

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Emilija M. Marinković

**Imunomodulatorna aktivnost rekombinantne
izoforme lektina iz banane u fiziološkim i
patološkim uslovima u debelom crevu miševa
BALB/c soja**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Emilija M. Marinković

**Immunomodulatory activity of recombinant
banana lectin isoform in large intestine of *BALB/c*
mice under physiological and pathological
conditions**

Doctoral dissertation

Beograd, 2017.

Mentori:

Dr Marijana Stojanović

viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za virusologiju, vakcine i serume – Torlak

Dr Biljana Božić Nedeljković

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr Marijana Stojanović

viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za virusologiju, vakcine i serume – Torlak

Dr Biljana Božić Nedeljković

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Dr Marija Gavrović-Jankulović

redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

Datum odbrane

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 virusologiju, vakcine i serume - Torlak u Beogradu. Mojoj mentorki dugujem ogromnu zahvalnost na ukazanom poverenju, podršci, velikom strpljenju, dragocenoj stručnoj pomoći i prijateljskim savetima. Hvala ti što si uvek bila uz mene!

Prof dr Biljani Božić Nedeljković, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu se naizmerno zahvaljujem na pomoći i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele konačnom formiranju ovog rada.

Prof dr Mariji Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu dugujem veliku zahvalnost na pruženu pomoć u realizaciji ovog rada.

Takođe se zahvaljujem prof dr Axelu Roers i mojoj prijateljici Lini Muhandes sa Instituta za imunološka istraživanja u Drezdenu u čijoj laboratoriji je određen jedan deo ove teze. Posebnu zahvalnost dugujem Evropskom udruženju biohemičara - FEBS koji su finansirali moj boravak u Nemačkoj.

Beskrajno se zahvaljujem dr Aleksandri Inić-Kanadi bez čije pomoći veliki deo teze ne bi bio ono što danas jeste.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim dragim koleginicama i prijateljicama Ivani Lukić, Ani Filipović, Radmili Đokić i dr Dejana Kosanović na nesebičnoj pomoći oko izrade teze i prijateljskoj podršci i u dobru i u zlu.

Najsrdahnije se zahvaljujem i ostalim kolegama iz Odseka za naučno-istraživački rad Instituta Torlak dr Stanislavi Stanojević, dr Ivanu Pilipoviću, Ivani Vujnović, Ivani Ćuruviji, Veljku Blagojeviću, Raisi Petrović i dr Dušku Kosecu.

Disertaciju posvećujem mojim najdražima, tati Milijanu i mami Oliveri. Beskrajno vam hvala na podršci, motivaciji i безусловnoj ljubavi koju ste mi u životu pružali!

Imunomodulatorna aktivnost rekombinantne izoforme lektina iz banane u fiziološkim i patološkim uslovima u debelom crevu miševa *BALB/c* soja

SAŽETAK

Lektin banane (BanLec) pripada podgrupi lektina koji vezuju glukozu ili manozu- u okviru familije lektina sličnih žakalinu. U plodu banane, koji predstavlja prirodni izvor BanLec-a, javlja se u više izoformi, a može se proizvesti i rekombinantnom DNK tehnologijom.

Rekombinantna izoforma BanLec-a (rBanLec) je po svojim strukturnim karakteristikama i specifičnosti vrlo slična prirodnim izoformama. Kao i većina biljnih lektina, (r)BanLec ne podleže brzo denaturaciji / razgradnji u uslovima digestivnog trakta, a pokazano je da se vezuje za epitel tankog creva i postepeno prolazi u subepitelni prostor. Danas je poznato da BanLec, nezavisno od izoforme, ima imunomodulatorni potencijal. Dosadašnja istraživanja su se dominantno bavila uticajem (r)BanLec-a na funkcionalne karakteristike limfocita i pokazano je da stimulacije određene ćelijske populacije prirodnim i rekombinantnom izoformom kvalitativno imaju isti ishod. Uticaj (r)BanLec-a na funkcionalne karakteristike drugih ćelija imunskog sistema nije detaljno analiziran.

Cilj ove doktorske teze je da se kroz ispitivanja (1) modulatornog dejstva rBanLec-a na funkcionalne karakteristike antigen-prezentujućih ćelija (APĆ) BALB/c miša, (2) imunomodulatornog dejstva rBanLec-a u debelom crevu BALB/c miša u fiziološkim uslovima, i (3) efekata profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a u modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša, dobije uvid u imunomodulatorni efekat rBanLec-a na imunski sistem u mukozi debelog creva miševa BALB/c soja pod specifičnim uslovima.

Koristeći peritonealne makrofage i dendritske ćelije slezine (DĆ) kao *in vitro* model sisteme, pokazano je da rBanLec dozno-zavisno moduliše funkcionalne karakteristike APĆ BALB/c miševa. Analiza uticaja rBanLec stimulacije na karakteristike rezidentnih (RM) i tioglikolatom-indukovanih (TGM) peritonealnih makrofaga, pokazala je da ishod stimulacije određene ćelijske populacije nije jednoznačan već zavisi od njihovog funkcionalnog stanja. rBanLec na pozitivan dozno-zavisan način pospešuje proinflamatorni kapacitet RM (povećanje produkcije NO i IL-12 i smanjenje aktivnosti arginaze i sekrecije IL-4), a na isti način smanjuje proinflamatorni kapacitet TGM (smanjenje produkcije NO i IL-12 i povećanje aktivnosti arginaze i sekrecije IL-4). Uticaj rBanLec-a na produkciju TGF- β kod peritonealnih makrofaga takođe zavisi od funkcionalnog stanja makrofaga (kod RM, rBanLec negativno dozno-zavisno, a kod TGM pozitivno dozno-zavisno utiče na produkciju TGF- β). I kod RM i kod TGM, rBanLec na pozitivan dozno-zavisan način podstiče aktivnost mijeloperoksidaze (MPO), produkciju TNF- α i IL-10. Za stimulaciju produkcije proinflamatornih medijatora, nezavisno od funkcionalnog stanja makrofaga, značajno je vezivanje rBanLec-a za TLR2 i TLR4 / CD14. rBanLec utiče na sekreciju efektorskih citokina IFN- γ i IL-4 (negativno dozno-zavisno) i regulatornog citokina IL-10 (pozitivno dozno-zavisno) od strane DĆ slezine. rBanLec TLR2-posredovana stimulacija DĆ slezine nije ključna za promene u ekspresiji *Ifn- γ* i *Il-4*.

U okviru ove doktorske teze je pokazano da rBanLec stupa u interakciju sa ćelijama epitela debelog creva i subepitelnog odeljka, i moduliše lokalne imunske karakteristike. Imunomodulatorni efekat rBanLec-a u debelom crevu je dozno-zavisan. Jednokratno lokalno aplikovan rBanLec u dozama od 0,5 do 50 µg/kg TT u debelom crevu BALB/c miša dozno-zavisno stimuliše mehanizme urođene imunosti koji deluju antimikrobno (MPO i iNOS aktivnost), pri čemu njihova pojačana aktivnost ne dovodi do lokalnih patoloških promena. rBanLec u dozi od 0,5 µg/kg TT (0,1 µg/ml) ne pokreće produkciju proinflammatoryh citokina ali stimuliše produkciju regulatornih citokina, dok u dozama > 5 µg/kg TT (>1 µg/ml) stimuliše uspostavljanje balansiranih proinflammatoryh imunskog odgovora Th1 / Th17 tipa. Već tokom prvih 24h, rBanLec, u koncentracijama 0,1-10 µg/ml, indukuje značajan porast lokalne koncentracije IL-2 čija koncentracija pozitivno korelira sa aplikovanom dozom rBanLec-a. Do značajnog porasta lokalne koncentracije IFN-γ, IL-12 i IL-17 dolazi tek drugog dana i ovaj porast je prolaznog karaktera. Takođe, drugog dana, nezavisno od lokalno aplikovane količine rBanLec-a, dolazi i do značajnog porasta lokalne koncentracije IL-10.

U modelu TNBS-om indukovanih kolitisa kod BALB/c miševa pokazano je da rBanLec, u dozama 0,5-50 µg/kg TT, može da ima profilaktički i pozitivan terapijski efekat u slučaju inflamatorne bolesti creva. Jednokratno lokalno primenjen rBanLec u navedenim dozama ne može da spreči razvoj eksperimentalnog kolitisa, ali su određeni profilaktički tretmani rezultovali blažom kliničkom slikom u piku bolesti i bržim oporavkom miševa. Stepenn poboljšanja opšte kliničke slike zavisio je i od profilaktičke doze rBanLec-a i od vremena njene primene. Terapijska primena rBanLec-a koja podrazumeva svakodnevnu oralnu primenu rBanLec-a u dozama 0,5-50 µg/kg TT počevši od dana indukcije eksperimentalnog kolitisa, takođe, na dozno-zavisan način, ublažavala opštu kliničku sliku. U slučaju profilaktičke i u slučaju terapijske primene rBanLec-a, opšte poboljšanje kliničke slike rezultat je ne samo smanjenja intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa (smanjenje: aktivnosti MPO i iNOS, ekspresije transkripcionih faktora T-bet i RORγt i koncentracije IL-12 i TNF-α), nego i promene odnosa aktivnosti proinflammatoryh i regulatornih mehanizama. Stepenn poboljšanja kliničke slike u piku bolesti usled specifičnog rBanLec tretmana je pozitivno korelirao sa smanjenjem odnosa [TNF-α] / [IL-10] u debelom crevu.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da rBanLec, modulišući aktivnost ćelija imunskog sistema, utiče na karakteristike lokalnog miljea u debelom crevu. Lokalno imunomodulatorno dejstvo rBanLec-a može doprineti ublažavanju opšte kliničke slike u slučaju inflamatorne bolesti creva.

Ključne reči: lektin banane (BanLec), imunomodulacija, debelo crevo, peritonealni makrofagi, dendritske ćelije slezine, TNBS indukovani kolitis, BALB/c miševi

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: imunologija

UDK broj: [616-097:[577.112.85:634.773]]:[591.434:636.028](043.3)

Immunomodulatory activity of recombinant banana lectin isoform in large intestine of BALB/c mice under physiological and pathological conditions

SUMMARY

Banana lectin (BanLec) is primarily isolated from the fruit of banana (*Musa paradisiac*). It is glucose / mannose-specific lectin that belongs to the jackalin superfamily of lectins. There are several naturally occurring BanLec isoforms. Nowadays BanLec can also be produced by recombinant technology (rBanLec). rBanLec possesses structural and functional characteristics that highly resemble those reported for its natural counterparts. As most plant lectins, (r)BanLec is resistant to denaturation/proteolytic cleavage in the gastrointestinal tract. It has been reported that rBanLec attaches specifically to the mucosal surface of small intestine and passes into subepithelial compartment. (r)BanLec has been recognized as a potential immunomodulator. It has been shown that (r)BanLec modulates functional characteristics of lymphocytes but the effects of (r)BanLec stimulation in other immune cells are not yet elucidated.

The aim of this study was to investigate immunomodulatory / immunostimulatory activity of rBanLec in the colon of BALB/c mice. This aim was accomplished through evaluation of the impact of rBanLec stimulation on 1) functional characteristics of antigen presenting cells (APC) isolated from BALB/c mice 2) local immune system in the large intestine of healthy BALB/c mice, and 3) the course of TNBS-induced experimental colitis in BALB/c mice.

Peritoneal macrophages and spleen dendritic cells (DC) isolated from BALB/c mice were used *in vitro* for the evaluation of rBanLec influence on functional characteristics of APC. Generally, it is shown that rBanLec in a dose-dependent manner modulated the functional characteristics of APCs. By using resident (RMs) and thioglycollate-elicited (TGMs) peritoneal macrophages, it has been shown that effects of rBanLec stimulation depend on its concentration but also on the functional status of macrophages. Obtained results have clearly shown that rBanLec, in a positive dose-dependent manner, promotes pro-inflammatory phenotype with BALB/c RMs (enhancement of NO and IL-12, reduction of arginase activity and IL-4 secretion) while, in the same manner, it tends to skew BALB/c TGMs towards anti-inflammatory profile (reduction of NO and IL-12 production, enhancement of arginase activity and IL-4 secretion). The dose-dependent changes in production of TGF- β by peritoneal macrophages also depended on their functional status: rBanLec stimulated the production of TGF- β by RMs in a negative dose-dependent manner, while in TGMs production of TGF- β positively correlated to the rBanLec concentration. The activity of myeloperoxidase (MPO) and productions of TNF- α and IL-10 were enhanced upon rBanLec stimulation in a positive dose-dependent manner with both RMs and TGMs. Further, it was shown that interactions of rBanLec with TLR2 and TLR4 / CD14 are important for initiations of the production of pro-inflammatory mediators by peritoneal macrophages irrespective to their functional status. rBanLec also stimulated in a specific dose-dependent manner the secretion of effector cytokines IFN- γ and IL-4 (negative dose-

dependent manner) and regulatory cytokine IL-10 (positive dose-dependent manner) by spleen DCs. However, it seems that TLR2-mediated rBanLec stimulation is not crucial for changes in the expression of *Ifn-γ* and *Il-4* in spleen DCs.

It has been shown that rBanLec binds to the luminal surface of murine colon epithelium, passes through epithelial barrier and modulates the local immune response. Single rectal application of rBanLec in doses ranging from 0.5 to 50 µg/kg BW (0.1 - 10 µg/ml) triggered the mechanisms of innate immunity (MPO and iNOS activity), which contribute to the antimicrobial activity in the colon of BALB/c mice. Although the enhanced activity of MPO and iNOS was recorded upon the rBanLec stimulation, no pathology changes in the colon tissue were marked. rBanLec in a dose of 0.5 µg/kg BW (0.1 µg/ml) did not stimulate the production of pro-inflammatory cytokines but enhanced the production of regulatory cytokines. In doses ≥ 5 µg/kg BW (≥ 1 µg/ml), rBanLec promoted the transitional establishment of balanced Th1/Th17 local immune response. A significant increase in local concentration of IL-2 that positively correlated with the applied rBanLec dose was marked during the first 24 hours upon stimulation with rBanLec in doses ranging from 0.1 to 10 µg/ml. The transitional rise in local production of IFN- γ , IL-12 and IL-17 was marked only upon treatment with rBanLec in concentration ≥ 1 µg/ml and it occurred during the second day upon rBanLec administration. In addition, irrespective of the applied dose of rBanLec, a significant increase of the local concentration of IL-10 was recorded on the second day upon rBanLec administration.

rBanLec, within a dose range analyzed herein (0.5-50 µg/kg BW) might exert prophylactic and positive therapeutic effects on inflammatory bowel disease. Prophylactic application of rBanLec in specified doses did not prevent the development of TNBS-induced colitis in BALB/c mice, but some treatments resulted in less severe pathology in the peak of disease and improved the recovery process. The extent of positive effect of prophylactic treatment with rBanLec depended on both rBanLec dose and the time of its application. Therapeutic treatment, which assumed oral administration of rBanLec in doses from 0.5 to 50 µg/kg BW on daily basis starting from the day of the induction of experimental colitis, also ameliorated disease severity in a dose-dependent manner. Reduction in experimental colitis severity upon prophylactic or therapeutic rBanLec treatment was due to lessening of the intensity of local inflammatory processes (local reductions in: activity of MPO and iNOS, expression of transcription factors T-bet and ROR γ t, and concentrations of IL-12 and TNF- α), but also due to the stimulation of local regulatory mechanisms. The extent of reduction in disease severity due to specific rBanLec treatment positively correlated to the decrease in the [TNF- α] / [IL-10] ratio in the colon.

The results presented in this thesis showed that rBanLec modulates the activity of the immune cells in a specific dosage-dependent manner and affects the characteristics of the local milieu in the murine colon. Local immunomodulatory impact of rBanLec may contribute to the alleviation of symptoms in the inflammatory bowel diseases.

Key words: banana lectin (BanLec), imunomodulation, colon, peritoneal macrophages, spleen dendritic cells, TNBS-induced experimental colitis, BALB/c mice

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunology

UDC number: [616-097:[577.112.85:634.773]]:[591.434:636.028](043.3)

Lista skraćenica

APC – alofikocijanin
APS – amonijum persulfat
APĆ – antigen-prezentujuće ćelije
At – antitelo
BanLec – lektin banane
BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat
BSA – goveđi serum albumin
CD – Kronova bolest
ConA – konkanavalin A
DAB – 3,3' diamino benzidin
DĆ – dendritske ćelije
EDTA – etilendiamin tetra sirćetna kiselina
FACS – protočna citofluorimetrija
FCS – fetalni goveđi serum
FITC – fikotocijanin
Gal – galaktoza
GalNAc - N-acetil-D-galaktozamin
GIT - gastrointestinalni trakt
Glc – glukoza
H&E – hematoksilin i eozin
IBD – zapaljenske bolesti creva
IFN – interferon
Ig – imunoglobulin
IL – interleukin
iNOS – inducibilna azot oksid sintaza
KML – lektin korejske imele
kDĆ – klasične dendritske ćelije
LP – lamina propria
LPS – lipopolisaharid
Man – manoza
Met-Man - α -metil-D-manopiranozid
MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti
MPM – mali peritonealni makrofagi
MPO – mijeloperoksidaza
NBT - nitrotetrazolijum hlorida
NO – azot oksid
OPD - *o*-fenilendiamin
pDĆ – plazmocitoidne dendritske ćelije
PAAG – poliakril amidni gel
PAGE – poliakril amid gel elektroforeza
PBS – fosfatni pufer

PE – fikoeritrin
PEPG – peptidoglikan
PI – indeks proliferacije
PMBC – mononukleari periferne krvi
RNS – reaktivne azotne vrste
ROS – reaktivne kiseonične vrste
rBanLec – rekombinantni lektin banane
RM – rezidentni peritonealni makrofagi
SDS – natrijum dodecil sulfat
TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletildiamid
TGF – transformišući faktor rasta
TGM – tioglikolatom-indukovani peritonealni makrofagi
Th – pomoćnički T limfociti
TLR – receptori slični *Toll*-u
TNBS - trinitrobenzen sulfonska kiselina
TNF – faktor nekroze tumora
Treg – regulatorni T limfociti
Tris - tris(hidroksimetil)aminometan
UC – ulcerozni kolitis
VPM – veliki peritonealni makrofagi
WST-8 - ([2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfopenil)-2-tetrazolijum])

1. UVOD	1
1.1 Lektini	1
1.1.1 Klasifikacija lektina	2
1.1.2 Lektini i imunski sistem	3
1.1.3 Lektin banane	6
1.1.3.1 Strukturne karakteristike i specifičnost lektina banane	6
1.1.3.2 Strukturna stabilnost lektina banane	9
1.1.3.3 Funkcionalne karakteristike lektina banane	9
1.2 Antigen prezentujuće ćelije kao <i>in vitro</i> sistemi	11
1.2.1 Makrofagi	12
1.2.1.1 Aktivacija i polarizacija makrofaga	12
1.2.1.2 Peritonealni makrofagi	14
1.2.2 Dendritske ćelije (DĆ)	16
1.2.2.1 DĆ slezine	17
1.3 Gastrointestinalni trakt kao deo imunskog sistema	18
1.3.1 Imunska homeostaza u gastrointestinalnom traktu	18
1.3.2 Zapaljenske bolesti creva	21
1.3.3 Eksperimentalni modeli zapaljenskih bolesti creva	23
1.3.3.1 Mišji model kolitisa indukovanoog trinitrobenzen sulfonskom kiselinom	24
1.4 Zašto je BanLec potencijalni imunomodulator u crevima?	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1 Dizajn eksperimenata	29
3.2 Eksperimentalne životinje	31
3.3 rBanLec	31
3.4 Dobijanje mišjih peritonealnih makrofaga	31
3.4.1 Priprema ćelijskih kultura mišjih peritonealnih makrofaga	32
3.4.2 Priprema ćelijskih kultura peritonealnih makrofaga u prisustvu anti-TLR2 i anti-CD14 blokirajućih antitela	33
3.5 Test vijabilnosti	33
3.6 Određivanje aktivnosti arginaze	34
3.7 Test redukcije NBT-a	35
3.8 Ispitivanje vezivanja anti-TLR4 At za peritonealne makrofage u prisustvu rBanLec-a	35

3.9 Ispitivanje vezivanja rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14 u prisustvu α -metil-D-Man -----	39
3.10 Imunofluorescentno bojenje citospin preparata peritonealnih makrofaga -----	36
3.11 Dobijanje mišjih splenocita-----	37
3.11.1 Izolovanje DĆ slezine metodom ćelijskog sortiranja-----	38
3.11.2 Priprema kulture DĆ slezine-----	38
3.12 Analiza ekspresije gena za citokine -----	39
3.12.1 Izolacija RNK-----	39
3.12.2 Reverzna transkripcija -----	40
3.12.3 <i>Real-time</i> qRT-PCR -----	40
3.13 Tretman životinja rBanLec-om-----	41
3.13.1 Profilaktička primena rBanLec-a -----	42
3.13.2 Indukcija eksperimentalnog modela kolitisa -----	42
3.13.3 Terapijska primena rBanLec-a -----	43
3.14 Priprema uzoraka debelog creva za analizu-----	43
3.15 Priprema histoloških preparata-----	44
3.16 Imunohistohemijska detekcija rBanLec-a u tkivu debelog creva -----	45
3.17 Određivanje koncentracije proteina -----	46
3.18 Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze -----	46
3.19 Određivanje produkcije azot oksida -----	46
3.20 Analiza produkcije ukupnih IgG i IgA At -----	47
3.21 Određivanje koncentracije citokina -----	47
3.22 Elektroforeza i <i>Western blot</i> -----	48
3.22.1 SDS-PAGE (<i>engl.</i> Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis) -----	48
3.22.2 <i>Western blot</i> -----	49
3.23 Statistička obrada rezultata-----	51
4. REZULTATI I DISKUSIJA -----	52
4.1 Uticaj rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike antigen-prezentujućih ćelija-----	52
4.1.1 Membranske strukture sa kojima rBanLec stupa u interakciju -----	52
4.1.2 rBanLec kao modulator funkcionalnih karakteristika peritonealnih makrofaga -----	56
4.1.2.1 Uticaj rBanLec stimulacije na vijabilnost peritonealnih makrofaga -----	56
4.1.2.2 Uticaj rBanLec stimulacije na produkciju ROS u makrofagima -----	58
4.1.2.3 Efekat rBanLec stimulacije na aktivnost arginaze i produkciju NO od strane peritonealnih makrofaga -----	59

