = 0,271$) (**Slika 19. E**).

Lokalna proizvodnja GM-CSF je analizirana s obzirom da on značajno utiče na funkcionalne karakteristike APC [212]. Značajno povećanje lokalne proizvodnje GM-CSF uočeno je jedino u 0.1rBL24 grupi ($p < 0,001$). Kod 1rBL24 i 10rBL24 grupa lokalna koncentracija GM-CSF se nije značajno razlikovala od koncentracije izmerene u NK grupi. Među rBanLec-tretiranim grupama, 24h nakon tretmana, najniža koncentracija je izmerena u 10rBL24 grupi ($p < 0,001$ za 0.1rBL24; $p < 0,01$ za 1rBL24). 48h nakon tretmana nije uočena značajna razlika u lokalnoj koncentraciji GM-CSF u debelom crevu rBanLec-tretiranih miševa i miševa NK grupe (**Slika 19. F**).

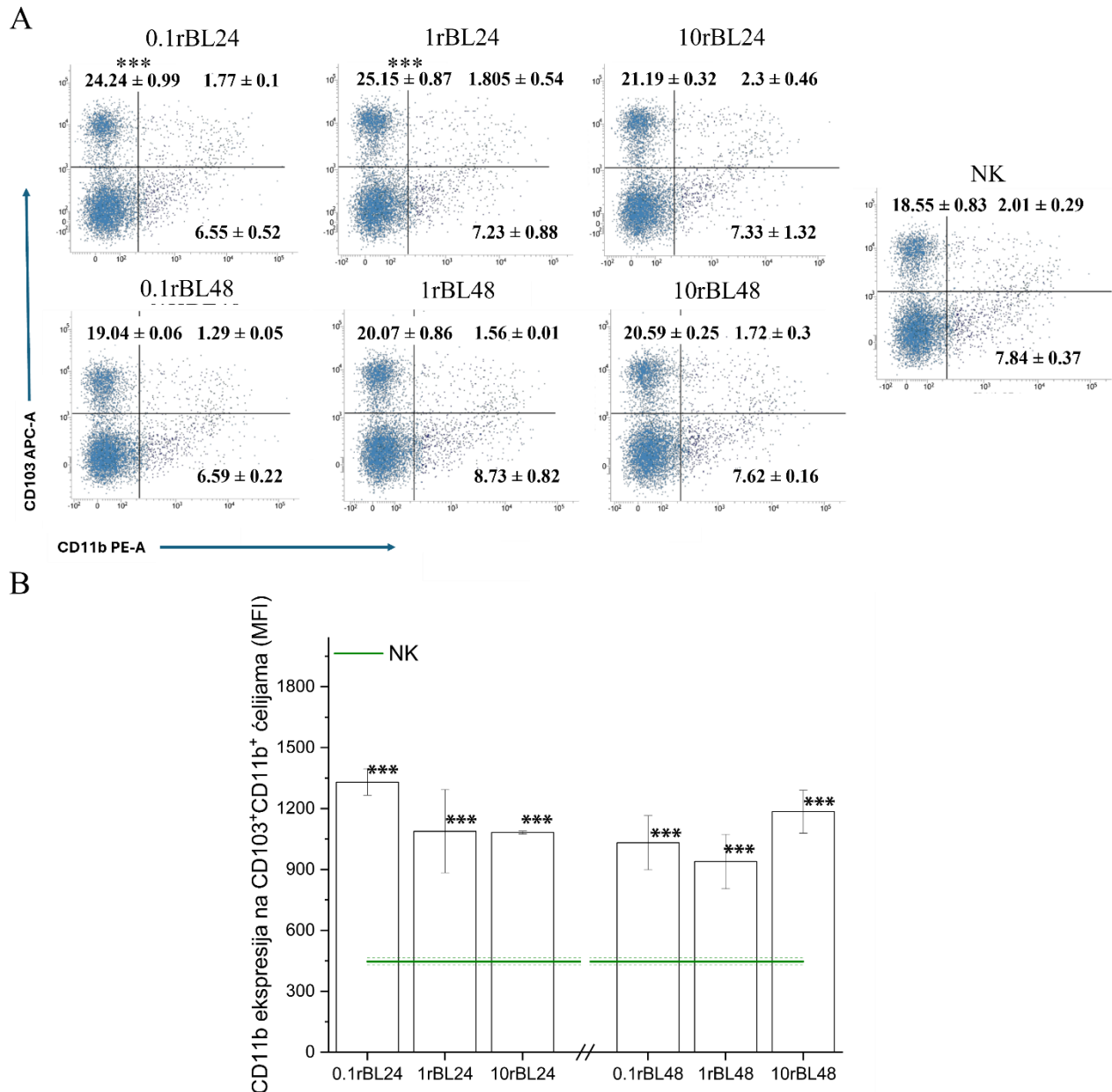


Slika 19. Koncentracija IL-12, IFN γ , TNF, IL-6, IL-17 i GM-CSF u debelom C57BL/6 miša 24h i 48h nakon intrarektalnog tretmana rBanLec. rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 μ g/mL (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 μ g/mL (1rBL24 i 1rBL48) i 10 μ g/mL (10rBL24 i 10rBL48). Koncentracije IL-12 (A), IFN γ (B), TNF (C), IL-6 (D), IL-17 (E) i GM-CSF (F) su predstavljene kao srednja vrednost koncentracije citokina izražene u pg po miligramu proteina $\pm$ SE (n = 5). Srednja vrednost koncentracija citokina u netretiranoj grupi je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je NK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Miševi iste starosti tretirani samo PBS (NK) su bili referentni. Statistika među rBanLec tretiranim grupama je predstavljena strelicama.

4.1.3.3. Uticaj jednokratnog intrarektalnog tretmana na zastupljenost specifičnih populacija imunskih ćelija u mLČ C57BL/6 miševa u fiziološkim uslovima

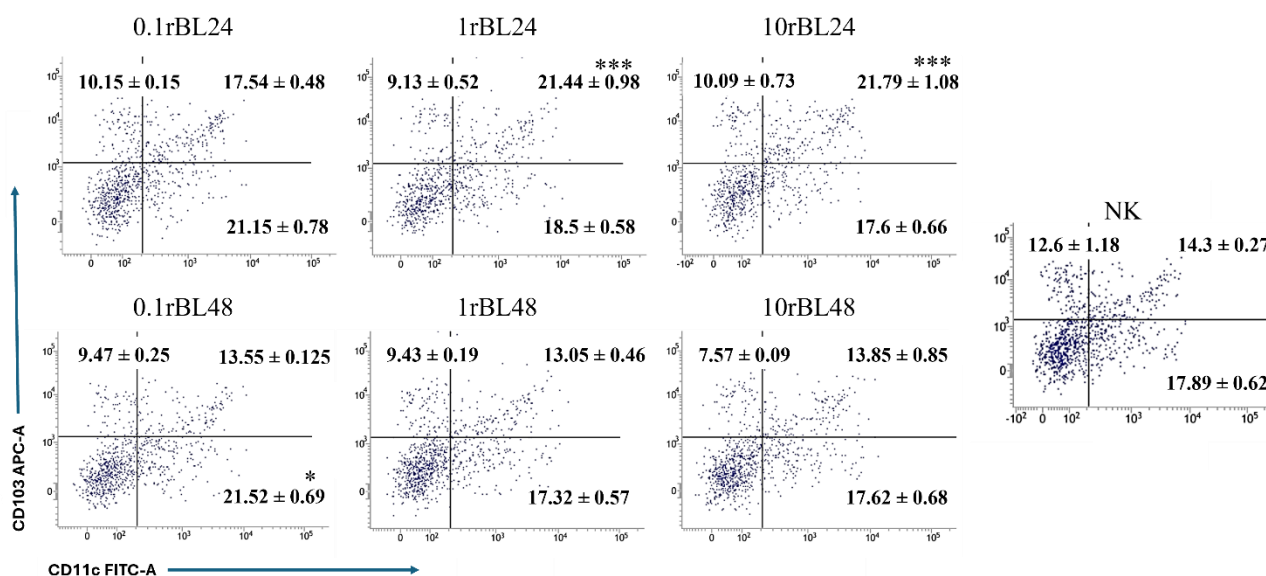
Na osnovu analize ekspresije CD103 (α E integrin), CD11b i CD11c protočnom citofluorimetrijom praćene su promene u zastupljenosti subpopulacija APČ u okviru drenirajućih mLČ C57BL/6 miševa jednokratno tretiranih rBanLec. Na osnovu ekspresije ovih markera, DČ se dele na subpopulacije različitih funkcionalnih karakteristika koje specifično utiču na kvalitativne odlike imunskog odgovora koji pokreću (Slika 20.).

Nakon 24h od tretmana rBanLec uočen je značajan porast zastupljenosti CD103⁺ pozitivnih ćelija (NK vs. 0.1rBL24 i 1rBL24 $p < 0,001$, NK vs. 10rBL24 $p < 0,05$) u mLČ i on je bio posledica porasta zastupljenosti CD103⁺CD11b⁻ ćelija. Jednokratni rektalni tretman rBanLec u koncentracijama 0,1 i 1 $\mu\text{g/mL}$ nakon 24h doveo je do prolaznog porasta zastupljenosti CD103⁺CD11b⁻ ćelija u mLČ ($p < 0,001$ za 0.1rBL24 i 1rBL24 u poređenju sa NK grupom). Nakon 24h od rBanLec tretmana nije uočena značajna promena u zastupljenosti CD103⁺CD11b⁺ ćelija u mLČ rBanLec-tretiranih miševa (Slika 20. A). 48h nakon intrarektalne aplikacije rBanLec, procentualna zastupljenost populacija APC definisanih na osnovu ekspresije CD103 i CD11b molekula bila je uporediva sa zastupljenošću u mLČ netretiranih miševa (Slika 20. A).



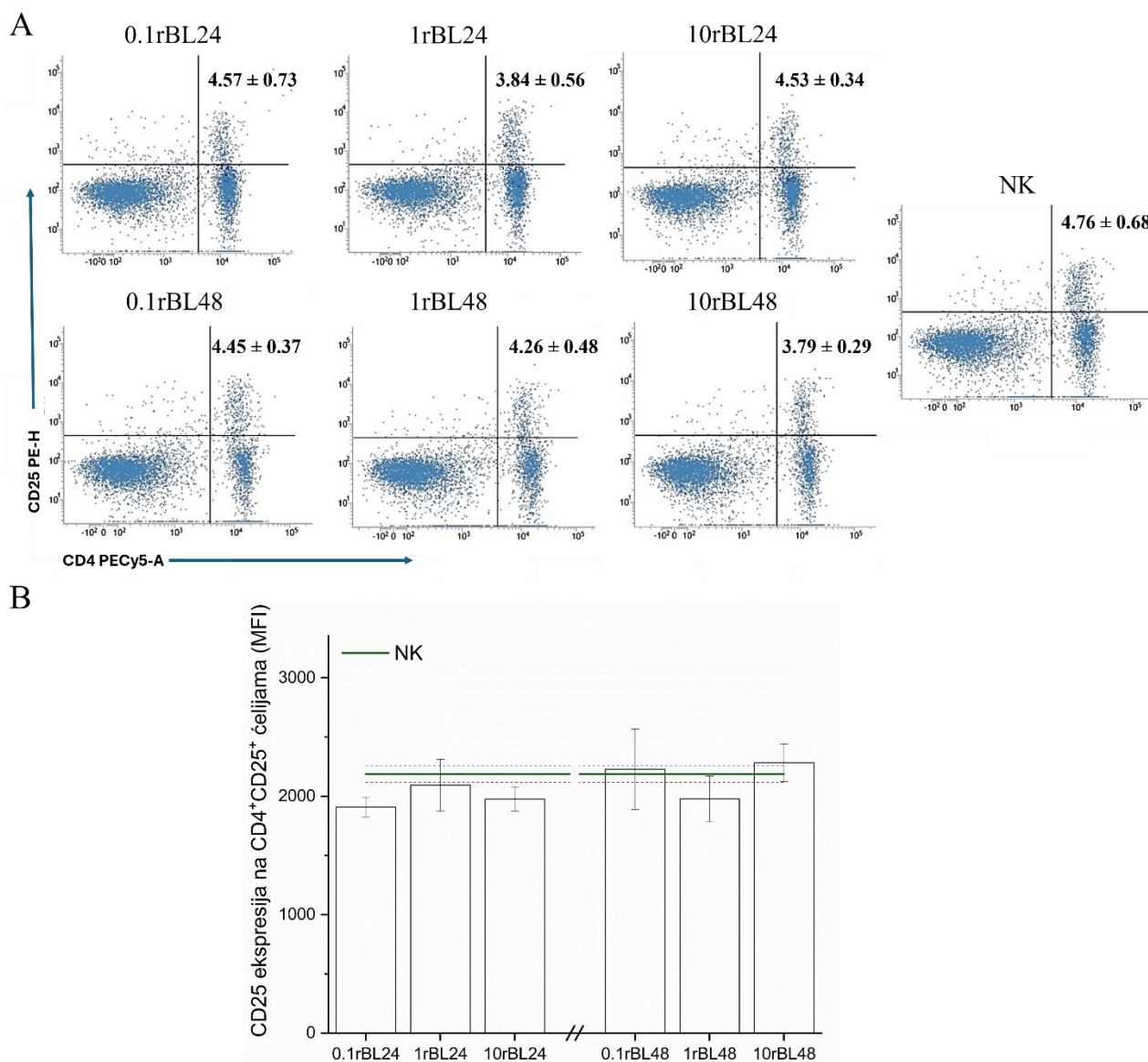
Slika 20. Ekspresija CD11b na CD103⁺CD11b⁺ ćelijama u mLČ C57BL/6 u piku TNBS-izazvanog kolitisa nakon jednokratnog pretretmana rBanLec. 24h ili 48h pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa, rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 $\mu\text{g/mL}$ (1rBL24 i 1rBL48) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (10rBL24 i 10rBL48). (A) Na reprezentativnim dotplotovima predstavljene su srednje vrednosti procentualne zastupljenosti CD103⁺CD11b⁺ ćelija $\pm$ SE ($n = 5$) u mLČ tretiranih miševa. (B) Na grafiku je predstavljena srednja vrednost gustine ekspresije CD11b molekula na površini CD103⁺CD11b⁺ ćelija u mLČ miševa (MFI) ($n = 5$). Srednja vrednost procentualne zastupljenosti ćelija u netretiranoj grupi je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je NK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ za obeležja na stubićima). Miševi iste starosti tretirani samo PBS (NK) su bili referentni.

Zastupljenost CD11b⁺ u mLČ tretiranih C57BL/6 miševa nije se značajno menjala tokom 48h od rBanLec tretmana, ali su se karakteristike ovog pula menjale. Dobijeni rezultati ukazuju da CD103⁺CD11b⁺ ćelije eksprimiraju značajno veću ($p < 0,001$) količinu CD11b u poređenju sa netretiranim miševima (**Slika 20. B**). Pored toga, analiza ekspresije CD11c i CD103 u pulu CD11b⁺ ćelija mLČ ukazala je da primena rBanLec u debelom crevu rezultira izmenama u zastupljenosti subpopulacija CD11b⁺ ćelija u mLČ. Tom analizom je pokazano prolazno uvećanje procentualne zastupljenosti CD103⁺CD11c⁺CD11b⁺ ćelija u mLČ 24h nakon rBanLec tretmana, pri čemu je ono bilo statistički značajno kod miševa grupa 1rBL24 i 10rBL24 ($p < 0,001$). Porast zastupljenosti CD103⁺CD11c⁺CD11b⁺ ćelija bio je praćen smanjenjem zastupljenosti CD103⁺CD11c⁻ u CD11b⁺ pulu. Trend smanjenja zastupljenosti CD103⁺CD11c⁻CD11b⁺ je bio još izraženiji 48h nakon jednokratne stimulacije. Pored toga, u grupama jednokratno tretiranim sa 0,1 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec, 0.1rBL24 i 0.1rBL48, uočen je značajan porast zastupljenosti CD103⁺CD11c⁺ u okviru CD11b⁺ pula ($p < 0,05$) (**Slika 21.**).



Slika 21. Procentualna zastupljenost CD103⁺CD11c⁺ ćelija u okviru CD11b⁺ ćelija mLČ C57BL/6 miševa nakon 24h i 48h od intrarektalnog tretmana rBanLec. rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 $\mu\text{g/mL}$ (1rBL24 i 1rBL48) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (10rBL24 i 10rBL48). Na reprezentativnim dotplotovima predstavljene su srednje vrednosti procentualne zastupljenosti CD103⁺CD11c⁺ ćelija u okviru CD11b⁺ ćelija $\pm$ SE ($n = 5$) u mLČ tretiranih miševa. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je NK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Miševi iste starosti tretirani samo PBS (NK) su bili referentni.

Nakon analize promena u pulu APC⁺, analizirana je i promena zastupljenosti efektorskih ćelija u mLČ. U fokusu su bile CD4⁺ T ćelije budući da one, kao Th ćelije, kvalitativno određuju imunski odgovor koji se uspostavlja i, kao Treg, učestvuju u kontroli njegovog intenziteta. Nije uočena značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti CD4⁺CD25⁺ ćelija u mLČ rBanLec-tretiranih miševa u poređenju sa NK grupom (**Slika 22. A**). Pored toga, analiza nivoa ekspresije CD25 molekula na CD4⁺CD25⁺ limfocitima, urađena u cilju preliminarne procene eventualne promene odnosa aktiviranih Th (CD25⁺) i Treg (CD25⁺), ukazala je da njihov odnos u mLČ 24h i 48h nakon rBanLec tretmana nije značajno izmenjen u odnosu na odnos u mLČ netretiranih C57BL/6 miševa (**Slika 22. B**).



Slika 22. Procentualna zastupljenost CD4⁺CD25⁺ ćelija u mLC C57BL/6 miša 24h i 48h nakon intrarektalnog tretmana rBanLec. rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (0.1rBL24 i 0.1rBL48), 1 µg/mL (1rBL24 i 1rBL48) i 10 µg/mL (10rBL24 i 10rBL48). (A) Na reprezentativnim dotplotovima predstavljene su srednje vrednosti procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺ ćelija ± SE (n = 5) u mLC tretiranih miševa. (B) Na grafiku je predstavljena srednja vrednost gustine ekspresije CD25 molekula na površini CD4⁺CD25⁺ ćelija u mLC miševa (MFI) (n = 5). Srednja vrednost gustine ekspresije CD25 molekula na površini CD4⁺CD25⁺ ćelija u netretiranoj grupi je prikazana punom zelenom linijom, a vrednost standardne greške je označena isprekidanom linijom. Miševi iste starosti tretirani samo PBS (NK) su bili referentni.

4.1.4. Imunomodulatorni efekat rBanLec u GIT u fiziološkim uslovima - diskusija

In vitro istraživanja u kulturi Caco-2 ćelija pokazala su da rBanLec u koncentraciji do 1 µg/mL ne ispoljava nikakav citotoksičan efekat na epitelnim ćelijama, ali i ukazala da bi stimulacija većim koncentracijama (10 µg/mL) rBanLec mogla negativno uticati na vijabilnost ćelija crevnog eptela. Takođe, pokazano je da rBanLec u Caco-2 ćelijama pokreće dinamičan odgovor čije karakteristike zavise od stimulatorne koncentracije. Pri stimulaciji rBanLec u koncentracijama 0,1 – 10 µg/mL, najintenzivniji odgovor je uočen u kulturi stimulisanjoj sa 10 µg/mL. Značajan porast proizvodnje IL-10 od strane Caco-2 ćelija stimulisanih sa 10 µg/mL uočen je već nakon 24h, dok je porast ekspresije NF-κB registrovan tek nakon 48h. Ovi podaci potvrđuju prethodna zapažanja koja se odnose na

sposobnost rBanLec da dozno-zavisno promoviše uspostavljanje izbalansiranog proinflamatornog odgovora [111].

S obzirom da je BanLec jedan od fiziološki aktivnih molekula u plodu banane koji značajan deo populacije redovno konzumira, *in vivo* su ispitani efekti višednevne (30 dana) oralne primene rBanLec u zdravim C57BL/6 miševima. Iako višednevni oralni tretman nije imao značajan negativan uticaj na opšte stanje životinja, činjenica da su te životinje sporije povećavale TT ukazuje da bi primeni rBanLec trebalo pristupiti sa oprezom. U prilog ovoj sugestiji ide i pojava nešto većeg broja infiltrata polimorfonuklearnih ćelija u tkivnim presecima debelog creva životinja čija je ishrana tokom tridesetodnevno perioda bila suplementirana rBanLec u odnosu na životinje koje su bile u standardnom režimu ishrane (NK). Iako nisu uočena značajna oštećenja tkiva, povećan broj ćelijskih infiltrata ukazuje na postojanje lokalne inflamatorne reakcije. Prethodna ispitivanja, rađena u BALB/c miševima, gde je rBanLec jednokratno primenjivan u koncentraciji 1 µg/mL, značajno većoj u odnosu na koncentraciju korišćenu za oralni tretman (0,1 µg/mL), nisu ukazala na pojačanu infiltraciju ćelija u subepitelni prostor usled rBanLec tretmana. Pored toga, navedena istraživanja su pokazala da se rBanLec u tkivu debelog creva zadržava 48-72h [111]. Imajući to u vidu, moglo bi se pretpostaviti da u određenoj vremenskoj tački efektivna koncentracija rBanLec u debelom crevu prevazilazi onu koju bi obezbedio jednokratni dnevni unos i da kumulativno, nakon višednevnog tretmana, to dovodi do lokalne pojave blage inflamacije.

Kontinuirana tridesetodnevna oralna primena rBanLec nije značajno uticala na analizirane imunološke parametre. Aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i GST je ostala nepromenjena u debelom crevu miševa tretiranih rBanLec, što bi se delom moglo povezati sa uočenim značajnim smanjenjem lokalne aktivnosti MPO, enzima koji dominantno ima prooksidativnu ulogu. Analiza citokinskog miljea u debelom crevu je pokazala da oralni tretman rBanLec, u odsustvu patološkog stanja, ne dovodi do značajne promene lokalne koncentracije TGFβ, IL-10, IL-12, IFNγ, IL-17, IL-4 i TNF. Prosečne lokalne koncentracije TGFβ, citokina koji promovišu Th1 tip imunskog odgovora (IL-12, IFNγ) i TNF su bile više u debelom crevu miševa oralno tretiranih rBanLec u poređenju sa NK grupom, ali uočene razlike nisu bile statistički značajne. Razlike u lokalnoj proizvodnji IL-10, IL-4 i IL-17 su bile još manje. Takođe, tretman rBanLec nije značajno uticao na procentualnu zastupljenost Treg ćelija u mLČ i u slezini. Analiza intenziteta ekspresije transkripcionog faktora FoxP3⁺ u CD4⁺CD25⁺ ćelijama ukazala je da tridesetodnevni oralni tretman rBanLec nije doveo ni do značajne promene u stepenu aktivnosti Treg ćelija kako na lokalnom tako i na sistemskom nivou [213].

Sa druge strane, višednevna oralna suplementacija rBanLec dovela je do promena karakteristika crevne mikrobiote C57BL/6 miševa. Uočeno je smanjenje broja vrsta bakterija koje ulaze u sastav mikrobiote i promena zastupljenost pojedinih bakterijskih familija. Zastupljenost familija *Bacteroidaceae*, *Desulfovibinaceae* i *Tannerellaceae* je značajno povećana u fecesu miševa koji su tretirani rBanLec. Dok se za bakterije koje pripadaju familiji *Tannerellaceae* zna samo da pripadaju oralnim patogenim bakterijama koje potpomažu proinflamatorni lokalni odgovor, o bakterijama koje pripadaju drugim familijama postoji više literaturnih podataka [214]. Rod bakterija *Bacteroides*, koji pripada familiji *Bacteroidaceae*, aktivno se istražuje kao potencijalni izvor probiotika nove generacije. Neke od vrsta koje pripadaju ovoj familiji imaju sposobnost inhibicije kolonizacije lumena debelog creva patogenim bakterijama i mogu da ublaže zapaljensku reakciju unutar intestinuma [215,216]. U nedavnoj studiji je pokazano da 21 vrsta bakterija iz familije *Bacteroidaceae* može uticati na oporavak mikroflore u debelom crevu posle primene antibiotika. Između ostalog, pokazano je da bakterijske vrste *B. thetaiotaomicron* i *B. adolescentis* sinergistički stimulišu oporavak i raznovrsnost mikrobiote [217]. *B. uniformis* inhibira povećanje koncentracije citokina čija je sekrecija indukovana lipopolisaharidom (LPS) i na taj način značajno smanjuje lokalnu zapaljensku reakciju [218]. Bakterije familije *Bacteroidaceae* koriste vlakna iz lumena creva za sintezu glikana. Komensalne bakterije *B. fragilis* proizvode specifičan glikan, polisaharid A, koji ima snažan antiinflamatorni efekat. Pokazano je da kolonizacija GIT „germ-free“ miševa sa *B. fragilis* ili tretman polisaharidom A smanjuju mogućnost indukcije IBD jer polisaharid A povećava lokalnu

produkciju IL-10 i pozitivno utiče na aktivnost Treg ćelija [219]. Dalje, uočena je pozitivna korelacija između nivoa SCFA u fecesu i rasprostranjenosti roda *Bacteroides* u debelom crevu [220]. Bakterije roda *Bacteroides* pokazuju visok stepen prilagodljivosti na spoljašnju okolinu i olakšavaju rast drugih vrsta koje proizvode SCFA metabolišući ugljene hidrate u lumen creva [221]. SCFA doprinose kontroli inflamatorne reakcije tako što inhibiraju proizvodnju TNF, IL-2 i IL-1 β koje su pozitivno regulisane NF- κ B-zavisnim transkripcionim putem [222,223]. Bakterije koje pripadaju porodici *Desulfovibrionaceae* aktiviraju imunski odgovor koji karakteriše povećanje proizvodnje NO i proizvodnja proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6 i IL-8 [224]. Iako se povećanje relativne zastupljenosti bakterija iz porodice *Desulfovibrionaceae* povezuje sa mnogim bolestima, uključujući i IBD, mehanizam koji je u osnovi te veze je i dalje nepoznat [225]. Kolonizacija debelog creva miša bakterijama iz porodice *Desulfovibrionaceae* indukuje imunski odgovor koji, pored porasta procentualne zastupljenosti B, CD11b⁺ i CD8⁺ T ćelija, uključuje i porast zastupljenosti Th17 i Treg ćelija u mLČ [226]. Opisani efekti bakterija iz porodica *Bacteroidaceae* i *Desulfovibrionaceae* na imunski odgovor u GIT, uz činjenicu da višednevni oralni tretman rBanLec dovodi do povećanja njihove zastupljenosti u GIT C57BL/6 miša, idu u prilog pretpostavci da rBanLec, pored direktnog uticaja na ćelije imunskog sistema, ostvaruje i indirektan imunomodulatorni efekat utičući na sastav mikrobiote. Sa druge strane, činjenica da promene u sastavu mikrobiote usled višednevnog oralnog tretmana rBanLec nisu bile praćene značajnim promenama analiziranih imunoloških parametara, uključujući lokalne koncentracije citokina koji određuju efektorske karakteristike imunskog odgovora (IL-10, IL-12, IFN γ , IL-17, IL-4 i TNF) i kontrolišu inflamatornu reakciju (IL-10, TGF β), ukazuje na potrebu za daljim istraživanjem mehanizama koji su obezbedili očuvanje imunske homeostaze u debelom crevu C57BL/6 miša tokom višednevnog tretmana rBanLec.