4.1.2.4	Uticao rBanLec stimulacije na produkcija citokina od strane peritonealnih makrofaga ---	62
4.1.2.5	Uloga TLR2 i CD14 u rBanLec-indukovanim promenama u produkciji NO-a i citokina od strane peritonealnih makrofaga -----	65
4.1.3	rBanLec kao modulator funkcionalnih karakteristika dendritskih ćelija-----	68
4.1.4	Uticao rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike antigen-perzentujućih ćelija - diskusija -----	71
4.2	Imunomodulatorno dejstvo rBanLec-a u debelom crevu miša u fiziološkim uslovima - -----	80
4.2.1	Vezivanje rBanLec-a za epitel debelog creva i dinamika njegovog prolaska u subepitelni kompartment -----	80
4.2.2	Uticao rBanLec-a na citokinski milje u debelom crevu -----	81
4.2.3	Uticao rBanLec-a na aktivnost iNOS i MPO u debelom crevu -----	84
4.2.4	Uticao rBanLec-a na produkciju IgA i IgG antitela u debelom crevu-----	86
4.2.5	Imunomodulatorni uticao rBanLec-a u debelom crevu miša pod fiziološkim uslovima - diskusija-- -----	89
4.3	Ispitivanje profilaktičkog i terapijskog potencijala rBanLec-a na mišjem modelu akutnog zapaljenja debelog creva-----	94
4.3.1	Evaluacija profilaktičkog potencijala rBanLec-a u mišjem modelu TNBS-om indukovano g kolitisa -----	95
4.3.1.1	Uticao profilaktičke primene rBanLec-a na opšte stanje miševa -----	95
4.3.1.2	Histološka analiza debelog creva miševa nakon profilaktičke primene rBanLec-a -----	98
4.3.1.3	Uticao profilaktičke primene rBanLec-a na aktivnost MPO u debelom crevu miševa -----	102
4.3.1.4	Uticao profilaktičke primene rBanLec-a na aktivnost iNOS u debelom crevu miševa -----	105
4.3.1.5	Uticao profilaktičke primene rBanLec-a na ekspresiju T-bet, GATA-3 i ROR γ t u debelom crevu miševa-----	108
4.3.1.6	Uticao profilaktičke primene rBanLec-a na lokalnu produkciju citokina -----	110
4.3.2	Evaluacija terapijskog potencijala rBanLec-a u mišjem modelu TNBS-om indukovano g kolitisa -----	121
4.3.2.1	Uticao oralno primenjenog tretmana rBanLec-a na opšte stanje miševa -----	121
4.3.2.2	Uticao oralno primenjenog rBanLec-a na promene u MPO i iNOS aktivnosti u debelom crevu miševa -----	123
4.3.2.3	Uticao oralno primenjenog rBanLec-a na produkciju citokina TNF- α i IL-10 u debelom crevu miševa -----	126
4.3.3	Profilaktički i terapijski potencijal rBanLec-a na mišjem modelu akutnog zapaljenja debelog creva-diskusija-----	129
5.	ZAKLJUČCI-----	136
6.	LITERATURA -----	144

1. UVOD

1.1 Lektini

Još krajem XIX veka je uočeno da neki proteini imaju sposobnost aglutinacije eritrocita. Ovi proteini nazvani su hemaglutinini ili fitoaglutinini jer su prvi put otkriveni u ekstraktima biljaka. Prvi opis fitoaglutinina dao je Peter Herman Stilmark 1888. godine (Sharon & Lis, 2004), opisujući ricin, veoma toksičan protein koji je izolovan iz semena biljke ricinus (*Ricinus communis*). Trideset godina kasnije, kroz karakterizaciju konkanavalina A (*engl.* Concanavalin A, ConA), otkriveno je da hemaglutinini interaguju sa ugljenohidratnim strukturama eksprimiranim na površini eritrocita i na taj način ih aglutiniraju (Summer & Howel, 1936). Činjenica da proteini koji imaju sposobnost aglutinacije različito interaguju sa eritrocitima specifičnih krvnih grupa, dovela je do uvođenja novog termina u literaturi - lektin (od latinske reči *legere* što znači "izabrati"). Tokom narednih godina, lektini su izolovani iz velikog broja biljaka, ali su pronađeni i u carstvima mikroorganizama i životinja.

Prvobitno su lektini opisani kao grupa glikoproteina neimunološkog porekla, koji se po biološkoj aktivnosti razlikuju od antitela i enzima, i koji imaju sposobnost aglutinacije eritrocita (Goldstein *et al.*, 1980). Ova definicija je bila previše restriktivna i nije obuhvatala slabo aglutinirajuće proteine koji imaju sposobnost specifičnog vezivanja za ugljene hidrate poput ricina i abrina. Stoga su Peumans i saradnici (1995) predložili sveobuhvatniju definiciju po kojoj su lektini definisani kao heterogena grupa fiziološki aktivnih biomolekula proteinske prirode koji poseduju najmanje jedan nekatalitički domen i koji imaju sposobnost da reverzibilno vezuju solubilne ugljene hidrate ili ugljenohidratne komponente glikoproteina ili glikolipida.

1.1.1 Klasifikacija lektina

Lektini predstavljaju grupu glikoproteina koji su široko zastupljeni u živom svetu. Radi lakšeg izučavanja predloženo je više klasifikacija gde su kriterijumi klasifikacije bili specifičnost, poreklo, broj vezivnih mesta, itd.

Prema specifičnosti za saharidne strukture lektini se dele na lektine specifične za:

- Glukozu (Glc)/manozu (Man)
- Galaktozu (Gal) i N-acetil-D-galaktozamin (GalNAc)
- L-fukozu (Fuc)
- Sijalinsku kiselinu

Prema poreklu lektini se dele na:

- Biljne lektine
- Životinjske lektine
- Lektine protozoa
- Bakterijske lektine
- Viralne hemaglutinine

Lektini su najrasprostranjeniji u biljnom svetu i uglavnom učestvuju u odbrambenim mehanizmima biljke. Dugo se smatralo da se biljni lektini nalaze isključivo u semenu, ali je vremenom prisustvo lektina potvrđeno u svim vegetativnim organima biljaka. U proseku, lektini čine od 0,1-5% ukupnog proteinskog sadržaja biljaka (Els *et al.* 1998).

Prvu grubu podelu biljnih lektina dali su Peumans i saradnici (1995) klasifikujući ih, po broju i specifičnosti šećer-vezujućih mesta, na:

- merolektine koji poseduju isključivo jedno mesto za vezivanje šećera pa shodno tome nemaju sposobnost aglutinacije eritrocita ili precipitacije glikokonjugata
- hololektine koji u svojoj strukturi poseduju dva ili više šećer-vezujućih mesta indentične specifičnosti i zahvaljujući ovoj multivalentnosti mogu da učestvuju u procesu aglutinacije eritrocita

- superlektine koji poseduju dva ili više šećer-vezujućih mesta koja interaguju sa strukturno različitim šećerima
- himerolektine koji predstavljaju fuzione dimerne proteine u kojima jedan peptidni lanac poseduje mesto za vezivanje ugljenih hidrata, a drugi ima katalitičku ili neku drugu biološku aktivnost

Razvojem biohemijskih tehnika i tehnika molekularne biologije, dobijeni su podaci po kojima su biljni lektini dalje klasifikovani u 4 grupe evolutivno bliskih proteina:

1. Lektini mahunarki
2. Lektini koji vezuju hitin
3. Lektini monokotiledonih biljaka koji vezuju Man
4. Tip 2 ribozom inaktivirajući proteini

Pored ove 4 grupe, identifikovane su i 3 manje familije lektina, imenovane po protopipovima, koje se razlikuju po strukturi:

1. Familija amarantina
2. Žakalin i njemu slični lektini
3. Floemski lektini

1.1.2 Lektini i imunski sistem

U organizmu životinja i čoveka endogeni lektini učestvuju u mnogobrojnim biološkim procesima kao što su komunikacija među ćelijama, adhezija ćelija za ćelijski matriks, ćelijsko kretanje, rast i diferencijacija ćelija (Ghazarian *et al.* 2011). Interakcije endogenih lektina sa njihovim ciljnim strukturama značajno oblikuju i aktivnost imunskog sistema i utiču na karakteristike uspostavljenog imunskog odgovora (aktivacija komplementa lektinskim putem, diferencijacija i migracija ćelija imunskog sistema, Singh & Sarath, 2012).

Rezultati koji su se akumulirali tokom vremena pokazuju da i lektini biljnog porekla, uneti u organizam putem ishrane, mogu interferirati sa gore navedenim procesima i uticati na aktivnost imunskog sistema (Hiemstra *et al.*, 1997; Van Damme *et*

al., 1998; Van Damme *et al.*, 2008). Biljni lektini su duži niz godina u imunološkim istraživanjima korišćeni kao reagensi za identifikaciju i izolovanje određenih struktura, ali su vremenom, zbog svog imunomodulatornog dejstva, i sami postali predmet ovih istraživanja. Brojne studije potvrđuju kapacitet biljnih lektina da utiču na imunski odgovor, tako što ga stimulišu, suprimiraju i / ili usmeravaju u određenom pravcu. Za veliki broj biljnih lektina je pokazano da u ćelijama imunskog sistema mogu stimulisati sekreciju citokina (**Tabela 1.1**) i produkciju reaktivnih azotnih (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) i kiseoničnih (engl. *reactive oxygen species*, ROS) vrsta, i time pospešiti imunski odgovor protiv različitih mikroorganizama (Coltri *et al.*, 2010) i tumora (da Silva *et al.*, 2014). Ovi nalazi daju osnov istraživanjima u kojima se biljni lektini razmatraju kao adjuvansi ili sredstva za prevenciju / tretman određenih patoloških stanja.

Direktno imunomodulatorno dejstvo lektina je posledica njihove interakcije sa ugljenohidratnim komponentama membranskih proteina ćelija imunskog sistema. Oligosaharidne strukture na receptorima iz familije receptora sličnih Toll-u (engl. Toll-like receptor; TLR) su strukture za koje je pokazano da između ostalog mogu biti prepoznate od strane lektina biljnog porekla i da je uspostavljanje te interakcije u osnovi imunomodulatornog dejstva dotičnih lektina.

Lektin izolovan iz korejske imele (KML), interagujući sa TLR tipa 4 (TLR4) moduliše aktivnost makrofaga. Vezivanje KML za TLR4 makrofaga dovodi do pojačane sekrecije citokina TNF- α , sinteze adhezivnih molekula, sekrecije ROS i povećanja sposobnosti fagocitoze makrofaga (Park *et al.*, 2010). Lektin ArtinM, izolovan iz biljke *Artrocarpus heterophyllus*, kao ligand TLR tipa 2 (TLR2), u makrofagima i dendritskim ćelijama (DĆ) indukuje sekreciju citokina IL-12 i IFN- γ , markera Th1 imunskog odgovora (Panunto-Castelo *et al.*, 2001; Coltri *et al.*, 2010). Pokazano je da neki lektini imaju sposobnost da modulišu Th2 imunski odgovor i „preusmere“ ga ka Th1 pravcu. Primena lektina izolovanog iz biljke *Synadenium carinatum* (ScLL) u mišijem modelu hronične astme dovodi do smanjenja lokalne sekrecije citokina IL-4, IL-5 i IL-13 (markeri Th2 imunskog odgovora) i značajno ublažava simptome bolesti kod ovih eksperimentalnih životinja (Rogerio *et al.*, 2007).

Tabela 1.1. Uticaji lektina na produkciju citokina (Souza et al., 2013).

Lektin	Biljni izvor	Citokini (izvor)
ArtinM	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	IL-12 i IL-10 (mišji makrofagi i dendritske ćelije) IL-10/IFN- γ (mišji splenociti)
BanLec	<i>Musa paradisiacal</i>	IL-10/ IFN- γ i IL-4 (mišji splenociti)
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	IFN- γ i IL-2 (mišji splenociti) IL-10 (humane PMBC (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells))
KML	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	IL-12 (humane dendritske ćelije) TNF- α (mišji makrofagi)
ML-1	<i>Viscum album</i>	IL-6, IL-10 i IL-12 (humane PMBC) IL-15 (humani neutrofilii)
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	TNF- α , IFN- γ i IL-2 (mišji splenociti)
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	IFN- γ i IL-2 (mišji splenociti)

Pored direktnog uticaja na funkcije ćelija imunskog sistema, lektini mogu i indirektno modulirati imunski odgovor. Usled sposobnosti da interaguju sa oligosaharidnim strukturama bakterija, lektini mogu dovesti do značajnih promena u sastavu komensalne mikroflore koja ima bitnu ulogu u očuvanju opšte homeostaze, odnosno predstavlja jedan od značajnih faktora za razvoj brojnih patoloških stanja (Branwell *et al.*, 1985, Vasconcelos & Oliveira, 2004). Takođe, pored toga što mogu stimulisati uspostavljanje imunskog odgovora koji efikasno eliminiše infektivni agens, lektini mogu doprineti borbi organizma sa infekcijom (a) kroz direktnu antimikrobnu aktivnost (Ajouba *et al.*, 1994; Charunghitrak *et al.*, 2011) i (b) vezujući se za oligosaharidne strukture na površini intracelularnih patogena čime sprečavaju njihov ulazak u ciljnu ćeliju (Singh & Sarath, 2012). Konačno, poslednjih godina raste i broj

istraživanja koja pokazuju da među biljnim lektinima ima i onih lektina koji ispoljavaju direktno anti-tumorsko dejstvo (Beuth *et al.*, 1991; Yoon *et al.*, 2003).

1.1.3 Lektin banane

U fokusu ove doktorske teze je lektin ploda biljke banana, lektin banane (*engl.* banana lectin; BanLec). BanLec su otkrili Koshte i saradnici (1990) godine kada su prilikom ispitivanja reaktivnosti humanih serumskih antitela ka proteinima hrane, uočeno je da se serumski IgG4 vezuje za komponente ekstrakta banane (Koshte *et al.*, 1992). Nakon frakcionisanja ekstrakta banane (izolovanje pojedinih komponenti) ustanovljeno je da je ciljani antigen serumskih IgG4 antitela lektin koji ima sposobnost da aglutinira zečje, ali ne i humane i ovčije eritrocite. Zastupljenost BanLec-a u plodu banana zavisi od faktora sredine i generalno raste tokom procesa zrenja (Peumans *et al.*, 2002). Koshte i saradnici su izračunali da je prosečna zastupljenost BanLec-a u zreлом plodu banana ~ 4 mg na 100g ploda (Koshte *et al.*, 1990).

BanLec se u prirodnim izvorima javlja u vidu više izoformi čija zastupljenost zavisi od vrste banane i stepena zrelosti ploda (Peumans *et al.*, 2002). Danas je dostupna i izoforma BanLec-a proizvedena rekombinantnom DNK tehnologijom (rBanLec) koja je po strukturnim i funkcionalnim karakteristikama vrlo slična BanLec-u iz prirodnih izvora (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008). Imajući u vidu relativno nisku zastupljenost BanLec-a u prirodnom izvoru, mogućnost proizvodnje BanLec-a rekombinantnom tehnologijom je od velikog značaja za detaljno utvrđivanje efekata rBanLec-a u organizmu. rBanLec je moguće relativno jednostavno dobiti u visokom prinosu i bez opasnosti da se javi nekonzistentnost u kvalitetu preparata.

1.1.3.1 Strukturne karakteristike i specifičnost lektina banane

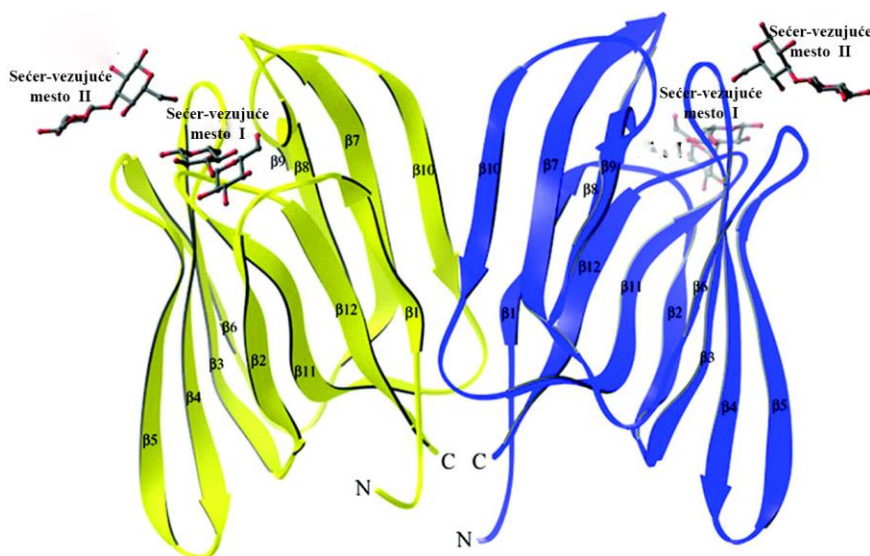
Sekvenciranjem cDNK ustanovljeno je da BanLec pripada porodici žakalini sličnih lektina. Ova porodica lektina dobila je ime po žakalini, galaktoza-specifičnom lektinu izolovanom iz semena biljke *Artocarpus integrifolia*, i u nju se svrstavaju lektini koji

poseduju jedan ili više žakalinu sličnih domena (Peumans *et al.*, 2000). Pošto je vremenom opisan veliki broj lektina koji su po strukturi slični žakalinu ali prepoznaju različite ugljeno-hidratne strukture, lektini iz žakalinu-slične familije su, na osnovu specifičnosti i unutarćelijske lokalizacije, podeljeni na (Peumans *et al.*, 2000, Els *et al.*, 2014):

1. Lektine specifične za Gal (locirani u vakuolama biljnih ćelija)
2. Lektine specifične za Man (locirani u citoplazmi biljnih ćelija)

Za razliku od žakalina koji pripada podgrupi lektina specifičnim za Gal, BanLec pripada podgrupi lektina specifičnih za Man jer specifično interaguje sa Glc i Man.

BanLec se u rastvoru nalazi u obliku dimera, ukupne molekulske mase ~30 kDa. Svaka subjedinica je sačinjena od jednog polipeptidnog lanca koji formira β prizmu sastavljenu od 3 β ploče koje čine po 4 antiparalelno orjentisana polipeptidna lanca (**Slika 1.1**). Subjedinice formiraju homodimerni molekul uspostavljajući nekovalentne interakcije između svojih hidrofobnih površina. Osobina po kojoj se BanLec izdvaja od ostalih lektina iz žakalinu-slične familije je prisustvo dva vezujuća mesta za šećere na jednoj subjedinici (Meagher *et al.*, 2005). S obzirom da oba vezujuća mesta pokazuju afinitet prema istim šećernim strukturama, BanLec se može svrstati u grupu hololektina.



Slika 1.1. 3D struktura dimera lektina banane, na kojoj su označena mesta za vezivanje šećera na svakom monomeru (Meagher *et al.*, 2005).

BanLec pokazuje specifičnost za monosaharide (Glc, Man, GlcNAc i α -metil-Man (Met-Man)) ali se sa znatno većim afinitetom vezuje za oligosaharidne strukture (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008). Kao i ostali Glc/Man-vezujući lektini, BanLec prepoznaje terminalne neredukujuće α Man i α Glc jedinice. Međutim, BanLec je specifičan po tome što može da se veže i za redukujuće Glc jedinice oligosaharida povezane β -1,3-glikozidnim vezama (Goldstein *et al.*, 2001, Winter *et al.*, 2005). Takođe, BanLec se sa visokim afinitetom vezuje za razgranate, manozom bogate, oligosaharidne strukture poput Man₉GlcNAc₂, gde su Man subjedinice povezane uglavnom sa α 1,3 glikozidnim vezama (Peumans *et al.*, 2000).

Među prirodnim izoformama BanLec-a postoje diskretne razlike u sekvenci, a njihove pI vrednosti su u opsegu 6.45–7.9. rBanLec, izoforma koju smo koristili u našim istraživanjima, je po svojim strukturnim karakteristikama vrlo slična prirodnim izoformama BanLec-a i, očekivano, pI vrednost izračunata za rBanLec (pI 7.4) je u rangu pI vrednosti određenih za prirodne izoforme (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008). Na nivou primarne proteinske sekvence pokazan je visok stepen sličnosti rBanLec-a i prirodnih BanLec izoformi (~95%), pogotovo u regionima polipeptidnih lanaca koji formiraju ligand-vezujuća mesta. Naime, proteinska sekvenca rBanLec-a sadrži 149 aminokiselina uključujući specifičan motiv od šest histidinskih ostataka (tzv. 6His-tag) - rBanLec na svom C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca poseduje aminokiselinsku sekvencu GSRSHHHHHH poreklom iz vektora korišćenog u procesu kloniranja. rBanLec-a se od prirodnih izoformi razlikuje po tome što na pozicijama 2 i 98 polipeptidnog lanca, umesto aminokiselina N i K, ima aminokiseline Q i N (N₍₂₎ > Q₍₂₎, K₍₉₈₎ > N₍₉₈₎). Ove izmene u primarnoj sekvenci su posledica same strategije kloniranja. Primarna sekvenca rBanLec-a u regionu prve petlje koja formira šećer-vezujuće mesto se razlikuje od aminokiselinske sekvence BanLec-a iz prirodnih izvora po tome što je na poziciji 130 K (umesto D) i na poziciji 132 I (umesto L). Aminokiselinska sekvenca druge petlje prisutne u ligand-vezujućem mestu (GDVVD) je potpuno očuvana u rBanLec-u tj. identična je sekvenci BanLec-a iz prirodnog izvora. Iako postoje male razlike u sekvenci ligand-vezujućeg regiona, pokazano je da rBanLec ima istu specifičnost kao i prirodne BanLec izoforme, ali

da ciljne saharidne strukture vezuje sa nešto većim afinitetom (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Strukturna stabilnost lektina banane

Analize strukturne stabilnosti BanLec-a pokazale su da su i prirodne i rekombinantna izoforma relativno otporne na denaturaciju pod različitim uslovima. Pokazana je dosta dobra otpornost BanLec-a na denaturaciju u prisustvu haotropnih agenasa - činjenica da su jedino visoke koncentracije guanidin hlorida (4M) dovele do denaturacije BanLec-a na sobnoj temperaturi ukazuje na veoma jake interakcije među β pločicama (Gupta *et al.*, 2014). Takođe, pokazana je i dobra termalna stabilnost BanLec-a - maksimalna temperatura na kojoj rBanLec ostaje stabilan iznosi 60,8 °C (Dimitrijević *et al.*, 2010), dok su testirane prirodne izoforme bile nešto otpornije na termalnu denaturaciju (temperatura denaturacije 67.5 °C) (Gupta *et al.*, 2014).

Ispitivanje stabilnosti BanLec-a u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta pokazalo je da su i prirodne i rekombinantna izoforma, kao u slučaju većine biljnih lektina, izuzetno stabilne u kiseloj sredini i otporne na dejstvo proteolitičkih enzima. Uprkos tome što, prema primarnoj strukturi, BanLec izoforme sadrže od 28 do 42 mesta na kojima pepsin može da iseče polipeptidne lance, BanLec ostaje strukturno i funkcionalno stabilan i nakon nekoliko časova inkubacije (prirodne izoforme 5h, rekombinantna izoforma 2h) u simuliranom želudačnom soku (Dimitrijević *et al.*, 2010). Očekivano, pri dužoj inkubaciji u simuliranim želudačnim uslovima, BanLec podleže proteolitičkoj degradaciji.

1.1.3.3 Funkcionalne karakteristike lektina banane

Ne postoje jasni podaci o ulozi BanLec-a u biljci banane, ali se pretpostavlja da on, poput ostalih lektina iz žakalinske familije, ima odbrambenu ulogu u biljci. Sa druge strane, vremenom raste baza podataka o funkcionalnim efektima BanLec-a kod virusa i u carstvu životinja.

Pokazano je da BanLec poseduje antiviralnu aktivnost koja se ispoljava na dva načina. U okviru istraživanja fokusiranih na definisanje načina kojima bi se sprečila replikacija HIV virusa pokazano je da BanLec (a) vezuje oligosaharidne strukture u proteinu omotača, gp120, i tako blokira ulazak virusa u ćeliju i (b) onemogućava replikaciju virusa unutar ćelije tako što inhibira aktivnost HIV-1 reverzne transkriptaze (Swanson *et al.*, 2010).

Strukture koje mogu biti prepoznate od strane BanLec-a široko su rasprostranjene u životinjskom carstvu. Ove strukture se najčešće sreću u tzv. *core*-regionima N-vezanih oligosaharidnih komponenti membranskih glikoproteina. Imajući to u vidu, kao i stabilnost BanLec-a u uslovima digestivnog trakta, može se očekivati da BanLec unet oralnim putem utiče na fiziološke procese u organizmu. Ranija istraživanja su pokazala da BanLec može da inhibira *in vitro* proliferaciju ćelija mišjeg limfoma (Wong & Ng, 2006; Cheung *et al.*, 2009) što ukazuje da bi se BanLec potencijalno mogao upotrebiti u lečenju limfoproliferativnih bolesti. Zatim, pokazano je da usled vezivanja za insulinske receptore miša, BanLec može, poput insulina, da pokrene određene procese koji, zavisno od vrste ćelije na kojoj su receptori eksprimirani, rezultuju pojačanom hematopoezom ili adipogenezom. Pored toga, publikovani su i podaci o uticajima BanLec-a na imunski sistem. Kao što je već spomenuto, BanLec je i otkriven zahvaljujući činjenici da kod ljudi, kao antigen, pokreće sekreciju IgG4 antitela (Koshte *et al.*, 1992). Takođe, pokazano je da IgG4 antitela iz humanog seruma interaguju i sa rBanLec-om po principu antigen-antitelo (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008). Pokazano je i u mišjem model sistemu da BanLec (korišćena rekombinantna izoforma) ima imunogena svojstva te pokreće BanLec-specifičan sistemski humoralni imunski odgovor gde su dominantna IgG1 antitela, a čiji intenzitet zavisi od rute imunizacije (Dimitrijević *et al.*, 2012). T limfociti su ćelije imunskog sistema na kojima je do sada najviše analiziran ishod stimulacije BanLec-om. Pokazano je da su i prirodne i rekombinantna izoforma BanLec-a mitogeni humanih (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008) i mišjih T limfocita (Stojanović *et al.*, 2010). Pored toga, u kulturi mišjih splenocita stimuliranih BanLec-om uočen je porast sekrecije proinflamatornih citokina (TNF- α (Cheng *et al.*, 2009) i IFN- γ (Stojanović *et al.*, 2010)), ali i anti-inflamatornog citokina IL-10 (Stojanović *et al.*, 2010). Konačno, Wong & Ng (2006)

su pokazali da *in vitro* stimulacija makrofaga BanLec-om rezultuje promenom u produkciji NO.

Pokazano je da se BanLec nakon oralne primene vezuje za epitel tankog creva i da prolazi u subepitelni odeljak, ali njegovi efekti nisu dovoljno proučeni (Dimitrijević *et al.*, 2012). Sansone i saradnici (2017) su pokazali da oralno primenjen BanLec podstiče produkciju citokina IL-10 i IL-17A, a redukuje koncentraciju citokina IL-6 i IFN- γ u perifernoj krvi miševa, dok je u timusu tretiranih životinja zabeležen porast broja CD4 limfocita na račun smanjenja CD8 limfocitnog pula.

1.2 Antigen prezentujuće ćelije kao *in vitro* sistemi

U mnogobrojnim istraživanjima koja za cilj imaju ispitivanje efekata različitih bioaktivnih supstanci na imunski odgovor, koriste se *in vitro* sistemi zasnovani na komercijalno dostupnim ćelijskim linijama ili izolovanim primarnim populacijama ćelija imunskog sistema. Ćelije imunskog sistema se mogu izolovati iz različitih organa eksperimentalnih životinja, a najčešći izvori su primarni (kostna srž i timus) i sekundarni (slezina i limfni čvorovi) limfoidni organi, periferna krv i telesne duplje.

U imunološkim istraživanjima, najčešće se analiziraju uticaji bioaktivnih supstanci na efektorske ćelije imunskog sistema (limfociti) i antigen-prezentujuće ćelije (APĆ). U dosadašnjim istraživanjima koja se odnose na BanLec pažnja je uglavnom posvećena njegovom uticaju na funkcionalne karakteristike limfocita (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008; Stojanović *et al.*, 2010; Sansone *et al.*, 2017), dok uticaj BanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike APĆ nije dovoljno analiziran.

APĆ predstavljaju važan deo sistema urođene imunosti i imaju ključnu ulogu u iniciranju i oblikovanju adaptivnog imunskog odgovora. Ispitivanju uticaja bioaktivnih supstanci na funkcionalne karakteristike APĆ najčešće obuhvataju testiranja u kulturama makrofaga i DĆ. U okviru ove doktorske teze, kako bi se stekao što bolji uvid u imunomodulatorni potencijal BanLec-a, urađena je *in vitro* analiza efekata rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike peritonealnih makrofaga i DĆ slezine.

1.2.1 Makrofagi

Makrofagi predstavljaju veoma heterogenu grupu ćelija u pogledu morfologije, funkcionalnih i fenotipskog karakteristika (Gordon & Taylor 2005; Cassado *et al.*, 2015). Funkcionalne karakteristike makrofaga zavise od karakteristika njihove mikrookoline, ali i prethodnog „imunološkog iskustva“ (Mosser, 2003; Cassado *et al.*, 2011; Sica & Maniovani, 2012; Martinez & Gordon, 2014). Makrofagi imaju sposobnost da prepoznaju, fagocituju i eliminišu patogene, i na taj način, kao deo sistema urođene imunosti, obezbeđuju prvu liniju odbrane od patogenih mikroorganizama. Pored toga, makrofagi, zbog sposobnosti da adekvatno prezentuju antigene efektorskim ćelijama imunskog sistema, imaju bitnu ulogu u pokretanju i oblikovanju adaptivnog imunskog odgovora (Hume 2008).

Makrofagi su prisutni u gotovo svim tkivima u organizmu i u fiziološkim uslovima čine oko 10% ukupne populacije ćelija u tkivu (Italiani & Boraschi, 2014). Makrofagi prisutni u tkivima pod fiziološkim uslovima nazivaju se rezidentni makrofagi i imaju tkivno-specifične fenotipske i funkcionalne karakteristike (Gordon & Taylor, 2005). Rezidentni makrofagi imaju važnu ulogu u imunološkom nadzoru, održavanju lokalne homeostaze i u pokretanju odgovarajućeg imunskog odgovora na patogene. Lokalna zastupljenost makrofaga i dominantne funkcione karakteristike se značajno menjaju tokom procesa inflamacije. Prisutni medijatori inflamacije utiču na same rezidentne makrofage ali i iniciraju influks monocita iz cirkulacije koji se potom, pod uticajem specifičnog mikrookruženja, lokalno diferenciraju u makrofage (Davies & Taylor, 2015).

1.2.1.1 Aktivacija i polarizacija makrofaga

Prema fenotipskim i funkcionalnim karakteristikama makrofagi se razvrstavaju na dva tipa označena kao M1 i M2. Na osnovu solubilnih medijatora koje proizvode, M1 makrofagi se smatraju proinflamatornim makrofazima dok su M2 makrofagi označeni kao anti-inflamatorni (Mills *et al.*, 2000). U realnosti, M1 i M2 makrofagi predstavljaju krajnje

tačke širokog spektra kombinacija fenotipskih i funkcionalnih karakteristika (Mosser & Edwards, 2008).

Generalno je prihvaćeno da način aktivacije određuje put diferencijacije makrofaga, ali je takođe poznato da ishod specifične aktivacije ne mora biti jednoznačan nego zavisi i od genetske osnove i prethodnog imunološkog iskustva makrofaga. Klasična aktivacija makrofaga, što podrazumeva stimulaciju preko TLR u inflamatornom miljeu (prisustvo IFN- γ), rezultuje diferencijacijom u M1 makrofage (Mosser, 2003; Mills *et al.*, 2000; Guangwei & Yanh, 2013). Sa druge strane, stimulacija makrofaga (a) citokinima iz Th2 spektra (interleukin (IL)-4, IL-13, IL-33; tzv. alternativni putevi aktivacije), (b) simultano preko Fc γ R (imunokompleksi) i TLR (tzv. tip II aktivacije), ili (c) u prisustvu regulatornih citokina, rezultuje diferencijacijom makrofaga u neki od funkcionalnih oblika iz M2 spektra (Manitova *et al.*, 2002, Martinez & Gordon, 2014). Stoga se danas, u terminološkom smislu, pojam M2 makrofagi ne odnose na karakterističan put aktivacije već označava heterogenu grupu funkcionalno sličnih makrofaga

Klasičan put stimulacije makrofaga je posredovan TLR-ovima koji specifično interaguju sa evoluciono očuvanim molekulskim obrascima (*engl.* pathogen associated molecular patterns; PAMP) mikroorganizama. Vezivanje bakterijskih antigena poput lipopeptida ili lipopolisaharida (*engl.* lipopolysaccharide; LPS) za TLR2 ili TLR4, pokreće produkciju ROS i RNS, sekreciju proinflamatornih citokina (IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6) i povećava antigen prezentujući kapacitet makrofaga (West *et al.*, 2011). Ovako aktivirani makrofagi pripadaju tipu M1 makrofaga i doprinose uspostavljanju Th1 adaptivnog imunskog odgovora. Obzirom na sposobnosti da sekretuju anti-mikrobne molekule (ROS i RNS) i doprinesu uspostavljanju zapaljenskog procesa, M1 makrofagi imaju značajnu ulogu u odbrani organizma od patogena (Jakobi & Petry, 2008), ali i u etiopatogenezi hroničnih inflamatornih bolesti i oštećenjima tkiva nastalim usled dugotrajnih zapaljenskih procesa (Farache *et al.*, 2013; Yan-Cun *et al.*, 2014).

Sa druge strane, aktivacija M2 makrofaga najčešće je posledica gljivičnih i parazitskih infekcija (Herbert *et al.*, 2004), ali do nje mogu dovesti i imunokompleksi (Martinez & Gordon, 2014). M2 makrofage odlikuje dominantna sekrecija anti-inflamatornih citokina, regulatornih (IL-10 i TGF- β) i citokina Th2 spektra (IL-4, IL-13), i

pojačana aktivnosti enzima arginaze (Munder *et al.*, 1998; Porcheray *et al.*, 2005). Veliki broj istraživanja je pokazao da su M2 makrofagi glavni učesnici u procesu rezolucije inflamacije (Meurs *et al.*, 2003). Jedan od sinonima koji se često koristi za označavanje M2 makrofaga je reparativni makrofagi jer oni imaju važnu, pozitivnu, ulogu u procesu reparacije tkiva i zarastanja rana (Meurs *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2000; Mosser & Edwards, 2008). U osnovi pozitivne uloge M2 makrofaga je pojačana aktivnost arginaze, enzim koji učestvuje u metabolizmu L-arginina konvertujući ga do uree i ornitina. Urea i ornitin su polazni molekuli u sintezi prolina i poliamnina, molekula koji učestvuju u procesu ćelijske deobe i reparacije tkiva (Meurs *et al.*, 2003, Pesce *et al.*, 2009).

1.2.1.2 Peritonealni makrofagi

U *in vitro* testiranjima koja se odnose na ispitivanje uticaja bioaktivnih supstanci na funkcionalne karakteristike makrofaga najčešće se, kao model sistem, koriste peritonealni makrofagi. Glavni razlog upotrebe peritonealnih makrofaga kao model sistema je jednostavan postupak njihovog izolovanja koji omogućava dobijanje vijabilnih makrofaga u visokom prinosu. Zahvaljujući univerzalnoj sposobnosti makrofaga da adheriraju na plastiku, tokom postupka izolovanja može se u velikoj meri ukloniti frakcija peritonealnih ćelija koje nemaju sposobnosti adhezije (B i T limfociti, dendritične ćelije, eozinofili, mast ćelije, neutrofilni i NK ćelije) i na taj način dobiti ćelijska suspenzija koju dominantno čine makrofagi (>95%)(Donnelly *et al.*, 2005).

Peritonealni makrofagi predstavljaju heterogenu populaciju čije dominantne fenotipske i funkcionalne karakteristike zavise od mikrookruženja u kome se nalaze neposredno pre izolovanja (Ghosn *et al.*, 2010). Radi lakšeg izučavanja peritonealni makrofagi se razvrstavaju na različite načine.

Zavisno od „imunološkog iskustva“ neposredno pre izolovanja, peritonealni makrofagi se klasifikuju na rezidentne i inflamatorne makrofage. Rezidentni peritonealni makrofagi (RM) predstavljaju populaciju makrofaga koja je prisutna u peritonealnoj šupljini pod fiziološkim uslovima. Inflamatorni peritonealni makrofagi predstavljaju populaciju makrofaga izolovanu iz peritonealne šupljine u kome se odigrava zapaljenski proces (Cassado *et al.*, 2011). Značajan deo inflamatornih peritonealnih makrofaga potiče

od monocita iz cirkulacije koji su, privučeni medijatorima inflamacije, naselili peritonealnu šupljinu i tu se, pod uticajem lokalnog miljea, diferencirali u makrofage. Najčešće primenjivan eksperimentalni pristup za pokretanje zapaljenskog procesa u peritonealnoj šupljini zasniva se na jednokratnom intraperitonealnom injektovanju sterilnog vodenog rastvora tioglikolata (Hoover & Nacy, 1984). Time se pokreće zapaljenski proces tokom koga dolazi do promena u lokalnom citokinskom miljeu i do promena u zastupljenosti i funkcionalnim karakteristikama određenih ćelijskih populacija. Brojne analize fluktuacija u zastupljenosti makrofaga u peritonealnoj šupljini miša nakon injekcije tioglikolata pokazale su da su makrofagi procentualno najzastupljeniji četvrtog dana od indukcije zapaljenskog proces (Ghosn *et al.*, 2010). Makrofagi koji se tada sakupljaju označavaju se kao tioglikolat-*indukovani makrofagi* (engl. thioglycollate-elicited macrophages; TGM) i predstavljaju jedan od najčešćih modela inflamatornih makrofaga.

Prema morfološkim karakteristikama, peritonealni makrofagi miša su podeljeni u dve grupe: veliki (VPM) i mali (MPM) peritonealni makrofagi (Ghosn *et al.*, 2010). Pored razlike u veličini, uočene su i značajne funkcionalne razlike između VPM i MPM. U poređenju sa VPM, MPM generalno odlikuje bolja responsivnost na proinflamatornu stimulaciju, ali im se, kao i VPM, teško može pripisati specifičan tip odgovora. Ghosn i saradnici (2010) su pokazali da VPM predstavljaju dominantnu populaciju u pulu rezidentnih makrofaga, dok veći deo inflamatornih makrofaga ima karakteristike MPM.

Zbog lakoće dobijanja, uprkos dokumentovanim tkivno-specifičnim razlikama, peritonealni makrofagi se koriste i kao model sistem i u istraživanjima koja se odnose na tkiva van peritonealne duplje. Rezultati dobijeni na peritonealnim makrofagima predstavljaju važne smernice u tim istraživanjima ali njihova ekstrapolacija na procese u konkretnim ciljnim tkivima mora biti rađena sa oprezom. U istraživanjima koja se odnose na imunski odgovor u gastrointestinalnom traktu, tačnije u crevu, peritonealni makrofagi su često korišćen model sistem i to ne samo zbog lakoće njihovog izolovanja već i zbog njihove značajne uključenosti u uspostavljanju lokalnog imunskog odgovora u crevu. Literaturni podaci potvrđuju intenzivnu ćelijsku komunikaciju između peritonealne šupljine i mukoze gastrointestinalnog trakta (Jones *et al.*, 2014). Pokazano je da makrofagi

peritonealne šupljine, privučeni od strane lokalnih inflamatornih stimulusa, migriraju u debelo crevo i tamo aktivno učestvuju u imunskom odgovoru protiv patogena (Fraga-Silva *et al.*, 2013). Pretpostavlja se, obzirom na anatomsku bliskost, da i u fiziološkim uslovima jedan deo ukupnog pula makrofaga u mukozni creva vodi poreklo iz peritonealne šupljine.

1.2.2 Dendritske ćelije (DĆ)

DĆ predstavljaju glavne APC u organizmu. One čine svega 1% ukupnog broja ćelija u organizmu ali su prisutne skoro u svim tkivima u organizmu. Slično makrofagima, DĆ su veoma heterogena grupa ćelija u pogledu porekla, morfologije, stupnja zrelosti, funkcionalnih i fenotipskih svojstava. Prisutne su u skoro svim tkivima u organizmu, a njihove specifične karakteristike zavise od mikrookoline (tip tkiva, citokinski milje) (Shortman & Naik, 2007). Zbog velike plastičnosti danas ne postoji jedinstvena klasifikacija DĆ. Jedna od podela DĆ koja se najčešće koristi, a koja izuzima ontogenetsko poreklo i prvenstveno se bazira na funkcionalnim razlikama, je na klasične DĆ (kDĆ) i plazmocitoidne DĆ (pDĆ) (Wu & Dakic, 2004; Karsunky *et al.*, 2005).

kDĆ se nalaze u nelimfoidnim i limfoidnim tkivima. U okviru kDĆ, razlikuju se dve podgrupe definisane na osnovu ekspresije CD8 α i CD11b molekula. CD11c^{hi}CD11b^{-/low}CD8 α ⁺MHCII⁺ se mogu naći isključivo u limfoidnim organima dok su CD11c^{hi}CD11b⁺CD8 α ⁻MHCII⁺ DĆ šire rasprostranjene u organizmu i nalaze se kako u limfoidnim tako i u nelimfoidnim tkivima (Shortman & Liu, 2002). Lokacija kDĆ u organizmu je takva da im omogućava efikasnu detekciju stranih antigena (tkivo gde infekcija počinje, marginalna zona slezine), a konstitutivno imaju visok kapacitet prezentacije antigena (Vremec *et al.*, 2000). kDĆ imaju važnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora na strane antigene koji prodru u tkivo kao i u uspostavljanju tolerance ka antigenima samog organizma (Merad *et al.*, 2013).

pDĆ se uglavnom nalaze u cirkulaciji i sa krvotokom ulaze u limfoidne organe. U poređenju sa kDĆ, konstitutivno ekspimiraju manje MHCII, kostimulatornih molekula i TLR-a. Nakon aktivacije TLR-ova povećava im se antigen-prezentujući potencijal i

proizvode interferone tipa I u velikoj količini. Generalno, proinflamatorni stimuli imaju značajnu ulogu u oblikovanju (Shortman & Naik, 2007) fenotipskih i funkcionalnih karakteristika pDC.