Kao i kod BALB/c miševa [111], jednokratna intrarektalna primena rBanLec u fiziološkim uslovima je dovela do dinamičnih promena karakteristika lokalnog imunskog miljea u debelom crevu C57BL/6 miševa. Jednokratni tretman rBanLec uticao je na lokalno prisutne ćelije urođene imunosti, na što ukazuju promene u lokalnoj sekreciji TNF i IL-6, proizvodnji NO i aktivnosti MPO. Porast njihove lokalne koncentracije / aktivnosti u odnosu na fiziološko stanje (NK grupa) je generalno bio izraženiji tokom prvih 24h, s tim što je u slučaju NO proizvodnje i MPO aktivnosti uočen pozitivan dozno-zavisni trend promena, dok je intenzitet lokalne sekrecije TNF i IL-6 dominantno bio u inverznoj korelaciji sa apliciranom dozom rBanLec. Ovi medijatori, utičući na funkcionalne karakteristike APC i efektorskih imunskih ćelija, predstavljaju važnu kariku koja povezuje urođeni i adaptivni imunski odgovor [227-230]. Međutim, ključnu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora u GALT imaju CD103⁺ DC. Ove ćelije predstavljaju migratornu populaciju koja, zahvaljujući ekspresiji CCR7 na svojoj površini, migrira iz limfoidnog tkiva pridruženog crevu (GALT) u mLČ. Imajući u vidu ovu mobilnost u pravcu GALT-mLČ, može se pretpostaviti da CD103⁺ DC populacija u mLČ u velikoj meri reprezentuje funkcionalne karakteristike CD103⁺ DC populacije u GALT. CD103⁺ DC imaju ključnu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora u GALT koja se zasniva na jedinstvenoj sposobnosti da pri aktivaciji T ćelija u mLČ promovišu uspostavljanje fenotipa (CCR9 i α 4 β 7 ekspresija) koji obezbeđuje njihov tropizam ka GIT [231]. U fiziološkim uslovima, CD103⁺ DC predstavljaju važan izvor TGF β i IL-10, citokina neophodnih za diferencijaciju i aktivnost Treg. Na taj način one doprinose kontroli imunske homeostaze u GALT i uspostavljanju tolerance na oralno unete antigene [232-235]. Tretman rBanLec, nezavisno od doze, doveo je do značajnog povećanja CD103⁺ DC u mLČ 24h nakon rBanLec tretmana. Ipak nakon rBanLec tretmana nije uočen značajan porast zastupljenosti Treg ćelija u mLČ, verovatno zbog potrebe za periodom dužim od 48h za njihovu značajniju ekspanziju posle kontakta sa DC [236]. Imajući u vidu da su CD103⁺ DC značajan izvor TGF β , može se pretpostaviti da je porast koncentracije TGF β u debelom crevu 24h nakon rBanLec tretmana delom povezan sa njihovom aktivnošću. Pored toga, literaturni podaci ukazuju da CD103⁺CD11b⁺ ćelije, čija zastupljenost u mLČ je porasla 24h nakon rBanLec tretmana (statistički značajno u 0.1rBL24 i 1rBL24 grupama), proizvode IFN γ i IL-17A promovišu uspostavljanje lokalnog Th1/Th17 imunskog odgovora [237,238]. Ta činjenica, uz značajan porast lokalne proizvodnje IL-12 24h nakon tretmana rBanLec, mogla bi objasniti intenzivan rast lokalne koncentracije IFN γ 48h nakon rBanLec tretmana. Takođe, porast lokalne koncentracije IL-17A 48h

nakon rBanLec tretmana u poređenju sa 24h ranije, mogao bi se bar delom povezati sa rastom zastupljenosti CD103⁺CD11b⁻ ćelija. Sa druge strane, usmeravanju imunskog odgovora u Th17 pravcu mogu doprineti i CD103⁺CD11b⁺ DC produkujui TGFβ i IL-23 [239,240]. Generalno, u poređenju sa NK, jednokratni rBanLec tretman nije doveo do značajne promene zastupljenosti CD11b⁺ ćelija u mLČ, ali je doveo do promena karakteristika ovog pula ćelija. CD11b⁺ ćelije u mLČ predstavljaju heterogeni pul koji obuhvata makrofage i DC. Analiza ekspresije CD11c, molekula koji se smatra osnovnim markerom mišjih DC, pokazala je da 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec, pogotovo sa 1 μg/mL i 10 μg/mL, dolazi do prolaznog porasta zastupljenosti CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ ćelija (CD103⁺CD11b⁺ DC) u CD11b⁺ pulu mLČ C57BL/6 miša. Takođe, na CD103⁺CD11b⁺ ćelijama u mLČ svih rBanLec pretretiranih miševa uočena je intenzivnija ekspresija CD11b koja bi se mogla povezati sa činjenicom da je rBanLec tretman, već tokom prva 24h, u debelom crevu doznovlasno stimulisao proizvodnju GM-CSF i TGFβ, citokina potrebnih za diferencijaciju CD103⁺CD11b⁺ DC [241,242]. Pored toga što produkuju TGFβ, aktivnost CD103⁺CD11b⁺ DC je i zavisna od TGFβR1-posredovane signalizacije. CD103⁺CD11b⁺ DC promovišu diferencijaciju IgA produkujuić plazma ćelija [232,242], a nedostatak funkcionalnih CD103⁺CD11b⁺ DC povezuje se sa značajnim padom zastupljenosti inducibilnih Treg i Th17 ćelija u crevnoj mukozi [232,242]. Pored porasta CD103⁺CD11b⁺ DC u 1rBL24 i 10rBL24 grupama, analiza koekspresije CD103/CD11c u CD11b⁺ pulu ćelija mLČ ukazala je i na porast zastupljenosti CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ ćelija u mLČ 0.1rBL24 i 0.1rBL48 grupa. Predpostavlja se da ove ćelije pripadaju populaciji rezidentnih APC u mLČ, i (jedna od) funkcija im je efikasna inicijacija imunskog odgovora protiv patogena koji na svojoj površini imaju flagelin. Pokazano je da CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ efikasno pokreću aktivaciju flagelin-specifičnih T ćelija i pri jako niskim koncentracijama antigena i da je efikasnost zavisna od TLR5 ekspresije na njihovoj površini [243].

Imajući u vidu rezultate dobijene u miševima dva soja, C57BL/6 mišu (poglavlju 4.1.3.) i BALB/c [111], koja se značajno razlikuju imunološkim karakteristikama, rBanLec bi se mogao označiti kao bioaktivni molekul koji značajno utiče na GALT. Jednokratni rBanLec tretman je indukovaio dinamične promene u lokalnoj koncentraciji solubilnih medijatora (ROS i RNS, regulatorni i proinflamatornih citokini) koje utiču na funkcionalne karakteristike ćelija imunskog sistema. Sticanje uvida u kojoj meri te promene utiču na karakteristike patološkog odgovora koji se može razviti usled dejstva specifičnog spoljašnjeg ili endogenog faktora, je preduslov za eventualnu primenu rBanLec u kontroli IBD.

4.2. Evaluacija efekta jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu

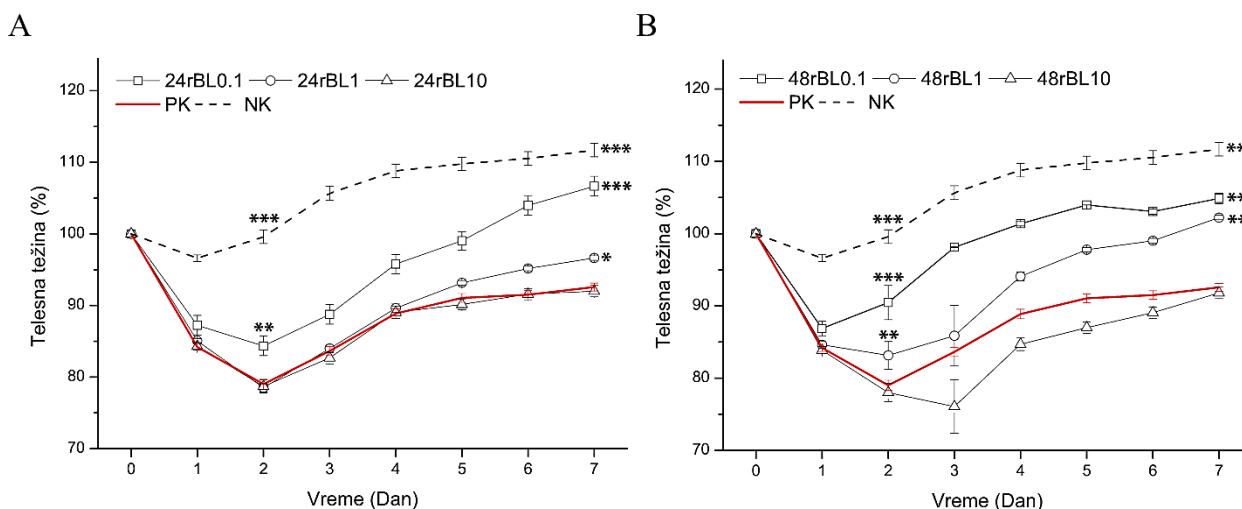
U drugoj fazi izrade ove teze, *in vivo* je isptivan efekat jednokratne profilaktičke primene rBanLec u modelu kolitisa izazvanog TNBS u C57BL/6 mišu. Cilj ovog seta eksperimenata je bio da se utvrdi kako funkcionalne karakteristike lokalnog imunskog miljea uspostavljenog nakon jednokratnog tretmana rBanLec utiču na težinu i tok TNBS izazvanog kolitisa. Imajući u vidu da rBanLec pokreće dinamične promene u limfoidnom tkivu pridruženom GIT i da se stoga razlikuju karakteristike lokalnog imunskog miljea uspostavljenog 24h i 48h nakon tretmana, analizirani su efekti jednokratnih rBanLec tretmana urađenih 24h (24rBL) ili 48h (48rBL) pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa. Profilaktički tretman je podrazumevao intrarektalno aplikovanje rastvora rBanLec koncentracije 0,1 μg/mL (grupe 24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 μg/mL (grupe 24rBL1 i 48rBL1) ili 10 μg/mL (grupe 24rBL10 i 48rBL10). Kao kontrolne, formirane su dve grupe miševa odgovarajuće starosti i pola: a) pozitivna kontrola (PK) – grupa miševa kojima je izazvan kolitis bez prethodnog tretmana rBanLec i b) negativna kontrola (NK) – grupa miševa koja nije podvrgnuta tretmanu rBanLec i izazivanju eksperimentalnog kolitisa.

4.2.1. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na opšte stanje C57BL/6 miševa tokom TNBS-izazvanog kolitisa

Gubitak TT je izabran kao glavni makroskopski parametar za procenu intenziteta bolesti. Analiza promena u TT je pokazala da jednokratni profilaktički tretman rBanLec nije uspeo da spreči razvoj bolesti ali je, zavisno od primenjene doze, doveo do ublažavanja inteziteta i ubrzanja funkcionalnog oporavka (**Slika 23.**). Promene TT nakon izazivanja bolesti su ukazale da najbolji profilaktički efekat ima jednokratna primena 0,1 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec.

Među 24rBL grupama, najmanji gubitak TT u piku bolesti (2. dana nakon izazivanja bolesti) zapažen je kod miševa grupe 24rBL0.1. TT miševa 24rBL0.1 grupe u piku bolesti je bila značajno manja u poređenju sa NK grupom ($p < 0,01$), ali i značajno viša u odnosu na grupu PK ($p < 0,01$). Gubitak TT kod miševa grupa 24rBL1 i 24rBL10 u piku bolesti nije se značajno razlikovao od gubitka TT u PK grupi. (**Slika 23. A**). U fazi oporavka, 7. dana nakon izazivanja kolitisa, svi miševi 24rBL0.1 grupe su se potpuno oporavili i imali TT koja je bila značajno viša od prosečne TT miševa PK, 24rBL1 i 24rBL10 grupa ($p < 0,001$) i ne značajno niža u odnosu na NK grupu. U poređenju sa PK grupom, 7. dana od izazivanja kolitisa izmeren je blagi porast TT i kod miševa 24rBL1 grupe ($p < 0,05$) (**Slika 23. A**).

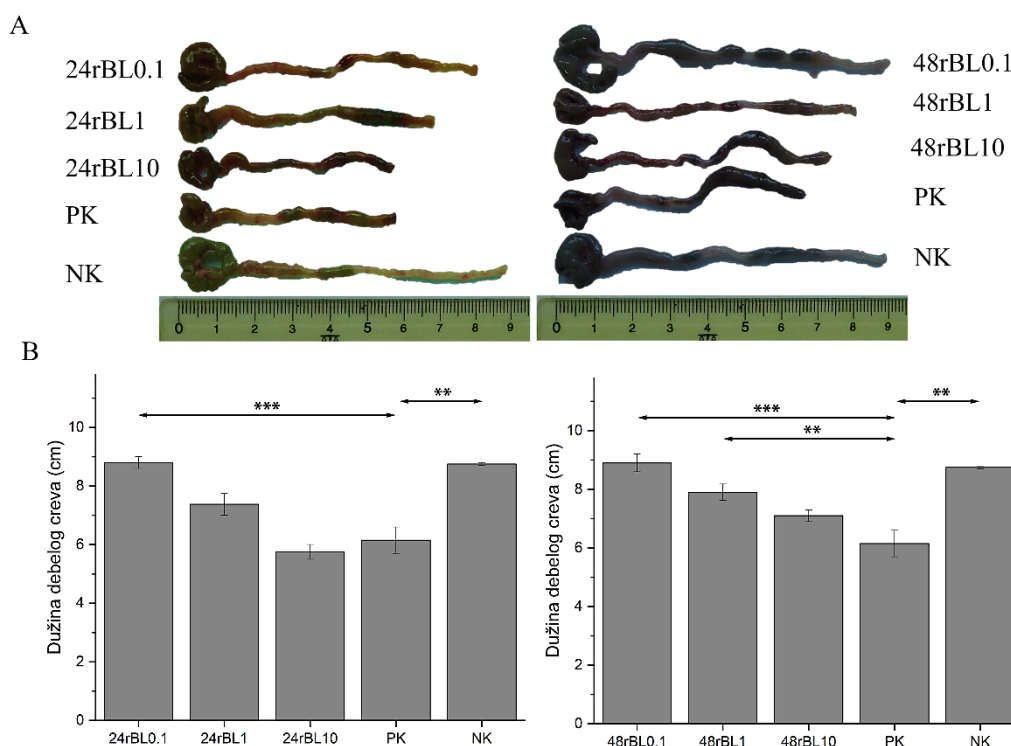
Rezultati svakodnevnog merenja TT miševa tretiranih rBanLec 48h pre izazivanja kolitisa su takođe pokazali da najbolji profilaktički efekat ima primena rBanLec u koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Među 48rBL grupama, najmanji gubitak TT u piku bolesti uočen je kod grupe 48rBL0.1 ($p < 0,001$ za 48rBL1 i 48rBL10). Međutim, iako značajno viša u odnosu na PK grupu ($p < 0,001$), prosečna TT miševa 48rBL0.1 grupe je i dalje bila značajno niža u odnosu na NK ($p < 0,05$). U poređenju sa PK grupom, pozitivan efekat na TT u piku bolesti uočen je i u 48rBL1 grupi ($p < 0,01$). U piku bolesti nisu uočene značajnije razlike u gubitku TT između 48rBL10 i PK grupa (**Slika 23. B**). Kod miševa 48rBL0.1 i 48rBL1 grupa uočen je i brži oporavak. Sedmog dana nakon izazivanja kolitisa, prosečna TT miševa 48rBL0.1 i 48rBL1 ($p < 0,05$) je bila nešto niža u odnosu na NK grupu, ali značajno viša u poređenju sa 48rBL10 ($p < 0,001$ za obe grupe) i PK ($p < 0,001$ za obe grupe) grupama (**Slika 23. B**).



Slika 23. Promene telesne težine nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa kod C57BL/6 miševa jednokratno tretiranih rastvorom rBanLec (A) 24h i (B) 48h pre izazivanja bolesti. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0). rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL1 i 48rBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL10 i 48rBL10). Telesna težina je predstavljena kao srednja vrednost $\pm$ SE ($n = 14$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Srednja vrednost telesne težine PK je prikazana punom crvenom linijom, dok je srednja vrednost telesne težine miševa NK grupe označena isprekidanom linijom. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

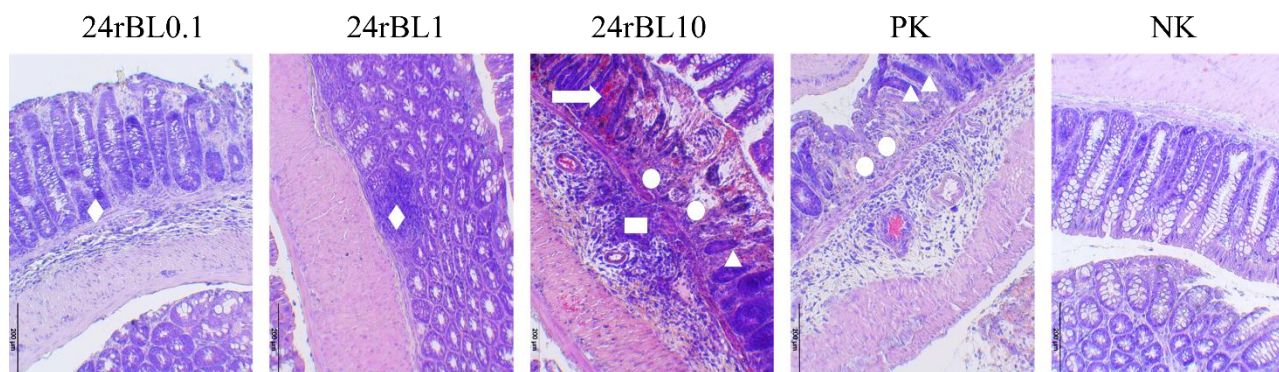
Izazivanje kolitisa TNBS dovodi do jake lokalne zapaljenske reakcije koja dovodi do smanjenja dužine debelog creva. Očekivano, skraćanje debelog creva u piku bolesti je bilo

najizraženije kod miševa PK grupe ($p < 0,01$ u poređenju sa NK). Među rBanLec-pretretiranim miševima, bez obzira na vreme pretretmana, najmanje skraćivanje debelog creva u piku bolesti izmereno je u grupi miševa koji su tretirani sa $0,1 \mu\text{g/mL}$ rBanLec i nije bilo statistički značajno u poređenju sa NK. Kod tretmana 24h pre izazivanja bolesti, skraćivanje dužine debelog creva miševa 24rBL0.1 grupe u piku bolesti je bilo značajno manje u poređenju sa 24rBL1, 24rBL10 i PK grupama ($p < 0,05$ za rBL1 grupu; $p < 0,001$ za 24rBL10 i PK grupu) (Slika 24. A i B). Kod tretmana 48h pre izazivanja bolesti, u grupama 48rBL0.1 i 48rBL1 je uočeno značajno manje skraćivanje creva u poređenju sa PK grupom ($p < 0,001$ za 48rBL0.1; $p < 0,01$ za 48rBL1). Skraćivanje debelog creva je bilo najizraženije u 48rBL10 grupi ($p < 0,01$ za NK i 48rBL0.1 grupe) (Slika 24. A i B).



Slika 24. Dužina debelog creva u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 24h i 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: $0,1 \mu\text{g/mL}$ (24rBL0.1 i 48rBL0.1), $1 \mu\text{g/mL}$ (24rBL1 i 48rBL1) i $10 \mu\text{g/mL}$ (24rBL10 i 48rBL10). Na slici (A) su predstavljene reprezentativne slike uzorkovanih debelih creva, na slici (B) je predstavljene dužine debelog creva kao srednja vrednost $\pm$ SE, ($n = 14$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Histološkom analizom preseka debelog creva grupe PK i 24rBL10 grupe, primećeno je prisustvo strukturnih promena koje uključuju visok stepen inflamacije praćen gubitkom peharastih ćelija, narušenu arhitekturu kripti i edem submukoze usled infiltracije inflamatornih ćelija. Pored malih ulceracija u nekim delovima mukoze, u debelom crevu u miševa 24rBL0.1 i 24rBL1 grupa primećena je deformacija kripti sa delimičnim gubitkom peharastih ćelija i infiltracijom PMNC. Ako se pored uзорci debelog creva 24rBL0.1 grupe i 24rBL1 grupa, hipertrofija mišićnog sloja i infiltrati ćelija u submukoznom sloju bili su izraženiji u uzorcima grupe 24rBL1. Na presecima debelog creva miševa grupe 24rBL10, slično kao i u debelom crevu miševa grupe PK, uočeni su obilni infiltrati PMNC u submukoznom sloju, izrazito narušavanje kripti i teške hemoragije u mukoznom sloju tkiva (Slika 25.). CHI izračunat na osnovu gubitka peharastih ćelija, zbijenosti i hiperplazije kripti, i broja i veličine submukoznih infiltrata [196], pokazuje da je narušenost struktura tkiva debelog creva najmanja u uzorcima miševa 24rBL0.1 grupe ($\text{CHI} = 7,0 \pm 1,7$), srednja u grupi 24rBL1 ($\text{CHI} = 11,9 \pm 3,9$), i najveća u grupi 24rBL10 ($\text{CHI} = 19,1 \pm 2,3$). Opseg patoloških promena u grupi 24rBL10 je bio u nivou promena uočenih u grupi PK ($\text{CHI} = 20,3 \pm 0,7$) (Tabela 9.).



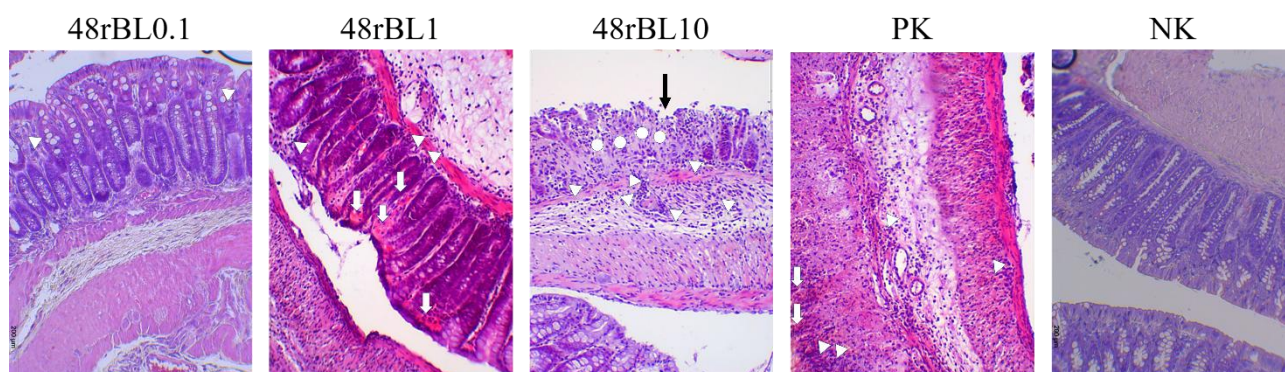
Slika 25. Poprečni presek debelog creva u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Tkivni preseki (debljina 5 µm) debelih creva C57BL/6 miševa su bojeni H&E (pogledati poglavlje 3.4.1.) i pregledani sa uvećanjem od 10X Olympus BH2-RFL svetlosnim mikroskopom (Olympus Optica Ltd., Tokio, Japan) koji je povezan sa digitalnom kamerom visoke rezolucije (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Nemačka). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Uzorci debelih creva uzeti u piku bolesti (dan 2). Na slici je obeležen gubitak peharastih ćelija (Δ), oštećena arhitektura kripti (○), infiltracija polimorfonuklearnih ćelija u umanjene kripte (◇), i u submukozne slojeve (□), hemoragija (⇒). Predstavljene su reprezentativne slike.

Tabela 9. Histološki Indeks Kolitisa procenjen na osnovu patoloških promena u piku bolesti u debelom crevu C57BL/6 miševa tretiranih rBanLec 24h pre izazivanja kolitisa TNBS

	Gubitak Peharastih ćelija	Gustina Kripti *	Hiperplazija Kripti *	Infiltrati u Submukozi **	CHI
24rBL0.1	1,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0	1,1 ± 0,4	7,0 ± 1,7
24rBL1	2,3 ± 0,5	1,4 ± 1,5	0,1 ± 0,4	2,1 ± 0,4	11,9 ± 3,0
24rBL10	2,9 ± 0,4	3	0,9 ± 0,4	2,9 ± 0,4	19,4 ± 2,3
PK	3	3	1,1 ± 0,4	3	20,2 ± 0,7
NK	0	0,9 ± 0,4	0	1,1 ± 0,4	7,0 ± 1,7

* pomnožiti sa 2, ** pomnožiti sa 3; CHI- Histološki Indeks Kolitisa

Histološkom analizom preseka debelog creva u grupi 48rBL0.1 nisu uočene velike promene u arhitekturi tkiva: jasno se uočavaju formirane kripte sa peharastim ćelijama, kao i kripte u nastajanju od bazalnog ka apikalnom sloju. U grupi 48rBL1 je uočena obilna hemoragična efuzija u lamina propria sloju i znaci inflamacije (infiltracija PMNC između kripti). U preseku debelog creva miševa 48rBL10 grupe znaci inflamacije bili su još izraženiji: polimorfonuklearni infiltrati su bili prisutni u mukozi i transbazalno u submukozi, kripte su bile atenuirane sa deplecijom peharastih ćelija i ulceracijama. Inflamatorne promene u presecima debelog creva PK grupe su bile najopsežnije: hemoragični izliv je prisutan kako transbazalno (u lamina propria sloju mukoze) i transmuralno u mišićnom sloju, u submukozi su bili prisutni masivni infiltrati polimorfonuklearnih ćelija. U NK grupi je arhitektura tkiva bila intaktna (**Slika 26.**). Izračunati CHI pokazuju da je narušenost struktura tkiva debelog creva bila najmanja u uzorcima debelog creva 48rBL0.1 grupe ($CHI = 6,0 \pm 1,39$), osrednja u grupi 48rBL1 ($CHI = 11,8 \pm 2,3$), i najveća u grupi 48rBL10 ($CHI = 16,3 \pm 1,9$). Opseg patoloških promena u grupi 48rBL10 je bio uporediv sa promenama uočenim u grupi PK ($CHI = 19,8 \pm 1,1$) (**Tabela 10.**).



Slika 26. Poprečni presek debelog creva u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Tkivni preseki (debljina 5 μ m) debelih creva C57BL/6 miševa su bojeni H&E (pogledati poglavlje 3.4.1.) i pregledani sa uvećanjem od 10X Olympus BH2-RFL svetlosnim mikroskopom (Olympus Optica Ltd., Tokio, Japan) koji je povezan sa digitalnom kamerom visoke rezolucije (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Nemačka). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Uzorci debelih creva uzeti u piku bolesti (dan 2). Na slici je obeležen gubitak peharastih ćelija (Δ), oštećena arhitektura kripti ($\circ$), infiltracija polimorfonuklearnih ćelija u umanjene kripte ($\diamond$), i u submukozne slojeve ($\square$), hemoragija ($\Rightarrow$). Predstavljene su reprezentativne slike.

Tabela 10. Histološki Indeks Kolitisa procenjen na osnovu patoloških promena u piku bolesti u debelom crevu C57BL/6 miševa tretiranih rBanLec 48h pre izazivanja kolitisa TNBS

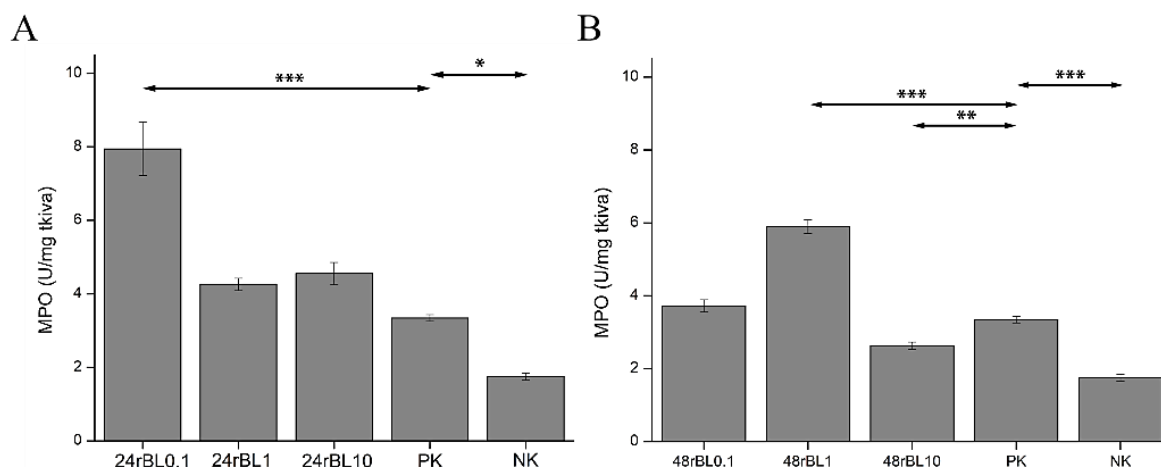
	Gubitak Peharastih Ćelija	Gustina Kripti *	Hiperplazija Kripti *	Infiltrati u Submukozi **	CHI
48rBL0.1	$1,2 \pm 0,2$	$1,15 \pm 0,16$	0	$1,1 \pm 0,2$	$6,0 \pm 1,39$
48rBL1	$1,35 \pm 0,15$	$2,4 \pm 0,3$	0	$2,2 \pm 0,4$	$11,8 \pm 2,3$
48rBL10	2	$3,2 \pm 0,2$	1	$2,3 \pm 0,4$	$16,3 \pm 1,9$
PK	$2,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$1,15 \pm 0,2$	$3,35 \pm 0,3$	$19,8 \pm 1,1$
NK	0	0	0	0	0

* pomnožiti sa 2, ** pomnožiti sa 3; CHI- Histološki Indeks Kolitisa

4.2.2. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na oksidativni status u debelom crevu C57BL/6 miša tokom TNBS-izazvanog kolitisa

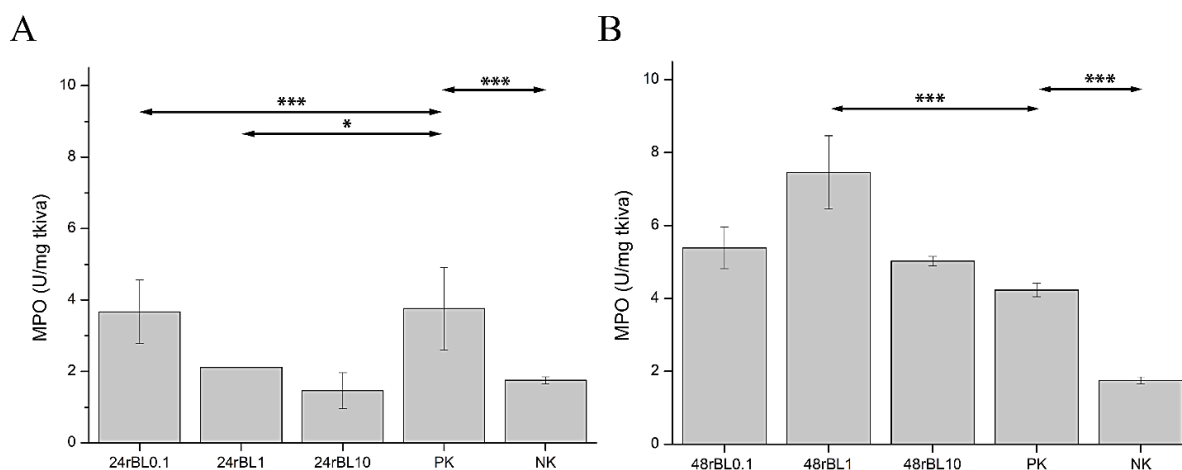
U skladu sa relevantnim podacima iz literature, izazivanje kolitisa TNBS samo po sebi dovelo je do značajnog pojačanja lokalne aktivnosti MPO u piku bolesti [244] (**Slika 27.**). I u svim rBanLec pretretiranim grupama, lokalna aktivnost MPO u piku bolesti bila je značajno veća u poređenju sa NK.

Analiza lokalne MPO aktivnosti kod 24rBL miševa je pokazala da profilaktički tretman nije značajno uticao na lokalnu aktivnost MPO u piku bolesti miševa 24rBL1 i 24rBL10 grupa. Međutim, pretretman koncentracijom 0,1 μ g/mL rBanLec (grupa 24rBL0.1) je bio udružen sa značajnim uvećanjem MPO aktivnosti u debelom crevu u piku bolesti u poređenju sa grupom PK kao i u poređenju sa grupama 24rBL1 i 24rBL10 (za sve grupe je $p < 0,001$) (**Slika 27. A**). Tretman rBanLec 48h pre izazivanja kolitisa je doveo do značajnog povećanja lokalne aktivnosti MPO u piku bolesti miševa 48rBL1 ($p < 0,001$ u poređenju sa PK. Aktivnosti MPO u debelom crevu 48rBL0.1 miševa bila je u nivou aktivnosti izmerene u PK grupi, dok je u 48rBL10 grupi bila niža nego u PK ($p < 0,01$) grupa (**Slika 27. B**).



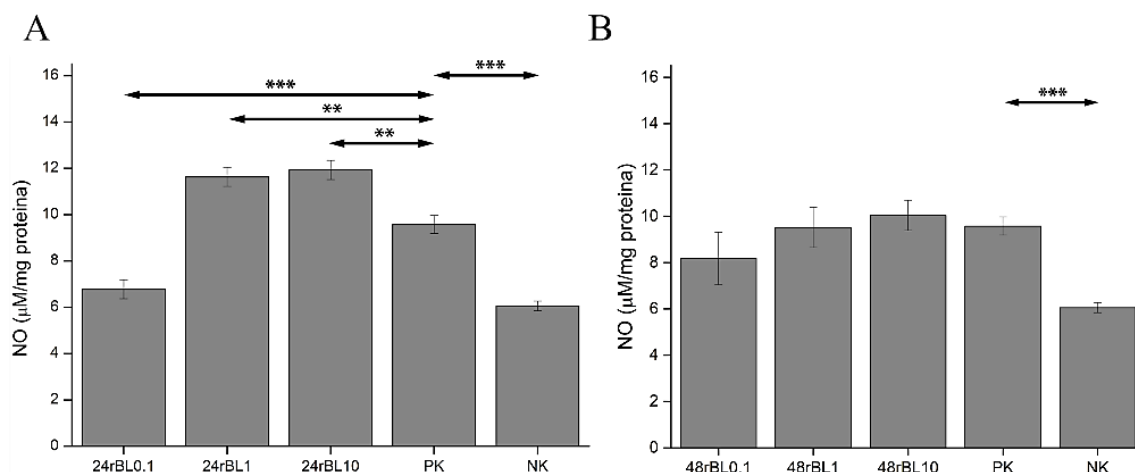
Slika 27. Aktivnost MPO u debelom crevu u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS: A) 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec i B) 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a MPO aktivnost je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 µg/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10 µg/mL (24rBL10 i 48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost U aktivnosti MPO po miligramu tkiva debelog creva ± SE (n = 7). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Kao i u piku bolesti, i u fazi oporavka lokalna MPO aktivnost se značajno razlikovala među kontrolnim grupama, PK i NK ($p < 0,001$). Kod svih miševa tretiranih rBanLec 24h pre izazivanja bolesti, u fazi rezolucije bolesti (dan 7) bilo je primetno smanjenje lokalne aktivnosti MPO u odnosu na pik bolesti. Aktivnost MPO u 24rBL0.1 grupi je bila smanjena u poređenju sa aktivnošću u piku bolesti, ali i dalje značajno veća u poređenju sa ostalim grupama tretiranim rBanLec ($p < 0,01$ za 24rBL1 i $p < 0,001$ za 24rBL10) (Slika 28. A). Kod 48rBL grupa dozno-zavisni obrazac promena lokalne MPO aktivnosti u fazi oporavka je bio sličan obrascu u piku bolesti. I u fazi oporavka, aktivnost MPO u debelom crevu miševa 48rBL0.1, 48rBL1 i 48rBL10 grupa bila je značajno veća u poređenju sa NK grupom ($p < 0,001$ za sve grupe). Među 48rBL miševima, najveća aktivnost MPO je izmerena u debelom crevu miševa 48rBL1 grupe ($p < 0,05$ za 48rBL10, $p < 0,001$ za grupe PK i NK). (Slika 28. B).



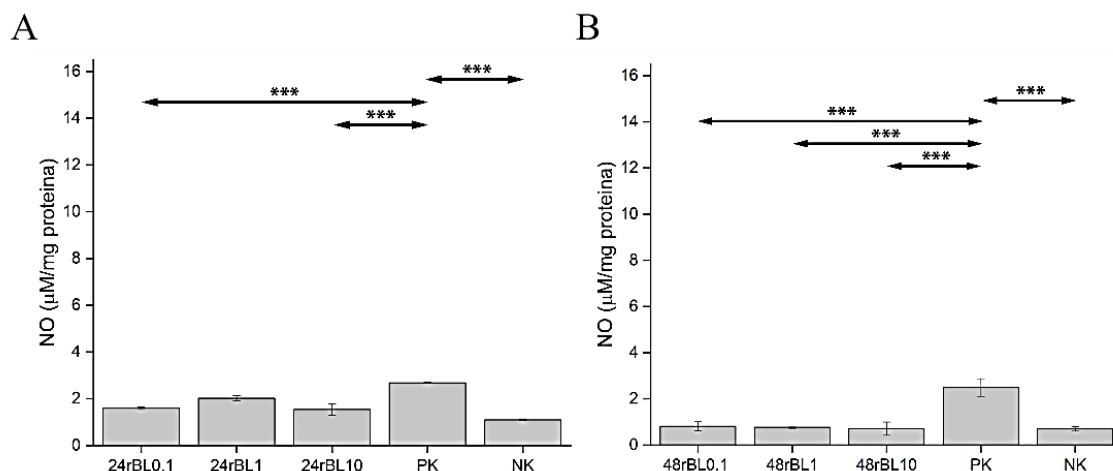
Slika 28. Aktivnost MPO u debelom crevu u fazi oporavka C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS: A) 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec i B) 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a MPO aktivnost je analizirana u fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 µg/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10 µg/mL (24rBL10 i 48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost U aktivnosti MPO po miligramu tkiva debelog creva ± SE (n = 7). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Poređenje NO proizvodnje u debelom crevu miševa PK i NK grupa je pokazalo da u TNBS-izazvanom eksperimentalnom kolitisu kod C57BL/6 miša dolazi i do značajnog porasta lokalne NO proukcije u piku bolesti (Slika 29.). Takođe, lokalna proizvodnja NO u piku bolesti u grupama 24rBL1 i 24rBL10 je bila značajno povećana u odnosu na PK grupu ($p < 0,01$). Međutim, koncentracija NO u debelom crevu miševa grupe 24rBL0.1 je bila značajno niža u poređenju sa 24rBL1, 24rBL10 i PK grupama ($p < 0,001$ za sve grupe), na nivou uporedivom sa NK grupom (Slika 29. A). Među grupama pretretiranim 48h pre izazivanja bolesti, najniža lokalna koncentracija NO je izmerena u grupi 48rBL0.1 ($p < 0,05$ u poređenju sa 48rBL10). Lokalna proizvodnja NO u piku bolesti miševa 48rBL1 i 48rBL10 grupa je bila u nivou proizvodnje uočene u PK grupi, značajno veća u poređenju sa NK grupom (za 48rBL1 $p < 0,05$, za 48rBL10 je $p < 0,01$)(Slika 29. B).



Slika 29. Koncentracija NO u debelom crevu u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS: A) 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec i B) 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a koncentracija NO je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 µg/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10 µg/mL (24rBL10 i 48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po miligramu proteina (µM/mg proteina) ± SE (n = 7). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

U fazi oporavka, lokalna proizvodnja NO u debelom crevu miševa PK grupe je i dalje bila značajno veća u odnosu na NK grupu ($p < 0,001$). Međutim, u svim grupama koje su tretirane rBanLec pre izazivanja kolitisa primećena je niža lokalna proizvodnja NO u poređenju sa PK grupom ($p < 0,001$ za 24rBL0.1, 24rBL10, 48rBL0.1, 48rBL1, 48rBL10) (Slika 30.).

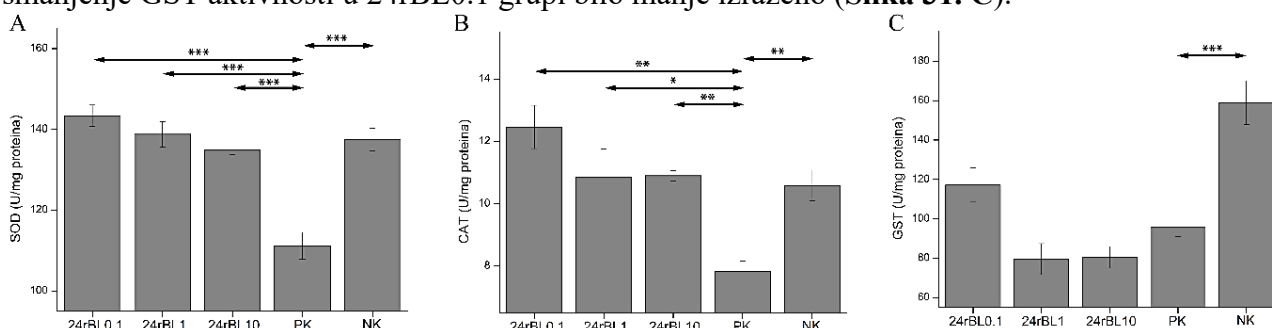


Slika 30. Koncentracija NO u debelom crevu u fazi oporavka C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS: A) 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec i B) 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a koncentracija NO je analizirana u fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 µg/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10

$\mu\text{g/mL}$ (24rBL10 i 48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po miligramu proteina ($\mu\text{M/mg proteina}$) $\pm$ SE ($n = 7$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

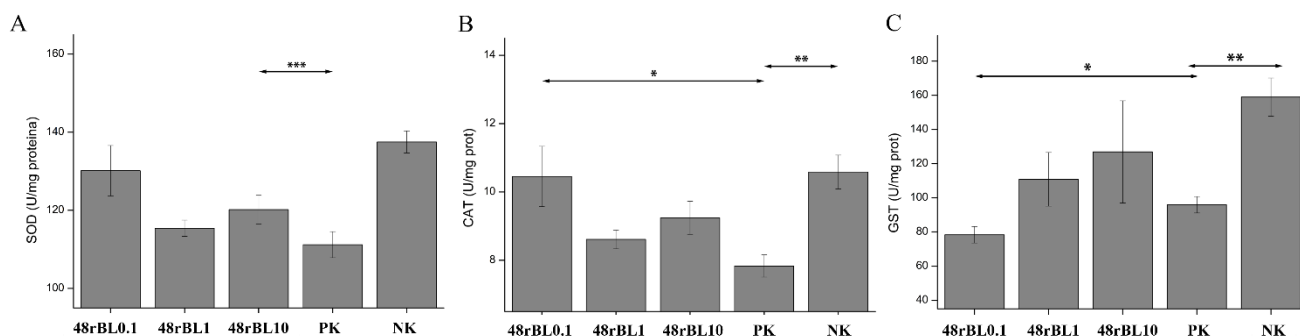
Aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i GST je bila značajno smanjena u debelom crevu miševa PK grupe u piku bolesti u poređenju sa NK grupom. Međutim, u poređenju sa grupom PK, tretman rBanLec pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa je generalno povećao njihovu aktivnost u tkivu debelog creva (Slika 31. i 32.).

U poređenju sa grupom PK, lokalne aktivnosti SOD ($p < 0,001$) i CAT ($p < 0,001$ za 24rBL0.1; $p < 0,05$ za 24rBL1; $p < 0,01$ za 24rBL10 grupu) su bile značajno povećane u piku bolesti u svim 24rBL, dostižući nivo izmeren u NK grupi. Među njima, najveće aktivnosti SOD i CAT su bile izmerene u 24rBL0.1 grupi, ali nisu bile značajno veće u poređenju se sa aktivnostima izmerenim u grupama 24rBL1 i 24rBL10 (Slika 31. A, B). U poređenju sa PK grupom u piku bolesti, izmerena aktivnost GST enzima kod miševa pretretirani rBanLec 24h sata pre izazivanja bolesti nije se značajno razlikovala (Slika 31. C). U poređenju sa miševima NK grupe, GST aktivnost u piku bolesti u 24rBL1 i 24rBL10 grupama bila je značajno niža ($p < 0,001$ za 24rBL1 i 24rBL10 grupu), dok je smanjenje GST aktivnosti u 24rBL0.1 grupi bilo manje izraženo (Slika 31. C).



Slika 31. Aktivnost antioksidativnih enzima u debelom crevu u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 24h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0), a lokalna aktivnost SOD (A), CAT (B) i GST (C) je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (24rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost aktivnosti (U) po miligramu proteina $\pm$ SE ($n = 7$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Aktivnosti SOD i CAT izmerene u piku bolesti kod miševa 48rBL grupa su bile više u poređenju sa PK grupom (CAT: $p < 0,05$ za 48rBL0.1), ali niže od aktivnosti izmerenih kod miševa NK grupe (SOD: $p < 0,05$ za 48rBL1). Najveće aktivnosti SOD i CAT u piku bolesti su izmerene u debelom crevu miševa 48rBL0.1 grupe, ali nisu bile statistički značajno više u odnosu na 48rBL1 i 48rBL10 grupe (Slika 32. A, B). Za razliku od miševa pretretiranih 24h pre izazivanja bolesti, kod miševa pretretiranih 48h pre izazivanja kolitisa najniža GST aktivnost je izmerena u 48rBL0.1 grupi ($p < 0,05$ za 48rBL10; $p < 0,01$ za NK) (Slika 32. C).



Slika 32. Aktivnost antioksidativnih enzima u debelom crevu u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0), a lokalna aktivnost SOD (A), CAT (B) i GST (C) je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (48rBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (48rBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao

kao srednja vrednost aktivnosti (U) po miligramu proteina $\pm$ SE (n = 7). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

4.2.3. Efekat jednokratnog profilaktičkog tretmana rBanLec na citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša tokom TNBS-izazvanog kolitisa

Analiza citokinskog miljea u piku TNBS-izazvanog kolitisa i fazi oporavak obuhvatala je merenje lokalnih koncentracija citokina koji imaju ulogu u kontroli inflamacije (IL-10, TGF β) i proinflamatornih citokina (IL-12, TNF).

U piku bolesti, u debelom crevu miševa PK grupe, u poređenju sa NK grupom, izostalo je značajno povećanje proizvodnje IL-10, koje bi moglo da umanjuje zapaljensku reakciju (**Slika 33. A**). Međutim, značajno povećanje koncentracije regulatornih citokina je uočeno kod nekih grupa pretretiranih rBanLec. Najveća koncentracija IL-10 izmerena je u grupi 24rBL0.1 ($p < 0,01$ vs. NK, $p < 0,001$ vs. PK) i bila je značajno veća u poređenju sa 24rBL1 ($p < 0,001$) i 24rBL10 ($p < 0,01$). U poređenju sa lokalnom koncentracijom IL-10 kod PK grupe, u piku bolesti kod 24rBL1 i 24rBL10 grupa nije uočen značajan porast lokalne proizvodnje IL-10 (**Slika 33. A**). U poređenju sa PK grupom, ni kod jedne od grupa koje su 48h pre izazivanja kolitisa tretirane rBanLec nije došlo do značajnog porasta lokalne koncentracije IL-10 u piku bolesti (**Slika 33. A**).

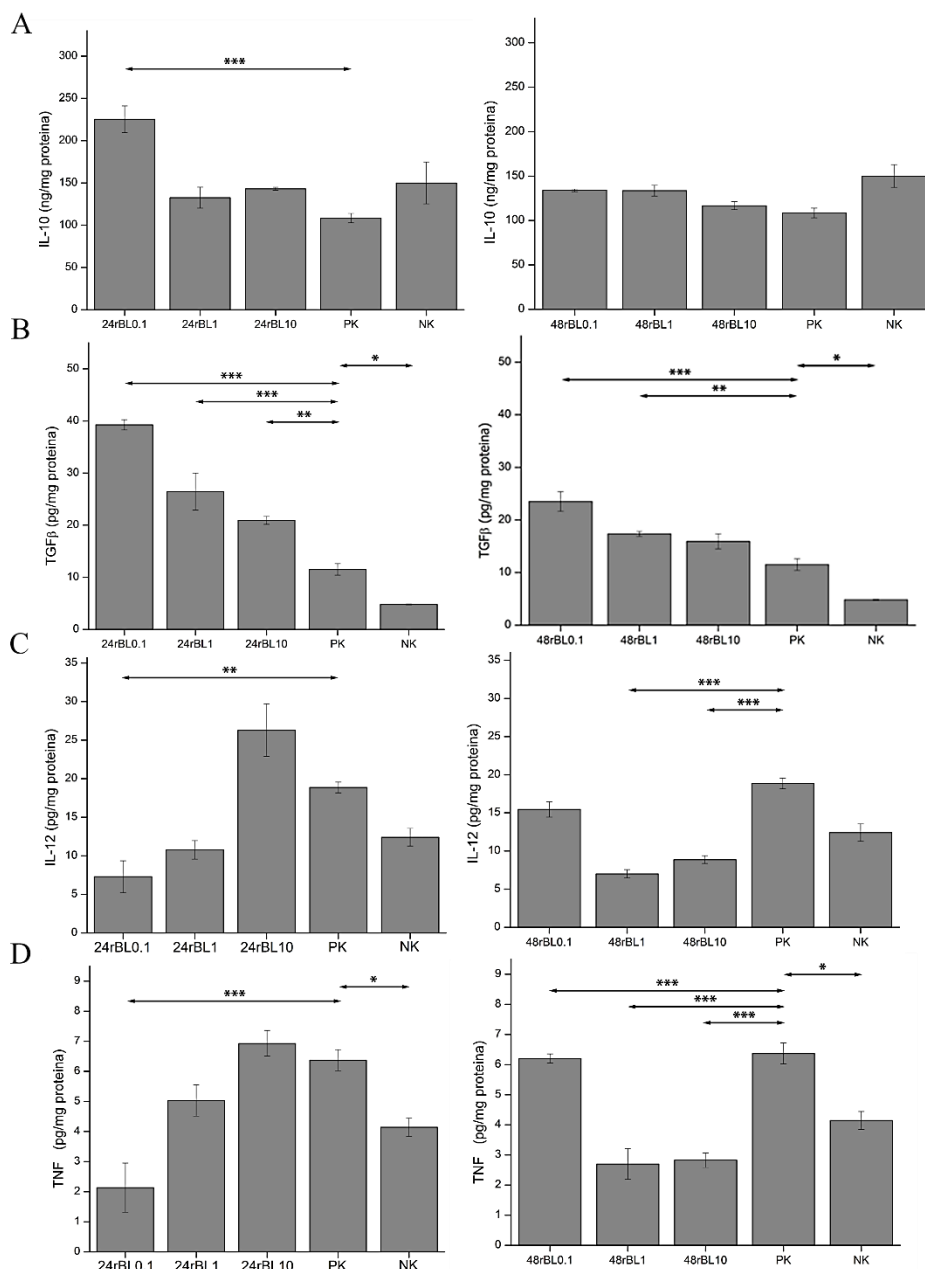
U poređenju sa NK, lokalna produkcija TGF β u piku bolesti bila je značajno povišena u PK grupi. Za razliku od IL-10, u poređenju sa kontrolnim grupama, u piku bolesti je lokalna proizvodnja TGF β bila značajno povećana u debelom crevu miševa 24rBL1 ($p < 0,001$ vs. PK i NK), i 24rBL10 ($p < 0,01$ vs. PK i NK) grupa. Među grupama pretretiranim rBanLec 24h pre izazivanja kolitisa najveća lokalna koncentracija TGF β u piku bolesti je izmerena u grupi 24rBL0.1 ($p < 0,05$ vs. 24rBL1, $p < 0,01$ vs. 24rBL10) (**Slika 33. B**). Pretretman rBanLec je doveo do značajnog povećanja koncentracije TGF β u debelom crevu u piku bolesti kod svih 48rBL grupa u poređenju sa NK grupom ($p < 0,001$ za sve 48rBL grupe). Takođe, lokalna proizvodnja TGF β u piku bolesti u svim 48rBL grupama je bila veća nego u PK grupi, pri čemu je navedeni porast bio statistički značajan u 48rBL0.1 ($p < 0,001$) i 48rBL1 ($p < 0,01$) grupama. Tretman rBanLec u koncentraciji 0,1 μ g/mL je doveo do najvećeg povećanja proizvodnje TGF β u poređenju sa ostalim 48rBL grupama ($p < 0,05$ za 48rBL1; $p < 0,01$ za 48rBL10) (**Slika 33. B**).

Generalno, patologija bolesti TNBS-izazvanog kolitisa se dovodi u vezu sa nekompenzovanim povećanjem lokalne sekrecije (proizvodnje) proinflamatornih citokina. U tom kontekstu je analizirana lokalna proizvodnja IL-12 i TNF u piku bolesti. U poređenju sa NK grupom, u grupi PK je, očekivano, došlo do lokalnog povećanja proizvodnje inflamatornih citokina u piku bolesti ($p < 0,05$ za IL-12, $p < 0,05$ za TNF) (**Slika 33. C, D**). Među grupama pretretiranim 24h pre izazivanja kolitisa, najviši nivo inflamatornih citokina u piku bolesti je izmeren u debelom crevu miševa 24rBL10 ($p < 0,001$ vs. 24rBL1) i bio je uporediv sa nivoom inflamatornih citokina koji su izmereni u debelom crevu miševa grupe PK. Takođe, najniža koncentracija inflamatornih citokina izmerena je u debelom crevu miševa grupe 24rBL0.1 (**Slika 33. C, D**).

Lokalna proizvodnja IL-12 je bila značajno povećana u grupi 24rBL10 ($p < 0,001$) i blago povećana u grupi 24rBL1 u poređenju sa grupom 24rBL0.1 (**Slika 33. C**). Sa druge strane, izmerena lokalna koncentracija IL-12 u piku bolesti je bila značajno manja kod grupa 48rBL1 i 48rBL10 u poređenju sa PK grupom ($p < 0,001$). Takođe, nivo IL-12 u debelom crevu miševa grupe 48rBL0.1 je bio značajno povećan u poređenju sa grupama 48rBL1 ($p < 0,001$) i 48rBL10 ($p < 0,01$; **Slika 33. C**).

Kod miševa tretiranih 24h pre izazivanja kolitisa primećen je dozno-zavisan efekat rBanLec na lokalnu proizvodnju TNF u piku bolesti. Lokalna koncentracija TNF je bila značajno uvećana u debelom crevu miševa 24rBL1 ($p < 0,01$), 24rBL10 ($p < 0,001$) i PK ($p < 0,001$) grupa u odnosu na koncentraciju TNF koja je izmerena u debelom crevu miševa grupe 24rBL0.1 (**Slika 33. D**). Sa druge

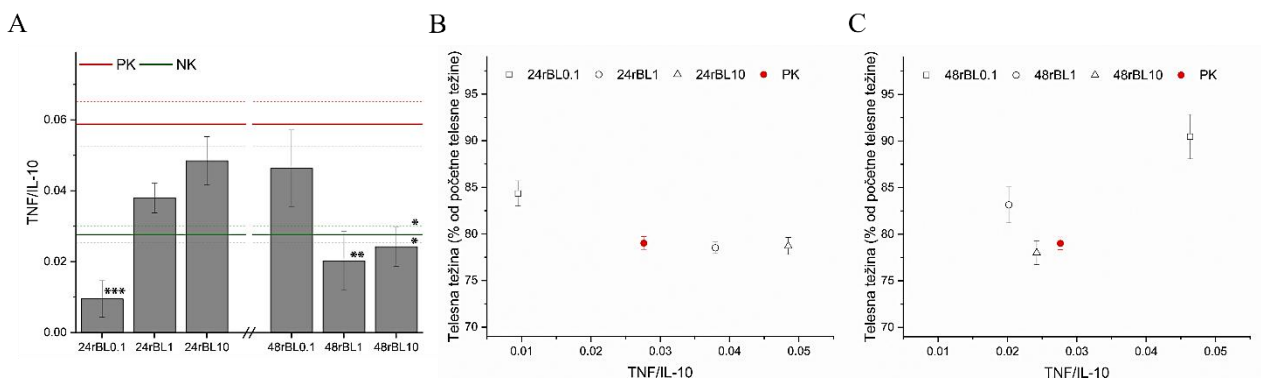
strane, među grupama tretiranim rBanLec 48h pre izazivanja bolesti, najviša lokalna koncentracija TNF u piku bolesti je izmerena u debelom crevu miševa grupe 48rBL0.1. Ona je bila u nivou lokalne koncentracije TNF u PK grupi, značajno veća u poređenju sa koncentracijama izmerenim u 48rBL1 ($p < 0,001$) i 48rBL10 ($p < 0,001$) grupama, kao i NK grupi ($p < 0,01$). Koncentracija TNF u debelom crevu miševa grupa 48rBL1 ($p < 0,001$) i 48rBL10 ($p < 0,001$) u piku bolesti je bila značajno manja u poređenju sa PK grupom, približna koncentraciji izmerenoj u NK grupi (Slika 33. D).