DC predstavljaju jednu od veza urođenog i adaptivnog imunskog odgovora. U poređenju sa drugim APC, DC imaju jedinstvenu sposobnost da aktiviraju naivne CD4⁺ i CD8⁺ T limfocite. Osim T limfocita, DC su neophodne i za aktivaciju B limfocita i pokretanje humoralnog imunskog odgovora. Kao i ostale ćelije urođene imunosti, DC karakteriše ekspresija PAMP-specifičnih receptora pomoću kojih prepoznaju mikroorganizme što dovodi do pokretanja intracelularnih signalnih kaskada koje kao krajnji ishod imaju sekreciju citokina. Produkovani citokini doprinose aktivaciji naivnih T limfocita specifičnih za prezentovane antigene što je praćeno klonskom ekspanzijom, i diferencijacijom u efektorske Th1, Th2 ili Th17 ćelije.

1.2.2.1 DC slezine

Veliki napredak u izučavanju DC napravljen je definisanjem uslova za njihovo *in vitro* generisanje iz prekursora iz periferne krvi ili kostne srži, *in vitro* kultivaciju kao i pojavom komercijalno dostupnih reagenasa na bazi monoklonskih antitela koji omogućavaju sortiranje DC iz prirodnog izvora.

DC izolovane iz slezine se često koriste u *in vitro* ispitivanjima jer ih je moguće relativno jednostavno izolovati u zadovoljavajućem prinosu. kDC su najzastupljenije DC u slezini miša (Hey *et al.*, 2012). U slezini CD11c^{hi}CD11b⁺CD8 α -MHCII⁺ DC čine približno 75% od ukupnih kDC (Wu & Dakic, 2014) i lokalizovane su dominantno u marginalnoj zoni (Merad *et al.*, 2013). CD11c^{hi}CD11b^{-/low}CD8 α +MHCII⁺ DC su, kako u slezini tako i u drugim limfoidnim organima, lokalizovane u T-ćelijskim zonama. Nakon prepoznavanja antigena i aktivacije PAMP-specifičnih receptora CD11c^{hi}CD11b⁺MHCII⁺ kDC slezine migriraju do T ćelijske zone, prezentuju antigene naivnim T limfocitima i direktno učestvuju u procesu njihove aktivacije i diferencijacije u odgovarajuće efektorske ćelije. Međutim, postoje oprečna mišljenja o funkcionalnoj specijalizaciji ovih kDC. CD11c^{hi}CD11b⁺MHCII⁺ DC, zavisno od vrste i intenziteta inicijalnog signala, mogu da

pokrenu adaptivni imunski odgovor različitih karakteristika favorizujući diferencijaciju efektorskih T ćelija ka određenom Th profilu (Th1, Th2, Th17, Treg) (Maldonado-Lopez *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008).

1.3 Gastrointestinalni trakt kao deo imunskog sistema

Gastrointestinalni trakt (GIT) čini niz organa čija je osnovna fiziološka funkcija ingestija hrane i resorpcija nutrijenata. Pored ove funkcije, GIT je i deo imunskog sistema. Jednoslojni epitel koji oblaže lumensku površinu creva predstavlja dinamičku barijeru koja reguliše preuzimanje nutrijenata, minerala i vode, ali je i imunološki aktivan. Ispod crevnog epitela, nalazi se sloj vezivnog tkiva, *lamina propria* (LP), bogat limfnim i krvnim sudovima ali i ćelijama imunskog sistema organizovanim u limfoidne folikule (Mowat & Agace, 2014).

Crevni epitel i njemu pridruženo limfoidno tkivo (engl. gut-associated lymphoid tissue; GALT), kao deo imunskog sistema, imaju važnu ulogu u odbrani organizma od patogena (Peterson & Artis, 2014). Pored toga, GIT je svakodnevno u dodiru sa milionima bioaktivnih supstanci, kako onih poreklom iz hrane tako i onim produkovanim od strane crevne mikrobiote koja nastanjuje GIT u fiziološkim uslovima (Worbs *et al.*, 2006; Round & Mazmanian, 2009). Aktivnost lokalnog imunskog sistema ima centralnu ulogu u kompleksnom mehanizmu održavanja homeostaze unutar samog GIT-a ali i celog organizma.

1.3.1 Imunska homeostaza u gastrointestinalnom traktu

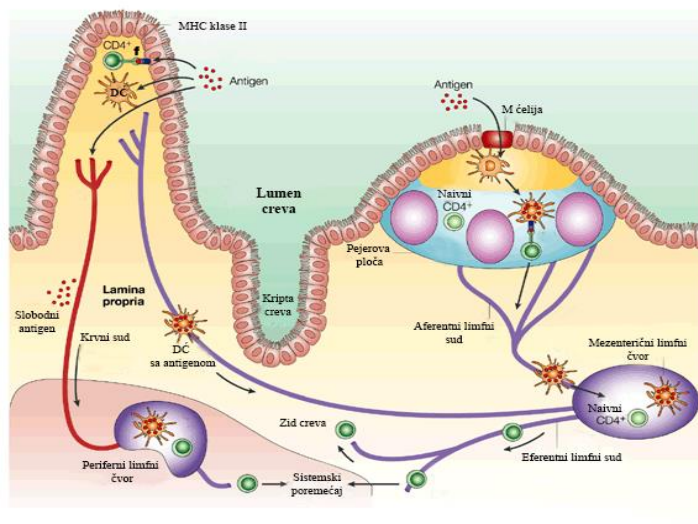
U sredini bogatoj mikroorganizmima, urođeni imunski sistem u mukozi creva obezbeđuje prvu liniju odbrane od patogena (Round & Mazmanian, 2009). Urođena imunost je od ključne važnosti kako za neposredno uklanjanje infektivnih agenasa tako i za pokretanje i oblikovanje lokalnog adaptivnog imunskog odgovora. Najvažnije komponente sistema urođene imunosti u GIT-u su epitelne ćelije i APC iz LP koje na svojoj

površini u manjoj ili većoj meri eksprimiraju PAMP-specifične receptore poput TLR (Santaolalla & Abreu, 2012). TLR su inducibilno ili konstitutivno eksprimirani na svim ćelijama urođene imunosti u mukozi GIT-a poput profesionalnih APĆ (makrofagi i DĆ), intestinalnim epitelnim ćelijama (enterociti, Panetove ćelije, peharaste ćelije) i M ćelijama (Abreu *et al.*, 2005). U fiziološkim uslovima, TLR2 i TLR4 su konstitutivno eksprimirani na epitelnim ćelijama tankog i debelog creva ali u jako malim količinama. Niska ekspresija ovih receptora, predstavlja jedan od mehanizama imunskog sistema kojim se sprečava pokretanje zapaljenske reakcije usled stimulacije komensalnim mikroorganizmima koji na sebi nose ligande za TLR2 i TLR4 (Tomasello *et al.*, 2013).

S obzirom na kontinuirani fizički kontakt sa komensalnom mikroflorom, intestinalne epitelne ćelije se smatraju ključnom modulatornom komponentom imunskog odgovora u crevima. Epitelne ćelije prepoznaju mikroorganizme preko svojih PAMP-specifičnih receptora, a rezultat ovih interakcija je sekrecija citokina, hemokina i humoralnih faktora koji učestvuju u inicijaciji i polarizaciji imunskog odgovora (Peterson & Artis, 2014).

Intestinalne DĆ su, na osnovu funkcionalnih karakteristika, grubo podeljene na proinflamatorne i anti-inflamatorne / regulatorne (Coombes & Powrie, 2008). Proinflamatorne DĆ pored MHCII i CD11c molekula eksprimiraju i CD11b i hemokinski receptor CX₃CR1 (MHCII⁺CD11c^{hi}CD11b⁺CX₃CR1⁺CD8α⁻CD103⁻). Anti-inflamatorne / regulatorne intestinalne DĆ (MHCII⁺CD11c^{hi}CD11b^{-/low}CX₃CR1⁻CD8α⁺CD103⁺) odlikuje ekspresija CD103 i uglavnom eksprimiraju CD8α, dok je ekspresija CD11b ili jako niska ili potpuno izostaje (Stagg *et al.*, 2003). CX₃CR1⁺CD11b⁺CD11c⁺ DĆ su lokalizovane u LP, odmah ispod crevnog epitela, i vrše kontinuirani imunski nadzor uzorkujući antigene iz lumena creva (**Slika 1.2**, Mowat, 2003). Nakon što prepoznaju patogen, one migriraju do regionalnih limfnih čvorova, prezentuju antigene naivnim T limfocitima i u citokinskom miljeu koji generišu (dominantno IL-12/23) usmeravaju diferencijaciju T ćelija u Th1 / Th17 pravcu. Efektorski Th1 i Th17 limfociti iz drenirajućih mezenteričnih limfnih čvorova migriraju do mesta prodora mikroorganizama u LP, direkto ili posredstvom medijatora, učestvuju u eliminaciji patogena (Mowat, 2003, Peterson *et al.*, 2014). Istovremeno sa aktivacijom T limfocita, u regionalnim limfnim čvorovima dolazi i do

aktivacije i diferencijacije B ćelija u plazma ćelije koje sekretuju IgA. IgA je najzastupljenija klasa imunoglobulina prisutna na mukoznim površinama i predstavlja glavni činilac protektivnog lokalnog humoralnog imunskog odgovora (Mantis *et al.*, 2011).



Slika 1.2. Prikaz imunske reakcije u debelom crevu pokrenute stranim antigenom (Mowat, 2003)

Pod fiziološkim uslovima, aktivnost efektorskih Th1 i Th17 limfocita fino je regulisana različitim mehanizama koji sprečavaju razvoj prekomerne zapaljenske reakcije. U odgovoru na komensalne mikroorganizme, CD103⁺ DC⁺ proizvode IL-10 koji, zajedno sa TGF- β čini citokinsku osnovu regulatornih mehanizama u crevnoj mukozi (del Rio *et al.*, 2010). Najvažnija funkcija CD103⁺ DC⁺ je promocija diferencijacije naivnih T limfocita u FoxP3⁺regulatorne T limfocite (Treg), glavne imunosupresivne ćelije u crevima. Osim direktnog imunosupresivnog dejstva, Treg posredno regulišu imunski odgovor kroz produkciju IL-10 i TGF- β (Coombes *et al.*, 2007). Pored DC⁺ i Treg, makrofagi koji se nalaze u LP predstavljaju značajan izvor IL-10 i TGF- β .

Prisustvo brojnih regulatornih / imunosupresivnih mehanizama omogućava održavanje homeostaze u crevima ali u pojedinim slučajevima njihov kapacitet je nedovoljan i, usled različitih endogenih i egzogenih faktora, dolazi do razvoja zapaljenskog procesa koji može zadobiti i hronični karakter.

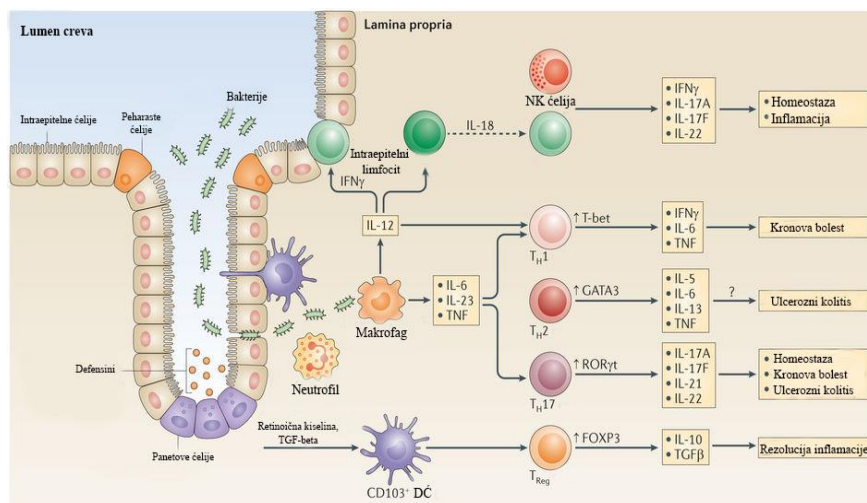
1.3.2 Zapaljenske bolesti creva

Zapaljenske bolesti creva (*engl.* Inflammatory Bowel Disease, IBD) predstavljaju grupu oboljenja GIT-a u čijoj osnovi leži hronična zapaljenska reakcija koja dovodi do masivnog oštećenja i nepravilnog funkcionisanja epitelne barijere (Baumgart, 2007). Iako su poslednjih godina IBD predmet velikog interesovanja i intenzivnog izučavanja, patogeneza ovih bolesti još uvek nije u potpunosti poznata. Etiologija IBD je multifaktorijalna, a faktori koji se dovode u vezu sa razvojem IBD-a su genetska predizpozicija jedinke, sastav komensalne mikroflore i faktori životne sredine (Loddo & Romano, 2015). Veruje se da je ova grupa bolesti prvenstveno posledica savremenog načina života, a u prilog tome ide činjenica da je incidenca IBD najveća u Evropi i Severnoj Americi. Smatra se da oko dva milion ljudi ima neki od oblika IBD-a, a da se svake godine u proseku registruje 70 000 novih slučajeva IBD-a u Severnoj Americi. Na žalost, godišnja incidenca pojave IBD-a beleži konstantn porast u čitavom svetu (Kaplan, 2015).

Kod ljudi su opisane dve forme IBD-a, Kronova bolest (*engl.* Crohn's Disease, CD) i ulcerozni kolitis (*engl.* Ulcerative colitis, UC). CD i UC se karakterišu različitim kliničkim slikama kao i histopatološkim i endoskopskim nalazima. CD se definiše kao granulomatozno oboljenje u kome se zapaljenje proteže kroz mukozni i submukozni sloj (transmuralna inflamacija), a pored debelog creva zahvata i delove tankog creva (Xavier & Podolsky, 2007). Za razliku od CD, kod UC inflamacija se zadržava na mukoznom sloju i ne prodire dublje, a patološke promene zahvataju samo mukozu debelog creva. Simptomi oba stanja su slični i podrazumevaju bol i grčeve u predelu abdomena, dijareju, rektalno krvarenje, gubitak telesne težine i porast telesne temperature. Stopa smrtnosti od CD i UC u proseku iznosi 17 % godišnje od ukupnog broja registrovanih pacijenata (Wolters *et al*, 2006).

Osnovna karakteristika ovih oblika IBD-a je narušena imunska homeostaza u digestivnom traktu usled poremećenog imunskog odgovora usmerenog ka komensalnoj mikroflori i drugim lokalno prisutnim antigenima (Round & Mazmanian, 2009). Smatra se da ovaj disbalans nastaje usled narušene ravnoteže u aktivnosti Th1, Th2 i Th17 subpopulacija T limfocita (**Slika 1.3**). Veliki broj istraživanja koja se odnose na IBD

ukazuju da je CD posledica prekomernog odgovora Th1 tipa, dok je UC primarno povezan sa dominacijom Th2 imunskog odgovora (Neurath, 2014). Patogeneza CD-a se sve češće dovodi i u vezu sa prekomernom aktivnošću Th17 limfocita. IL-17 i IL-23 koje proizvode Th17 limfociti smatraju se odgovornim za održavanje zapaljenskog procesa koji zadobija hronični tok (Brand, 2009).



Slika 1.3. Prikaz imunološkog miljea koji doprinosi razvoju Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa (Neurath, 2014).

Istraživanja sprovedena u poslednjih par godina ističu da narušena ravnoteža aktivnosti komponenti urođene imunosti takođe ima bitnu ulogu u indukciji / propagaciji zapaljenske reakcije u GIT-u (Yi-Zhen & Yong-Yu, 2014). Ne mali broj istraživanja pokazuje da, u sklopu zapaljenskog procesa koji se odvija, dolazi do porasta lokalne koncentracije ROS i RNS što pokrenuti patološki proces dodatno ubrzava. Konačno, pokazano je da ćelije epitela creva zahvaćenog inflamacijom eksprimiraju više TLR u poređenju sa ekspresijom u fiziološkim uslovima, čime se povećava njihova responsivnost na stimulaciju komensalnom florom.

1.3.3 Eksperimentalni modeli zapaljenskih bolesti creva

Poslednjih decenija, veliki doprinos identifikaciji etioloških faktora, shvatanju mehanizama patogeneze koji se nalaze u osnovi IBD-a i razvoju pristupa za prevenciju / tretman IBD-a dala su istraživanja na različitim životinjskim modelima (Boismenu & Chen, 2006). Iako ni jedan model ne može u potpunosti da simulira kompleksnost ove bolesti kod čoveka svaki model omogućava značajan uvid u neki od aspekata bolesti. Ispitivanja patofizioloških mehanizama i imunskih procesa koji leže u osnovi hroničnog zapaljenja crevne mukoze najviše su rađena na mišjim modelima (Goyal *et al.*, 2014).

Modeli IBD-a na životinjama se klasifikuju u četiri grupe, zavisno od načina na koji se bolest izaziva:

- 1) model spontanog kolitisa
- 2) model kolitisa na genetski modifikovanim životinjama
- 3) model kolitisa indukovani adoptivnim transferom ćelija
- 4) model hemijski indukovanog kolitisa

Model spontanog kolitisa. Spontani kolitis karakteriše poremećena arhitektura mukoze, nastala usled prekomernog zapaljenja sa hroničnim tokom koje nije indukovano ni jednim spoljnim faktorom. Kolitis se spontano razvija u nekoliko prirodno mutiranih sojeva miševa kao što su SAMP1/YitFc i CH3/HeJBir. Ovi modeli spadaju među najrelevantnije eksperimentalne sisteme za izučavanje mehanizma nastanka CD (Boismenu & Chen, 2006; Prattis & Jurjus, 2015).

Model kolitisa na genetski modifikovanim životinjama. U ispitivanjima kolitisa koristi se nekoliko transgenih sojeva miševa. U ovim modelima bakterijska flora je bitan faktor u razvoju bolesti jer miševi odgajani u sterilnim uslovima ne razvijaju kolitis. Primer ovog modela su životinje sa deficijencijom gena za citokin IL-10, koje razvijaju hronični transmuralni kolitis jako sličan CD kod ljudi (Goyal *et al.*, 2014). Model se zasniva na pretpostavci da je IL-10 bitan regulatorni faktor neophodan za kontrolu zapaljenske reakcije. Zapaljenski proces u ovom modelu je hroničnog tipa što ga čini pogodnim za ispitivanja fokusirana na hronični oblik IBD-a (Boismenu & Chen, 2006).

Model kolitisa indukovano adoptivnim transferom ćelija. Jedan od često korišćenih modela IBD-a zasniva se na indukciji bolesti putem adoptivnog transfera CD4⁺CD45RB^{high} T ćelija iz singenih donora u imunodeficientne životinje. Pokazano je da adoptivni transfer T limfocita izolovanih iz LP tankog ili debelog creva miševa kod kojih je prethodno indukovano kolitis, u SCID (*engl.* severe combined immunodeficiency) ili *Rag1*^{-/-} (*engl.* recombination activation gene 1) deficijntnim životinjama takođe dovodi do razvoja kolitisa (Elson *et al.*, 2005).

Model hemijski indukovano kolitisa. Zapaljenje i oštećenje tkiva može biti indukovano oralnom i intrarektalnom primenom specifičnih hemijskih agenasa poput natrijum dekstran sulfata, trinitrobenzen sulfonske kiseline (*engl.* 2, 4, 6-Trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS), oksazolona, sirćetne kiseline i karagenana (Boismenu & Chen, 2006; Randhawa *et al.*, 2014). Mehanizam koji je u osnovi indukcije kolitisa u ovim modelima podrazumeva narušavanje integriteta epitelne barijere i uspostavljenje zapaljenskog odgovora na komensalnu mikrofloru i proteinske antigene nastale modifikacijom ovim hemijskih supstancama. Imunski mehanizmi nastanka kolitisa u ovim modelima su različiti i zavise od primenjenog hemijskog agensa i specifične genetske osnove soja miša u kome se indukuje bolest (Goyal *et al.*, 2014; Kiesler *et al.*, 2015). Ovi modeli se često koriste u istraživanjima koja se odnose na mehanizame nastanka CD i UC (Mizoguchi, 2012). Među ovim modelima, najčešće korišćen i najbolje opisan je model u kome se bolest indukuje primenom TNBS-a (tzv. TNBS-indukovani kolitis).

1.3.3.1 Mišji model kolitisa indukovano trinitrobenzen sulfonskom kiselinom

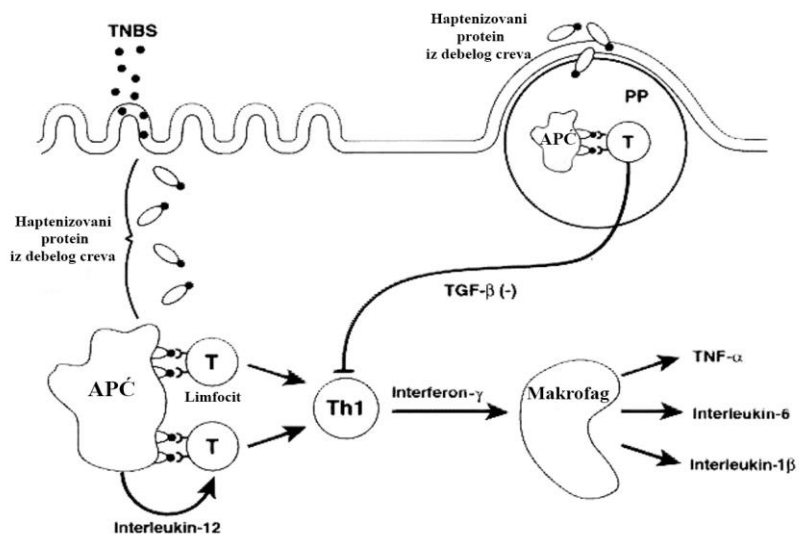
Mišji model TNBS-om indukovano kolitisa inicijalno je opisan kod miševa SJL/J soja koji su veoma podložni razvoju hroničnog zapaljenja creva sa dominantnom Th1 posredovanom patologijom (Neurath *et al.*, 1995, Kiesler *et al.*, 2015). Kasnije su opisani i modeli TNBS-om indukovano kolitisa na drugim sojevima miševa od kojih je najčešće korišćen BALB/c soj. Pokazano je da su miševi BALB/c soja posebno osetljivi na indukciju kolitisa primenom etanolnog rastvora TNBS-a.

Rektalna aplikacija rastvora TNBS-a indukuje transmuralni kolitis tj. akutno zapaljenje debelog creva praćeno kliničkom slikom koja podrazumeva progresivni

gubitak telesne težine, dijareju i krv u stolici. Obzirom da su simptomi bolesti jako slični simptomima CD kod čoveka (Neurath *et al.*, 2000, Goyal *et al.*, 2014, Kiesler *et al.*, 2015) ovaj model se koristi za izučavanje imunskih mehanizama, najčešće sa fokusom na ulogu citokina, koji su u osnovi nastanka bolesti, ali se primenjuje i za ispitivanje efikasnosti potencijalnih imunoterapeutika.

TNBS je derivat pikrinske kiseline koji, vezujući se preko trinitrofenil grupe (*engl.* trinitrophenyl group, TNP), interaguje sa proteinima domaćina i komensalne mikroflore, pri čemu nastaju kompleksi koji imaju imunogena svojstva. TNBS se aplicira rastvoren u 30-50% etanolu koji inicijalno narušava integritet crevno epitelne barijere i povećava njenu propustljivost za antigene iz lumena creva (Stober *et al.*, 1998, Scheiffele & Fuss, 2001). Aplikacija etanolnog rastvora TNBS-a dalje indukuje teško oštećenje mukoze creva jer dolazi do prekomerne aktivacije lokalno prisutnih ćelija urođene imunosti, influksa ćelija koje omogućavaju dodatnu propagaciju zapaljenske reakcije i nagomilavanja reaktivnih molekulskih vrsta u oštećenom tkivu. Imunski odgovor u debelom crevu miševa je perzistentan i pretpostavlja se da je rezultat unakrsne reakcije ćelija aktiviranih antigenima bakterijske mikroflore, što omogućava prolongiranu stimulaciju imunskog odgovora i nakon uklanjanja kompleksa TNP-proteina (Neurath *et al.*, 1995; Stober *et al.*, 1998). Generalno, intenzitet patologije i stepen preživljavanja životinja u modelu TNBS-om indukovano kolitisa zavise od soja i količine primenjenog etanola i TNBS-a (Stober *et al.*, 1998; Scheiffele & Fuss, 2001; Kiesler *et al.*, 2015). Na **slici 1.4** su prikazani imunski mehanizmi koji su, prema trenutno dostupnim podacima, u osnovi razvoja patologije u modelu TNBS-om indukovano kolitisa. Naime, nakon aplikacije TNBS-a, usled reaktivnosti njegove TNP grupe, nastaju haptinizovani proteini koji imaju imunogena svojstva i koji bivaju procesuirani od strane lokalnih APĆ. Aktivirane APĆ sekretuju IL-12 koji dalje aktivira T limfocite iz LP i usmerava njihovu diferencijaciju u Th1 pravcu, odnosno u ćelije koje produkuju IFN- γ . Ovaj citokin po principu pozitivne povratne sprege dodatno stimuliše sekreciju IL-12 od strane APĆ i tako dolazi do ekspanzije aktiviranih T limfocita. Takođe, IL-12 i IFN- γ deluju i na makrofage tako što ih stimulišu da sekretuju proinflamatorne citokine kao što su IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Konačno, novonastali inflamatorni milje dovodi do povećane infiltracije ćelija iz cirkulacije u tkivo creva čime se

dodatno amplifikuje zapaljenski proces. Sve ovo ide u prilog stavu da je kolitis indukovano TNBS-om dominantno posredovan Th1 tipom imunskog odgovora (Stober *et al.*, 1998; Goyal *et al.*, 2014; Kiesler *et al.*, 2015). Rezultati nekoliko studija pokazuju da Th17 ćelije, u poređenju sa Th1, znatno manje doprinose razvoju patologije u modelu TNBS-indukovanog kolitisa. Štaviše, IL-17A koji proizvode Th17 ćelije pokreće mehanizme koji kao krajnju posledicu imaju inhibiciju ekspresije transkripcionog faktora T-bet, glavnog regulatora produkcije IFN- γ (Becker *et al.*, 2006).



Slika 1.4. Šematski prikaz mehanizma nastanka zapaljenja u eksperimentalnom modelu TNBS-om indukovane akutne inflamacije creva (Stober *et al.*, 1998).

Krajnji rezultat TNBS-om indukovane akutne inflamacije creva je oštećenje tkiva creva (sa nekrozom tkiva kao krajnjim stupnjem) i gubitak sposobnosti resorpcije nutrijenata i vode što dovodi do pada u telesnoj težini i dijareje kod eksperimentalne životinje.

1.4 Zašto je BanLec potencijalni imunomodulator u crevima?

Poznato je da konzumiranje banane ima blagotvorno dejstvo na GIT i da se konzumiranje banana preporučuje u određenim patološkim stanjima GIT-a (Pannangpetch *et al.*, 2001, Olendzki *et al.*, 2014). Dostupni literaturni podaci pokazuju da pozitivan uticaj banane na GIT obezbeđuju visoka zastupljenost fruktooligosaharida

(deluju kao prebiotici) u plodu banane (Olendzki *et al.*, 2014) i supstance sa antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću (Mohamed *et al.*, 1994; Ighodaro, 2012). Uloga BanLec-a u GIT-u je nedovoljno proučena. Dosadašnja istraživanja koja potvrđuju sposobnost nBanLec / rBanLec da stimuliše izbalansiran proinflamatorni imunski odgovor i koja potvrđuju njegovu stabilnost u gastrointestinalnom traktu, sposobnost interakcije sa crevnim epitelom i prolaz kroz epitelnu barijeru ukazuju da bi BanLec mogao imati pozitivnu ulogu u modulaciji lokalnog imunskog odgovora u crevima. Takođe, činjenica da može biti proizveden kao rekombinantni protein, u velikoj količini i sa jasno definisanim svojstvima, omogućava da se, ukoliko se njegovi pozitivni efekti potvrde, koristi kao funkcionalan dodatak hrani, u profilaktičke i terapijske svrhe.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita imunomodulatorno / imunostimulatorno dejstvo rBanLec-a u mukozni debelog creva miševa BALB/c soja u fiziološkim i patološkim uslovima. Kako bi se ostvario navedeni cilj, planirano je da se eksperimentalni deo realizuje u tri faze čiji su pojedinačni ciljevi:

1. da se ispita imunomodulatorno dejstvo rBanLec-a na funkcionalne karakteristike APC

U okviru ove faze planirano je da se ispita sa kojim molekularnim strukturama APC interaguje rBanLec i, koristeći peritonealne makrofage i DC iz slezine BALB/c miša kao *in vitro* model sisteme, utvrdi kakav je funkcionalni ishod stimulacije APC-a rBanLec-om.

2. da se ispita uticaj rBanLec stimulacije na karakteristike lokalnog imunskog odgovora u debelom crevu BALB/c miša pod fiziološkim uslovima

U okviru ove faze planirano je da se ispita dinamika kretanja rBanLec-a kroz tkivo debelog creva i na koji način jednokratna primena rBanLec-a utiče na aktivnost lokalnog imunskog sistema u debelom crevu tj. kakav je funkcionalni ishod lokalne stimulacije rBanLec-om.

3. da se ispita efikasnosti profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a u modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša

U okviru ove faze planirano je da se efikasnost profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a procenjuje na osnovu opšteg stanja eksperimentalnih životinja, a da se imunski mehanizam koji je u osnovi uočenih efekata rBanLec-tretmana definiše na osnovu imunoloških parametara (produkcija inflamatornih i regulatornih citokina, metabolizam ROS i RNS) koji će biti određeni u uzorcima tkiva debelog creva BALB/c miševa podvrgnutih specifičnom tretmanu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Dizajn eksperimenata

Ispitivanje uticaja rBanLec-a na funkcionalne karakteristike komponenti urođene imunosti je urađeno na peritonealnim, RM i TGM kao i na DĆ slezine BALB/c miševa.

Peritonealni i DĆ su *in vitro* stimulirani rBanLec-om u koncentracijama od 0,1, 1, 5 i 10 µg/ml. Uticaj rBanLec-a praćen je na:

- vijabilnost / proliferaciju RM i TGM testom proliferacije
- produkciju azot oksida (*engl.* nitric oxide, NO) Griess-ovim reagensom u kulturama RM i TGM
- aktivnosti mijeloperoksidaze (*engl.* myeloperoxidase, MPO) i arginaze u kulturama RM i TGM
- produkciju citokina IL-12, TNF- α , IL-10 i TGF- β u kulturama RM i TGM primenom ELISA testa
- produkciju citokina IFN- γ , IL-4, IL-10 u kulturama DĆ primenom ELISA testa
- ekspresiju gena za citokine IFN- γ , IL-4 i IL-10 u kulturama DĆ analizirano primenom *real time*-PCR metode

Analizama koje su rađene u prisustvu TLR2-, TLR4- i CD14-specifičnih monoklonskih antitela (*Western blot*, ELISA test i konfokalna mikroskopija) ispitano je da li i kako rBanLec interaguje sa TLR2, TLR4 i CD14 na makrofagima.

Da bismo ispitali učešće ovih receptora u rBanLec modulaciji funkcionalnih karakteristika makrofaga urađena je *in vitro* stimulacija RM i TGM rBanLec-om u prisustvu monoklonskih antitela koja blokiraju stimulaciju TLR2 i TLR4 i agonista ovih receptora (peptidoglikan i lipopolisaharid).

Ispitivanje vezivanja rBanLec-a za epitel debelog creva i dinamika njegove translokacije u subepitelni odeljak urađena je imunohistohemijskom analizom tkiva debelog creva BALB/c miševa uzetog u definisanim vremenskim intervalima nakon jednokratne rektalne aplikacije rBanLec-a.

Da bi se ispitao uticaja jednokratno apliciranog rBanLec-a na karakteristike lokalnog imunskog odgovora u debelom crevu BALB/c miševa, u fiziološkim uslovima, u homogenatima tkiva debelog creva određena je:

- koncentracije IgG i IgA antitela primenom ELISA testa
- koncentracija citokina IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 i IL-17A primenom ELISA testa
- aktivnost MPO (MPO test) i koncentracija NO (Griess-ovim reagensom).

Efikasnost profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a analizirana je u eksperimentalnom modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miševa. U cilju evaluacije profilaktičkog potencijala, eksperiment je dizajniran tako da su životinje jednokratno tretirane rBanLec-om 24h ili 48h pre indukcije kolitisa. Miševi su praćeni na dnevnoj bazi (težina, aktivnost, konzistencija fecesa). Uzorci debelog creva, sakupljeni 3. i 7. dana od indukcije bolesti, pripremljeni su za histološku analizu, a u homogenatima tkiva analizirana je:

- ekspresija transkripcionih faktora T-bet, GATA-3 i ROR γ t primenom *Western blot* analize
- koncentracija citokina IL-10, TGF- β , IL-12 i TNF- α primenom ELISA testa
- promene u aktivnosti MPO (MPO test) i koncentracije NO (Griess-ovim reagensom).

U cilju procene terapijskog potencijala rBanLec-a urađen je slično dizajniran eksperiment, s tim što je rBanLec primenjivan svakodnevno u određenoj dozi počev od dana indukcije kolitisa kod BALB/c miševa. U homogenatima tkiva analizirana je lokalna koncentracija citokina TNF- α i IL-10 (ELISA test), aktivnost MPO (MPO test) i koncentracija NO (Griess-ovim reagensom).

3.2 Eksperimentalne životinje

Za sve eksperimentalne procedure sprovedene na životinjama dobijena je dozvola Etičkog komiteta Instituta za virusologiju, vakcine i serume - Torlak (rešenje broj 20/2016). U ispitivanjima korišćene su ženke BALB/c miševa, starosti od 10 do 12 nedelja, težine 20 ± 2 g koje su odgajane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije u Beogradu. Životinje su imale neograničen pristup hrani i pijaćoj vodi *ad libitum*.

3.3 rBanLec

Lektin banane korišćen u ovoj disertaciji za *in vitro* i *in vivo* ispitivanja dobijen je rekombinantnom tehnologijom iz *E. coli* SG13009 [pREP4] opisanom u radu (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008). Svi rastvori rBanLec-a upotrebljeni u ovim istraživanjima testirani su na prisustvo endotoksina LAL testom (engl. Limulus Amoebocyte Lysate). Sadržaj endotoksina bio je manji od 0,5 ng/ml.

3.4 Dobijanje mišjih peritonealnih makrofaga

U *in vitro* eksperimentima najčešće se, zbog jednostavnog načina izolovanja i mogućnosti dobijanja u zadovoljavajućem prinosu, koriste peritonealni makrofagi. Oni mogu biti rezidentni ili diferencirani od monocita privučenih iz cirkulacije tokom procesa inflamacije. Rezidentni makrofagi sakupljaju se postupkom lavaže peritonealne šupljine zdravih netretiranih BALB/c miševa. Intraperitonealna injekcija tioglikolata je jedan od najčešćih eksperimentalnih postupaka koji se primenjuje za privlačenje monocita iz cirkulacije u peritonealnu šupljinu, nakon čega se ćelije skupljaju procesom peritonealne lavaže.

RM i TGM izolovani su iz intaktne peritonealne šupljine miša ili miša tretiranog intraperitonealnom injekcijom 1,5 ml 3% tioglikolata 4 dana pre žrtvovanja. Žrtvovanim

životinjama je pod aseptičnim uslovima urađena lavaža trbušne duplje sa 5 ml prethodno ohlađenog (4°C) sterilnog PBS-a. Čelijska suspenzija je centrifugirana 10 min na 300 x g, 4°C, a talog je finalno rastvoren u RPMI 1640 medijumu (*engl.* Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, USA) sa dodatkom dekomplementiranog (56°C, 30 min) FCS-a (*engl.* Fetal Calf Serum) (10%, v/v), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina i streptamicina (P/S) i 50 µM β-merkaptetanola. Broj ćelija je određen hemocitometrijski, upotrebom *Tripan Blue* rastvora.

3.4.1 Priprema ćelijskih kultura mišjih peritonealnih makrofaga

Ćelijske suspenzije RM i TGM razlivene su u ploče za gajenje ćelijskih kultura sa 24 bunara (Nunc, Germany) tako da u bunarima bude finalno 1×10^6 ćelija (1 ml 1×10^6 ćelija/ml suspenzije po bunaru). Da bi se suspenzija obogatila makrofagima, ćelije su ostavljene preko noći na inkubaciju (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti) kako bi se makrofagi adherirali za dno bunara, dok ćelije koje nemaju sposobnost adherencije za plastiku odstranile ispiranjem ploča sa toplim medijumom.

Zatim su nestimulisane ćelije i ćelije stimulisane rBanLec-om u finalnim koncentracijama od 1, 5 i 10 µg/ml u RPMI 1640/10% FCS/2 mM glutamin/100 U/ml P/S/50 µM β-merkaptetanol ostavljene na inkubaciju (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti). Nakon 48h, supernatanti stimulisanih i nestimulisanih RM i TGM su pokupljeni i zamrznuti na -70°C do upotrebe. U njima je analizirana produkcija citokina ELISA testom, opisanom u odeljku 3.21.

Za testove u kojima je odeređivana produkcija NO i aktivnosti enzima arginaze i MPO, ćelije suspenzije RM i TGM su razlivene u ploče sa 96 bunara (Nunc) (100 µl, 1×10^6 ćelija/ml suspenzije po bunaru), ostavljene preko noći na adherenciju, a nakon toga stimulisane istim koncentracijama rastvora rBanLec-a (1, 5 i 10 µg/ml). Nakon 48h inkubacije (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti) supernatanti nestimulisanih i stimulisanih RM i TGM su pokupljeni i u njima je odmah analizirana produkcija NO-a na način opisan u odeljku 3.19.

Ćelije koje su ostale zalepljene za plastiku isprane su toplim rastvorom PBS-a, centrifugirane 5 min na 250 x g, a zatim lizirane dodatkom 0,1% Triton X-100/PBS rastvora koji sadrži inhibitore proteaza (50 µl/bunaru). Ploče su inkubirane pola sata na RT a nakon toga su ćelijski lizati zamrznuti na -20°C do upotrebe u testovima aktivnosti arginaze i MPO (videti odeljak 3.6. i 3.18.).

Druga ploča od 96 bunara sa ćelijskim kulturama RM i TGM stimulisanim i inkubiranim na prethodno opisani način iskorišćena je za testove vijabilnosti i redukcije NBT-a (odeljak 3.5 i 3.7.).

3.4.2 Priprema ćelijskih kultura peritonealnih makrofaga u prisustvu anti-TLR2 i anti-CD14 blokirajućih antitela

Kulture RM i TGM (1×10^6 ćelija/bunaru, ploče za gajenje ćelijskih kultura sa 24 bunara) su 1h pre stimulacije rBanLec-om (0, 1, 5 i 10 µg/ml) inkubirane sa 20 µg/ml anti-TLR2 At (klon T2.5, Biolegend, USA) ili sa 20 µg/ml anti-CD14 At (klon M14-23, Biolegend). Za ova monoklonska At je pokazano da blokiraju signalnu transdukciju preko odgovarajućeg receptora za koji su specifični (TLR2 ili CD14). Nakon 48h inkubacije (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti) supernatanti nestimulisanih i stimulisanih RM i TGM su pokupljeni i u njima je odmah analizirana produkcija NO-a na način opisan u odeljku 3.19. Ostatak supernatanta je iskorišćen za analizu citokina opisanu u odeljku 3.21.

Takođe, kulture RM i TGM, stimulisane pojedinačno peptidoglikanom koncentracije 10 µg/ml (PEPG, agonist TLR2, Sigma) i LPS-om koncentracije 100 ng/ml (agonist TLR4/CD14, Sigma) predstavljaju pozitivne kontrole aktivacije makrofaga.

3.5 Test vijabilnosti

Vijabilnost ćelija RM i TGM nakon stimulacije rBanLec-om određena je kolorimetrijskim testom u kome je korišćen Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Sigma). Test se zasniva na sposobnosti ćelija da metabolišu tetrazolijumsko jedinjenje WST-8 ([2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfopenil)-2-tetrazolijum] transformišući

ga do obojenog formazanskog produkta. Intenziteta transformacije WST-8 proporcionalan je broju vijabilnih ćelija.

U svaki bunar mikrotitar ploče (96 bunara) sa ćelijskim kulturama stimulisanih i nestimuliranih RM i TGM dodato je po 10 μ l rastvora CCK-8. Nakon inkubacije od 4h, izmerena je apsorbancija na talasnim dužinama 450/650 nm ($A_{450/650}$) pomoću spektrofotometra (Multiskan Ascent, Finland).

Broj vijabilnih ćelija po bunaru izračunat je sa standardne krive konstruisane na osnovu apsorbancije poznatog broja ćelija. Alikvoti nestimuliranih ćelija RM i TGM korišćeni su kao standard nakon što je u njima određen broj ćelija upotrebom Tripan Blue rastvora. Vrednosti indeksa proliferacije (PI) dobijene su deljenjem broja vijabilnih ćelija po stimulisanom bunaru sa brojem vijabilnih ćelija po nestimulisanom bunaru.

3.6 Određivanje aktivnosti arginaze

Metoda za određivanje aktivnosti arginaze koja se zasniva na merenju koncentracije uree, nastale enzimskom konverzijom L-arginina, opisana je u radu Koraliza i saradnika (Corraliza *et al.*, 1994). Ukratko, u supernatante lizata nestimuliranih i stimuliranih RM i TGM dodato je 50 μ l pufera koji sadrži 10 mM $MnCl_2$ i 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 da bi se enzim aktivirao. Lizati su inkubirani 10 min na 55 °C. U sledećem koraku hidrolize arginina, 25 μ l 0,5 M L-arginina je dodato u istu zapreminu lizata i ostavljeno na inkubaciju preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena rastvorom koji sadrži H_2SO_4 , H_3PO_4 i H_2O u odnosu 1:3:7. Nastala urea je kvantifikovana kolorimetrijski dodatkom 9% α -izonitropropiofenona u apsolutnom etanolu i nakon zagrevanja na 100°C, 45 min očitana je apsorbancija na 540 nm talasne dužine. Koncentracija uree u uzorcima je izračunata preko jednačine standardne krive, konstruisane pomoću dobijenih apsorbancija rastvora uree poznatih koncentracija.

3.7 Test redukcije NBT-a

Jedna od karakteristika aktiviranih makrofaga je i produkcija ROS-a koje se mogu detektovati korišćenjem jedinjenja nitrotetrazolijum hlorida (NBT). U bunare sa stimulisanim i nestimulisanim RM i TGM dodat je NBT (Sigma) u finalnoj koncentraciji od 0,1 mg/ml (100 µl/bunaru). Nakon 4h inkubacije (37°C, 5% CO₂), reakcija je prekinuta dodatkom 100 µl 10% SDS u 10 mM HCl. Apsorbance rastvora na 580 nm (A₅₈₀) očitane su nakon prekonoćne inkubacije (37°C, 5% CO₂).