Slika 33. Proizvodnja IL-10, TGFβ, IL-12 i TNF u debelom crevu u piku bolesti C57BL/6 miševa kojima je izazvan kolitis TNBS 24h i 48h nakon jednokratnog tretmana rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0), a lokalna aktivnost IL-10 (A), TGFβ (B), IL-12 (C) i TNF (D) je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 μg/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 μg/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10 μg/mL (24rBL10 i 48rBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina izražene u pg(ng) po miligramu proteina supernatanta ± SE (n = 7). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa nisu tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Analizom lokalnih koncentracija TNF i IL-10, pokazano je da, u poređenju sa PK grupom, pretretman 0,1 μg/mL rBanLec 24h pre izazivanja kolitisa značajno smanjuje TNF/IL-10 odnos u piku bolesti u poređenju sa PK grupom ($p < 0,001$). TNF/IL-10 odnos je bio značajno manji i u

grupama 48rBL1 i 48rBL10 u poređenju sa PK grupom ($p < 0,01$ za 48rBL1; $p < 0,05$ za 48rBL10) (Slika 34. A). Međutim, ni kod 24rBL ni kod 48rBL grupa nije uočena značajna korelacija između TNF/IL-10 i intenziteta patologije procenjenog na osnovu smanjenja TT u piku bolesti ($P_{cc} = -0,879$, $p = 0,120$ za 24rBL; $P_{cc} = 0,805$, $p = 0,194$ za 48rBL) (Slika 34. B,C).



Slika 34. Odnos proizvodnje TNF i IL-10 u debelom crevu i njegova korelacija sa težinom kliničke slike u piku eksperimentalnog kolitisa kome je prethodio jednokratni tretman rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan u C57BL/6 mišu intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0). Izazivanje eksperimentalnog kolitisa je rađena 24h (24rBL) ili 48h (48rBL) nakon jednokratne intrarektalne aplikacije (100 μ L) rBanLec u koncentracijama: 0,1 μ g/mL (24rBL0.1 i 48rBL0.1), 1 μ g/mL (24rBL1 i 48rBL1) i 10 μ g/mL (24rBL10 i 48rBL10). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa, obeleženi zelenom linijom) i miševi kojima je izazvan kolitis bez rBanLec tretmana (PK grupa, obeleženi crvenom linijom) su korišćeni kao kontrole. Na osnovu koncentracija TNF i IL-10 određenih u debelom crevu u piku bolesti (dan 2; slika 33.) izračunati su TNF/IL-10 odnosi i predstavljeni kao srednji TNF/IL-10 $\pm$ SE po grupi (A). TNF/IL-10 su korelirani sa težinom kliničke slike procenjenom na osnovu gubitka telesne težine u piku bolesti (dan 2; slika 23.), odvojeno za 24rBL (B) i 48rBL (C) grupe. Statistička značajnost razlika TNF/IL-10 je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Korelacija između TNF/IL-10 i težine kliničke slike je određena Pirsonovom bivarijantnom korelacionom analizom; P_{cc} - Pearson's correlation coefficient, $p < 0,05$.

4.2.4. Procena profilaktičkog efekta jednokratne primene rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu - diskusija

Predstavljeni rezultati pokazuju da preaktivacija imunskog sistema debelog creva rBanLec može ublažiti težinu eksperimentalnog kolitisa kod C57BL/6 miševa i ubrzati oporavak. Smanjenje kliničkih simptoma prati pojačana antioksidativna odbrana u tkivu i usmeravanje lokalnog mikrokruženja ka rezoluciji inflamacije i regeneraciji crevne mukoze.

Jednokratni profilaktički tretman rBanLec u koncentracijama od 0,1 μ g/mL do 10 μ g/mL, 24 ili 48h pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa, nije sprečio nastanak bolesti, ali je, posebno tretmanom najnižom koncentracijom, smanjio težinu bolesti. Analiza je otkrila da u piku bolesti postoji obrnuta korelacija između profilaktički primenjenih doza rBanLec i njihove efikasnosti u ublažavanju kliničke slike TNBS-izazvanog kolitisa. U grupama tretiranim rBanLec, najblaži oblik patologije je opisan kod 24rBL0.1 i 48rBL0.1 grupa. Nasuprot tome, najteži klinički ishod, sličan onom koji je uočen u PK grupi (eksperimentalni kolitis izazvan bez prethodnog rBanLec tretmana), je opisan u 24rBL10 i 48rBL10 grupama. Procena težine kliničke slike zasnivala se prvenstveno na gubitaku TT, ali su u obzir uzeti i smanjenje dužine debelog creva u piku bolesti (2. dan nakon izazivanja kolitisa) i histološke promene u debelom crevu. Histološkom analizom debelog creva pokazano je da težina kliničke slike prvenstveno pozitivno korelira sa intenzitetom infiltracije imunskih ćelija u submukozu.

Jedan od inicijalnih koraka u razvoju inflamacije je infiltracija neutrofila u tkivo. Porast lokalne MPO aktivnosti se često smatra markerom infiltracije neutrofila [245]. Povećanje lokalne MPO aktivnosti pokazano je kod pacijenata obolelih od UC i CD [246] tokom aktivne faze bolesti, kao i u različitim životinjskim modelima zapaljenskih bolesti creva [247-250]. U skladu sa ovim nalazima, u debelom crevu svih miševa kojima je izazvan eksperimentalni kolitis u piku bolesti je

uočeno značajno povećanje aktivnosti MPO. Među grupama pretretiranim 24h pre izazivanja bolesti najveća lokalna aktivnost je uočena u 24rBL0.1, dok je među grupama pretretiranim 48h pre izazivanja bolesti najveća lokalna aktivnost je uočena u 48rBL1. Pored toga, lokalna MPO aktivnost u 24rBL0.1 i 48rBL1 u piku bolesti bila je značajno veća od aktivnosti izmerene u PK grupi. Ovaj nalaz je neočekivan, imajući u vidu (i) da se MPO primarno smatra prooksidativnim enzimom koji, učestvujući u stvaranju ROS/RNS, doprinosi propagaciji inflamacije, kao i činjenicu (ii) da je u grupama 24rBL0.1 i 48rBL1 uočeno značajno smanjenje težine kliničke slike u poređenju sa PK. Međutim, nekoliko studija urađenih na životinjskim modelima je pokazalo da MPO deficijencija može rezultovati i preteranom zapaljenskom reakcijom [251]. Pozitivan, antiinflamatorni, efekat MPO potvrđen je u modelima eksperimentalnog lupusa nefritisa i autoimunskog encefalomijelitisa, gde MPO-posredovana supresija patogenih T-ćelija prevazilazi njene potencijalno štetne efekte [252,253]. Slično tome, zaštitna uloga MPO uočena je i u plućnoj inflamaciji izazvanoj lipopolisaharidom (LPS), zimožanom ili umrtvljenom *Candida albicans* [254-256]. U modelu sepse, miševi sa genetskom inaktivacijom MPO (MPO-KO) razvili su intenzivniji inflamatorni odgovor nego „wild type“, što dodatno naglašava antiinflamatorni potencijal ovog enzima [257]. U navedenim studijama je antiinflamatorna aktivnost MPO bila u korelaciji sa različitim faktorima uključujući i povećanu sekreciju proinflamatornih citokina (IL-6, IFN γ , TNF α , IL-1 β) i hemokina (monocitni hemoatraktant protein-1), kao i povećanu proizvodnju inflamatornog proteina 2 makrofaga. Pokazano je da MPO, produkujući ROS, može negativno uticati i na aktivnost D $\mathcal{C}$ (smanjenje preuzimanja i prezentacije antigena, inhibicija migracije u mL $\mathcal{C}$ usled smanjenja ekspresije CCR7), čime sprečava patološku inflamaciju u tkivu [227]. Takođe, MPO je enzim koji može da ima i dismutaznu aktivnost, u zavisnosti od karakteristika mikro okruženja u kojem se nalazi. Naime MPO enzimska aktivnost je kompleksna jer podrazumeva niz redoks reakcija usled kojih MPO prolazi kroz različita prelazna stanja generišući spektar intermedijarnih proizvoda različite stabilnosti, značajno određene karakteristikama mikrookruženja [258]. U prilog dismutaznoj aktivnosti MPO ide nalaz da kod neutrofila koji ne poseduju aktivni MPO enzim dolazi do nagomilavanja superoksidnih anjona, budući da je njihova spontana dismutacija značajno sporija od dismutacije posredovane MPO [259]. Pored toga, ne smemo zaboraviti da neutrofili, pored uloge u razvoju inflamacije, igraju važnu ulogu i u njenoj rezoluciji [138,139]. Rezolucija inflamacije podrazumeva apoptozu neutrofila i njihovu eferocitozu od strane makrofaga, što posledično dovodi do polarizacije makrofaga ka M2 fenotipu (antiinflamatorni makrofazi) [260,261].

Prezentovani rezultati ukazuju da je pozitivan efekat rBanLec pretretmana na težinu kliničke slike TNBS-izazvanog kolitisa povezan i sa porastom lokalne aktivnosti antioksidativnih odbrambenih mehanizama. To čini lokalno tkivo otpornijim na potencijalna oštećenja usled intenzivne proizvodnje ROS. Ublaženje kliničke slike u piku bolesti je bilo u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću antioksidativnih enzima, konkretno SOD i CAT, koji su kontrolisali oksidativni stres. Ukupna aktivnost antioksidativnih enzima u debelom crevu rBanLec-pretretiranih miševa značajno prevazilazi aktivnost zabeleženu u debelom crevu miševa PK grupe, sa najvećom aktivnošću u grupi 24rBL0.1 i 48rBL0.1. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa onima koji pokazuju da je smanjena SOD aktivnost povezana sa povećanom zapaljenskom reakcijom kod IBD pacijenata [262]. Pored toga što su odgovorni za efikasno uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika, antioksidativni enzimi takođe imaju negativan uticaj na proizvodnju ROS. Studije na modelu TNBS-izazvanog kolitisa pokazuju da pojačana aktivnost enzima SOD značajno suprimira proizvodnju proinflamatornih citokina TNF i IL-1 β [263], koji pojačavaju proizvodnju ROS tako što podstiču internalizaciju Nox1 oksidaze putem endocitoze [264,265].

Ranije je pokazano da rBanLec dozno-zavisno promoviše istovremenu sintezu i proinflamatornih i antiinflamatornih citokina [111]. U piku bolesti, u debelom crevu miševa koji su profilaktički tretirani rBanLec došlo je do rasta lokalne proizvodnje IL-10 i TGF β , pri čemu je dozno-zavisni rast TGF β bio izraženiji. IL-10 se opisuje kao antiinflamatorni citokin sa antioksidativnim svojstvima [266]. Pored toga što inhibira proizvodnju IFN γ i TNF, IL-10 ima i ulogu negativnog regulatora oksidativnog sistema baziranog na Nox1 u epitelu debelog creva i inhibira proizvodnju ROS koja je u pozitivnoj sprezi sa IFN γ /TNFsintezom [267,268]. TGF β se najčešće opisuje kao

regulatorni citokin, ali njegova funkcija je izuzetno složena i često dovodi do naizgled kontradiktornih bioloških efekata [269,270]. Uzimajući u obzir pozitivnu korelaciju između lokalne koncentracije TGF β i stepena ublažavanja bolesti, možemo zaključiti da njegova sposobnost da podstakne regeneraciju i obnovu crevnog epitela prevazilazi ROS-zavisni pro-fibrozni efekat [269,270]. U prilog ovoj hipotezi, studije na životinjama kao i analize uzoraka IBD pacijenata su pokazale da smanjena signalizacija putem TGF β usporava regeneraciju epitela creva u odgovoru na lokalnu inflamaciju [271,272]. Sinteza antiinflamatornih citokina IL-10 i TGF β je bila dominantna u grupama 24rBL0.1 i 48rBL0.1, dok je u grupama 24rBL10 i 48rBL10 preovlađivala proizvodnja IL-12, citokina koji promoviše sekreciju IFN γ i Th1 tip imunskog odgovora, i TNF [265,273]. U skladu sa tim je i uočena pozitivna korelacija između profilaktičke doze rBanLec i lokalne NO proizvodnje u piku bolesti. Ako se uzme u obzir da indukcija NO proizvodnje podrazumeva stimulaciju preko receptora urođene imunosti u prisustvu IFN γ , nije iznenađujuća da je u piku bolesti najniža NO proizvodnja uočena u 24rBL0.1 i 48rBL0.1 grupama, a najviša u 24rBL10 i 48rBL10 [274]. Za razliku od ishoda profilaktičkog tretmana rBanLec kod BALB/c miševa [275], gde težina kliničke slike u piku TNBS-izazvanog kolitisa inverzno korelira sa odnosom lokalnih koncentracija TNF i IL-10 (TNF/IL-10), kod C57BL/6 miševa težina kliničke slike u piku bolesti ne korelira sa TNF/IL-10 u debelom crevu.

U literaturi se često ističe značaj biljne ishrane u kontroli IBD [276,277]. Brojna istraživanja potvrđuju povoljan efekat biljne ishrane, ali ne smeju se zanemariti ni njeni potencijalni neželjeni efekti, između ostalog povezani i sa lektinima. Iako biljni lektini mogu doprineti uspostavljanju anti-inflamatornog miljea, u zavisnosti od doze i specifičnosti, oni takođe mogu intenzivirati inflamatorni odgovor [75,278]. Činjenica da niske doze rBanLec ublažavaju kliničku sliku, dok visoke doze pojačavaju inflamatorni odgovor, jasno ukazuje na to da je precizno doziranje lektina ključno za uspeh tretmana. Takođe, prezentovani rezultati ukazuju da tretman rBanLec može „pripremiti“ GALT da efikasno aktivira antioksidativne i regulatorne mehanizme. Delotvoran efekat pretretmana niskim dozama rBanLec potiče od prethodne pripreme lokalnog imunskog odgovora, što dovodi do efikasne aktivacije antioksidativnih odbrambenih mehanizama. To čini lokalno tkivo otpornijim na potencijalna oštećenja usled intenzivne proizvodnje ROS.

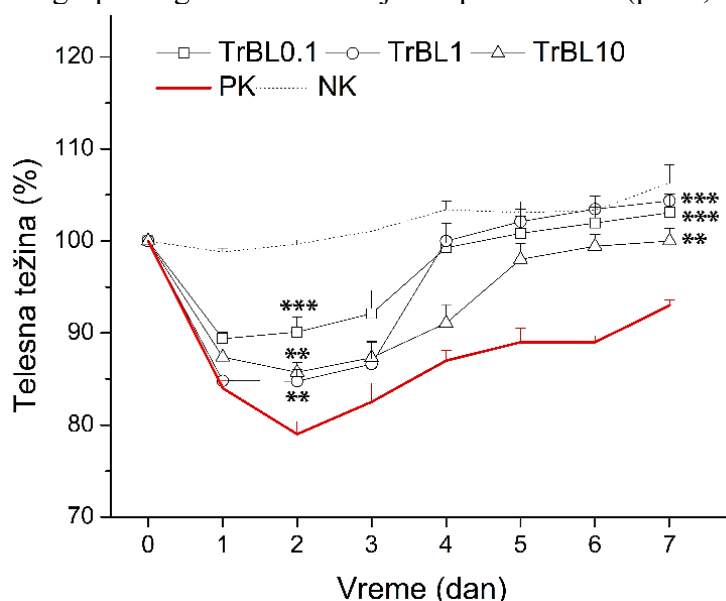
4.3. Oralna primena rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu

Treći set eksperimenata urađenih u okviru izrade ove doktorske teze je bio fokusiran na evaluaciju imunomodulatornog efekta rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu. Tokom sedam dana, od dana izazivanja bolesti (dan 0), životinjama je oralno davan rastvor rBanLec koncentracije od 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (grupa TrBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (grupa TrBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (grupa TrBL10). rBanLec je oralno primenjivan kako bi se izbeglo dodatno oštećenje već upaljenog tkiva rektalnim tretmanom i svakodnevno anesteziranje miševa koje bi opterećivalo životinje i potencijalno uticalo na ishod eksperimenta.

4.3.1. Opšte stanje C57BL/6 miševa oralno tretiranih rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa

Dobijeni rezultati pokazuju da tretman rBanLec, započet neposredno nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa, nije sprečio razvoj bolesti ali je značajno ublažio kliničku sliku u piku bolesti i ubrzao oporavak tretiranih životinja. U poređenju sa grupom PK, analiza smanjenja TT u piku bolesti je potvrdila povoljan efekat rBanLec tretmana kod svih rBanLec-tretiranih grupa ($p < 0,001$ za TrBL0.1; $p < 0,05$ za TrBL1 i TrBL10). Takođe, pokazano je da se bolji efekat postiže nižom dozom rBanLec. Konkretno, miševi grupe TrBL0.1 su izgubili najmanji procenat TT u piku bolesti i on je bio značajno manji u poređenju sa miševima koji su tretirani višim dozama rBanLec ($p < 0,001$ za grupe TrBL1 i TrBL10). Oralni tretman većom dozom rBanLec je takođe doveo do određenog poboljšanja kliničke slike (grupe TrBL1 i TrBL10), koje se najbolje vidi sedmog dana kada je stanje

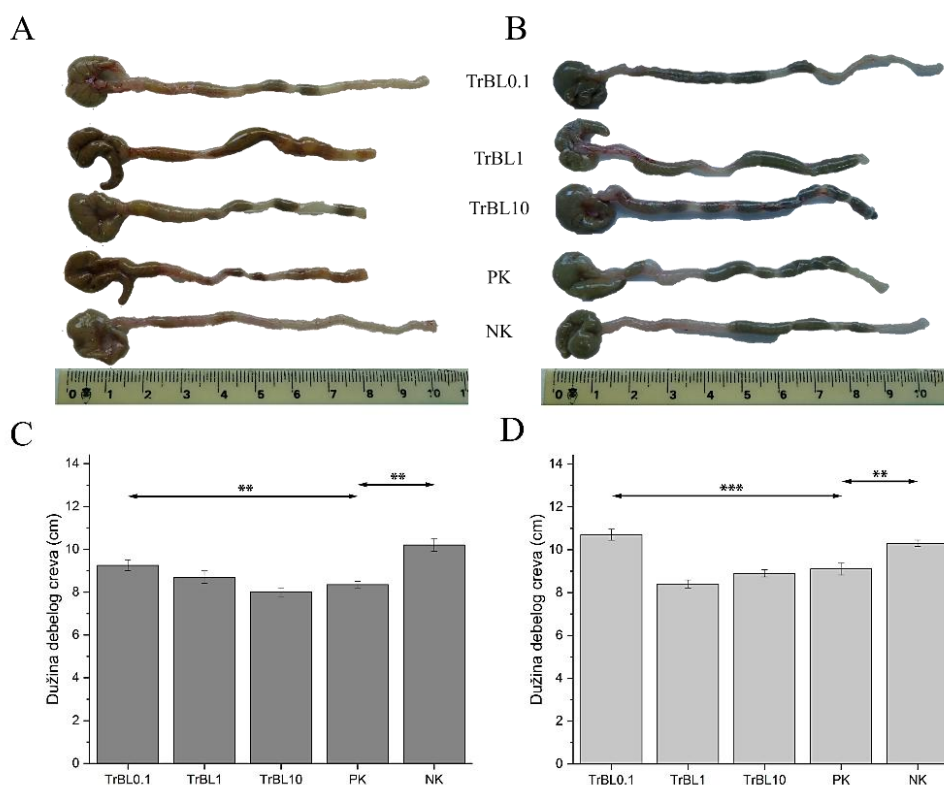
svih grupa tretiranih rBanLec, u poređenju sa PK, bilo značajno bolje. U poređenju sa PK grupom sedmog dana, najznačajnija razlika uočena je kod miševa TrBL0.1 i TrBL1 grupa ($p < 0,001$), mada se i kod miševa TrBL10 grupe mogao uočiti značajan napredak u TT ($p < 0,005$) (Slika 35.).



Slika 35. Uticaj oralne primene rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu na promenu telesne težine. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0). Počevši od dana izazivanja, miševima je tokom 7 dana oralno primenjen (100 μ l/dan) rBanLec u sledećim koncentracijama: 0,1 μ g/mL (TrBL0.1), 1 μ g/mL (TrBL1) i 10 μ g/mL (TrBL10). Telesna težina je predstavljena kao srednja vrednost $\pm$ SE ($n = 15$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Srednja vrednost telesne težine PK je prikazana punom crvenom linijom, dok je srednja vrednost telesne težine miševa NK grupe označena isprekidanom linijom. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Pored gubitka TT, smatranim glavnim makroskopskim parametrom za procenu intenziteta bolesti, kao pokazatelja zapaljenja tkiva analizirano je i skraćivanje debelog creva. Na Slici 36. A se vidi da je do skraćenje dužine debelog creva u piku bolesti došlo u svim grupama u kojima je izazvan eksperimentalni kolitis. Najmanje skraćenje debelog creva uočeno je u TrBL0.1 grupi, bilo je značajno manje u poređenju sa PK ($p < 0,01$), TrBL0.1 ($p < 0,01$) i TrBL10 ($p < 0,01$) grupama (Slika 36. C). Kod ostale dve grupe tretirane rBanLec, TrBL1 i TrBL10, nije uočena značajna razlike u dužini debelog creva u poređenju sa debelim crevom PK grupe tj. uočeno je značajno skraćenje dužine debelog creva u poređenju sa NK grupom ($p < 0,01$ za TrBL1; $p < 0,001$ za TrBL10).

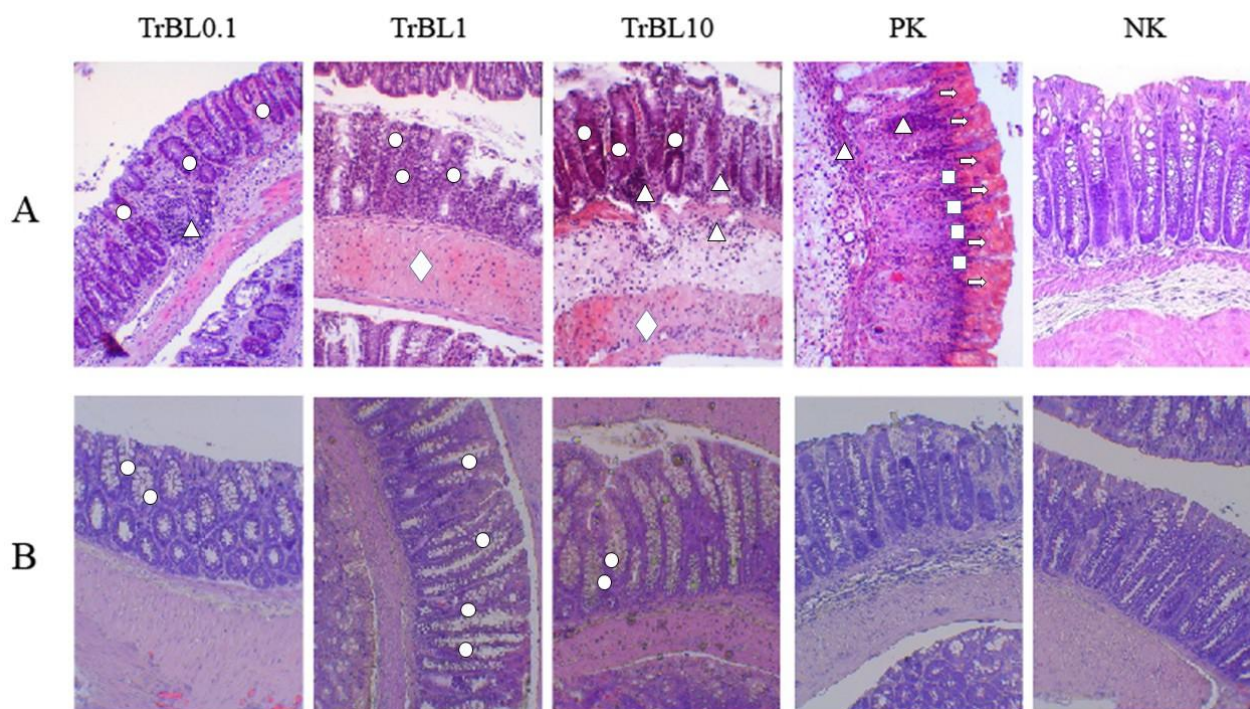
Poređenjem debelih creva uzorkovanih u fazi oporavka (7. dan nakon izazivanja kolitisa) takođe je uočeno da je dužina debelog creva miševa grupe TrBL0.1 značajno veća u poređenju sa ostalim grupama tretiranim rBanLec kao i debelim crevom miševa iz grupe PK ($p < 0,001$ za sve grupe). Debela creva miševa grupe TrBL0.1 u fazi oporavka bila su najpribližnija po dužini debelim crevima miševa grupe NK. Značajna razlika u dužini debelih creva uočena je između grupe NK i grupa TrBL1, TrBL10 i PK u fazi oporavka ($p < 0,001$ za TrBL1 i TrBL10; $p < 0,01$ za PK grupu) (Slika 36. B, D).



Slika 36. Dužina debelog creva C57BL/6 miševa koji su oralno tretirani rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0). rBanLec je apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (TrBL0.1), 1 µg/mL (TrBL1) i 10 µg/mL (TrBL10). Na slici (A) su predstavljene reprezentativne slike uzorkovanih debelih creva u piku bolesti (dan 2), na slici (B) su predstavljene reprezentativne slike uzorkovanih debelih creva u fazi oporavka (dan 7), na slici (C) su predstavljene dužine debelog creva u piku bolesti kao srednja vrednost ± SE, (n = 5) i na slici (D) su predstavljene dužine debelog creva u fazi oporavka kao srednja vrednost ± SE, (n = 10). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Histološki pregled tkiva debelog creva C57BL/6 miševa u piku bolesti je ukazao da kod miševa PK grupe i miševa oralno tretiranih rBanLec nakon izazivanja kolitisa dolazi do promena u arhitekturi debelog creva i infiltraciji imunskih ćelija različitih intenziteta (Slika 37. A). Veličina ćelijskih infiltrata i obim deformacije kripti bio je u pozitivnoj korelaciji sa težinom bolesti procenjenoj prema gubitku TT (Slika 35.). Analiza preseka uzoraka grupe PK u piku bolesti je otkrila dubinska oštećenja arhitekture tkiva debelog creva koja su povezana sa intenzivnom destrukcijom peharastih ćelija. Takođe, u svim slojevima tkiva debelog creva, a ponajviše u sloju lamina propriae, uočeni su infiltrati imunskih ćelija. Dodatno, u tkivu debelog creva PK grupe primećene su deformisane kripte koje su bile impregnirane sadržajem oslobođenim usled intenzivne hemoragije. Sa druge strane, preseki debelih creva grupa tretiranih rBanLec razlikovali su se po stepenu degeneracije kripti i gubitku peharastih ćelija. Najmanje navedenih promena je primećeno u presecima debelog creva grupe tretirane koncentracijom 0,1 µg/mL rBanLec (grupa TrBL0.1) (Slika 37. A). Na presecima debelog creva koji pripadaju grupama TrBL1 i TrBL10 uočena je hipertrofija lamina muscularis externe, kao odgovor na zapaljensku reakciju. Infiltracija imunskih ćelija je primećena na presecima svih debelih creva tretiranih rBanLec, s tim da je najizraženija infiltracija primećena u grupi koja je tretirana koncentracijom 10 µg/mL (grupa TrBL10). Na tkivnim presecima debelog creva TrBL10 grupe primećene su i velike zone hemoragije. Uzimajući u obzir histološke parametre koje su Koelink i saradnici [196] definisali kao najbolji pokazatelj ozbiljnosti bolesti (gubitak peharastih ćelija, gustina kripti, hiperplazija kripti i submukozni infiltrati), može se zaključiti da je najblaža patologija razvijena u grupi TrBL0.1 ($CHI = 9,2 \pm 1,8$). Suprotno, ozbiljnost patologije (Tabela 11.) koja se razvila u grupi TrBL10 ($CHI = 18,6 \pm 2,7$) je bila uporediva sa

patologijom u grupi PK ($CHI = 18,7 \pm 1,3$). U fazi oporavka, uočena je regeneracija tkiva koja se, među rBanLec-tretiranim grupama gradacijski descendently od TrBL0.1 ka TrBL10, manifestovala restitucijom arhitekture Lieberkinijevih kripti, odsustvom infiltrata, pupljenjem i migracijom mladih (još uvek ne sasvim metabolički aktivnih) peharastih ćelija od bazalnog ka apikalnom sloju (Slika 37. B).



Slika 37. Poprečni presek debelog creva u piku TNBS-izazvanog kolitisa i u fazi oporavka kod C57BL/6 miševa koji su tretirani različitim koncentracijama rBanLec tokom bolesti u trajanju od 7 dana. Tkivni preseki (debljina 5 μ m) debelih creva C57BL/6 miševa su bojeni H&E (pogledati poglavlje 3.4.1.) i pregledani sa uvećanjem od 10X Olympus BH2-RFL svetlosnim mikroskopom (Olympus Optica Ltd., Tokio, Japan) koji je povezan sa digitalnom kamerom visoke rezolucije (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Nemačka). Miševi istog uzrasta tretirani vodenim rastvorom 50% etanola su obeleženi kao NK grupa, dok su miševi tretirani samo TNBS u vodenom rastvoru 50% etanola obeleženi kao PK grupa. Uzorci debelih creva uzeti u piku bolesti (dan 2) (A) Uzorci debelih creva uzeti u fazi oporavka (dan 7) (B). Na slici je obeležen gubitak peharastih ćelija (Δ), oštećena arhitektura kripti ($\circ$), infiltracija polimorfonuklearnih ćelija u umanjene kripe ($\diamond$), i u submukozne slojeve ($\square$), hemoragija ($\Rightarrow$). Predstavljene su reprezentativne slike.

Tabela 11. – Histološki Indeks Kolitisa procenjen na osnovu patoloških promena u piku bolesti u debelom crevu C57BL/6 miševa u oralno tretiranih rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa.

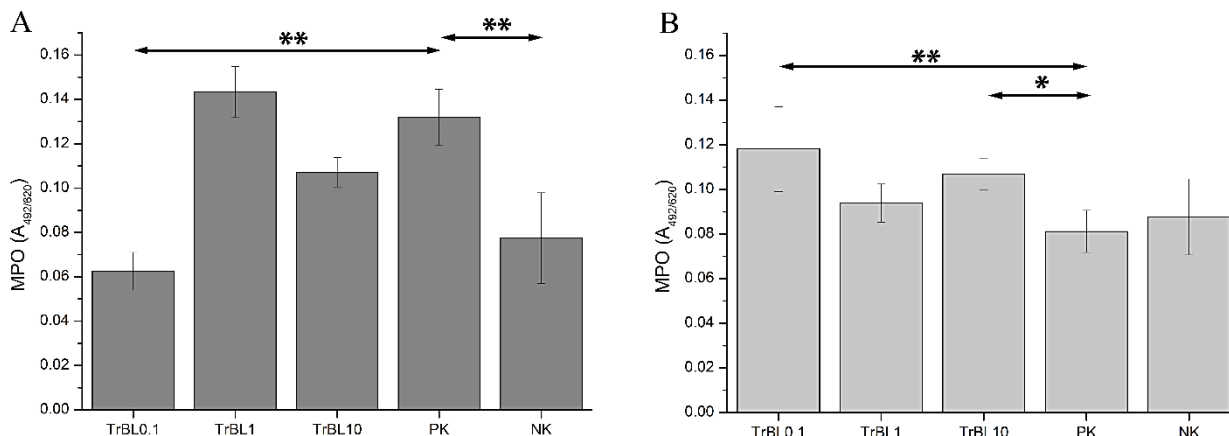
	Gubitak Peharastih Ćelija	Gustina Kripti *	Hiperplazija Kripti *	Infiltrati u Submukozi **	CHI
TrBL0.1	$1,1 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	0	$1,9 \pm 0,3$	$9,2 \pm 1,8$
TrBL1	$2,2 \pm 0,6$	$1,9 \pm 1,2$	0	$2,1 \pm 0,5$	$12,3 \pm 2,8$
TrBL10	$3 \pm 0,6$	2	1	$3,2 \pm 0,3$	$18,6 \pm 2,7$
PK	$3,1 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$	3	$18,7 \pm 1,3$
NK	0	0	0	0	0

* pomnožiti sa 2, ** pomnožiti sa 3; CHI- Histološki Indeks Kolitisa

4.3.2. Aktivnost MPO i NO proizvodnja u debelom crevu C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa

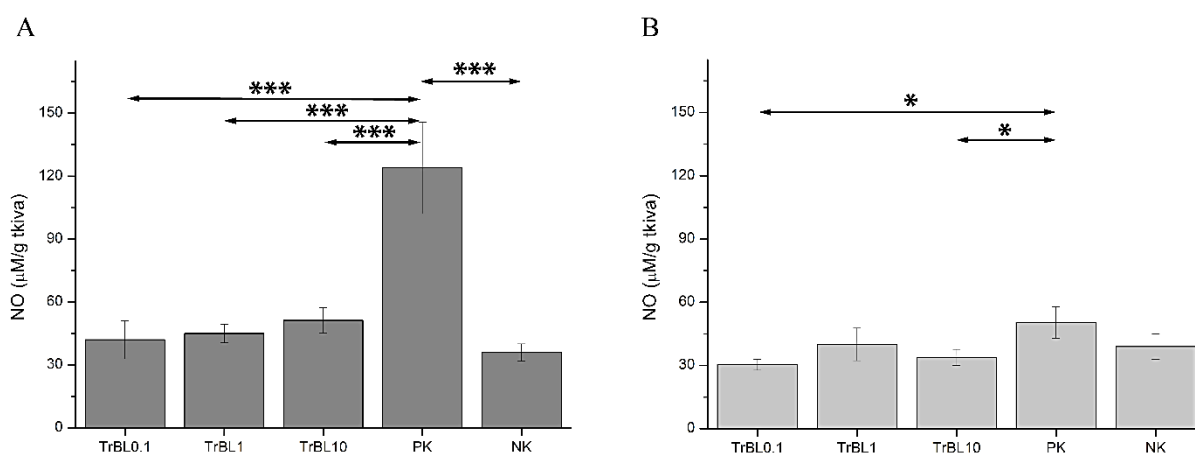
Analize uzoraka debelih creva miševa PK grupe su pokazale značajan porast lokalne MPO aktivnosti i NO proizvodnje u piku bolesti, dok se u fazi oporavka vrednosti ovih parametara približavale vrednostima izmerenim u uzorcima NK grupe (Slike 38. i 39.).

Oralni tretman sa 0,1 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec (grupa TrBL0.1) je značajno smanjio lokalnu MPO aktivnost u poređenju sa grupom PK ($p < 0,01$). Takođe, lokalna MPO aktivnost u TrBL0.1 grupi je bila statistički značajno manja u poređenju sa ostalim rBanLec-tretiranim grupama ($p < 0,01$ za TrBL1 i TrBL10; **Slika 38. A**) gde je lokalna MPO aktivnost bila u nivou PK grupe. Međutim, u fazi oporavka, kod grupa koje su tretirane rBanLec aktivnost MPO je bila povišena u poređenju sa PK ($p < 0,005$ za TrBL0.1 i $p < 0,05$ za TrBL10; **Slika 38. B**)



Slika 38. Aktivnost MPO u debelom crevu C57BL/6 miševa koji su oralno tretirani rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a MPO aktivnost je analizirana u (A) piku bolesti (dan 2) i u (B) fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost U aktivnosti MPO po miligramu tkiva debelog creva $\pm$ SE ($n = 5$, $n = 10$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Kod svih rBanLec-tretiranih miševa nije uočena značajna promena u lokalnoj NO proizvodnji nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa. Za razliku od PK grupe, u svim rBanLec-tretiranim grupama u piku bolesti izmerena je značajno manja ($p < 0,001$ za sve grupe), u nivou NK grupe, lokalna proizvodnja NO (**Slika 39. A**). U fazi oporavka (dan 7), u PK grupi je došlo do značajnog smanjenja lokalne proizvodnje NO u odnosu na pik bolesti, ali je ona i dalje bila viša nego u rBanLec-tretiranim grupama ($p < 0,05$ u odnosu na TrBL0.1 i TrBL10 grupe; **Slika 39. B**).



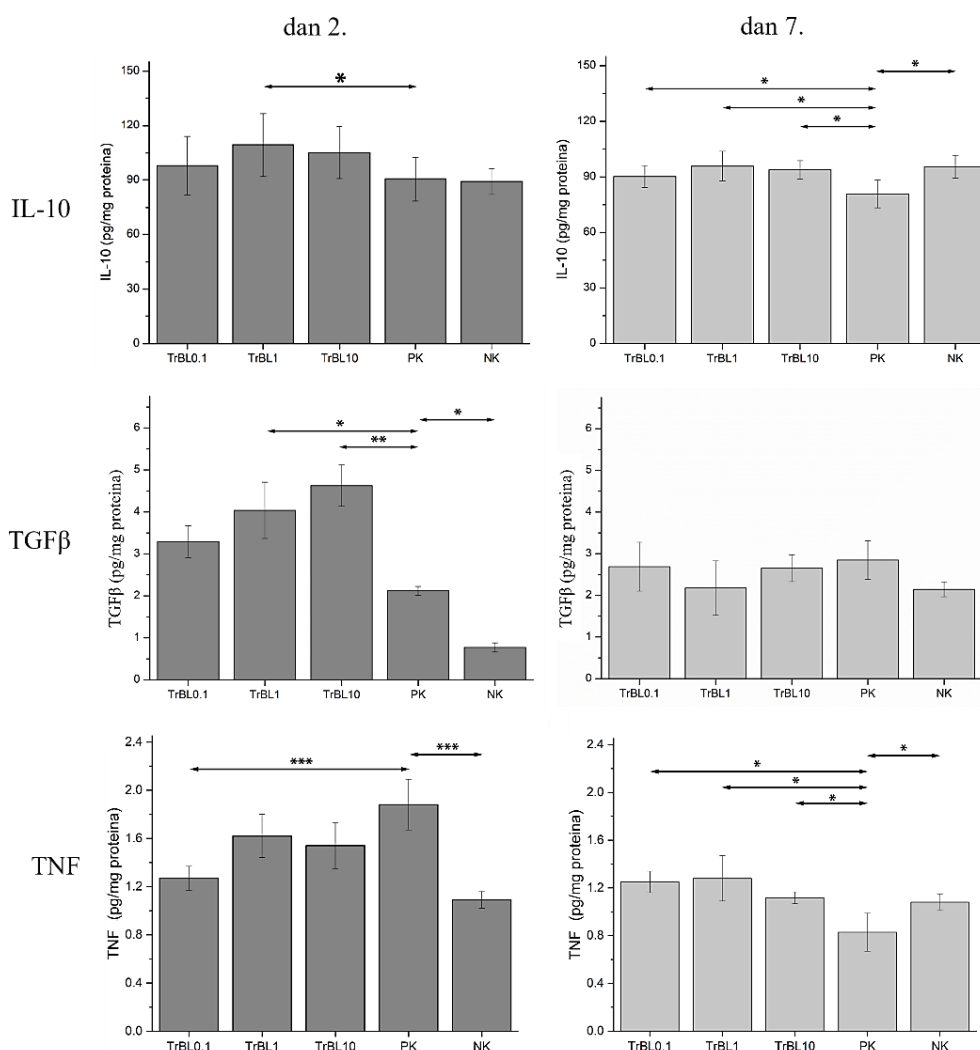
Slika 39. Koncentracija NO u debelom crevu C57BL/6 miševa koji su oralno tretirani rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a MPO aktivnost je analizirana u (A) piku bolesti (dan 2) i u (B) fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL0.1), 1 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL1) i 10 $\mu\text{g/mL}$ (TrBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po gramu tkiva ($\mu\text{M/g}$ tkiva) $\pm$ SE, ($n = 5$, $n = 10$). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

4.3.3. Citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa

Analiza uticaja oralnog rBanLec tretmana nakon izazivanja eksperimentalnog kolitisa na citokinski milje u debelom crevu C57BL/6 miša obuhvatala je merenje lokalnih koncentracija IL-10, TGF β i TNF (**Slika 40.**). Kao i u prethodno prikazanim eksperimentima koji su se odnosili na jednokratni profilaktički tretman rBanLec (**Slika 33.**), u debelom crevu PK grupe u piku bolesti je uočeno statistički značajno povećanje lokalne proizvodnje TNF ($p < 0,001$), ali je izostao značajan porast lokalne proizvodnje regulatornih citokina IL-10 i TGF β .

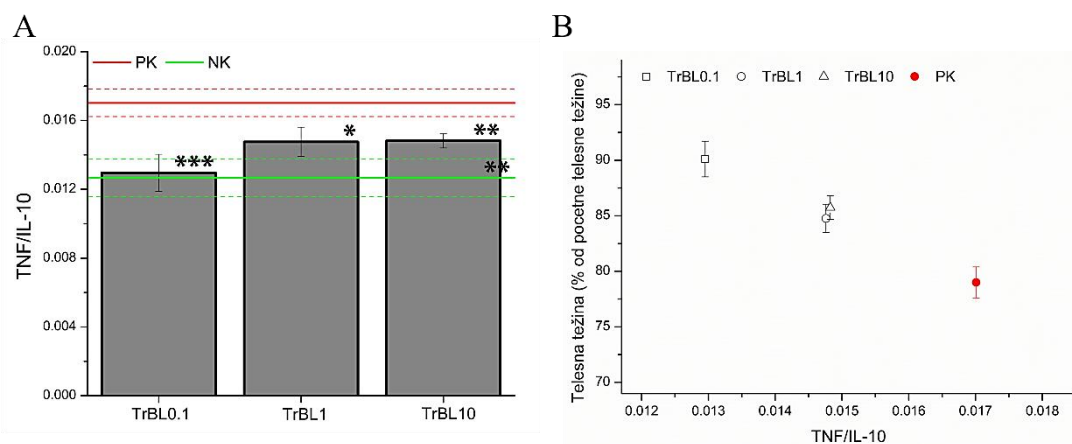
U odnosu na PK grupu, u rBanLec-tretiranim grupama u piku bolesti je uočen blagi porast lokalne proizvodnje IL-10 ($p < 0,05$ za TrBL1) i porast lokalne proizvodnje TGF β ($p < 0,05$ za TrBL1; $p < 0,01$ za TrBL10 grupu). Lokalne koncentracije TGF β u piku bolesti bile su značajno iznad bazalnog nivoa izmerenog u NK grupi NK ($p < 0,01$ za TrBL0.1; $p < 0,001$ za TrBL1 i TrBL10 grupe). U fazi rezolucije bolesti, nije uočena značajna razlika lokalnih koncentracija IL-10 među rBanLec-tretiranim grupama i one su bile veće nego u PK grupi ($p < 0,05$ za sve grupe). Lokalna proizvodnja TGF β je opadala tokom rezolucije bolesti u svim rBanLec-tretiranim grupama i nedelju dana nakon izazivanja bolesti je dospela na nivo izmeren u NK grupi.

U svim rBanLec-tretiranim grupama lokalna proizvodnja TNF u piku bolesti je bila manja nego u debelom crevu miševa PK grupe, pri čemu je najmanja koncentracija TNF izmerena u debelom crevu miševa tretiranih sa 0,1 $\mu\text{g/mL}$ rBanLec ($p < 0,001$ u poređenju sa PK). Nije detektovana značajna razlika u koncentraciji TNF u debelom crevu miševa među tretiranim grupama rBanLec. Tokom rezolucije bolesti, lokalna koncentracija TNF je opadala u svim grupama, nezavisno od rBanLec tretmana. Sedmog dana nakon izazvanog kolitisa u eksperimentalnim uslovima nije uočena značajna razlika lokalnih koncentracija TNF među rBanLec-tretiranim grupama i one su, kao i koncentracije IL-10, bile veće nego u PK grupi ($p < 0,05$ za sve grupe).



Slika 40. Proizvodnja IL-10, TGFβ i TNF u debelom crevu C57BL/6 miševa koji su oralno tretirani rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a lokalna aktivnost IL-10, TGFβ i TNF je analizirana u piku bolesti (dan 2) i fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (TrBL0.1), 1 µg/mL (TrBL1) i 10 µg/mL (TrBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina izražene u pg po miligramu proteina supernatanta ± SE (n = 5, n = 10). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Analizom odnosa lokalnih koncentracija TNF i IL/10, TNF/IL-10, u piku bolesti pokazano je da tretman koncentracijom 0,1 µg/mL rBanLec 24h značajno smanjuje TNF/IL-10 u poređenju sa PK grupom ($p < 0,01$). Takođe, TNF/IL-10 je bio značajno manji i u grupama TrBL1 i TrBL10 u poređenju sa PK grupom ($p < 0,05$ za TrBL1; $p < 0,01$ za TrBL10) (Slika 41. A). Pored toga, pokazano je da u slučaju oralne primene rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa intenzitet patologije procenjen na osnovu smanjenja TT u piku bolesti značajno korelira sa TNF/IL-10 u debelom crevu u piku bolesti ($P_{cc} = -0,909$, $p < 0,05$), (Slika 41. B).

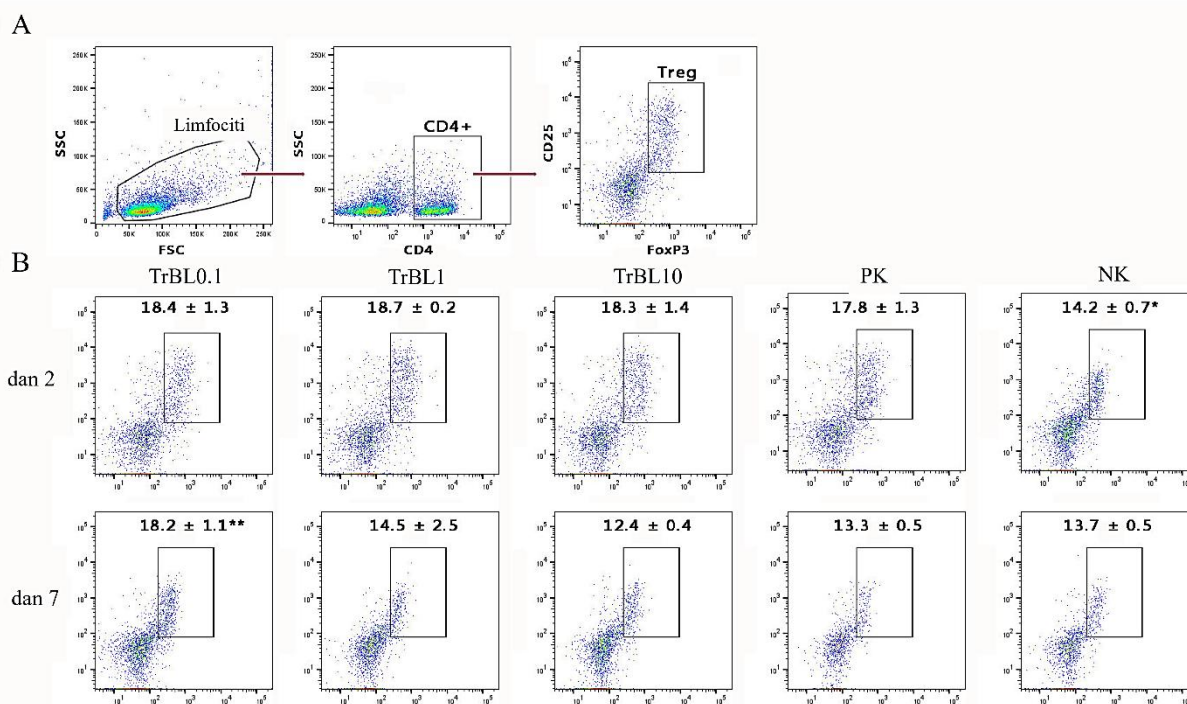


Slika 41. Odnos proizvodnje TNF i IL-10 u debelom crevu i njegova korelacija sa težinom kliničke slike u piku eksperimentalnog kolitisa tokom koga je oralno primenjivan rBanLec. Eksperimentalni kolitis je izazvan u C57BL/6 mišu intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0). Počevši od dana izazivanja, miševima je oralno apliciran (100 μ L) rBanLec u koncentracijama: 0,1 μ g/mL (TrBL0.1), 1 μ g/mL (TrBL1) i 10 μ g/mL (TrBL10). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) samo rastvorom 50% etanola (NK; obeleženi zelenom linijom) i miševi kojima nakon izazivanja kolitisa nije oralno apliciran rBanLec (PK; obeleženi crvenom linijom) su korišćeni kao kontrole. Na osnovu koncentracija TNF i IL-10 određenih u debelom crevu u piku bolesti (dan 2; slika 40.) izračunati su TNF/IL-10 odnosi i predstavljeni kao srednji TNF/IL-10 $\pm$ SE po grupi (A). TNF/IL-10 su korelirani sa težinom kliničke slike procenjenom na osnovu gubitka telesne težine u piku bolesti (dan 2; slika 35.), što je predstavljeno na panelu B. Statistička značajnost razlika TNF/IL-10 je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Korelacija između TNF/IL-10 i težine kliničke slike je određena Pirsonovom bivarijantnom korelacionom analizom; Pcc- Pearson's correlation coefficient, $p < 0,05$.

4.3.4. T ćelije u mLČ C57BL/6 miša oralno tretiranog rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa

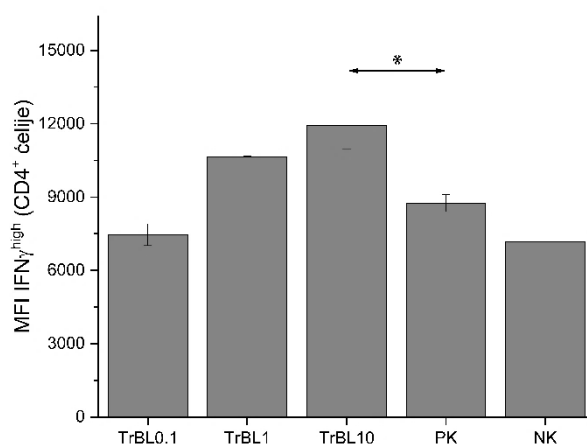
Imajući u vidu da je prekomerni inflamatorni odgovor u brojnim istraživanjima povezan sa IBD [154,279], analiza T ćelijske populacije u mLČ C57BL/6 miševa oralno tretiranih rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa obuhvatala je analizu populacije Th1 ćelija, sa fokusom na Th1 ($CD4^+IFN\gamma^+$ limfociti) ćelije koje promovišu inflamaciju, i Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$ limfociti; **Slika 42. A**) ćelija koje su ključne za njenu kontrolu.

Protočnom citofluorimetrijskom analizom je pokazano da u piku bolesti procentualna zastupljenost Treg ćelija u mLČ raste kod svih miševa kojima je izazvan kolitis, nezavisno od tretmana rBanLec ($p < 0,05$ za sve grupe u odnosu na NK). Pored toga, među rBanLec-tretiranim grupama, kao i pri njihovom poređenju sa PK, nisu uočene značajne razlike procentualne zastupljenosti Treg ćelija u okviru $CD4^+$ limfocita mLČ. U grupi koja je svakodnevno oralno tretirana rastvorom 0,1 μ g/mL rBanLec tokom sedam dana (TrBL0.1 grupa) povećana zastupljenost Treg je zadržana i tokom faze oporavka ($p < 0,01$ vs. PK), dok je u ostalim rBanLec-tretiranim grupama (TrBL1 i TrBL10) i PK grupi sedmog dana od izazivanja bolesti ona bila u nivou zastupljenosti uočene u NK grupi (**Slika 42. B**).



Slika 42. Procentualna zastupljenost CD25⁺FoxP3⁺ ćelija u okviru limfocitnih i CD4⁺ ćelija u mLČ C57BL/6 miševa koji su oralno tretirani rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa. Eksperimentalni kolitis je izazvan jednokratnom rektalnom primenom rastvora 50% etanola i TNBS (dan 0) a procentualna zastupljenost CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ je analizirana u piku bolesti (dan 2) i u fazi oporavka (dan 7). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (TrBL0.1), 1 µg/mL (TrBL1) i 10 µg/mL (TrBL10). Prikazan je (A) su reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profil ćelija u limfocitnom i CD4⁺ okviru izolovanih iz mLČ C57BL/6 miševa. (B) Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost procentualne zastupljenosti CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ćelija ± SE, (n = 5, n = 10). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna (p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***).

Takođe, protočna citofluorimetrijska analiza urađena nakon intracelularnog bojenja IFN γ pokazala je da CD4⁺ ćelije mLČ u piku bolesti intenzivnije sintetišu IFN γ (Slika 43.), pogotovo kod C57BL/6 miševa koji su nakon izazivanja kolitisa u eksperimentalnim uslovima oralno tretirani rastvorom 10 µg/mL (TrBL10 vs. NK i PK p < 0,05). rBanLec je pozitivno dozno-zavisno uticao na proizvodnja IFN γ , tako da je najmanji sadržaj IFN γ izmeren u CD4⁺ limfocitima mLČ miševa grupe TrBL0.1 (p < 0,05 vs. TrBL1; p < 0,001 vs. TrBL10).



Slika 43. Uticaj oralne primene rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu na proizvodnju IFN γ od strane CD4⁺ ćelija u izolovanim mLČ u piku bolesti. Eksperimentalni kolitis je izazvan intrarektalnom aplikacijom TNBS rastvorenog u 50 % etanolu (dan 0) a količina proizvodnje molekula IFN γ od strane CD4⁺IFN γ ^{high} ćelija u populaciji ćelija izolovanih iz mLČ tretiranih C57BL/6 miševa je analizirana u piku bolesti (dan 2). rBanLec je intrarektalno apliciran u sledećim koncentracijama: 0,1 µg/mL (TrBL0.1), 1 µg/mL (TrBL1) i 10 µg/mL (TrBL10). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost gustine eksprimiranja IFN γ

molekula na površini CD4⁺ ćelije $\pm$ SE (n = 5). Miševi iste starosti tretirani (dan 0) rastvorom 50% etanola (NK grupa) i miševi koji nakon izazivanja kolitisa nisu oralno tretirani rBanLec (PK grupa) su korišćeni kao kontrole. Statistička značajnost je procenjena one-way ANOVA testom, praćenim Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde je PK grupa korišćena kao referentna ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

4.3.5. Oralna primena rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu - diskusija

Imajući u vidu da su IBD hronične bolesti u kojima se smenjuju faze relapsa i remisije bolesti, bilo je potrebno ispitati i efekte rBanLec primene tokom aktivne faze bolesti koji karakteriše uspostavljanje izrazito inflamatornog miljea. Činjenice da inflamatorno okruženje može dovesti do promene u obrascu glikozilacije proteina [280] i epigenetskih promena koje utiču na proizvodnju solubilnih medijatora [281] ukazuju da odgovor specifične populacije imunskih ćelija na rBanLec stimulaciju ne mora nužno biti identičan u fiziološkim uslovima i u uslovima inflamacije. Predstavljeni rezultati pokazuju da oralna primena rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa dozno-zavisno moduliše lokalni imunski odgovor u debelom crevu tako što značajno smanjuje težinu bolesti i pomaže u oporavku C57BL/6 miševa.