3.8 Ispitivanje vezivanja anti-TLR4 At za peritonealne makrofage u prisustvu rBanLec-a

U cilju ispitivanja uticaja različitih koncentracija rBanlec-a na vezivanje mišjih anti-TLR4 antitela za TGM urađen je ELISA test. Kao antigen u ovom testu korišćeni su mišjih peritonealni makrofagi. Naime, mikrotitar ploča (96 bunara, MaxiSorp, Nunc) nalivena je suspenzijom ćelija makrofaga u finalnoj koncentraciji od 10⁴ ćelija po bunaru. Ploča je zatim centrifugirana na 200 x g, 5 min, RT i ostavljena preko noći na inkubaciju da bi se ćelije makrofaga adherirale za dno bunara (4°C). Nakon inkubacije, ploča je zasićena 3% rastvorom proteina obranog mleka u PBS-u (200 µl/bunaru, 2h na sobnoj temperaturi), kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje i isprana PBS-om (4 x 200 µl/bunaru). U sledećem koraku dodat je rBanLec u koncentracijama 5-0,08 µg/ml pravljenim u duplim razblaženjima (50 µl/bunaru), a ploča je ostavljena na inkubaciju 1h, na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja PBS-om (4 x 200 µl/bunaru) ploča je nalivena biotinom obeleženim anti-TLR4 At u 1% BSA/PBS (5 µg/ml, 50 µl/bunaru, na 1h na sobnoj temperaturi). U bunare je dodato po 50 µl rastvora extrAvidin-alkalna fosfataza/1% BSA/PBS nakon koraka ispiranja PBS-om (4 x 200 µl/bunaru). Ploče su ostavljene 1h na sobnoj temperaturi i nakon ispranja (PBS, 4 x 200 µl/bunaru) dodat je enzimski supstrat 1 mg/ml *p*-nitrofenil fosfat za detekciju (50 µl/bunaru). Nakon prekidanja enzimske reakcije dodatkom pufera koji sadrži 0,02 M Tris i 0,005 M EDTA (50 µl/bunaru) očitavana je apsorbance na 405 nm (A₄₀₅).

3.9 Ispitivanje vezivanja rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14 u prisustvu α -metil-D-Man

Vezivanje rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14 u prisustvu monosaharida α -metil-D-Man provereno je ELISA testom. Na mikrotitar ploču (MaxiSorp, Nunc) adsorbovano je 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-TLR2, anti-TLR4 ili anti-CD14 At (eBioscience, USA) pojedinačno (50 $\mu\text{l/bunaru}$, preko noći na 4°C). Ploča je zasićene 3% rastvorom proteina obranog mleka u PBS-u (200 $\mu\text{l/bunaru}$, 2h na sobnoj temperaturi), kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje, a zatim isprana rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 $\mu\text{l/bunaru}$). U sledećem koraku, dodat je lizati TGM (50 $\mu\text{l/bunaru}$) dobijen upotrebom RIPA pufera za lizu ćelija (ThermoFisher Scientific) koji je korišćen po uputstvu proizvođača. Nakon inkubacije 1h na RT, ploča je isprana rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 $\mu\text{l/bunaru}$), a zatim na ploču je nanet biotinom obeležen rBanLec (10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{l/bunaru}$) bez ili u prisustvu 0,5 M α -metil-D-Man. Nakon 1h inkubacije na RT i koraka ispiranja (0,05% Tween 20/PBS, 4 x 200 $\mu\text{l/bunaru}$), individualne interakcije rBanLec-a sa TLR2, TLR4 ili CD14 detetovane su enzim/supstrat sistemom extrAvidin-alkalna fosfataza/*p*-nitrofenil fosfat. Reakcija je zaustavljena dodatkom pufera koji sadrži 0,02 M Tris i 0,005 M EDTA (50 $\mu\text{l/bunaru}$), a apsorbance očitavana na 405 nm (A_{405}).

3.10 Imunofluorescentno bojenje citospin preparata peritonealnih makrofaga

Rezidentni makrofagi, izolovani postupkom peritonealne lavaže opisanim u odeljku 3.4. nakon centrifugiranja na 300 x g, 10 min 4°C resuspendovani su u HBSS (*engl.* Henk's balanced salt solution) puferu (ThermoFisher Scientific) do finalne koncentracije od 1×10^5 ćelija/ml. Ova ćelijska suspenzija je korišćena za pripremu preparata na citospin centrifugi (100 μl ćelijske suspenzije po pločici, centrifugirano na 250 x g, 10 min 4°C). Ćelije su nakon centrifuge adherirane za pločice presvučene poli-L-lizinom (ThermoFischer Scientific), a preparati ostavljeni 1h na RT kako bi se osušili, zatim fiksirali 10 minuta u prethodno ohlađenom acetonu i zamrznuli na -20 do upotrebe.

Preparati su neposredno pre bojenja temperirani na RT, rehidrirani 5 min u PBS-u, i saturisani sa 3% rastvorom obranog mleka u PBS-u, 30 min na RT. Nakon saturacije, preparati su inkubirani u prisustvu anti-TLR2-FITC (Biolegend) ili anti-TLR4-FITC (Biolegend) ili anti-CD14-FITC (Biolegend) u koncentraciji od 3 µg/ml. Rastvori svih antitela pravljeni su u 3% rastvorom obranog mleka u PBS-u, a preparati inkubirani preko noći na 4°C. Nakon tri ispiranja u PBS-u, svi preparati su tretirani biotinom obeleženim rBanLec-om (3 µg/ml u 3% rastvoru obranog mleka/PBS). Pločice su inkubirane 2h na sobnoj temperaturi i nakon tri ispiranja u PBS-u, obojene streptavidin-rodaminom B (Sigma) u razblaženju od 1:60 / 3% rastvor obranog mleka/PBS. Nakon jednočasovne inkubacije na RT i ispiranja u PBS-u (3x), preparati su montirani sa medijumom za fluorescentnu mikroskopiju (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Denmark). Ovako pripremljeni preparati analizirani su na konfokalnom mikroskopu Zeiss Laser scanning system LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany), a dobijene mikrografije obrađene u programu Zeiss LSM Image Browser software.

3.11 Dobijanje mišjih splenocita

Prvi korak u izolovanju dendritičnih ćelija je dobijanje suspenzije splenocita. Nakon žrtvovanja miševa, slezine su izolovane pod aseptičnim uslovima. Suspenzija splenocita, napravljena u RPMI 1640/10% FCS/2 mM glutamin/100 U/ml P/S propuštena je kroz sterilnu mrežicu. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 10 min na 1200 rpm, 24°C. Kako bi se eritrociti uklonili iz suspenzije, talog sa ćelijama je resuspendovan u 4 ml dejonizovane vode, inkubiran 15 sekundi i nakon toga je dodato 4 ml 0,3 M NaCl u 10 % FCS/ RPMI 1640. Suspenzija sa liziranim eritrocitima je centrifugirana pod istim uslovima (10 min, 300 x g, 24°C), a ćelije su finalno resuspendovane u RPMI 1640/10% FCS/2 mM glutamin/100 U/ml P/S. Broj ćelija u suspenziji određen je hemocitometrijski, korišćenjem *Trypan blue* boje, kojom je pokazano da je više od 95% ćelija vijabilno. Dalje, suspenzija splenocita korišćena je kao polazni materijal za izolovanje DC.

3.11.1 Izolovanje DĆ slezine metodom ćelijskog sortiranja

DĆ su izolovane iz suspenzije splenocita na osnovu ekspresije markera MHCII, CD11b i CD11c. U postupku izolovanja korišćena su fluorohromom obeležena mišja monoklonska At upotrebljena prema preporuci proizvođača (eBioscience): anti-MHCII-eF450, anti-F4/80-APC, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-PE/Cy7 i anti-CD19-FITC.

Na talog suspenzije splenocita dodata su anti-CD16/32 At specifična za Fc receptore koja sprečavaju nespecifično vezivanje fluorohromom obeleženih At za ove receptore. Ćelije su nakon inkubacije 15 min na RT, isprane (300 x g, 5 min, 4°C) u hladnom PBS-u koji sadrži 2% BSA i 0,01% NaN₃. Nakon ispiranja, na talog ćelija dodata su fluorohromom obeležena At napravljena u razblaženjima po preporuci proizvođača i inkubirana 30 min na 4°C u mraku. U sledećem koraku, ćelije su isprane od viška nevezanih At hladnim rastvorom 2% BSA/ 0,01% NaN₃/ PBS (2 x 5 min, 300 x g, 4°C). Finalno je u uzorak dodata boja za detekciju mrtvih ćelija Zombie NIR (BioLegend). Nakon inkubiranja 10 min na RT u mraku i ispiranja 2 x 5 min, 300 x g, 4°C, uzorak je bio spreman za ćelijsko sortiranje.

Sortiranje DĆ je izvedeno na BD FACSAria II protočnom citometru (Becton Dickinson, SAD), a strategija gejtovanja ćelija prilikom sortiranja primenjena je na način opisan u radu Taverniera i saradnika (Tavernier *et al.*, 2015). Čistoća izolovanih MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺ DĆ je bila 95%.

3.11.2 Priprema kulture DĆ slezine

Suspenzija izolovanih DĆ slezine je nakon sortiranja centrifugirana na 300 x g, 10 min, 24°C. Ćelije su finalno resuspendovane u RPMI 1640/10% FCS/2 mM glutamin/100 U/ml P/S i razliveno u ploče za ćelijske kulture od 24 bunara, tako da u svakom bunaru bude finalno 5 x 10⁴ ćelija. Ćelije su inkubirane preko noći (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti). Sutradan su DĆ stimulisane rBanLec-om u finalnim koncentracijama od 1, 5 i 10 µg/ml u RPMI 1640/10% FCS/2 mM glutamin/100 U/ml P/S/50 µM β-merkaptotanol i ostavljene na inkubaciju (37°C, 5% CO₂, 95% vlažnosti). Nakon 48h, supernatanti

nestimuliranih i stimuliranih DĆ su sakupljeni radi analize produkcije citokina (odjeljak 3.21.), dok je u ćelije analizirana ekspresija gena za te citokine (odjeljak 3.12.).

DĆ su najpre resuspendovane u 100 µl pufera za ekstrakciju nukleinskih kiselina (Qiagen, UK), inkubirane pola sata na 42°C, a zatim centrifugirane na 3000 x g, 2 min. Nakon centrifugiranja, supernatani su izdvojeni i zamrznuti na -80°C do dalje upotrebe.

3.12 Analiza ekspresije gena za citokine

Ekspresija gena za citokine IFN-γ, IL-4 i IL-10 u DĆ analizirana je metodom lančane reakcije polimeraze (*engl.* Polymerase Chain Reaction, PCR) u realnom vremenu, *Real-time* PCR, kombinovanim sa tehnikom reverzne transkripcije (*engl.* Reverse Transcription, RT). U ovoj metodi se kao matrica za amplifikaciju specifičnog gena koristi cDNK i omogućava merenje količine PCR produkta u toku svakog ciklusa, odnosno u realnom vremenu.

3.12.1 Izolacija RNK

U cilju određivanja specifične genske ekspresije u ćeliji, najpre je neophodno izolovati intaknu RNK iz DĆ. Izolovanje molekula RNK urađena je po protokolu propisanom od strane proizvođača koristeći kit za izolovanje RNK (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Ceo postupak izolovanja i prečišćavanja RNK urađen je na koloni sa membranom koja ima sposobnost selektivne adsorpcije nukleinskih kiselina (RNA Purification column, Qiagen). U supernatane ekstrakta DĆ pripremljenih na način opisan u prethodnom odeljku nakon odmrzavanja dodata je jednaka zapremina 70% rastvora etanola (100 µl), radi grube ekstrakcije nukleinskih kiselina. Na membranu je naneto 200 µl ove smeše, koja je zatim zajedno sa mikrotubom centrifugirana na 16000 x g, 30 s, a eluat je odbačen.

Dalji korak u prečišćavanju RNK, podrazumeva tretman uzorka DNazama kako bi se oslobodili od DNK molekula. Naime, kolona sa vezanim nukleinskim kiselinama tretirana je sa 40 µl rastvora DNaza, inkubirana 15 min na RT, a zatim centrifugirana na

8000 x g, 15 s. Na kolonu je dodato 100 µl pufera za ispiranje, a zatim centrifugirana na 8000 x g, 1 min. Postupak ispiranja kolone je ponovljen još jednom. Kolona je zatim preneti na novu mikrotubu, a RNK je eluirana direktno sa membrane puferom za eluciju koji je prečišćen od RNaza. Uzorci izolovanih RNK su sačuvani na -80°C do dalje upotrebe. Prinos izolovane RNK merena je spektrofotometrijski NanoDrop 2000c (ThermoScientific).

3.12.2 Reverzna transkripcija

Reakcija reverzne transkripcije urađena je uz upotrebu kita RevertAid minus H Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) po uputstvu proizvođača. Prethodno pripremljen rastvor (5 µM oligo(dT) prajmera, 1 x reakcioni pufer, 1 mM dNTP, 20 U RiboLock inhibitora Rnaze i 200 U reverzne transkriptaze) pomešan je sa uzorkom koji sadrži RNK u jednakoj zapremini (ukupna zapremina je 20 µl). Ova reakciona smeša je inkubirana najpre na 10 min na 24°C, zatim 1h na 42°C i finalno 10 min na 70°C. Uzorak koji sadrži cDNK je zamrznut na -20°C do dalje upotrebe.

3.12.3 *Real-time* qRT-PCR

Ekspresija gena za citokine IFN- γ , IL-4 i IL-10 kvantifikovana je metoda qRT-PCR-om sa komparativnom ddCt analizom (Livak & Schmittgen, 2001). Pripremljena cDNK umnožena je u regionima ovih gena pomoću Maxima SYBR Green kit (ThermoFisher Scientific) prema uputstvima proizvođača na instrumentu Rotorgene 3000 (Corbett Research, Eight Miles Plains, Australia). Za normalizaciju ekspresije ispitivanih gena korišćen je gen za β -aktin. Parovi prajmera korišćeni za analizu prikazani su u **Tabeli 3.1**. Reakcija umnožavanja PCR produkata sastojala se od sledećih ciklusa:

50°C 2 min, 1 ciklus

95°C 5 min, 1 ciklus

95 °C 15 s -> 60 °C 30 s -> 72 °C 30 s, 40 ciklusa

Svi uzorci su rađeni u triplikatu.

Tabela 3.1. Sekvence parova prajmera korišćeni u qRT-PCR analizi.

Ciljni gen	Prajmeri
<i>Ifn-γ</i>	Forward: 5'-AGAGGATGGTTTGCATCTGGGTCA-3' Reverse: 5'-ACAACGCTATGCAGCTTGTTTCGTG -3'
<i>Il-4</i>	Forward: 5'-AGATGGATGTGCCAAACGTCCTCA-3' Reverse: 5'-AATATGCCGAAGCACCTTGGAAGCC-3'
<i>Il-10</i>	Forward: 5'-ATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG-3' Reverse: 5'-CCCAAGTAACCCTTAAATCCTGC-3'
<i>β-aktin</i>	Forward: 5'-CCCTGAAGTACCCATTGAAC-3' Reverse: 5'-CTTTTCACGGTTGGCCTTAG-3'

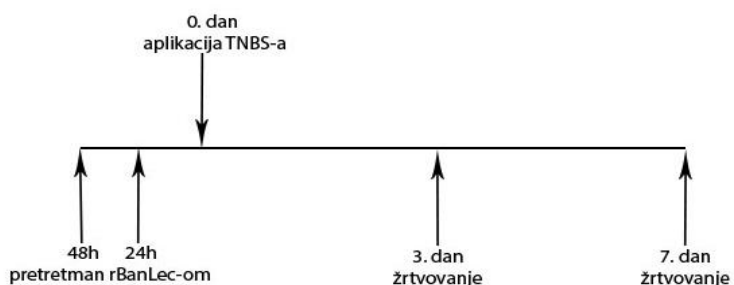
3.13 Tretman životinja rBanLec-om

U cilju ispitivanja uticaja rBanLec stimulacije na karakteristike imunskog odgovora u debelom crevu pod fiziološkim uslovima, rBanLec je jednokratno rektalno aplikovan u različitim koncentracijama. Neposredno pre tretmana rBanLec-om miševima je ukinuta hrana preko noći uz neograničeni pristup vodi (režim gladovanja). Životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina i ksilazina, a zatim im je intrarektalno apliciran rastvor rBanLec-a (doza 100 μ l) u koncentracijama od: 0,1 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 0,5 μ g rBanLec/kg telesne težine, 1 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 5 μ g rBanLec/kg telesne težine i 10 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 50 μ g rBanLec/kg telesne težine. Odgovarajući rBanLec/PBS rastvor je apliciran preko katetera dužine 4 cm. Miševi su podeljeni u četiri grupe (n = 15 miševa po grupi) u zavisnosti od količine rBanLeca koju su primili, a grupe su označene kao BL0,1, BL1, BL10 i NK (kontrolna grupa koja je primila samo PBS). Životinje su žrtvovane u vremenskim periodima od 24h, 48h i 72h nakon tretmana rBanLec-om (n = 5 miševa u svakoj vremenskoj tački), a uzorci tkiva debelog creva su sakupljeni za dalju analizu.

3.13.1 Profilaktička primena rBanLec-a

Radi ispitivanja profilaktičkog dejstva rBanLec-a na modelu TNBS-om indukovano kolitisa, rBanLec je apliciran intrarektalno u određenim vremenskim periodima pre indukcije kolitisa. Neposredno pre tretmana rBanLec-om miševi su podvrgnuti režimu gladovanja. Životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina i ksilazina, a zatim s im je intrarektalno apliciran rastvor rBanLec-a (doza 100 μ l) u koncentracijama od: 0,1 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 0,5 μ g rBanLec/kg telesne težine (grupa BL0,1), 1 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 5 μ g rBanLec/kg telesne težine (grupa BL1) i 10 μ g/ml rBanLec/PBS tj. 50 μ g rBanLec/kg telesne težine (grupa BL10). Odgovarajući rBanLec/PBS rastvor je apliciran preko katetera dužine 4 cm.

Pre tretman rBanLec-om je primenjen u dva različita vremenska intervala 24h (24BL0,1, 24BL1, 24BL10) i 48h (48BL0,1, 48BL1, 48BL10) pre aplikacije TNBS-a. Miševi su žrtvovani trećeg i sedmog dana nakon indukcije kolitisa radi sakupljanja reprezentativnih uzoraka tkiva debelog creva (n = 5 miševa po grupi po danu) (Slika 3.1).



Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna profilaktičkog tretmana rBanLec-om u modelu TNBS-om indukovano kolitisa.

3.13.2 Indukcija eksperimentalnog modela kolitisa

Pre primene TNBS-a životinje su podvrgnuti režimu gladovanja preko noći. Miševi su potom anestetizirani kombinacijom ketamina i ksilazina. Eksperimentalni model kolitisa indukovano je intrarektalnom primenom rastvora TNBS-a (Sigma) pripremljenog u 50%

etanolu (100 mg TNBS-a / kg telesne mase). Ovako pripremljan alkoholni rastvor TNBS-a primenjen je preko katetera dužine 4 cm (100 µl/dozi). Da bi se osigurala ravnomerna distribucija TNBS-a po čitavom debelom crevu, miševi su zadržani dodatnih 50 sekundi u vertikalnom položaju. Kontrolne životinje kojima je intrarektalno primenjen vodeni rastvor 50% etanola uzete su kao negativna kontrola eksperimenta, NK grupa, dok životinje koje su tretirane samo rastvorom TNBS-a bez prethodnog tretmana rBanLec-om predstavljaju pozitivnu kontrolu eksperimenta (PK grupa). Svakodnevno su praćene promene u telesnoj težini miševa, kao i propratni simptomi bolesti (konzistencija stolice, dijarea i vidljivi tragovi krvarenja).

3.13.3 Terapijska primena rBanLec-a

Radi ispitivanja terapijskog potencijala rBanLec-a, u ovoj eksperimentalnoj postavci, miševi su svakodnevno oralnim putem tretirani različitim koncentracijama rBanLec-a, neposredno nakon indukcije kolitisa. Tretman je započet 3h nakon primene rastvora TNBS-a pripremljenog na način opisan u prethodnom odeljku, kada je životinjama pomoću šprica oralno primenjen vodeni rastvor rBanLec-a (100µl / dozi) u koncentracijama od 0,1 µg/ml rBanLec/PBS tj. 0,5 µg rBanLec/kg telesne težine (grupa BL0,1), 1 µg/ml rBanLec/PBS tj. 5 µg rBanLec/kg telesne težine (grupa BL1) i 10 µg/ml rBanLec/PBS tj. 50 µg rBanLec/kg telesne težine (grupa BL10), dva puta dnevno, sedam dana tokom trajanja eksperimenta. Životinje su praćene na dnevnoj bazi i tom prilikom su beležene promene u telesnoj težini miševa, konzistenciji stolice, pojavi dijarea i vidljivi tragova krvarenja. Miševi su žrtvovani trećeg i sedmog dana nakon indukcije kolitisa radi sakupljanja reprezentativnih uzoraka tkiva debelog creva (n = 5 miševa po grupi po danu).

3.14 Priprema uzoraka debelog creva za analizu

Nakon što su uzorci tkiva debelog creva sakupljeni u navedenim vremenskim periodima, iz različitih rBanLec tretmana, deo uzoraka je iskorišćen za pripremu

histoloških preparata, a drugi deo je homogenizovan radi dalje analize. Neposredno pre homogenizacije tkiva, izmerena je težina svakog uzorka debelog creva. Tkivo je homogenizovano u 1ml hladnog pufera koji sadrži PBS (pH 7,4), 1mM EDTA, 0,1% NP-40, 1% Triton X-100 i 1% rastvor proteaznih inhibitora. Homogenati su centrifugirani (14 000 rpm, 10 min, 4°C), a supernatanti su izdvojeni i sačuvani na -80°C do upotrebe. U svim supernatantima određena je koncentracija proteina Bredfordovom metodom (odeljak 3.17.), a potom su u njima određeni 1) aktivnost MPO (odeljak 3.18.), 2) koncentracija NO (odeljak 3.19.), 3) ukupna količina IgG i IgA At (odeljak 3.20.), 4) koncentracija citokina (odeljak 3.21.) i 5) ekspresija transkripcionih faktora (odeljak 3.22.).

3.15 Priprema histoloških preparata

Kriopreseci su pripremljeni za bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E). Tkiva debelog creva su očišćena od fecesa i isprana hladnim PBS-om (pH 7,4). Zatim je svako tkivo postavljeno u koncentričnom krugu, preliveno OCT komponentom (*engl.* optimal cutting temperature compound) i zamrznuto na -20°C. Dalji koraci u pripremi kriopreseka za bojenje podrazumevaju:

- Sečenje tkiva debljine 5 µm i montiranje zamrznutih preseka na mikroskopske pločice presvučenu poli-lizinom
- Sušenje preparata na sobnoj temperaturi, 2h
- Fiksiranje preparata u hladnom acetonu, 10min
- Sušenje preparata na sobnoj temperaturi, 1h

H&E bojenje kriopreseka tkiva izvedeno je u sledećim koracima:

- Rehidratacija preseka u česmenskoj vodi, 1min
- Bojenje preseka hematoksilinom, 3 min
- Ispiranje preseka u česmenskoj vodi, 4min
- Bojenje preseka eozinom, 30sek

- Dehidratacija tkiva u seriji vodenih rastvora etanola: 70% 1min
96% 3min
100% 3 min
- Uklanjanje alkohola ksilolom, 2x1min
- Montiranje mikroskopskih pločica kanada balzomom

3.16 Imunohistohemijska detekcija rBanLec-a u tkivu debelog creva

Za imunohistohemijsku detekciju rBanLec-a u debelom crevu, miševi su tretirani rastvorom rBanLec/PBS (10 µg u 100 µl). Odgovarajuća kontrolna grupa tretirana je samo PBS-om (100 µl). Životinje su žrtvovane 1h, 24h, 48h i 72h nakon tretmana rBanLec-om (n = 3 miša za svaku vremensku tačku), zajedno sa životinjama iz kontrolne grupe koje su primile samo PBS. Sakupljeni su uzorci tkiva debelog creva od kojih su pripremljeni kriopreseći na način opisan u prethodnom odeljku.

Gotovi preseći su isprani u PBS-u, tretirani rastvorom 3% H₂O₂ u metanolu i nakon 15min isprani 3 x u PBS-a. Da bi se izbeglo bilo kakvo nespecifično vezivanje, preseći su tretirani 5% kozjim serumom/PBS, a nakon 30 min isprani 3 x u PBS-u. Na preseke je zatim dodat rastvor zečjih poliklonskih At specifičnih za rBanLec (razblaženje 1:1000 u 5% kozijem serumu/PBS) koji su ostavljeni preko noćnu na inkubaciju (4°C). Sutradan su nakon ispiranja (3 x PBS-om) preseći tretirani sa peroksidazom konjugovanim kozijim anti-zečjim IgG At (Sigma) u radnom razblaženju od 1:500 napravljenim u 5% kozijem serumu/PBS. Nakon 1h inkubacije na RT i tri ispiranja u PBS-u, na preseke je dodat supstrat za peroksidazu koristeći DAB kit (Dako, Glostrup, Denmark) upotrebljen po preporuci proizvođača. Preseći su isprani u česmenskoj vodi i kontrastirani hematoksilinom. Mikroskopske pločice su motirane kanada balzomom.

Potpuno pripremljeni tkivni preseći iz ovog i prethodnog odeljka posmatrani su na Olympus BH2-RFL mikroskopu (Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) na 10x uvećanju, a mikrografije su dobijene pomoću digitalne kamere (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Germany) povezanom sa ovim mikroskopom.

3.17 Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima korišćena je Bradfordova metoda (Bradford, 1976). U bazene mikrotitarske ploče naneto je 10 μ l uzorka, a zatim je dodato 200 μ l Bradford radnog rastvora (15 ml štoka Bradfordove boje + 85 ml destilovane vode, štok je napravljen rastvaranjem 100 mg *Comassie Brilliant Blue* G-250 u 50 ml 95% etanola i dodavanjem 100ml 85% fosforne kiseline (H_3PO_4), nakon čega je filtriran). Za izradu standardne krive korišćen je goveđi serum albumin (BSA) u rastućim koncentracijama (0 μ g/ml, 31,25 μ g/ml, 65,2 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml). Apsorbanca je očitana nakon 5 minuta na 580nm. Koncentracije proteina u uzorcima su preračunate na osnovu standardne krive BSA.

3.18 Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze

Ova metoda bazira se na sposobnost enzima da oksiduje o-fenilendiamin (*engl.* O-phenylenediamine, OPD) do žuto obojenog jedinjenja. Uzorci homogenata debelog creva u kojima je merena aktivost MPO su pre testa podešeni na istu koncentraciju proteina od 1 mg/ml. Test je izveden u mikrotitarskoj ploči od 96 bunara (Nunc) dodavanjem 50 μ l uzorka i 50 μ l OPD-a (1 mg/ml u 50 mM limunske kiseline) u prisustvu 0,01% H_2O_2 . Reakcija je prekidana na svaka 3 minuta, a potom apsorbanca očitana na talasnim dužinama od 492nm i 620 nm ($A_{492/620}$) u svakoj vremenskoj tački.

3.19 Određivanje produkcije azot oksida

Određivanje koncentracije azot oksida (NO) koja je indirektni pokazatelj produkcije reaktivnih azotnih vrsta (*engl.* Reactive nitrogen species, RNS), bazira se na detekciji nitrita (NO_2^-) stabilnog produkta reaktivnih azotnih intermedijera *Griess*-ovim reagensom koji sa NO_2^- formira ružičasto obojen rastvorni kompleks. Uzorci su razliveni u mikrotitar ploče od 96 bunara (50 μ l/bunaru, Nunc) zajedno sa *Griess*-ovim reagensom

(50 μ l/bunaru, 0,2% rastvor naftiletilendiamin-dihlorid i 2% sulfanilamid u 5% H_3PO_4 pomešani u jednakim zapreminama). Ploče su ostavljene na RT i nakon 10 min očitane su apsorbance na talasnoj dužini od 545 nm (A_{545}). Koncentracija nitritnih jona prisutnih u supernatantima uzoraka izračunata je pomoću jednačine standardne krive, konstruisane pomoću dobijenih apsorbanci rastvora $NaNO_2$ poznatih koncentracija.

3.20 Analiza produkcije ukupnih IgG i IgA At

U homogenatima tkiva debelog creva (iz odeljka 3.14) analizirana je produkcija ukupnih IgG i IgA At ELISA testom. U bunare mikrotitarskih ploča od 96 bunara (MaxiSorp) dodati su uzorci homogenizovanog tkiva (50 μ l/bunaru) koji su prethodno podešeni na istu koncentraciju ukupnih proteina od 0,5 mg/ml. Ploče su ostavljene na adsorpciju preko noći (4°C), a sutradan zasićene rastvorom 1% BSA/PBS (200 μ l/bunaru, 2h na sobnoj temperaturi). Nakon saturacije, ploče su isprane 0,05% Tween 20/ PBS (4 x 200 μ l/bunaru) i dodati su rastvori (50 μ l/bunaru) biotinom obeleženih anti-IgA At (Biolegend) i anti-IgG At (Sigma) napravljeni u odgovarajućim razblaženjima po preporuci proizvođača. Ploče su ostavljene na inkubaciju 1h na RT, isprane sa 0,05% Tween 20/ PBS rastvorom (4 x 200 μ l/bunaru), u bunare dodato po 50 μ l rastvora extrAvidin-alkalna fosfataza/1% BSA/PBS. Nakon 1h inkubacije na RT i ispiranja ploča kao u prethodnim koracima, dodato je 50 μ l rastvora supstrata *p*-nitrofenil fosfat. Reakcija je zaustavljena dodatkom pufera koji sadrži 0,02 M Tris i 0,005 M EDTA (50 μ l/bunaru), a apsorbance očitavana na 405 nm (A_{405}).

3.21 Određivanje koncentracije citokina

Koncentracije citokina IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α i TGF- β , u supernatantima kultura RM, TGM i DĆ kao i u homogenatima tkiva određivane su ELISA testom. Naime, u bunare mikrotitarskih ploča od 96 bunara (MaxiSorp) naneta su specifična anti-citokinska At (50 μ l/bunaru) u odgovarajućim razblaženjima napravljena

u PBS-u po preporuci proizvođača. Ploče su ostavljene preko noći na inkubaciju radi adsorpcije At (4°C). Nakon adsorpcije, ploče su zasićene rastvorom 1% BSA/PBS (200 µl/bunaru, 2h na sobnoj temperaturi), kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje i isprane rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 µl/bunaru). U sledećem koraku dodati su uzorci (50 µl/bunaru), a ploče su ostavljene na inkubaciju 1h, na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane sa 0,05% Tween 20/PBS (4 x 200 µl/bunaru) i nalivene biotinom obeleženim odgovarajućim anti-citokinskim At u 1% BSA/PBS (50 µl/bunaru, na 1h na sobnoj temperaturi). Nakon ispiranja ploča sa 0,05% Tween 20/ PBS rastvorom (4 x 200 µl/bunaru), u bunare je dodato po 50 µl rastvora extrAvidin-peroksidaza/1% BSA/PBS. Ploče su ostavljene 1h na sobnoj temperaturi i nakon inkubacije isprane na isti način kao i u prethodnim koracima. Enzimski supstrat OPD (1 mg/ml u 50 mM limunske kiseline) uz dodatak 0,01% H₂O₂ korišćen je za detekciju (50 µl/bunaru). Nakon prekidanja enzimske reakcije dodatkom 2M H₂SO₄ (50 µl/bunaru) očitavana je apsorbanca na 492/620 nm (A_{492/620}).

3.22 Elektroforeza i *Western blot*

3.22.1 SDS-PAGE (*engl. Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*)

Materijal za elektroforezu:

- Pufer za gel za razdvajanje: 2M Tris-HCl pH 8,8 (četiri puta koncentrovan)
- Pufer za gel za koncentrovanje: 1M Tris-HCl pH 6,8 (četiri puta koncentrovan)
- 30% akrilamid (30% (w/v) akrilamida/H₂O i 3% (w/v) bis-akrilamid/H₂O)
- Štok elektrodnog pufera (0,25 M Tris, 1,92 M GlyHCl, pH 8,3)
- 10% (w/v) APS (amonijum persulfat)
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamid)
- 10% SDS (w/v) (natrijum dodecilsulfat)
- Pufer za uzorke: 60mM Tris, 25% glicerol, 2,5% SDS (pet puta koncentrovan)

- 1% (w/v) bromfenolplavo
- Sistem za elektroforezu Mini protean (BioRad)

Postupak:

Priprema gela za koncentrovanje i razdvajanje na osnovu proračuna X% gela:

- 49,5% akrilamidaX/3 ml
 - 4 x koncentrovan pufer za odgovarajući gel.....2,5 ml
 - H₂O(7,5- X/3) ml
 - 10% APS50 µl
 - TEMED5 µl (10 µl ako je X > 8%)
- Ukupno 10 ml

Uzorci su koncentrovani tokom prolaska kroz 5% PAAG (gel za koncentrovanje) a proteini u njima su razdvajani na osnovu molekulske mase tokom prolaska kroz 10% PAAG (gel za razdvajanje).

Priprema uzoraka i elektroforetsko razdvajanje:

Sve uzorke smo prethodno podesili na istu koncentraciju proteina (1 mg/ml). Svaki uzorak smo nanosili u zapremini od 20 µl po bunaru. Uzorci su pripremljeni u puferu za uzorke (80 µl uzorka i 20 µl 5 x konc. pufera za uzorke).

Napon pri prolasku uzoraka kroz gel za koncentrovanje bio je 80 V, a kroz gel za razdvajanje 120 V.

3.22.2 Western blot

Materijal za Western blot:

- Nitrocelulozna membrana, veličina pora 0,2 µm

- Pufer za blot: 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH 8,3
- Pufer za blokiranje: 2% BSA/PBS
- Rastvor za ispiranje: 0,05% Tween 20/PBS
- Primarna monoklonska At specifično za T-bet, GATA-3, RORyt i β -aktin (u razblaženju 1:250, BioLegend)
- Monoklonsko anti-IgG At konjugovano biotinom (u razblaženju od 1:2000, Sigma)
- EkstrAvidin alkalna fosfataza razblažena u 1% BSA (1:10000, prema uputstvima proizvođača)
- Supstrat za alkalnu fosfatazu NBT/BCIP
- Pufer za supstrat: 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂, pH=9,5
- Pufer za prekidanje reakcije: 0,02 M Tris, 5mM EDTA, pH=7,5
- Filter papir

Postupak:

1) Elektrotransfer

Po završetku SDS-PAGE, gel je izvađen iz staklenih ploča, opran destilovanom vodom i potopljen u pufer za blot. Za transfer je korišćena nitrocelulozna membrana koja je prethodno aktivirana kratkim potapanjem u destilovanu vodu, a zatim prebačena u pufer za blot. Na grafitnu elektrodu aparata za elektrotransfer složen je "sendvič" za blot od filter papira, između koga se nalaze nitrocelulozna membrana i gel. Sendvič je postavljen u aparat za elektrotransfer tako da nitrocelulozna membrana bude bliža anodi. Transfer je obavljen pri jačini struje od 48mA/cm², 1h.

2) Razvijanje blota

1. Saturacija: slobodna mesta na nitroceluloznoj membrani su blokirana inkubacijom membrane u 2% rastvoru BSA/PBS preko noći na 4°C.
2. Ispiranje membrane rastvorom za ispiranje, 4 puta

3. Inkubacija membrane u rastvoru anti-T-bet, anti-GATA-3, anti-RORyt, anti- β -aktin At, 1h, RT
4. Ispiranje membrane rastvorom za ispiranje, 4 puta
5. Inkubacija membrane u rastvoru biotinisano anti-IgG At radi detekcije primarnih At, 1h, RT
6. Ispiranje membrane rastvorom za ispiranje, 4 puta
7. Inkubacija rastvorom streptavidin-alkalne fosfataze, 1h, RT
8. Ispiranje membrane rastvorom za ispiranje, 4 puta
9. Inkubacija membrane u rastvoru supstrata za alkalnu fosfatazu, dok pojave traka na membrani, RT
10. Reakcija je prekinuta puferom za prekidanje reakcije
11. Membrana isprana vodom i osušena

3.23 Statistička obrada rezultata

Statistička značajnost uočenih razlika među dobijenim rezultatima proistekli iz svih eksperimenata iz ove doktorske diertacije, određena je *one-way* ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U skladu sa definisanim ciljevima doktorske teze, izrada eksperimentalnog dela doktorske teze je podeljena u tri faze. U prvoj fazi je *in vitro* ispitano imunomodulatorno dejstvo rBanLec-a na funkcionalne karakteristike APĆ BALB/c miša. U drugoj fazi je ispitan uticaj rBanLec-a na karakteristike lokalnog imunskog odgovora u debelom crevu BALB/c miševa pod fiziološkim uslovima. Treća faza se odnosila na ispitivanje efikasnosti profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a na modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miševa.

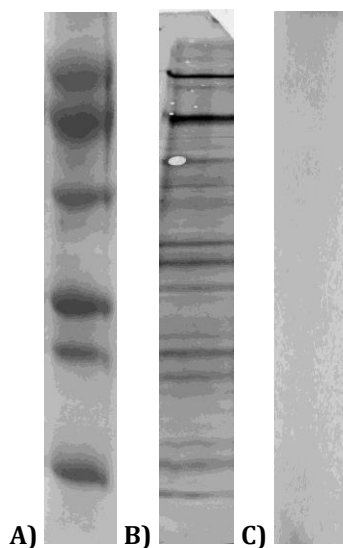
4.1 Uticaj rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike antigen-prezentujućih ćelija

S obzirom da APĆ predstavljaju deo sistema urođene imunosti i ključne su za inicijaciju i profilisanje adaptivnog imunskog odgovora, ispitivanje uticaja bioaktivnih supstanci na njihove funkcionalne karakteristike od velikog je značaja za jasnije definisanje ukupnog imunomodulatornog potencijala bioaktivnih supstanci. U okviru ove teze ispitan je, u *in vitro* uslovima, uticaj rBanLec-a na funkcionalne karakteristike peritonealnih makrofaga i DĆ slezine BALB/c miša.

4.1.1 Membranske strukture sa kojima rBanLec stupa u interakciju

Identifikacija ćelijskih struktura sa kojima rBanLec interaguje bio je prvi zadatak u okviru ispitivanja imunomodulatornog potencijala rBanLec-a. *Western blot* analizom, urađenom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina lizata peritonealnih makrofaga

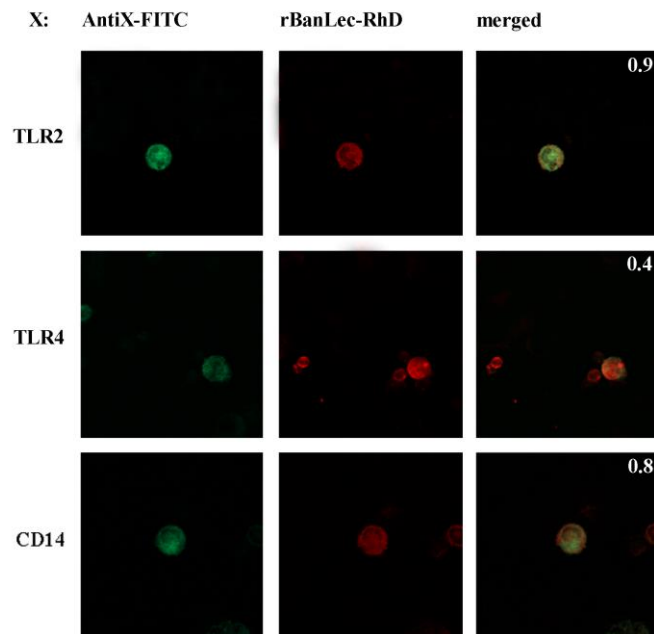
BALB/c miša, pokazano je da rBanLec stupa u interakciju sa velikim brojem membranskih proteina (**Slika 4.1**).



Slika 4.1. Western blot analiza vezivanja rBanLec-a za membranske proteine peritonealnih makrofaga BALB/c miša. A) Molekulski markeri (opseg molekulskih masa proteina 36.5-180 kDa) B) Membranski proteini iz ćelijskog lizat peritonealnih makrofaga su nakon razdvajanja neredukcionom SDS-PAGE-om (7% PAAG), transferovani na polivinil difluoridnu membranu. Za vizuelizaciju interakcije rBanLec-a (korišćen u biotinisanoj formi) i membranskih proteina makrofaga korišćen je sistem extrAvidin-alkalna fosfataza//NBT/BCIP. C) Membrana na kojoj su transferovani proteini ćelijskog lizat peritonealnih makrofaga tretirana sa extrAvidin-alkalna fosfataza//NBT/BCIP (negativna kontrola).

S obzirom da stimulacija preko TLR-a predstavlja jedan od najvažnijih načina aktivacije i modulacije funkcionalnih karakteristika APĆ, istraživanja su usmerena ka dobijanju odgovora na pitanje da li i na koji način rBanLec stupa u interakciju sa TLR-ovima. Brojne publikacije dokumentuju sposobnost lektina da interaguju sa TLR i, kao posledica uspostavljanja tih interakcija, utiču na funkcionalne karakteristike ciljne ćelije.

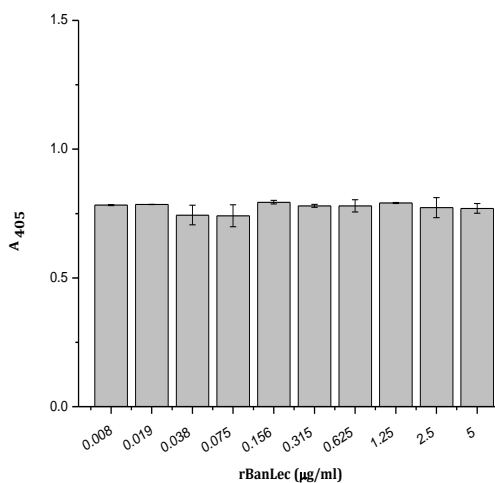
Konfokalnom mikroskopijom makrofaga, rađenom nakon njihove inkubacije sa fluorohromama obeleženim rBanLec-om i antitelima specifičnim za mišje TLR2, TLR4 i CD14 (**Slika 4.2**), pokazano je da rBanLec intenzivno kolokalizuje sa TLR2 (koeficijent kolokalizacije 0,9) i CD14 (koeficijent kolokalizacije 0,8). Step en kolokalizacija sa TLR4 je bio nizak (koeficijent kolokalizacije 0,4).



Slika 4.2. Vezivanja rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14 eksprimiranim na peritonealnim makrofagima. TLR2, TLR4 i CD14 su vizuelizovani odgovarajućim specifičnim antitelima konjugovanim sa FITC-om (zelena boja). Biotinisani rBanLec je detektovan pomoću strpetavidin-rodaminB boje (RhD, crvena boja). Žuta boja na preklapljenim mikrografijama zajedno sa prikazanim koeficijentom preklapanja (u gornjem desnom uglu mikrografije) ukazuje na stepen kolokalizacije vezivanja rBanLec za TLR2, TLR4 ili CD14.