Iako sedmodnevni oralni tretman rBanLec u dozama 0,01-1 μ g/dan nije sprečio razvoj eksperimentalnog kolitisa, uočeni su važni povoljni efekti njegove primene. U piku bolesti, pozitivan efekat rBanLec-tretmana je bio u inverznoj korelaciji sa primenjenom dozom. Međutim, i veće doze rBanLec su imale značajno pozitivno dejstvo, pogotovo uzevši u obzir i fazu oporavka. Oralni tretman rBanLec u najnižoj dozi (TrBL0.1 grupa; doza 0,01 μ g/dan tj. 0,5 mg/kg TT/dan) je bio najefikasniji u ublažavanju eksperimentalnog kolitisa kod C57BL/6 miševa. Njoj ekvivalentna humana doza je ~ 0,04 mg/kg TT/dan [282]. U skladu sa tim, dnevna doza rBanLec za tretman osobe čoveka čija je TT 70 kg bila bi 2,8 mg. Ta količina lektina banane se može naći u nešto više od polovine (oko 60%) banane srednje veličine (sardži ~ 120 g pulpe [283]; prosečan sadržaj lektina banane ~ 4 mg/100g pulpe [86]).

Slični dozno-zavisni efekti oralne primene rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa opisani su i kod BALB/c miševa [284]. Razlike u dinamici i intenzitetu promena pojedinačnih imunoloških parametara tokom oralnog tretmana rBanLec ukazuju na fine razlike u doprinosu specifičnih regulatornih mehanizama u postizanju pozitivnog efekta na eksperimentalni kolitis u BALB/c i C57BL/6 miševima. Uočene razlike mogle bi se, bar delom, objasniti različitom genetskom osnovom BALB/c i C57BL/6 miša koja, između ostalog, dovodi do razlike u zastupljenosti subpopulacija T ćelija u GALT i drenirajućim LČ i razlike u kvalitativnim karakteristikama imunskog odgovora na antigene (BALB/c pro-Th2, C57BL/6 pro-Th1) [110,285], što rezultira i različitom osetljivosti na zapaljenske bolesti, uključujući i IBD [286]. Činjenica da je oralni rBanLec-tretman imao pozitivan efekat u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u oba soja ukazuje na dobru robustnost ovog pristupa u kontroli IBD.

Kao kod BALB/c miševa, pozitivno dejstvo oralnog tretmana rBanLec u TNBS-izazvanom kolitisu u C57BL/6 mišu, procenjeno prvenstveno na osnovu manjeg gubitka TT u odnosu na PK grupu, bilo je povezano sa boljom kontrolom inflamatorne reakcije u debelom crevu.

Prikazani rezultati pokazuju da je bolja kontrola inflamacije u debelom crevu C57BL/6 miša u piku bolesti obuhvatala lokalno povećanje proizvodnje regulatornih citokina IL-10 i TGF β i smanjenje lokalnog proinflamatornog odgovora (proizvodnja TNF, proizvodnje NO i aktivnost MPO). Tretman nižim dozama rBanLec je efikasnije promovisao antiinflamatorno okruženje, na šta ukazuju i odnosi lokalnih koncentracija TNF i IL-10 u piku bolesti u PK i rBanLec-tretiranim grupama. Međutim, za razliku od BALB/c miševa gde je smanjenje TNF/IL-10 dominantno posledica rBanLec-stimulisanog povećanja lokalne proizvodnje IL-10 [284], smanjenje TNF/IL-10 kod C57BL/6 miševa je posledica značajnog smanjenja lokalne proizvodnje TNF. Slično zapažanje u pogledu razlike u proizvodnji IL-

10 kod BALB/c i C57BL/6 miševa su opisali i Mukhopadhyay i saradnici u modelu DSS-izazvanog kolitisa [286].

U prilog uzročno-posledičnoj vezi kontrole inflamacije i ublažavanja kliničke slike TNBS-izazvanog kolitisa, idu i rezultati analize T ćelijskog pula mLČ u piku bolesti. Pokušaj imunskog sistema da reguliše zapaljensku reakciju u tkivu debelog creva se ogledala i u povećanoj zastupljenosti Treg u mLČ. U piku bolesti, u mLČ, uočeno je konzistentno povećanje zastupljenosti Treg ćelija kod svih miševa kojima je izazvan kolitis, što implicira da je sam imunski sistem ima tendenciju da limitira inflamaciju. Sa druge strane, među rBanLec grupama, najmanji intenzitet sinteze IFN γ od strane CD4⁺ ćelija je uočen u mLČ TrBL0.1 miševa, a najveći u mLČ TrBL10 miševa kod kojih je uočeno najslabije ublaženje kliničke slike. Pored toga, u TrBL0.1 grupi, gde je uočena najblaža klinička slika i najefikasniji oporavak, povećana zastupljenost Treg u mLČ se održala i tokom faze oporavka.

Analiza lokalne MPO aktivnosti u fazi oporavka ukazuje da bi pozitivno dejstvo rBanLec u rezoluciji bolesti kod C57BL/6 miša u velikoj meri moglo da bude povezano sa antiinflamatornom aktivnošću neutrofila [138]. Pored toga, moguće je da rBanLec doprinosi rezoluciji bolesti i kao agonist TLR2 receptora, podstičući obnavljanje oštećenog epitelnog sloja crevne sluznice [287] i utičući pozitivno na aktivnost Treg [288].

Rezultati opisani u ovom poglavlju pokazuju da rBanLec i hrana koja sadrži BanLec imaju veliki potencijal za primenu u kontroli IBD. Ipak, zapažanje da je uticaj rBanLec na ishod IBD visoko zavisano od doze ukazuje na neophodnost njegove pažljive primene.

5. ZAKLJUČCI

Predstavljeni rezultati pokazuju da primena rBanLec u TNBS-izazvanom kolitisu dozno-zavisno modulira lokalni imunski odgovor u debelom crevu tako što značajno smanjuje težinu bolesti i pomaže u oporavku C57BL/6 miševa. Ovakvo zapažanje da je uticaj rBanLec na ishod IBD visoko zavisano od doze ukazuje na neophodnost njegove pažljive primene.

5.1. Imunomodulatorni efekat rBanLec u GIT C57BL/6 miša u fiziološkim uslovima

1. rBanLec u koncentraciji do 1 $\mu\text{g/mL}$ ne ispoljava citotoksičan efekat na epitelnim ćelijama, a u većim koncentracijama (10 $\mu\text{g/mL}$) može negativno uticati na njihovu vijabilnost.
2. rBanLec u koncentraciji $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ne inicira proizvodnju IL-10 niti povećava ekspresiju NF- κB u ćelijama crevnog epitela.
3. Kontinuirana tridesetodnevna oralna suplementacija 0,01 $\mu\text{g/dan}$ rBanLec rezultuje sporijim napretkom TT i blago pojačanom infiltracijom imunskih ćelija u limfoidno tkivo pridruženo GIT.
4. Kontinuirana tridesetodnevna oralna suplementacija rBanLec u fiziološkim uslovima ne utiče značajno na aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i GST) i citokinski milje (TGF β , IL-10, IL-12, IFN γ , IL-17, IL-4 i TNF) u debelom crevu, kao i na zastupljenost Treg ćelija u mLČ i slezini. Kao rezultat ovog tretmana, smanjuje se aktivnosti MPO u debelom crevu C57BL/6 miševa.
5. Višednevna oralna suplementacija rBanLec je dovodi do promena karakteristika crevne mikrobiote C57BL/6 miševa, koja se ogleda u smanjenju njene raznovrsnosti i porastu zastupljenosti bakterijskih familija *Bacteroidaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Deferribacteraceae* i *Tannerellaceae*.
6. Jednokratni intrarektalni tretman rBanLec u fiziološkim uslovima dozno-zavisno utiče na lokalnu sekreciju TNF i IL-6, proizvodnju NO i aktivnosti MPO u debelom crevu C57BL/6 miša. Porast njihove lokalne koncentracije / aktivnosti je generalno izraženiji tokom prvih 24h. Porast lokalne proizvodnje NO i aktivnosti MPO pozitivan korelira sa apliciranom dozom rBanLec, dok je (intenzivniji) porast sekrecije TNF i IL-6 uočen pri stimulaciji nižim koncentracijama rBanLec.
7. Jednokratni intrarektalni tretman rBanLec u fiziološkim uslovima dovodi do promene citokinskog miljea u debelom crevu C57BL/6 miša. Promena, pored porasta koncentracije TNF i IL-6 tokom 24h nakon tretmana, uključuje i porast koncentracije regulatornih (IL-10 tokom najmanje 48h i TGF β tokom 24h od tretmana), proinflamatornih citokina (IL-12 pozitivno dozno-zavisno tokom najmanje 48h i IFN γ intenzivno 24-48h od tretmana) i GM-CSF (pri stimulaciji nižim koncentracijama rBanLec, intenzivnije tokom prva 24h od tretmana).
8. Jednokratni intrarektalni tretman rBanLec u fiziološkim uslovima, nezavisno od doze rBanLec, dovodi do povećanja zastupljenosti CD103⁺ DC u mLČ C57BL/6 miša 24h nakon tretmana, kao i do dozno-zavisnih razlika u njihovom sastavu. Tretman nižim koncentracijama rBanLec ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) bolje promovira ekspanziju CD103⁺CD11b⁻ DC populacije, dok je za povećanje zastupljenosti CD103⁺CD11b⁺ DC potrebna stimulacija rBanLec u većoj koncentraciji ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$). Takođe, jednokratni intrarektalni tretman rBanLec dovodi do pojačanja ekspresije CD11b na CD103⁺CD11b⁺ DC u mLČ koja perzistira bar 48h nakon tretmana.
9. Jednokratni intrarektalni tretman rBanLec u niskoj koncentraciji (0,1 $\mu\text{g/mL}$) dovodi do porasta zastupljenosti CD103⁻CD11b⁺CD11c⁺ ćelija u mLČ C57BL/6 miša koji perzistira bar 48h nakon tretmana.

5.2. Evaluacija efekta jednokratne profilaktičke primene rBanLec u modelu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu

1. Preaktivacija imunskog sistema debelog creva C57BL/6 miša jednokratnom intrarektalnom aplikacijom rBanLec u koncentracijama 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ (100 μL), 24h ili 48h pre izazivanja eksperimentalnog kolitisa, ne može da spreči razvoj bolesti ali može, dozno-zavisno, da ublaži kliničku sliku i ubrzava oporavak. Nezavisno od dužine vremenskog intervala između profilaktičkog tretmana i izazivanja bolesti, najpovoljniji efekat ostvaruje pretretman 0,01 μg rBanLec.
2. Ublaženje kliničke slike u piku TNBS-izazvanog kolitisa povezano je sa porastom aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i CAT i padom proizvodnje NO u debelom crevu rBanLec-pretretiranih C57BL/6 miševa. U fazi oporavka, proizvodnja NO u debelom crevu rBanLec-pretretiranih miševa se značajno brže u odnosu na PK grupu vraća na bazalni nivo.
3. Pretretman rBanLec utiče na MPO aktivnost u debelom crevu C57BL/6 miša u piku TNBS-izazvanog kolitisa. Dozno-zavisni obrazac promena lokalne aktivnosti MPO, kao i karakteristike uzročno-posledičnog odnosa „porast MPO aktivnosti – ublažavanje kliničke slike u piku bolesti“ se razlikuju među grupama tretiranim rBanLec 24h i 48h pre izazivanja bolesti. Među grupama pretretiranim 24h pre izazivanja bolesti najveća lokalna aktivnost MPO je u 24rBL0.1 grupi koju odlikuje najblaža klinička slika, dok je među grupama pretretiranim 48h pre izazivanja bolesti najveća lokalna MPO aktivnost u 48rBL1 koju odlikuje najteža klinička slika među istovremeno rBanLec-pretretiranim grupama. Takođe, smer promena lokalne MPO aktivnosti tokom faze oporavka je različit među grupama pretretiranim 24h (pad) i 48h (blagi porast) pre izazivanja bolesti.
4. Profilaktički tretman rBanLec dovodi do intenzivnije proizvodnje regulatornih citokina IL-10 i TGF β u debelom crevu C57BL/6 miša u piku TNBS-izazvanog kolitisa. Profilaktička doza rBanLec inverzno korelira sa porastom lokalne koncentracije oba citokina u piku bolesti, nezavisno od vremena pretretmana. Porast lokalne proizvodnje TGF β u piku bolesti je intenzivniji u poređenju sa porastom lokalne koncentracije IL-10. Takođe, rast lokalne proizvodnje regulatornih citokina je intenzivniji u grupama pretretiranim 24h pre izazivanja bolesti.
5. Proizvodnja inflamatornih citokina IL-12 i TNF u debelom crevu rBanLec-pretretiranih C57BL/6 miševa u piku bolesti je generalno niža u poređenju sa PK grupom. Dozno-zavisni obrazac promena lokalnih koncentracija IL-12 i TNF u piku bolesti se razlikuje među grupama pretretiranim 24h (pozitivna korelacija, najviše u 24rBL10 grupi) i 48h (inverzna korelacija, najniža u 48rBL10 grupi) pre izazivanja bolesti.
6. Za razliku od ishoda profilaktičkog tretmana rBanLec kod BALB/c miševa, gde težina kliničke slike u piku TNBS-izazvanog kolitisa inverzno korelira sa odnosom lokalnih koncentracija TNF i IL-10 (TNF/IL-10), kod C57BL/6 miševa težina kliničke slike u piku bolesti ne korelira sa TNF/IL-10 u debelom crevu.

5.3. Oralna primena rBanLec kao imunomodulatora tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu

1. Oralna primena rBanLec u koncentracijama 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ (100 $\mu\text{L/dan}$) tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu ne sprečava razvoj bolesti, ali, dozno-zavisno modulišući lokalni imunski odgovor u debelom crevu, smanjuje težinu bolesti i ubrzava oporavak. U navedenom opsegu koncentracija, oralni tretman 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (doza 0,01 $\mu\text{g/dan}$ tj. 0,5 mg/kg TT/dan) najefikasnije ublažava težinu TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu.
2. Pozitivno dejstvo oralnog tretmana rBanLec u TNBS-izazvanom kolitisu u C57BL/6 mišu, procenjeno prvenstveno na osnovu manjeg gubitka TT u odnosu na PK grupu, je povezano sa boljom kontrolom inflamatorne reakcije u debelom crevu, što obuhvata lokalno povećanje proizvodnje regulatornih citokina (IL-10 i TGF β) i smanjenje proizvodnje / aktivnosti proinflamatornih medijatora (TNF i NO). U skladu sa tim, stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolesti korelira sa smanjenjem TNF/IL-10 odnosa (dominantno zbog smanjenja lokalne proizvodnje TNF) u debelom crevu.
3. Oralna primene rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu utiče na lokalnu aktivnost MPO. Kod rBanLec-tretiranih grupa u poređenju sa PK, MPO aktivnost u debelom crevu u piku bolesti je niža. Tokom oporavka ona sporije opada u rBanLec-tretiranim grupama postavši u jednom momentu veća od aktivnosti u PK grupi. Intenzitet MPO aktivnosti u fazi oporavka ukazuje da bi pozitivno dejstvo rBanLec u rezoluciji bolesti kod C57BL/6 moglo da bude povezano sa anti-inflamatornom aktivnošću neutrofila.
4. Oralna primena rBanLec tokom TNBS-izazvanog kolitisa u C57BL/6 mišu, dozno zavisno, dovodi do promena u zastupljenosti Treg ćelija i intenzitetu proizvodnje IFN γ od strane CD4⁺ limfocita u mLČ. U skladu sa već iznetim zaključkom da stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolest zavisi od efikasnosti kontrole inflamatorne reakcije u debelom crevu, najveći porast zastupljenosti Treg kao i najslabija proizvodnja IFN γ u CD4⁺ ćelijama, uočeni su u mLČ miševa TrBL0.1 grupe koja je imala najblažu kliničku sliku.

6. LITERATURA

1. Mishra, A.; Behura, A.; Mawatwal, S.; Kumar, A.; Naik, L.; Mohanty, S.S.; Manna, D.; Dokania, P.; Mishra, A.; Patra, S.K.; et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol* **2019**, *134*, 110827, doi:10.1016/j.fct.2019.110827.
2. Kirchgessner, J.; Lemaitre, M.; Carrat, F.; Zureik, M.; Carbonnel, F.; Dray-Spira, R. Risk of Serious and Opportunistic Infections Associated With Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2018**, *155*, 337-346.e310, doi:10.1053/j.gastro.2018.04.012.
3. Beaugerie, L.; Kirchgessner, J. Balancing Benefit vs Risk of Immunosuppressive Therapy for Individual Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2019**, *17*, 370-379, doi:10.1016/j.cgh.2018.07.013.
4. Reich, J.; Wasan, S.; Farraye, F.A. Vaccinating Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **2016**, *12*, 540-546.
5. Hermann, S. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen Tartu, 1888.
6. Van Damme, E.J.M. History of Plant Lectin Research. In *Lectins: Methods and Protocols*, Hirabayashi, J., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2014; pp. 3-13.
7. Boyd, W.C.; Shapleigh, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **1954**, *119*, 419, doi:10.1126/science.119.3091.419.
8. Hamid, R.; Masood, A.; Wani, I.H.; Rafiq, S. Lectins: proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2013**, *3*, S93-S103.
9. Peumans, W.J.; Van Damme, E.J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* **1995**, *109*, 347-352, doi:10.1104/pp.109.2.347.
10. Sharon, N.; Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **2004**, *14*, 53R-62R, doi:10.1093/glycob/cwh122.
11. Van Damme, E.J.M.; Lannoo, N.; Peumans, W.J. Plant Lectins. In *Advances in Botanical Research*, Kader, J.-C., Delseny, M., Eds.; Academic Press: 2008; Volume 48, pp. 107-209.
12. Damme, E.; Rougé, P.; Peumans, W.J. Carbohydrate-protein interactions: Plant lectins. *Comprehensive Glycoscience - From Chemistry to Systems Biology* **2007**, *3*, 563-599.
13. Damme, E.J.M.V.; Peumans, W.J.; Barre, A.; Rougé, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **1998**, *17*, 575-692, doi:10.1080/07352689891304276.
14. Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **1991**, *3*, 1-9, doi:10.1105/tpc.3.1.1.
15. Harper, S.M.; Crenshaw, R.W.; Mullins, M.A.; Privalle, L.S. Lectin Binding to Insect Brush Border Membranes. *Journal of Economic Entomology* **1995**, *88*, 1197-1202, doi:10.1093/jee/88.5.1197.
16. Gatehouse, A.M.; Powell, K.S.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.; Gatehouse, J.A. Insecticidal Properties of Plant Lectins: Their Potential in Plant Protection. *Lectins: Biomedical Perspectives* **2005**, 29.
17. Oka, Y.; Chet, I.; Spiegel, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1997**, *51*, 333-345, doi:<https://doi.org/10.1006/pmpp.1997.0127>.
18. Ripoll, C.; Favery, B.; Lecomte, P.; Van Damme, E.; Peumans, W.; Abad, P.; Jouanin, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science* **2003**, *164*, 517-523, doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00448-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00448-X).

19. Pusztai, A. Plant Lectins. Cambridge: Cambridge University Press (Chemistry and Pharmacology of Natural Products). 1992.
20. Narahari, A.; Nareddy, P.K.; Swamy, M.J. A new chitoooligosaccharide specific lectin from snake gourd (*Trichosanthes anguina*) phloem exudate. Purification, physico-chemical characterization and thermodynamics of saccharide binding. *Biochimie* **2011**, *93*, 1676-1684, doi:10.1016/j.biochi.2011.05.032.
21. Garcia-Pino, A.; Buts, L.; Wyns, L.; Loris, R. Interplay between metal binding and cis/trans isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin. *J Mol Biol* **2006**, *361*, 153-167, doi:10.1016/j.jmb.2006.06.006.
22. Stirpe, F.; Bolognesi, A.; Bortolotti, M.; Farini, V.; Lubelli, C.; Pelosi, E.; Polito, L.; Dozza, B.; Strocchi, P.; Chambery, A.; et al. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). *Toxicon* **2007**, *50*, 94-105, doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.020>.
23. Barre, A.; Peumans, W.J.; Rossignol, M.; Borderies, G.; Culerrier, R.; Van Damme, E.J.M.; Rougé, P. Artocarpin is a polyspecific jacalin-related lectin with a monosaccharide preference for mannose. *Biochimie* **2004**, *86*, 685-691, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.001>.
24. kaur, M.; Singh, K.; Rup, P.J.; Saxena, A.K.; Khan, R.H.; Ashraf, M.T.; Kamboj, S.S.; Singh, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *445*, 156-165, doi:<https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.021>.
25. Sitohy, M.; Doheim, M.; Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chemistry* **2007**, *104*, 971-979, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.026>.
26. Li, Y.R.; Liu, Q.H.; Wang, H.X.; Ng, T.B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2008**, *1780*, 51-57, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.09.004>.
27. Takahashi, K.G.; Kuroda, T.; Muroga, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2008**, *150*, 45-52, doi:10.1016/j.cbpb.2008.01.006.
28. Araújo, L.C.C.; Aguiar, J.S.; Napoleão, T.H.; Mota, F.V.B.; Barros, A.L.S.; Moura, M.C.; Coriolano, Marília C.; Coelho, L.C.B.B.; Silva, T.G.; Paiva, P.M.G. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e81973, doi:10.1371/journal.pone.0081973.
29. da Silva, L.C.N.; Alves, N.M.P.; de Castro, M.C.A.B.; Pereira, V.R.A.; da Paz, N.V.N.; Coelho, L.C.B.B.; de Figueiredo, R.C.B.Q.; dos Santos Correia, M.T. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *International journal of biological macromolecules* **2015**, *72*, 848-854.
30. Panunto-Castelo, A.; Souza, M.A.; Roque-Barreira, M.-C.; Silva, J.S. KM⁺, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* **2001**, *11*, 1035-1042, doi:10.1093/glycob/11.12.1035.
31. Lourenço, E.V.; Bernardes, E.S.; Silva, N.M.; Mineo, J.R.; Panunto-Castelo, A.; Roque-Barreira, M.C. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* **2006**, *8*, 1244-1251, doi:10.1016/j.micinf.2005.11.013.

32. Ivory, C.P.; Chadee, K. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* **2007**, *37*, 385-394, doi:10.1002/eji.200636476.
33. de Toledo, K.A.; Bernardes, E.S.; Baruffi, M.D.; Roque-Barreira, M.C. Neutrophil haptotaxis induced by mouse MNCF: interactions with extracellular matrix glycoproteins probably contribute to overcoming the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Inflamm Res* **2007**, *56*, 368-376, doi:10.1007/s00011-007-6159-6.
34. Coltri, K.C.; Oliveira, L.L.; Pinzan, C.F.; Vendruscolo, P.E.; Martinez, R.; Goldman, M.H.; Panunto-Castelo, A.; Roque-Barreira, M.C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* **2008**, *173*, 423-432, doi:10.2353/ajpath.2008.080126.
35. Stojanović, M.M.; Živković, I.P.; Petrušić, V.Ž.; Kosec, D.J.; Dimitrijević, R.D.; Jankov, R.M.; Dimitrijević, L.A.; Gavrović-Jankulović, M.Đ. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *International Immunopharmacology* **2010**, *10*, 120-129.
36. Souza, M.A.; Carvalho, F.C.; Ruas, L.P.; Ricci-Azevedo, R.; Roque-Barreira, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate journal* **2013**, *30*, 641-657.
37. da Silva, L.C.; Correia, M.T. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **2014**, *5*, 20.
38. Coelho, L.C.B.B.; Silva, P.M.d.S.; Lima, V.L.d.M.; Pontual, E.V.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H.; Correia, M.T.d.S. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, *2017*, 1594074.
39. Komath, S.S.; Kavitha, M.; Swamy, M.J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & biomolecular chemistry* **2006**, *4*, 973-988.
40. de Oliveira Figueiroa, E.; Albuquerque da Cunha, C.R.; Albuquerque, P.; de Paula, R.A.; Aranda-Souza, M.A.; Alves, M.S.; Zagmignan, A.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Nascimento da Silva, L.C.; dos Santos Correia, M.T. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. *Current medicinal chemistry* **2017**, *24*, 3667-3680.
41. Unitt, J.; Hornigold, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochemical pharmacology* **2011**, *81*, 1324-1328.
42. Pereira-da-Silva, G.; Caroline Carvalho, F.; Cristina Roque-Barreira, M. Neutrophil activation induced by plant lectins: modulation of inflammatory processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets-Inflammation & Allergy* **2012**, *11*, 433-441.
43. Batista, J.; Ralph, M.; Vaz, R.; Souza, P.; Silva, A.; Nascimento, D.; Souza, L.; Ramos, M.; Mastroeni, P.; Lima-Filho, J. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phytomedicine* **2017**, *25*, 52-60.
44. Thakur, A.; Sharma, V.; Thakur, A. An overview of anti-nutritional factors in food. *Int. J. Chem. Stud* **2019**, *7*, 2472-2479.
45. Rudiger, H.; Siebert, H.-C.; Solís, D.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Lieth, C.-W.v.d.; Diaz-Mauriño, T.; Gabius, H.-J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Current medicinal chemistry* **2000**, *7*, 389-416.

46. Ohno, Y.; Naganuma, T.; Ogawa, T.; Muramoto, K. Effect of lectins on the transport of food factors in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 548-553.
47. Kumar, V.P.; Venkatesh, Y.P. Alleviation of cyclophosphamide-induced immunosuppression in Wistar rats by onion lectin (*Allium cepa* agglutinin). *Journal of ethnopharmacology* **2016**, *186*, 280-288.
48. Lee, H.-A.; Han, S.-J.; Hong, S.; Kim, D.-W.; Oh, G.-W.; Kim, O. Onion peel water extracts enhance immune status in forced swimming rat model. *Laboratory animal research* **2014**, *30*, 161-168.
49. Lavanya, V.; Bommanabonia, A.K.; Ahmed, N.; Jamal, S. Immunomodulatory Effects of Jacalin, a Dietary Plant Lectin on the Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Appl Biochem Biotechnol* **2022**, *194*, 587-599, doi:10.1007/s12010-021-03722-6.
50. Pires, A.F.; Rodrigues, N.V.; Soares, P.M.G.; Ribeiro, R.d.A.; Aragao, K.S.; Marinho, M.M.; da Silva, M.T.; Cavada, B.S.; Assreuy, A.M.S. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. *Inflammation Research* **2016**, *65*, 43-52.
51. Santi-Gadelha, T.; de Almeida Gadelha, C.A.; Aragao, K.S.; Mota, M.R.L.; Gomes, R.C.; de Freitas Pires, A.; Toyama, M.H.; de Oliveira Toyama, D.; de Alencar, N.M.N.; Criddle, D.N. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *350*, 1050-1055.
52. Konozy, E.H.; Osman, M.E.M. From inflammation to immune regulation: The dual nature of dietary lectins in health and disease. *Heliyon* **2024**, *10*.
53. Prasanna, V.K.; Venkatesh, Y.P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. *International Immunopharmacology* **2015**, *26*, 304-313.
54. Clement, F.; Venkatesh, Y.P. Dietary garlic (*Allium sativum*) lectins, ASA I and ASA II, are highly stable and immunogenic. *International immunopharmacology* **2010**, *10*, 1161-1169.
55. de Santana Brito, J.; Ferreira, G.R.S.; Klimczak, E.; Gryshuk, L.; de Lima Santos, N.D.; de Siqueira Patriota, L.L.; Moreira, L.R.; Soares, A.K.A.; Barboza, B.R.; Paiva, P.M.G. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *94*, 865-872.
56. Liu, X.Q.; Wu, H.; Yu, H.L.; Zhao, T.F.; Pan, Y.Z.; Shi, R.J. Purification of a lectin from *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott and its pro-inflammatory effects. *Molecules* **2011**, *16*, 9480-9494.
57. Kabir, S. The isolation and characterisation of jacalin [*Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) lectin] based on its charge properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1995**, *27*, 147-156.
58. Barbosa-Lorenzi, V.C.; Cecilio, N.T.; de Almeida Buranello, P.A.; Pranchevicius, M.C.; Goldman, M.H.S.; Pereira-da-Silva, G.; Roque-Barreira, M.C.; Jamur, M.C.; Oliver, C. Recombinant ArtinM activates mast cells. *BMC immunology* **2016**, *17*, 1-11.
59. Zeng, Q.; Lin, F.; Zeng, L.; Deng, Y.; Li, L. Purification and characterization of a novel immunomodulatory lectin from *Artocarpus hypargyreus* Hance. *International immunopharmacology* **2019**, *71*, 285-294.
60. Girão, D.K.F.B.; Cavada, B.S.; de Freitas Pires, A.; Martins, T.V.; Franco, Á.X.; Morais, C.M.; Nascimento, K.S.d.; Delatorre, P.; da Silva, H.C.; Nagano, C.S. The galactose-binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion via primary cytokines. *Journal of Molecular Recognition* **2015**, *28*, 285-292.

61. Santiago, M.Q.; Leitão, C.C.; Pereira-Junior, F.N.; Pinto-Junior, V.R.; Osterne, V.J.; Lossio, C.F.; Cajazeiras, J.B.; Silva, H.C.; Arruda, F.V.; Pereira, L.P. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. *Journal of Molecular Recognition* **2014**, *27*, 117-123.
62. Leite, J.F.M.; Assreuy, A.M.S.; Mota, M.R.L.; Bringel, P.H.d.S.F.; e Lacerda, R.R.; Gomes, V.d.M.; Cajazeiras, J.B.; Do Nascimento, K.S.; Pessôa, H.d.L.F.; Gadelha, C.A.d.A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. *Molecules* **2012**, *17*, 3277-3290.
63. Pereira, P.R.; Corrêa, A.C.N.T.F.; Vericimo, M.A.; Paschoalin, V.M.F. Tarin, a potential immunomodulator and COX-inhibitor lectin found in taro (*Colocasia esculenta*). *Comprehensive reviews in food science and food safety* **2018**, *17*, 878-891.
64. Rangel, T.B.A.; Rocha, B.A.M.; Bezerra, G.A.; Assreuy, A.M.S.; de Freitas Pires, A.; do Nascimento, A.S.F.; Bezerra, M.J.B.; do Nascimento, K.S.; Nagano, C.S.; Sampaio, A.H. Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl. *Biochimie* **2012**, *94*, 525-532.
65. Bai, C.; Ji, H.; Feng, M.; Hao, X.; Zhong, Q.; Cui, X.; Wang, Z. Stimulation of dendritic cell maturation and induction of apoptosis in lymphoma cells by a stable lectin from buckwheat seeds. *Genet Mol Res* **2015**, *14*, 2162-2175.
66. Butle, A.; Talmale, S.; Patil, M. Potential in vivo immunomodulatory effects of the most active lectin isolated from seeds of *Zizyphus oenoplia*. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* **2016**, *7*, 1-6.
67. de Moura, K.S.; da Silva, H.R.C.; Dornelles, L.P.; Coelho, L.C.B.B.; Napoleão, T.H.; de Oliveira, M.D.L.; Paiva, P.M.G. Coagulant activity of water-soluble *Moringa oleifera* lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. *Applied biochemistry and biotechnology* **2016**, *180*, 1361-1371.
68. Sansone, A.C.M.B.; Sansone, M.; dos Santos Dias, C.T.; do Nascimento, J.R.O. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *89*, 19-24.
69. Silva, H.C.; Bari, A.U.; Rocha, B.A.M.; Nascimento, K.S.; Ponte, E.L.; Pires, A.F.; Delatorre, P.; Teixeira, E.H.; Debray, H.; Assreuy, A.M.S. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Journal of Molecular Recognition* **2013**, *26*, 470-478.
70. Li, J.; Wang, W.; Yuan, Y.; Cui, X.; Bian, H.; Wen, H.; Zhang, X.; Yu, H.; Wu, H. Pinellia ternata lectin induces inflammation through TLR4 receptor and mediates PI3K/Akt/mTOR axis to regulate NF- κ B signaling pathway. *Toxicology* **2023**, *486*, 153430.
71. Yu, H.-L.; Zhao, T.-F.; Wu, H.; Pan, Y.-Z.; Zhang, Q.; Wang, K.-L.; Zhang, C.-C.; Jin, Y.-P. Pinellia ternata lectin exerts a pro-inflammatory effect on macrophages by inducing the release of pro-inflammatory cytokines, the activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway and the overproduction of reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Medicine* **2015**, *36*, 1127-1135.
72. Nunes, M.A.S.; Silva, L.d.S.; Santos, D.M.; Cutrim, B.d.S.; Vieira, S.L.; Silva, I.S.S.; Castelo Branco, S.J.d.S.; Nascimento, M.d.S.d.; Vale, A.A.M.; Santos-Azevedo, A.P.S.d. *Schinus terebinthifolius* leaf lectin (SteLL) reduces the bacterial and inflammatory burden of wounds infected by *staphylococcus aureus* promoting skin repair. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1441.
73. Silva, H.C.; Nagano, C.S.; Souza, L.A.; Nascimento, K.S.; Isidro, R.; Delatorre, P.; Rocha, B.A.M.; Sampaio, A.H.; Assreuy, A.M.S.; Pires, A.F. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. *Process Biochemistry* **2012**, *47*, 2347-2355.

74. Marques, G.F.O.; Pires, A.F.; Osterne, V.J.S.; Pinto-Junior, V.R.; Silva, I.B.; Martins, M.G.Q.; Oliveira, M.V.; Gomes, A.M.; de Souza, L.A.G.; Pavão, M.S.G. Vatairea guianensis lectin stimulates changes in gene expression and release of TNF- α from rat peritoneal macrophages via glycoconjugate binding. *Journal of Molecular Recognition* **2021**, *34*, e2922.
75. Konozy, E.H.E.; Osman, M.E.M. From inflammation to immune regulation: The dual nature of dietary lectins in health and disease. *Heliyon* **2024**, *10*, e39471, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39471>.
76. Souza, M.A.; Carvalho, F.C.; Ruas, L.P.; Ricci-Azevedo, R.; Roque-Barreira, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate Journal* **2013**, *30*, 641-657, doi:10.1007/s10719-012-9464-4.
77. Stanilova, S.A.; Dobrev, Z.G.; Slavov, E.S.; Miteva, L.D. C3 binding glycoprotein from Cuscuta europea induced different cytokine profiles from human PBMC compared to other plant and bacterial immunomodulators. *Int Immunopharmacol* **2005**, *5*, 723-734, doi:10.1016/j.intimp.2004.12.003.
78. Wang, W.; Wu, H.; Yu, H.; Zhang, X.; Cui, G.; Wang, K.; Mao, S.; Pan, Y. Typhonium giganteum Lectin Exerts A Pro-Inflammatory Effect on RAW 264.7 via ROS and The NF- κ B Signaling Pathway. *Toxins* **2017**, *9*, 275.
79. Batista, J.E.C.; Ralph, M.T.; Vaz, R.V.; Souza, P.F.C.; Silva, A.B.; Nascimento, D.C.O.; Souza, L.T.; Ramos, M.V.; Mastroeni, P.; Lima-Filho, J.V. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Phytomedicine* **2017**, *25*, 52-60, doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.12.005>.
80. Iordache, F.; Carmen, I.; Aneta, P.; Lupu, M.; Andrei, E.; Buzila, C.; Maniu, H. Effects of plant lectin and extracts on adhesion molecules of endothelial progenitors. *Central European Journal of Biology* **2011**, *6*, 330-341, doi:10.2478/s11535-011-0018-8.
81. de Santana Brito, J.; Ferreira, G.R.S.; Klimczak, E.; Gryshuk, L.; de Lima Santos, N.D.; de Siqueira Patriota, L.L.; Moreira, L.R.; Soares, A.K.A.; Barboza, B.R.; Paiva, P.M.G.; et al. Lectin from inflorescences of ornamental crop Alpinia purpurata acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *94*, 865-872, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.026>.
82. Lavanya, V.; Bommanaboina, A.K.; Ahmed, N.; Jamal, S. Immunomodulatory Effects of Jacalin, a Dietary Plant Lectin on the Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2022**, *194*, 587-599, doi:10.1007/s12010-021-03722-6.
83. Jiandong, L.; Yang, Y.; Peng, J.; Xiang, M.; Wang, D.; Xiong, G.; Li, S. Trichosanthes kirilowii lectin ameliorates streptozocin-induced kidney injury via modulation of the balance between M1/M2 phenotype macrophage. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 93-102, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.060>.
84. Lu, J.; Peng, J.; Xiang, M.; He, L.; Wang, D.; Xiong, G.; Li, S. Trichosanthes kirilowii lectin alleviates diabetic nephropathy by inhibiting the LOX1/NF- κ B/caspase-9 signaling pathway. *Bioscience Reports* **2018**, *38*, doi:10.1042/bsr20180071.
85. e Lacerda, R.R.; do Nascimento, E.S.; de Lacerda, J.T.J.G.; Pinto, L.d.S.; Rizzi, C.; Bezerra, M.M.; Pinto, I.R.; Filho, S.M.P.; Pinto, V.d.P.T.; Filho, G.C.; et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (Phaseolus lunatus L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *95*, 1072-1081, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.097>.
86. Koshte, V.L.; van Dijk, W.; van der Stelt, M.E.; Aalberse, R.C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from Musa paradisiac (banana). *Biochem J* **1990**, *272*, 721-726, doi:10.1042/bj2720721.

87. Meagher, J.L.; Winter, H.C.; Ezell, P.; Goldstein, I.J.; Stuckey, J.A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. *Glycobiology* **2005**, *15*, 1033-1042, doi:10.1093/glycob/cwi088.
88. Koshte, V.L.; Aalbers, M.; Calkhoven, P.G.; Aalberse, R.C. The potent IgG4-inducing antigen in banana is a mannose-binding lectin, BanLec-I. *Int Arch Allergy Immunol* **1992**, *97*, 17-24, doi:10.1159/000236090.
89. Peumans, W.J.; Zhang, W.; Barre, A.; Houllès Astoul, C.; Balint-Kurti, P.J.; Rovira, P.; Rougé, P.; May, G.D.; Van Leuven, F.; Truffa-Bachi, P.; et al. Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta* **2000**, *211*, 546-554, doi:10.1007/s004250000307.
90. Raval, S.; Gowda, S.B.; Singh, D.D.; Chandra, N.R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology* **2004**, *14*, 1247-1263, doi:10.1093/glycob/cwh140.
91. Sharma, A.; Vijayan, M. Quaternary association in β -prism I fold plant lectins: Insights from X-ray crystallography, modelling and molecular dynamics. *Journal of Biosciences* **2011**, *36*, 793-808, doi:10.1007/s12038-011-9166-2.
92. Khan, J.M.; Qadeer, A.; Ahmad, E.; Ashraf, R.; Bhushan, B.; Chaturvedi, S.K.; Rabbani, G.; Khan, R.H. Monomeric Banana Lectin at Acidic pH Overrides Conformational Stability of Its Native Dimeric Form. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e62428, doi:10.1371/journal.pone.0062428.
93. Gupta, G.; Sinha, S.; Surolia, A. Unfolding energetics and stability of banana lectin. *Proteins* **2008**, *72*, 754-760, doi:10.1002/prot.21961.
94. Singh, S.S.; Devi, S.K.; Ng, T.B. Banana Lectin: A Brief Review. *Molecules* **2014**, *19*, 18817-18827.
95. Meagher, J.L., Winter, H.C., Ezell, P., Goldstein, I.J., Stuckey, J.A. Banana Lectin. **2005**, doi:<https://doi.org/10.2210/pdb2bmy/pdb>.
96. Wong, J.H.; Ng, T. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2006**, *38*, 234-243.
97. Gavrovic-Jankulovic, M.; Spasic, M.; Cirkovic Velickovic, T.; Stojanovic, M.; Inic-Kanada, A.; Dimitrijevic, L.; Lindner, B.; Petersen, A.; Becker, W.M.; Jankov, R.M. Quantification of the thaumatin-like kiwi allergen by a monoclonal antibody-based ELISA. *Mol Nutr Food Res* **2008**, *52*, 701-707, doi:10.1002/mnfr.200700286.
98. Singh, D.D.; Saikrishnan, K.; Kumar, P.; Dauter, Z.; Sekar, K.; Surolia, A.; Vijayan, M. Purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of the banana lectin from *Musa paradisiaca*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2104-2106, doi:10.1107/s0907444904024114.
99. Sankaranarayanan, R.; Sekar, K.; Banerjee, R.; Sharma, V.; Surolia, A.; Vijayan, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat Struct Biol* **1996**, *3*, 596-603, doi:10.1038/nsb0796-596.
100. Swanson, M.D.; Winter, H.C.; Goldstein, I.J.; Markovitz, D.M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 8646-8655, doi:10.1074/jbc.M109.034926.
101. Cheung, A.H.; Wong, J.H.; Ng, T.B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 594-600, doi:10.1016/j.phymed.2008.12.016.
102. Wong, J.H.; Ng, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, *38*, 234-243, doi:10.1016/j.biocel.2005.09.004.

103. Gavrovic-Jankulovic, M.; Poulsen, K.; Brckalo, T.; Bobic, S.; Lindner, B.; Petersen, A. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, *40*, 929-941, doi:10.1016/j.biocel.2007.10.033.
104. Wearne, K.; C., W.H.; and Goldstein, I.J. ISOLATION OF BANANA LECTIN—A PRACTICAL SCALE PROCEDURE FROM RIPE BANANA FRUIT. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **2013**, *43*, 285-292, doi:10.1080/10826068.2012.722578.
105. Yu, M.; Lin, A.; Baharom, F.; Li, S.; Legendre, M.; Covés-Datson, E.; Sohlberg, E.; Schlisio, S.; Loré, K.; Markovitz, D.M.; et al. A genetically engineered therapeutic lectin inhibits human influenza A virus infection and sustains robust virus-specific CD8 T cell expansion. *PLOS Pathogens* **2025**, *21*, e1013112, doi:10.1371/journal.ppat.1013112.
106. Lloyd, M.G.; Liu, D.; Legendre, M.; Markovitz, D.M.; Moffat, J.F. H84T BanLec has broad spectrum antiviral activity against human herpesviruses in cells, skin, and mice. *Scientific Reports* **2022**, *12*, 1641, doi:10.1038/s41598-022-05580-6.
107. Chan, J.F.; Oh, Y.J.; Yuan, S.; Chu, H.; Yeung, M.L.; Canena, D.; Chan, C.C.; Poon, V.K.; Chan, C.C.; Zhang, A.J.; et al. A molecularly engineered, broad-spectrum anti-coronavirus lectin inhibits SARS-CoV-2 and MERS-CoV infection in vivo. *Cell Rep Med* **2022**, *3*, 100774, doi:10.1016/j.xcrm.2022.100774.
108. Protić-Rosić, I.; Lopandić, Z.; Popović, D.; Blagojević, G.; Gavrović-Jankulović, M. rBet v 1a-BanLec(wt) induce upregulation of IL-10 and IFN- γ gene expression in Caco-2/THP-1 co-culture and secretion of IL-10 and IFN- γ /IL-4 levels in PBMCs of birch pollen allergic donors. *Int Immunopharmacol* **2024**, *129*, 111607, doi:10.1016/j.intimp.2024.111607.
109. Protić-Rosić, I.; Lopandić, Z.; Popović, D.; Blagojević, G.; Gavrović-Jankulović, M. rBet v 1a-BanLecwt induce upregulation of IL-10 and IFN- γ gene expression in Caco-2/THP-1 co-culture and secretion of IL-10 and IFN- γ /IL-4 levels in PBMCs of birch pollen allergic donors. *International Immunopharmacology* **2024**, *129*, 111607, doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111607>.
110. Marinkovic, E.; Djokic, R.; Lukic, I.; Filipovic, A.; Inic-Kanada, A.; Kosanovic, D.; Gavrovic-Jankulovic, M.; Stojanovic, M. Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PLoS One* **2017**, *12*, e0172469, doi:10.1371/journal.pone.0172469.
111. Marinković, E.; Lukić, I.; Kosanović, D.; Inić-Kanada, A.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon. *Journal of Functional Foods* **2016**, *20*, 68-78.
112. Dimitrijevic, R.; Stojanovic, M.; Micic, M.; Dimitrijevic, L.; Gavrovic-Jankulovic, M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. *Journal of Functional Foods* **2012**, *4*, 636-641.
113. Dimitrijevic, R.; Jadranin, M.; Burazer, L.; Ostojic, S.; Gavrovic-Jankulovic, M. Evaluation of the thermal stability and digestibility of heterologously produced banana lectin. *Food Chemistry* **2010**, *120*, 1113-1118, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.062>.
114. Holmes, E.; Li, J.V.; Athanasiou, T.; Ashrafi, H.; Nicholson, J.K. Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in microbiology* **2011**, *19*, 349-359.
115. Feng, Q.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D. Gut microbiota: an integral moderator in health and disease. *Frontiers in microbiology* **2018**, *9*, 151.
116. Mowat, A.M.; Agace, W.W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology* **2014**, *14*, 667-685.

117. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3*, 331-341, doi:10.1038/nri1057.
118. Peterson, L.W.; Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14*, 141-153, doi:10.1038/nri3608.
119. Scaldaferri, F.; Pizzoferrato, M.; Gerardi, V.; Lopetuso, L.; Gasbarrini, A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol* **2012**, *46 Suppl*, S12-17, doi:10.1097/MCG.0b013e31826ae849.
120. Bischoff, S.C.; Barbara, G.; Buurman, W.; Ockhuizen, T.; Schulzke, J.D.; Serino, M.; Tilg, H.; Watson, A.; Wells, J.M. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* **2014**, *14*, 189, doi:10.1186/s12876-014-0189-7.
121. Groschwitz, K.R.; Hogan, S.P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **2009**, *124*, 3-20; quiz 21-22, doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.
122. Ermund, A.; Schütte, A.; Johansson, M.E.; Gustafsson, J.K.; Hansson, G.C. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2013**, *305*, G341-347, doi:10.1152/ajpgi.00046.2013.
123. Johansson, M.E.; Phillipson, M.; Petersson, J.; Velcich, A.; Holm, L.; Hansson, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 15064-15069, doi:10.1073/pnas.0803124105.
124. Wershil, B.K.; Furuta, G.T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2008**, *121*, S380-S383.
125. Tlaskalová-Hogenová, H.; Štěpánková, R.; Hudcovic, T.; Tučková, L.; Cukrowska, B.; Lodinová-Žádníková, R.; Kozáková, H.; Rossmann, P.; Bártová, J.; Sokol, D. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters* **2004**, *93*, 97-108.
126. Acheson, D.W.; Luccioli, S. Mucosal immune responses. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2004**, *18*, 387-404.
127. Atreya, R.; Neurath, M.F. Factors affecting mucosal homeostasis: a fine balance. *Inflammatory Bowel Disease: Translating basic science into clinical practice* **2010**, 52-63.
128. Denning, T.L.; Norris, B.A.; Medina-Contreras, O.; Manicassamy, S.; Geem, D.; Madan, R.; Karp, C.L.; Pulendran, B. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *The Journal of Immunology* **2011**, *187*, 733-747.
129. Maynard, C.L.; Harrington, L.E.; Janowski, K.M.; Oliver, J.R.; Zindl, C.L.; Rudensky, A.Y.; Weaver, C.T. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature immunology* **2007**, *8*, 931-941.
130. Veenbergen, S.; Samsom, J.N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. *Current opinion in immunology* **2012**, *24*, 269-276.
131. Newberry, R.D.; Lorenz, R.G. Organizing a mucosal defense. *Immunological reviews* **2005**, *206*, 6-21.
132. Willard-Mack, C.L. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicologic pathology* **2006**, *34*, 409-424.
133. Perera, P.-Y.; Lichy, J.H.; Waldmann, T.A.; Perera, L.P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes and infection* **2012**, *14*, 247-261.

134. Buettner, M.; Bode, U. Lymph node dissection—understanding the immunological function of lymph nodes. *Clinical & Experimental Immunology* **2012**, *169*, 205-212.
135. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*, 8th Edition ed.; Elsevier Saunders: 2015.
136. Herb, M.; Schramm, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/antiox10020313.
137. Perez-Lopez, A.; Behnsen, J.; Nuccio, S.P.; Raffatellu, M. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat Rev Immunol* **2016**, *16*, 135-148, doi:10.1038/nri.2015.17.
138. Wéra, O.; Lancellotti, P.; Oury, C. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *Journal of clinical medicine* **2016**, *5*, 118.
139. Aviello, G.; Knaus, U.G. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunology* **2018**, *11*, 1011-1023, doi:<https://doi.org/10.1038/s41385-018-0021-8>.
140. Ahluwalia, B.; Magnusson, M.K.; Öhman, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol* **2017**, *52*, 1185-1193, doi:10.1080/00365521.2017.1349173.
141. Chistiakov, D.A.; Bobryshev, Y.V.; Kozarov, E.; Sobenin, I.A.; Orekhov, A.N. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in microbiology* **2015**, *5*, 781.
142. Pabst, O.; Mowat, A. Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology* **2012**, *5*, 232-239.
143. Rimoldi, M.; Chieppa, M.; Salucci, V.; Avogadri, F.; Sonzogni, A.; Sampietro, G.M.; Nespoli, A.; Viale, G.; Allavena, P.; Rescigno, M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **2005**, *6*, 507-514, doi:10.1038/ni1192.
144. Coombes, J.L.; Maloy, K.J. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* **2007**, *19*, 116-126, doi:10.1016/j.smim.2007.01.001.
145. Coombes, J.L.; Siddiqui, K.R.; Arancibia-Cárcamo, C.V.; Hall, J.; Sun, C.-M.; Belkaid, Y.; Powrie, F. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β –and retinoic acid–dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* **2007**, *204*, 1757-1764.
146. Mowat, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 331-341, doi:10.1038/nri1057.
147. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **2008**, *133*, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
148. Yamada, A.; Arakaki, R.; Saito, M.; Tsunematsu, T.; Kudo, Y.; Ishimaru, N. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 2195-2205, doi:10.3748/wjg.v22.i7.2195.
149. Westendorf, A.M.; Fleissner, D.; Hansen, W.; Buer, J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *Int J Med Microbiol* **2010**, *300*, 11-18, doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.009.
150. Abadie, V.; Jabri, B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev* **2014**, *260*, 221-234, doi:10.1111/imr.12191.
151. Allez, M.; Brimnes, J.; Dotan, I.; Mayer, L. Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1516-1526, doi:10.1053/gast.2002.36588.
152. Ng, S.C.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E.; Tang, W.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.; Chan, F.K. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* **2017**, *390*, 2769-2778.

153. Kaplan, G.G.; Windsor, J.W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **2021**, *18*, 56-66.
154. de Souza, H.S.; Fiocchi, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2016**, *13*, 13-27, doi:10.1038/nrgastro.2015.186.
155. K Ko, J.; K Auyeung, K. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Current pharmaceutical design* **2014**, *20*, 1082-1096.
156. Vrdoljak, J.; Vilović, M.; Živković, P.M.; Tadin Hadjina, I.; Rušić, D.; Bukić, J.; Borovac, J.A.; Božić, J. Mediterranean diet adherence and dietary attitudes in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrients* **2020**, *12*, 3429.
157. Alam, M.T.; Amos, G.C.A.; Murphy, A.R.J.; Murch, S.; Wellington, E.M.H.; Arasaradnam, R.P. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog* **2020**, *12*, 1, doi:10.1186/s13099-019-0341-6.
158. Rogler, G.; Biedermann, L.; Scharl, M. New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss medical weekly* **2018**, *148*, w14599.
159. Saez, A.; Herrero-Fernandez, B.; Gomez-Bris, R.; Sánchez-Martinez, H.; Gonzalez-Granado, J.M. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: innate immune system. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 1526.
160. Abraham, B.P.; Ahmed, T.; Ali, T. Inflammatory bowel disease: pathophysiology and current therapeutic approaches. *Gastrointestinal pharmacology* **2017**, 115-146.
161. Kruidenier, L.; Verspaget, H.W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* **2002**, *16*, 1997-2015, doi:10.1046/j.1365-2036.2002.01378.x.
162. Baydi, Z.; Limami, Y.; Khalki, L.; Zaid, N.; Naya, A.; Mtairag, E.M.; Oudghiri, M.; Zaid, Y. An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *ScientificWorldJournal* **2021**, *2021*, 7479540, doi:10.1155/2021/7479540.
163. Jurjus, A.R.; Khoury, N.N.; Reimund, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2004**, *50*, 81-92, doi:10.1016/j.vascn.2003.12.002.
164. Pizarro, T.T.; Arseneau, K.O.; Bamias, G.; Cominelli, F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* **2003**, *9*, 218-222, doi:10.1016/s1471-4914(03)00052-2.
165. Matsumoto, S.; Okabe, Y.; Setoyama, H.; Takayama, K.; Ohtsuka, J.; Funahashi, H.; Imaoka, A.; Okada, Y.; Umesaki, Y. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* **1998**, *43*, 71-78, doi:10.1136/gut.43.1.71.
166. Reilly, M.T.; Harris, R.A.; Noronha, A. Using genetically engineered animal models in the postgenomic era to understand gene function in alcoholism. *Alcohol Res* **2012**, *34*, 282-291.
167. Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **1993**, *75*, 263-274, doi:10.1016/0092-8674(93)80068-p.
168. Khor, B.; Gardet, A.; Xavier, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **2011**, *474*, 307-317, doi:10.1038/nature10209.
169. Anderson, C.A.; Boucher, G.; Lees, C.W.; Franke, A.; D'Amato, M.; Taylor, K.D.; Lee, J.C.; Goyette, P.; Imielinski, M.; Latiano, A.; et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* **2011**, *43*, 246-252, doi:10.1038/ng.764.
170. Wirtz, S.; Neurath, M.F. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* **2000**, *15*, 144-160, doi:10.1007/s003840000227.
171. Sellon, R.K.; Tonkonogy, S.; Schultz, M.; Dieleman, L.A.; Grenther, W.; Balish, E.; Rennick, D.M.; Sartor, R.B. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis

- and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **1998**, *66*, 5224-5231, doi:10.1128/iai.66.11.5224-5231.1998.
172. Ni, J.; Wu, G.D.; Albenberg, L.; Tomov, V.T. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14*, 573-584, doi:10.1038/nrgastro.2017.88.
 173. Morris, G.P.; Beck, P.L.; Herridge, M.S.; Depew, W.T.; Szewczuk, M.R.; Wallace, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **1989**, *96*, 795-803.
 174. Dharmani, P.; Leung, P.; Chadee, K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One* **2011**, *6*, e25058, doi:10.1371/journal.pone.0025058.
 175. Yang, J.; Zhao, J.; Nakaguchi, T.; Gregersen, H. Biomechanical changes in oxazolone-induced colitis in BALB/C mice. *J Biomech* **2009**, *42*, 811-817, doi:10.1016/j.jbiomech.2009.01.028.
 176. Hagar, H.H.; El-Medany, A.; El-Eter, E.; Arafa, M. Ameliorative effect of pyrrolidinedithiocarbamate on acetic acid-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* **2007**, *554*, 69-77, doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.066.
 177. Moyana, T.N.; Lalonde, J.M. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat--a model for inflammatory bowel disease. *Ann Clin Lab Sci* **1990**, *20*, 420-426.
 178. Reingold, L.; Rahal, K.; Schmiedlin-Ren, P.; Rittershaus, A.C.; Bender, D.; Owens, S.R.; Adler, J.; Zimmermann, E.M. Development of a peptidoglycan-polysaccharide murine model of Crohn's disease: effect of genetic background. *Inflamm Bowel Dis* **2013**, *19*, 1238-1244, doi:10.1097/MIB.0b013e31828132b4.
 179. Randhawa, P.K.; Singh, K.; Singh, N.; Jaggi, A.S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* **2014**, *18*, 279-288, doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.279.
 180. Neurath, M.F.; Fuss, I.; Kelsall, B.L.; Stüber, E.; Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* **1995**, *182*, 1281-1290, doi:10.1084/jem.182.5.1281.
 181. Kiesler, P.; Fuss, I.J.; Strober, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2015**, *1*, 154-170, doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.
 182. Ellrichmann, M.; Wietzke-Braun, P.; Dhar, S.; Nikolaus, S.; Arlt, A.; Bethge, J.; Kuehbach, T.; Wintermeyer, L.; Balschun, K.; Klapper, W.; et al. Endoscopic ultrasound of the colon for the differentiation of Crohn's disease and ulcerative colitis in comparison with healthy controls. *Aliment Pharmacol Ther* **2014**, *39*, 823-833, doi:10.1111/apt.12671.
 183. Wirtz, S.; Neurath, M.F. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews* **2007**, *59*, 1073-1083.
 184. Strober, W.; Ludviksson, B.R.; Fuss, I.J. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Annals of internal medicine* **1998**, *128*, 848-856.
 185. Qiu, P.; Ishimoto, T.; Fu, L.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Liu, Y. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *12*, 733992, doi:10.3389/fcimb.2022.733992.
 186. Stappenbeck, T.S.; Virgin, H.W. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science. *Nature* **2016**, *534*, 191-199.
 187. Lavelle, A.; Hoffmann, T.W.; Pham, H.-P.; Langella, P.; Guédon, E.; Sokol, H. Baseline microbiota composition modulates antibiotic-mediated effects on the gut microbiota and host. *Microbiome* **2019**, *7*, 1-13.
 188. Halfvarson, J.; Brislawn, C.; Lamendella, R.; Vázquez-Baeza, Y.; Walters, W.; Bramer, L.; D'Amato, M.; Bonfiglio, F.; McDonald, D.; Gonzalez, A. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* **2017**, *2*, 17004.