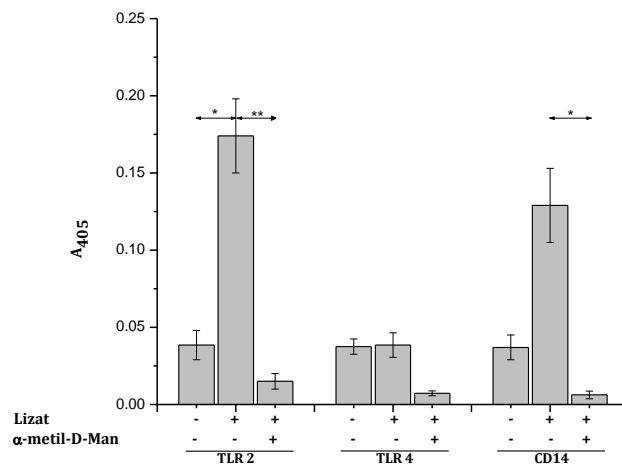
Odsustvo značajnijeg signala kolokalizacije rBanLec-a i TLR4 može biti posledica sternih smetnji za simultano vezivanje rBanLec-a i anti-TLR4 antitela koje je korišćeno u analizi, i stoga ne mora nužno značiti da ne dolazi do uspostavljanja rBanLec-TLR4 interakcije. Naime, ukoliko se epitop koji prepoznaje korišćeno anti-TLR4 antitelo poklapa ili nalazi u blizini strukture sa kojom interaguje rBanLec, rBanLec, prethodno vezan za TLR4, bi sterno ometao vezivanje detektujućih anti-TLR4 antitela. Da bi se isključile sterne smetnje kao uzrok izostanka signala kolokalizacije, urađena je ELISA gde su 1) ćelije makrofaga, korišćene kao antigen, adherirane za površinu ELISA ploče, 2) koncentracija rBanLec-a varirana u opsegu od 5-0,008 $\mu\text{g/ml}$, a 3) antitelo specifično za mišji TLR4 korišćeno u nepromenljivoj koncentraciji. Pretpostavljeno je da bi, ukoliko rBanLec stvara sterne smetnje za vezivanje anti-TLR4 antitela, smanjenje koncentracije rBanLec-a u sistemu trebalo da ostavi i određeni broj epitopa dostupnih za prepoznavanje od strane anti-TLR4 antitela. U tom slučaju bi signal koji potiče od vezivanja anti-TLR4

antitela, u slučaju rBanLec koncentracije niže od saturišuće za navedeni sistem, trebalo da negativno korelira sa koncentracijom rBanLec-a. Ipak, dobijeni rezultati su pokazali da, u širokom opsegu koncentracija, rBanLec ne utiče značajno na vezivanje anti-TLR4 antitela za makrofage. (**Slika 4.3**).



Slika 4.3. Uticaj različitih koncentracija rBanlec-a (5-0,008 µg/ml) na vezivanje anti-TLR4 antitela za TGM. Makrofagi su adherirani za ELSA ploču i u prisustvu rBanLec-a u opsegu koncentracija 5-0,008 µg/ml detektovano je vezivanje anti-TLR4 antitela za TLR4 na makofazima. Uzorci su rađeni u duplikatu, a rezultati dobijeni ELISA, predstavljeni su kao srednja A₄₀₅ ± SE.

Kako bismo potvrdili prethodno dobijene rezultate vezivanja rBanLec-a za TLR2 i CD14 i detaljnije ispitali prirodu ovih interakcija, urađena je ELISA u kojoj je ćelijski lizat makrofaga korišćen kao izvor TLR2, TLR4 i CD14 (**Slika 4.4**). Rezultati ELISA su potvrdili rezultate analize konfokalnom mikroskopijom, uključujući i nalaz da se rBanLec ne vezuje specifično za TLR4. Takođe, rezultati su pokazali da je vezivanje rBanLec-a za TLR2 i CD14 posredovano lektin-oligosaharid interakcijama jer je dodatak α -metil-D-Man, koji rBanLec vezuje sa visokim afinitetom (Gravrović-Jankulović *et al.*, 2008), umanjio ili potpuno inhibirano uspostavljanje ovih interakcija.



Slika 4.4. Uticaj monosaharida α -metil-D-Man na vezivanje rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14. TLR2, TLR4 i CD14 su izdvojeni iz ćelijskog lizata makrofaga pomoću odgovarajućih specifičnih monoklonskih antitela koja su adsorbovana na ELISA ploču. Vezivanje rBanLec-a za navedene molekule posmatrano je bez ili u prisustvu 0,5 M α -metil-D-Man. Uzorci ($n=3$) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{405} \pm SE$. Statistička značajnost promena u vezivanju rBanLec-a za TLR2, TLR4 i CD14 u prisustvu α -metil-D-Man određena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje. Poređene grupe su označene strelicama ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

4.1.2 rBanLec kao modulator funkcionalnih karakteristika peritonealnih makrofaga

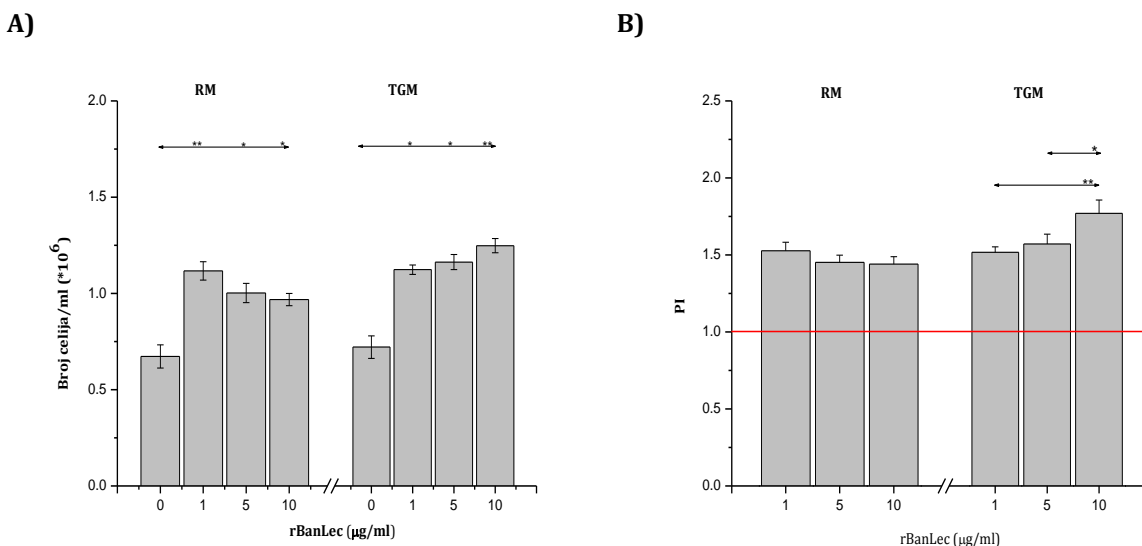
Imajući u vidu da ishod specifične stimulacije zavisi i od prethodnog „imunološkog iskustva“ makrofaga, ispitivan je uticaj rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike RM (peritonealni makrofagi dobijeni pod fiziološkim uslovima) i TGM (model inflamatornih makrofaga).

4.1.2.1 Uticaj rBanLec stimulacije na vijabilnost peritonealnih makrofaga

U svrhu ispitivanja uticaja rBanLec stimulacije na vijabilnost RM i TGM rađen je kolorimetrijski test u kome je intenzitet obojenja srazmeran stepenu transformacije rastvorne bezbojne tetrazolijum soli WST-8 u rastvorno žuto obojeno formazansko jedinjenje. Pošto brzina transformacije WST-8 direktno zavisi od aktivnosti Krebsovog ciklusa, smatra se da je stepen obojenosti rastvora srazmeran broju vijabilnih ćelija.

Takođe, pretpostavljajući da specifična rBanLec stimulacija ne utiče značajno na intenzitet Krebsovog ciklusa u vijabilnim ćelijama, te da je razlika u obojenju supernatanta stimulisanih i nestimulisanih ćelija isključivo posledica razlike u broju vijabilnih ćelija, ovaj test je korišćen i za evaluaciju proliferativnog odgovora ciljnih ćelija na specifičnu stimulaciju.

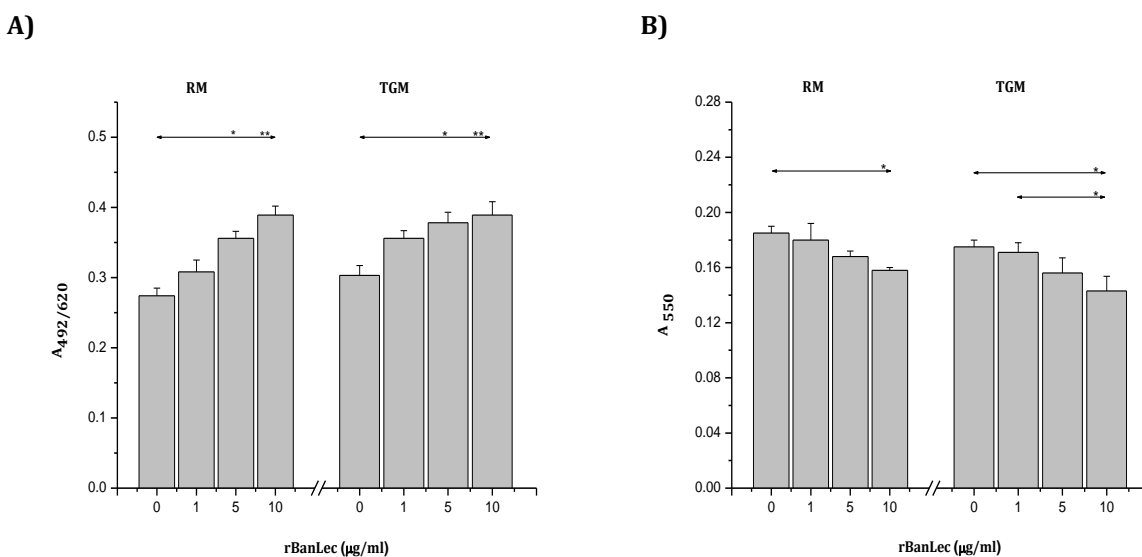
Vijabilnost peritonealnih makrofaga analizirana je nakon 48h stimulacije rBanLec-om u finalnim koncentracijama 1, 5 i 10 $\mu\text{g/ml}$. Pokazano je da rBanLec, u koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$, ne utiče negativno na vijabilnost ni RM ni TGM. Kod oba tipa peritonealnih makrofaga, broj vijabilnih ćelija je, nakon rBanLec stimulacije, značajno porastao u odnosu na broj ćelija u odgovarajućoj nestimulisanoj kulturi ($P < 0,05$ za RM i $P < 0,005$ za TGM u odnosu na odgovarajuće nestimulisane ćelije) (Slika 4.5A), što ukazuje da je rBanLec je indukovao proliferaciju i RM i TGM (Slika 4.5B). U slučaju RM, koncentracija rBanLec-a nije značajno uticala na mitotsku aktivnost. Sa druge strane, dobijeni rezultati pokazuju rBanLec-a pozitivno dozno zavisno utiče na proliferaciju TGM.



Slika 4.5. Uticaj različitih koncentracija rBanLec-a na A) apsolutni broj ćelija u kulturama i B) indeks proliferacije (PI) RM i TGM. PI vrednosti izračunate su na osnovu rezultata dobijenih testom proliferacije, urađenim 48h nakon stimulacije. Analizirana su po tri uzorka i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

4.1.2.2 Uticaj rBanLec stimulacije na produkciju ROS u makrofagima

ROS predstavlja grupu visokoreaktivnih molekula i slobodnoradikalnih jona koji sadrže kiseonik i koji, zbog svoje izrazite reaktivnosti, imaju mikrobicidno dejstvo ali mogu da dovedu i do oštećenja tkiva. U proizvodnju i razgradnju ROS uključen je veliki broj enzima i njihova sinhronizovana aktivnost omogućava kontrolu nivoa ROS u ćeliji (Forman & Torres, 2001). Jedan od tih enzima je i mijeloperoksidaza (MPO), intracelularni enzim lokalizovan u citoplazmi makrofaga, u neposrednoj blizini ćelijske membrane, koji, koristeći vodonik peroksid nastao tokom respiratornog praska, generiše visoko reaktivne molekulske vrste poput hipohloraste kiseline i tirozil radikala (de Araujo *et al.*, 2013). U ovim istraživanjima aktivnost MPO određena je kolorimetrijskom analizom, na osnovu stepena konverzije o-fenilendiamina iz redukovanog, bezbojnog, u oksidovan, žuti, oblik.



Slika 4.6. Uticaj rBanLec-a (koncentracije 1-10 µg/ml) na A) aktivnost intracelularne mijeloperoksidaze (MPO) i B) produkciju O₂⁻ u kulturama RM i TGM. Nakon 48h duge stimulacije urađen je MPO test i test redukcije NBT-a. Uzorci (n=3) su analizirani u duplikatu. Rezultati MPO testa su predstavljeni kao srednja A_{492/620} ± SE, a rezultati testa redukcije NBT-a kao srednja A₅₅₀ ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje (P<0,05*, P<0,005**, P<0,0001***).

Sposobnost rBanLec-stimuliranih RM i TGM da proizvode superoksid anjon (O_2^-), praćena je testom redukcije NBT-a. Ovim testom se indirektno određuje kolićina nastalog O_2^- tako što on redukuje NBT i prevodi ga iz žute, rastvorne, u plavu, nerastvornu, formu (Choi *et al.*, 2006).

Pokazano je da u testiranom opsegu koncentracija (0-10 $\mu\text{g/ml}$), rBanLec, proporcionalno primenjenoj koncentraciji, povećava aktivnost MPO kod oba tipa makrofaga (**Slika 4.6A**). Takođe, pokazano je da, nezavisno od aktivacionog stanja makrofaga, rBanLec na dozno zavisian naćin smanjuje intenzitet produkcije O_2^- (**Slika 4.6B**).

4.1.2.3 Efekat rBanLec stimulacije na aktivnost arginaze i produkciju NO od strane peritonealnih makrofaga

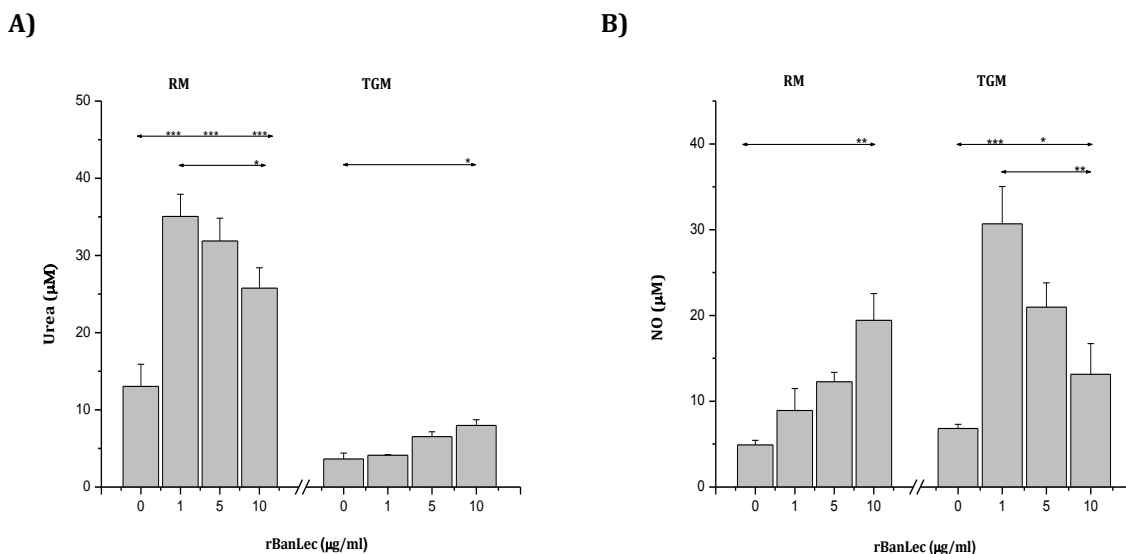
Inducibilna azot oksid sintaza (iNOS), u prisustvu kiseonika i NADPH, metaboliše L-arginin u azot oksid (NO) i L-citrulin. Zbog velike reaktivnosti, NO moće imati citotoksićno dejstvo, pa intenzivna, nekontrolisana produkcija NO, rezultuje tećkim oštećenjem okolnog tkiva (Wink *et al.*, 2011). NO predstavlja jedan od vaćznih medijatora imunskog odgovora koji direktno i posredno ućestvuje u odbrani od mikroorganizama. Osim mikrobicidne uloge i uloge u regulaciji imunskog odgovora koja se ogleda u podspećivanju stvaranju zaćtitnog proinflamatornog miljea, NO ućestvuje i u regulaciji odrećdenih fizioloćkih procesa koji nisu direktno povezani sa aktivnoćću imunskog sistema (Meo *et al.*, 2016). U zavisnosti od koncentracije, NO moće da pokrene signalne puteve ćiji je ishod otpućstanje neurotransmitera ili vazodilatacija mićićnog tkiva i interaguje sa molekulima koji su deo metabolićkih i signalnih puteva (Wink *et al.*, 2011; Meo *et al.*, 2016).

NO je nestabilan molekul koji u prisustvu kiseonika brzo prelazi u stabilne produkte, nitrite (NO_2^-) i nitrate (NO_3^-). Stoga se NO produkcija detektuje posredno, koriććenjem Grieseov reagens koji sa NO_2^- formira rućićeasto obojen rastvorni kompleks (Bryan & Grisham, 2007).

Enzim arginaza ima ulogu u kontroli produkcije NO i na taj način sprečava ispoljavanje citotoksičnih efekata koji su povezani sa prekomernom produkcijom NO-a. Arginaza kontroliše NO produkciju kroz kompeticiju sa iNOS-om za isti supstrat, L-arginin (Rath *et al.*, 2014). Aktivnost arginaze je praćena na osnovu produkcije uree koja nastaje, zajedno sa ornitinom kao rezultat dejstva arginaze na L-arginin. Količina nastale uree se određuje kolorimetrijski, na osnovu svojstva uree da u prisustvu α -izonitrozopropiofenona gradi ljubičasto obojeni produkt (Corraliza *et al.*, 1994).

Dobijeni rezultati su pokazali da dvodnevna (48h) stimulacija rBanLec-om generalno ima pozitivan uticaj na NO produkciju i aktivnost arginaze i kod RM i kod TGM.

Uočen je statistički značajan porast aktivnosti arginaze u svim RM kulturama stimulisanim rBanLec-om ($P < 0,0001$ u poređenju sa odgovarajućom nestimulisanom kontrolom), ali je aktivnost enzima negativno korelirala sa primenjenim dozama rBanLec-a (Slika 4.7A).

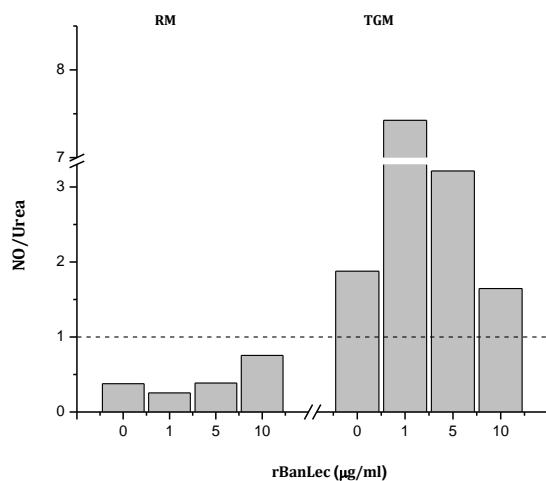


Slika 4.7. Uticaj rBanLec-a (1-10 µg/ml) na A) aktivnost arginaze i B) NO produkciju u kulturama RM i TGM. Nakon 48h rBanLec stimulacije, u supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija NO pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test), a aktivnost arginaze je određena u ćelijama. Koncentracija NO i uree izračunata je pomoću odgovarajućih stanadrdnih kriva (NO: NaNO₂ korišćen kao standard; urea: rastvori uree definisanih koncentracija korišćeni kao standard). Uzorci (n=3) su analizirani u duplikatu. Rezultati NO testa su predstavljeni kao srednja [NO] ± SE, a rezultati testa arginaze kao srednja [Urea] ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Suprotno arginaznoj aktivnosti, u istom opsegu koncentracija, rBanLec je pozitivno dozno-zavisno uticao na NO produkciju u kulturi RM (RM stimulisani sa 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec-a: $P < 0,005$ u poređenju sa nestimulisanim RM) (**Slika 4.7B**).

U poređenju sa nestimulisanim RM kulturama, u kulturama TGM bazalna aktivnost arginaze je bila manja ($P < 0,005$), a produkcija NO intenzivnija. Takođe, u odnosu na RM, kod rBanLec-stimuliranih TGM je uočen suprotan dozno-zavisian trend promena u aktivnosti arginaze i intenzitetu produkcije NO (**Slika 4.7**). Najveća aktivnost arginaze registrovana je u TGM kulturama stimuliranim sa 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec ($P < 0,05$ u odnosu na nestimulirane TGM), dok je u istoj kulturi produkcija NO bila značajno niža u odnosu na TGM kulture stimulirane sa 1 $\mu\text{g/ml}$ i 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec ($P < 0,005$ za 10 $\mu\text{g/ml}$ u odnosu na 1 $\mu\text{g/ml}$ i 5 $\mu\text{g/ml}$).

Osim analize uticaja rBanLec stimulacije pojedinačno na aktivnosti iNOS i arginaze, analiziran je i odnos aktivnosti ova dva enzima u RM i TGM kulturama. Dominantna aktivnost jednog od enzima (arginaza ili iNOS) takođe ukazuje na funkcionalno stanje makrofaga (Porcheray *et al.*, 2005).