189. Vich Vila, A.; Imhann, F.; Collij, V.; Jankipersadsing, S.A.; Gurry, T.; Mujagic, Z.; Kurilshikov, A.; Bonder, M.J.; Jiang, X.; Tigchelaar, E.F. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Science translational medicine* **2018**, *10*, eaap8914.
190. Britton, G.J.; Contijoch, E.J.; Spindler, M.P.; Aggarwala, V.; Dogan, B.; Bongers, G.; San Mateo, L.; Baltus, A.; Das, A.; Gevers, D. Defined microbiota transplant restores Th17/ROR γ t+ regulatory T cell balance in mice colonized with inflammatory bowel disease microbiotas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 21536-21545.
191. Lin, L.; Zhang, J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC immunology* **2017**, *18*, 1-25.
192. Ohnmacht, C.; Park, J.-H.; Cording, S.; Wing, J.B.; Atarashi, K.; Obata, Y.; Gaboriau-Routhiau, V.; Marques, R.; Dulauroy, S.; Fedoseeva, M. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t+ T cells. *Science* **2015**, *349*, 989-993.
193. Sartor, R.B.; Wu, G.D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 327-339. e324.
194. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408, doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
195. Saadh, M.J.; Haddad, M.; Dababneh, M.F.; Bayan, M.F.; Al-Jaidi, B.A. A guide for estimating the maximum safe starting dose and conversion it between animals and humans. *Syst. Rev. Pharm* **2020**, *11*.
196. Koelink, P.J.; Wildenberg, M.E.; Stitt, L.W.; Feagan, B.G.; Koldijk, M.; van 't Wout, A.B.; Atreya, R.; Vieth, M.; Brandse, J.F.; Duijst, S.; et al. Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* **2018**, *12*, 794-803, doi:10.1093/ecco-jcc/jjy035.
197. Dodda, D.; Chhajed, R.; Mishra, J.; Padhy, M. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of quercetin. *Indian J Pharmacol* **2014**, *46*, 286-291, doi:10.4103/0253-7613.132160.
198. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254, doi:10.1006/abio.1976.9999.
199. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **1972**, *247*, 3170-3175.
200. SM, W. - Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 2nd Edition. *Yale J Biol Med* **1976**, *49*, 310-311.
201. Nebert, D.W.; Vasiliou, V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics* **2004**, *1*, 460-464, doi:10.1186/1479-7364-1-6-460.
202. Angelis, I.D.; Turco, L. Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Curr Protoc Toxicol* **2011**, Chapter 20, Unit20.26, doi:10.1002/0471140856.tx2006s47.
203. Gazzinelli, R.T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, W.; Trinchieri, G.; Sher, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **1996**, *157*, 798-805.
204. Smale, S.T. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nature immunology* **2011**, *12*, 689-694.

205. Lobner, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods* **2000**, *96*, 147-152, doi:10.1016/s0165-0270(99)00193-4.
206. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *cell* **2008**, *133*, 775-787.
207. Lo, B.C.; Chen, G.Y.; Núñez, G.; Caruso, R. Gut microbiota and systemic immunity in health and disease. *Int Immunol* **2021**, *33*, 197-209, doi:10.1093/intimm/dxaa079.
208. Hanning, N.; De Man, J.G.; De Winter, B.Y. Measuring Myeloperoxidase Activity as a Marker of Inflammation in Gut Tissue Samples of Mice and Rat. *Bio Protoc* **2023**, *13*, e4758, doi:10.21769/BioProtoc.4758.
209. Mountford, A.P.; Coulson, P.S.; Cheever, A.W.; Sher, A.; Wilson, R.A.; Wynn, T.A. Interleukin-12 can directly induce T-helper 1 responses in interferon-gamma (IFN-gamma) receptor-deficient mice, but requires IFN-gamma signalling to downregulate T-helper 2 responses. *Immunology* **1999**, *97*, 588-594, doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00832.x.
210. Yan, J.-b.; Luo, M.-m.; Chen, Z.-y.; He, B.-h. The function and role of the Th17/Treg cell balance in inflammatory bowel disease. *Journal of immunology research* **2020**, *2020*, 8813558.
211. Yang, J.; Sundrud, M.S.; Skepner, J.; Yamagata, T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends in pharmacological sciences* **2014**, *35*, 493-500.
212. Eksioglu, E.A.; Mahmood, S.S.; Chang, M.; Reddy, V. GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Exp Hematol* **2007**, *35*, 1163-1171, doi:10.1016/j.exphem.2007.05.001.
213. Georgiev, P.; Charbonnier, L.M.; Chatila, T.A. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol* **2019**, *39*, 623-640, doi:10.1007/s10875-019-00684-7.
214. Zhao, T.; Wen, Z.; Cui, L. Supplementation of Glucosamine Selenium Ameliorates DSS-Induced Chronic Colitis in Mice via Affecting Gut Microbiota, Inhibiting Pyroptosis and Inactivating Chemokine Signaling Pathway. *Journal of Inflammation Research* **2025**, 3571-3588.
215. Li, Z.; Deng, H.; Zhou, Y.; Tan, Y.; Wang, X.; Han, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; Yang, R.; Bi, Y. Bioluminescence imaging to track *Bacteroides fragilis* inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* infection in mice. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2017**, *7*, 170.
216. Hudcovic, T.; Kozakova, H.; Kolinska, J.; Stepankova, R.; Hrnčir, T.; Tlaskalova-Hogenova, H. Monocolonization with *Bacteroides ovatus* protects immunodeficient SCID mice from mortality in chronic intestinal inflammation caused by long-lasting dextran sodium sulfate treatment. *Physiological research* **2009**, *58*.
217. Chng, K.R.; Ghosh, T.S.; Tan, Y.H.; Nandi, T.; Lee, I.R.; Ng, A.H.Q.; Li, C.; Ravikrishnan, A.; Lim, K.M.; Lye, D.; et al. Metagenome-wide association analysis identifies microbial determinants of post-antibiotic ecological recovery in the gut. *Nature Ecology & Evolution* **2020**, *4*, 1256-1267, doi:10.1038/s41559-020-1236-0.
218. Masoudi, A.; Raetz, C.R.; Zhou, P.; Pemble IV, C.W. Chasing acyl carrier protein through a catalytic cycle of lipid A production. *Nature* **2014**, *505*, 422-426.
219. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 12204-12209.
220. Zhao, Y.; Wu, J.; Li, J.V.; Zhou, N.-Y.; Tang, H.; Wang, Y. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. *Journal of proteome research* **2013**, *12*, 2987-2999.
221. Arike, L.; Hansson, G.C. The densely O-glycosylated MUC2 mucin protects the intestine and provides food for the commensal bacteria. *Journal of molecular biology* **2016**, *428*, 3221-3229.

222. Vinolo, M.A.; Rodrigues, H.G.; Hatanaka, E.; Sato, F.T.; Sampaio, S.C.; Curi, R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of nutritional biochemistry* **2011**, *22*, 849-855.
223. Qi, Y.; Chen, L.; Gao, K.; Shao, Z.; Huo, X.; Hua, M.; Liu, S.; Sun, Y.; Li, S. Effects of Schisandra chinensis polysaccharides on rats with antibiotic-associated diarrhea. *International journal of biological macromolecules* **2019**, *124*, 627-634.
224. Figueiredo, M.C.; Lobo, S.A.; Sousa, S.H.; Pereira, F.P.; Wall, J.D.; Nobre, L.S.; Saraiva, L.M. Hybrid cluster proteins and flavodiiron proteins afford protection to *Desulfovibrio vulgaris* upon macrophage infection. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195*, 2684-2690.
225. Singh, S.B.; Carroll-Portillo, A.; Lin, H.C. *Desulfovibrio* in the gut: the enemy within? *Microorganisms* **2023**, *11*, 1772.
226. Figliuolo, V.R.; Coutinho-Silva, R.; Coutinho, C.M.L.M. Contribution of sulfate-reducing bacteria to homeostasis disruption during intestinal inflammation. *Life Sciences* **2018**, *215*, 145-151.
227. Odobasic, D.; Kitching, A.R.; Yang, Y.; O'Sullivan, K.M.; Muljadi, R.C.M.; Edgton, K.L.; Tan, D.S.Y.; Summers, S.A.; Morand, E.F.; Holdsworth, S.R. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood* **2013**, *121*, 4195-4204, doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-456483>.
228. Morris, G.; Gevezova, M.; Sarafian, V.; Maes, M. Redox regulation of the immune response. *Cellular & Molecular Immunology* **2022**, *19*, 1079-1101, doi:10.1038/s41423-022-00902-0.
229. Sun, L.; Wang, X.; Saredy, J.; Yuan, Z.; Yang, X.; Wang, H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biology* **2020**, *37*, 101759, doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759>.
230. Yang, J.; Zhang, L.; Yu, C.; Yang, X.-F.; Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research* **2014**, *2*, 1-9.
231. Siewert, C.; Menning, A.; Dudda, J.; Siegmund, K.; Lauer, U.; Floess, S.; Campbell, D.J.; Hamann, A.; Huehn, J. Induction of organ-selective CD4⁺ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol* **2007**, *37*, 978-989, doi:10.1002/eji.200636575.
232. Sato, A.; Hashiguchi, M.; Toda, E.; Iwasaki, A.; Hachimura, S.; Kaminogawa, S. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *The Journal of Immunology* **2003**, *171*, 3684-3690.
233. Chirido, F.G.; Millington, O.R.; Beacock-Sharp, H.; Mowat, A.M. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* **2005**, *35*, 1831-1840, doi:10.1002/eji.200425882.
234. Persson, E.K.; Jaensson, E.; Agace, W.W. The diverse ontogeny and function of murine small intestinal dendritic cell/macrophage subsets. *Immunobiology* **2010**, *215*, 692-697, doi:<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.013>.
235. Schulz, O.; Jaensson, E.; Persson, E.K.; Liu, X.; Worbs, T.; Agace, W.W.; Pabst, O. Intestinal CD103⁺, but not CX3CR1⁺, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* **2009**, *206*, 3101-3114, doi:10.1084/jem.20091925.
236. Smith, K.M.; Davidson, J.M.; Garside, P. T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* **2002**, *106*, 144-158.
237. Furuhashi, K.; Suda, T.; Hasegawa, H.; Suzuki, Y.; Hashimoto, D.; Enomoto, N.; Fujisawa, T.; Nakamura, Y.; Inui, N.; Shibata, K. Mouse lung CD103⁺ and CD11b^{high} dendritic cells

- preferentially induce distinct CD4⁺ T-cell responses. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **2012**, *46*, 165-172.
238. Fujimoto, K.; Karuppuachamy, T.; Takemura, N.; Shimohigoshi, M.; Machida, T.; Haseda, Y.; Aoshi, T.; Ishii, K.J.; Akira, S.; Uematsu, S. A new subset of CD103⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *The Journal of Immunology* **2011**, *186*, 6287-6295.
 239. Kinnebrew, M.A.; Buffie, C.G.; Diehl, G.E.; Zenewicz, L.A.; Leiner, I.; Hohl, T.M.; Flavell, R.A.; Littman, D.R.; Pamer, E.G. Interleukin 23 production by intestinal CD103⁺ CD11b⁺ dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* **2012**, *36*, 276-287.
 240. Bain, C.C.; Montgomery, J.; Scott, C.L.; Kel, J.M.; Girard-Madoux, M.J.H.; Martens, L.; Zangerle-Murray, T.F.P.; Ober-Blöbaum, J.; Lindenbergh-Kortleve, D.; Samsom, J.N.; et al. TGF β R signalling controls CD103(+)CD11b(+) dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun* **2017**, *8*, 620, doi:10.1038/s41467-017-00658-6.
 241. Bogunovic, M.; Ginhoux, F.; Helft, J.; Shang, L.; Hashimoto, D.; Greter, M.; Liu, K.; Jakubzick, C.; Ingersoll, M.A.; Leboeuf, M.; et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **2009**, *31*, 513-525, doi:10.1016/j.immuni.2009.08.010.
 242. Bain, C.; Montgomery, J.; Scott, C.; Kel, J.; Girard-Madoux, M.; Martens, L.; Zangerle-Murray, T.; Ober-Blöbaum, J.; Lindenbergh-Kortleve, D.; Samsom, J. TGF β R signalling controls CD103⁺ CD11b⁺ dendritic cell development in the intestine. *Nature communications* **2017**, *8*, 620.
 243. Atif, S.M.; Uematsu, S.; Akira, S.; McSorley, S.J. CD103[−] CD11b⁺ dendritic cells regulate the sensitivity of CD4 T-cell responses to bacterial flagellin. *Mucosal immunology* **2014**, *7*, 68-77.
 244. Chami, B.; Martin, N.J.J.; Dennis, J.M.; Witting, P.K. Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2018**, *645*, 61-71, doi:<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.012>.
 245. Grisham, M.B.; Benoit, J.N.; Granger, D.N. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol* **1990**, *186*, 729-742, doi:10.1016/0076-6879(90)86172-r.
 246. Hansberry, D.R.; Shah, K.; Agarwal, P.; Agarwal, N. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Cureus* **2017**, *9*, e1004, doi:10.7759/cureus.1004.
 247. Kim, J.J.; Shajib, M.S.; Manocha, M.M.; Khan, W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp* **2012**, doi:10.3791/3678.
 248. Moreels, T.G.; Nieuwendijk, R.J.; De Man, J.G.; De Winter, B.Y.; Herman, A.G.; Van Marck, E.A.; Pelckmans, P.A. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut* **2004**, *53*, 99-107, doi:10.1136/gut.53.1.99.
 249. Vermeulen, W.; De Man, J.G.; Nullens, S.; Pelckmans, P.A.; De Winter, B.Y.; Moreels, T.G. The use of colonoscopy to follow the inflammatory time course of TNBS colitis in rats. *Acta Gastroenterol Belg* **2011**, *74*, 304-311.
 250. Heylen, M.; Deleue, S.; De Man, J.G.; Ruysers, N.E.; Vermeulen, W.; Stroobants, S.; Pelckmans, P.A.; Moreels, T.G.; Staelens, S.; De Winter, B.Y. Colonoscopy and μ PET/CT are valid techniques to monitor inflammation in the adoptive transfer colitis model in mice. *Inflamm Bowel Dis* **2013**, *19*, 967-976, doi:10.1097/MIB.0b013e3182802c7c.
 251. Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* **2018**, *640*, 47-52, doi:10.1016/j.abb.2018.01.004.

252. Odobasic, D.; Muljadi, R.C.; O'Sullivan, K.M.; Kettle, A.J.; Dickerhof, N.; Summers, S.A.; Kitching, A.R.; Holdsworth, S.R. Suppression of Autoimmunity and Renal Disease in Pristane-Induced Lupus by Myeloperoxidase. *Arthritis Rheumatol* **2015**, *67*, 1868-1880, doi:10.1002/art.39109.
253. Bouali, H.; Nietert, P.; Nowling, T.M.; Pandey, J.; Dooley, M.A.; Cooper, G.; Harley, J.; Kamen, D.L.; Oates, J.; Gilkeson, G. Association of the G-463A myeloperoxidase gene polymorphism with renal disease in African Americans with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **2007**, *34*, 2028-2034.
254. Endo, D.; Saito, T.; Umeki, Y.; Suzuki, K.; Aratani, Y. Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. *Inflamm Res* **2016**, *65*, 151-159, doi:10.1007/s00011-015-0899-5.
255. Homme, M.; Tateno, N.; Miura, N.; Ohno, N.; Aratani, Y. Myeloperoxidase deficiency in mice exacerbates lung inflammation induced by nonviable *Candida albicans*. *Inflammation Research* **2013**, *62*, 981-990, doi:10.1007/s00011-013-0656-6.
256. Kremserova, S.; Perecko, T.; Soucek, K.; Klinke, A.; Baldus, S.; Eiserich, J.P.; Kubala, L. Lung Neutrophilia in Myeloperoxidase Deficient Mice during the Course of Acute Pulmonary Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 5219056, doi:<https://doi.org/10.1155/2016/5219056>.
257. Reber, L.L.; Gillis, C.M.; Starkl, P.; Jönsson, F.; Sibilano, R.; Marichal, T.; Gaudenzio, N.; Bérard, M.; Rogalla, S.; Contag, C.H.; et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, *214*, 1249-1258, doi:10.1084/jem.20161238.
258. Kettle, A.J.; Anderson, R.F.; Hampton, M.B.; Winterbourn, C.C. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4888-4897, doi:10.1021/bi602587k.
259. Winterbourn, C.C.; Hampton, M.B.; Livesey, J.H.; Kettle, A.J. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 39860-39869.
260. Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Konowal, A.; Freed, P.W.; Westcott, J.Y.; Henson, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* **1998**, *101*, 890-898.
261. Stables, M.J.; Shah, S.; Camon, E.B.; Lovering, R.C.; Newson, J.; Bystrom, J.; Farrow, S.; Gilroy, D.W. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* **2011**, *118*, e192-208, doi:10.1182/blood-2011-04-345330.
262. Ishihara, T.; Tanaka, K.; Tasaka, Y.; Namba, T.; Suzuki, J.; Ishihara, T.; Okamoto, S.; Hibi, T.; Takenaga, M.; Igarashi, R.; et al. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, *328*, 152-164, doi:10.1124/jpet.108.144451.
263. Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Dugo, L.; Caputi, A.P.; Riley, D.P.; Salvemini, D. Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. *European journal of pharmacology* **2001**, *432*, 79-89.
264. Miller Jr, F.J.; Chu, X.; Stanic, B.; Tian, X.; Sharma, R.V.; Davisson, R.L.; Lamb, F.S. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1. *Antioxidants & redox signaling* **2010**, *12*, 583-593.
265. Oakley, F.D.; Abbott, D.; Li, Q.; Engelhardt, J.F. Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxidants & redox signaling* **2009**, *11*, 1313-1333.
266. Haddad, J.J.; Fahlman, C.S. Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *297*, 163-176, doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02094-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02094-6).

267. Kamizato, M.; Nishida, K.; Masuda, K.; Takeo, K.; Yamamoto, Y.; Kawai, T.; Teshima-Kondo, S.; Tanahashi, T.; Rokutan, K. Interleukin 10 inhibits interferon γ - and tumor necrosis factor α -stimulated activation of NADPH oxidase 1 in human colonic epithelial cells and the mouse colon. *Journal of Gastroenterology* **2009**, *44*, 1172-1184, doi:10.1007/s00535-009-0119-6.
268. Tréton, X.; Pedruzzi, E.; Guichard, C.; Ladeiro, Y.; Sedghi, S.; Vallée, M.; Fernandez, N.; Bruyère, E.; Woerther, P.L.; Ducroc, R.; et al. Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice. *PLoS One* **2014**, *9*, e101669, doi:10.1371/journal.pone.0101669.
269. Fink, M.; Wrana, J.L. Regulation of homeostasis and regeneration in the adult intestinal epithelium by the TGF- β superfamily. *Developmental Dynamics* **2023**, *252*, 445-462.
270. Liu, R.-M.; Desai, L.P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biology* **2015**, *6*, 565-577, doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.009>.
271. Hahm, K.; Im, Y.; Parks, T.; Park, S.; Markowitz, S.; Jung, H.; Green, J.; Kim, S. Loss of transforming growth factor β signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* **2001**, *49*, 190-198.
272. Monteleone, G.; Kumberova, A.; Croft, N.M.; McKenzie, C.; Steer, H.W.; MacDonald, T.T. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2001**, *108*, 601-609, doi:10.1172/JCI12821.
273. Sands, B.E.; Kaplan, G.G. The role of TNF α in ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2007**, *47*, 930-941.
274. Mills, C.D.; Kincaid, K.; Alt, J.M.; Heilman, M.J.; Hill, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of immunology* **2000**, *164*, 6166-6173.
275. Marinković, E. Imunomodulatorna aktivnost rekombinantne izoforme lektina iz banane u fiziološkim i patološkim uslovima u debelom crevu miševa BALB/c soja. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2017.
276. Chiba, M.; Nakane, K.; Takayama, Y.; Sugawara, K.; Ohno, H.; Ishii, H.; Tsuda, S.; Tsuji, T.; Komatsu, M.; Sugawara, T. Development and Application of a Plant-Based Diet Scoring System for Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Perm J* **2016**, *20*, 16-019, doi:10.7812/tpp/16-019.
277. Triantafyllidi, A.; Xanthos, T.; Papalois, A.; Triantafillidis, J.K. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* **2015**, *28*, 210-220.
278. Gong, T.; Wang, X.; Yang, Y.; Yan, Y.; Yu, C.; Zhou, R.; Jiang, W. Plant Lectins Activate the NLRP3 Inflammasome To Promote Inflammatory Disorders. *J Immunol* **2017**, *198*, 2082-2092, doi:10.4049/jimmunol.1600145.
279. Cario, E.; Gerken, G.; Podolsky, D. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1359-1374.
280. Radovani, B.; Gudelj, I. N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation. *Frontiers in Immunology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.893365.
281. Kapellos, T.S.; Iqbal, A.J. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm* **2016**, *2016*, 6591703, doi:10.1155/2016/6591703.
282. Nair, A.B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* **2016**, *7*, 27-31, doi:10.4103/0976-0105.177703.
283. M Soltani, R.A., M Omid. Some physical properties of full-ripe banana fruit (Cavendish variety). **2011**.
284. Miljkovic, R.; Marinkovic, E.; Lukic, I.; Kovacevic, A.; Lopandic, Z.; Popovic, M.; Gavrovic-Jankulovic, M.; Schabussova, I.; Inic-Kanada, A.; Stojanovic, M. Banana Lectin: A Novel

- Immunomodulatory Strategy for Mitigating Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **2024**, *16*, 1705.
285. Stanisavljevic, S.; Dedovic, N.; Vujicic, M.; Saksida, T.; Jevtic, B.; Milovanovic, B.; Momcilovic, M.; Miljkovic, D.; Stojanovic, I. Strain-specific helper T cell profile in the gut-associated lymphoid tissue. *Immunol Lett* **2017**, *190*, 282-288, doi:10.1016/j.imlet.2017.08.017.
 286. Mukhopadhyay, S.; Saha, S.; Chakraborty, S.; Prasad, P.; Ghosh, A.; Aich, P. Differential colitis susceptibility of Th1- and Th2-biased mice: A multi-omics approach. *PLoS One* **2022**, *17*, e0264400, doi:10.1371/journal.pone.0264400.
 287. Cario, E.; Gerken, G.; Podolsky, D.K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1359-1374, doi:10.1053/j.gastro.2007.02.056.
 288. Abdollahi-Roodsaz, S.; Joosten, L.A.; Koenders, M.I.; Devesa, I.; Roelofs, M.F.; Radstake, T.R.; Heuvelmans-Jacobs, M.; Akira, S.; Nicklin, M.J.; Ribeiro-Dias, F.; et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 205-216, doi:10.1172/JCI32639.

BIOGRAFIJA

Radmila D. Miljković je rođena 17. 11. 1990. godine u Beogradu. Srednju školu, Šestu beogradsku gimnaziju, je pohađala od 2005. do 2009. godine. Osnovne akademske studije je upisala školske 2009/10. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne akademske studije je završila 2014. godine. Master akademske studije je upisala školske 2014/2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Imunobiologija. Master akademske studije je završila 2015. godine i stekla zvanje master biolog. Doktorske akademske studije je upisala 2016. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa prosekom 10 (deset). Od 2015. godine, Radmila Miljković je angažovana na institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak" kao naučni radnik u odseku za naučno istraživački rad.

Do danas je objavila 10 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od toga 2 rada iz doktorske teze kao prvi autor, oba iz M21 kategorije. Ima 9 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 12 saopštenja na domaćim skupovima.

Naučni radovi

1. **Miljković, R.**; Marinković, E.; Prodić, I.; Kovačević, A.; Protić-Rosić, I.; Vasić, M.; Lukić, I.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. Ameliorative Effect of Banana Lectin in TNBS-Induced Colitis in C57BL/6 Mice Relies on the Promotion of Antioxidative Mechanisms in the Colon. *Biomolecules* **2025**, *15*, 476, doi:<https://doi.org/10.3390/biom15040476>.
2. **Miljkovic, R.**; Marinkovic, E.; Lukic, I.; Kovacevic, A.; Lopandic, Z.; Popovic, M.; Gavrovic-Jankulovic, M.; Schabussova, I.; Inic-Kanada, A.; Stojanovic, M. Banana Lectin: A Novel Immunomodulatory Strategy for Mitigating Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **2024**, *16*, 1705, doi:<https://doi.org/10.3390/nu16111705>.

Saopštenja

Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja (M34):

1. **Miljković, R.**; Marinković, E.; Kovačević, A.; Lukić, I.; Popović, M.; Lopandić, Z.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. The impact of prophylactic treatment of recombinant banana lectin on the innate immune response in TNBS induced colitis in C57BL/6 mice. *14th Dresden Symposium on Autoantibodies*, Dresden, September 10-13, 2019.

Radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja (M64):

1. **Miljković, R.**; Lukić, I.; Marinković, E.; Kovačević, A.; Popović, M.; Lopandić, Z.; Gavrović-Jankulović, M.; Stojanović, M. Prophylactic treatment by banana lectin influences the immune response in the peak of experimental colitis. *Immunology at the confluence of multidisciplinary approaches*, Abstract book, Hotel Mona Plaza Belgrade, December 6-8, 2019, 52-52.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Radmila Miljković**

Broj indeksa **DB01/2016**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**Profilaktičko dejstvo rekombinantne izoforme lektina banane u zapaljenskim bolestima creva:
ispitivanje na modelu hemijski-indukovanog kolitisa u miša**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Radmila Miljković**
Broj indeksa **DB01/2016**
Studijski program **Biohemija**
Naslov rada **Profilaktičko dejstvo rekombinantne izoforme lektina banane u zapaljenkim bolestima creva: ispitivanje na modelu hemijski-indukovanog kolitisa u miša**
Mentor Dr Marijana Stojanović i dr Marija Gavrović-Jankulović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Profilaktičko dejstvo rekombinantne izoforme lektina banane u zapaljenjskim bolestima creva:
ispitivanje na modelu hemijski-indukovanog kolitisa u miša**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
- 4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)**
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, _____

Potpis autora

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda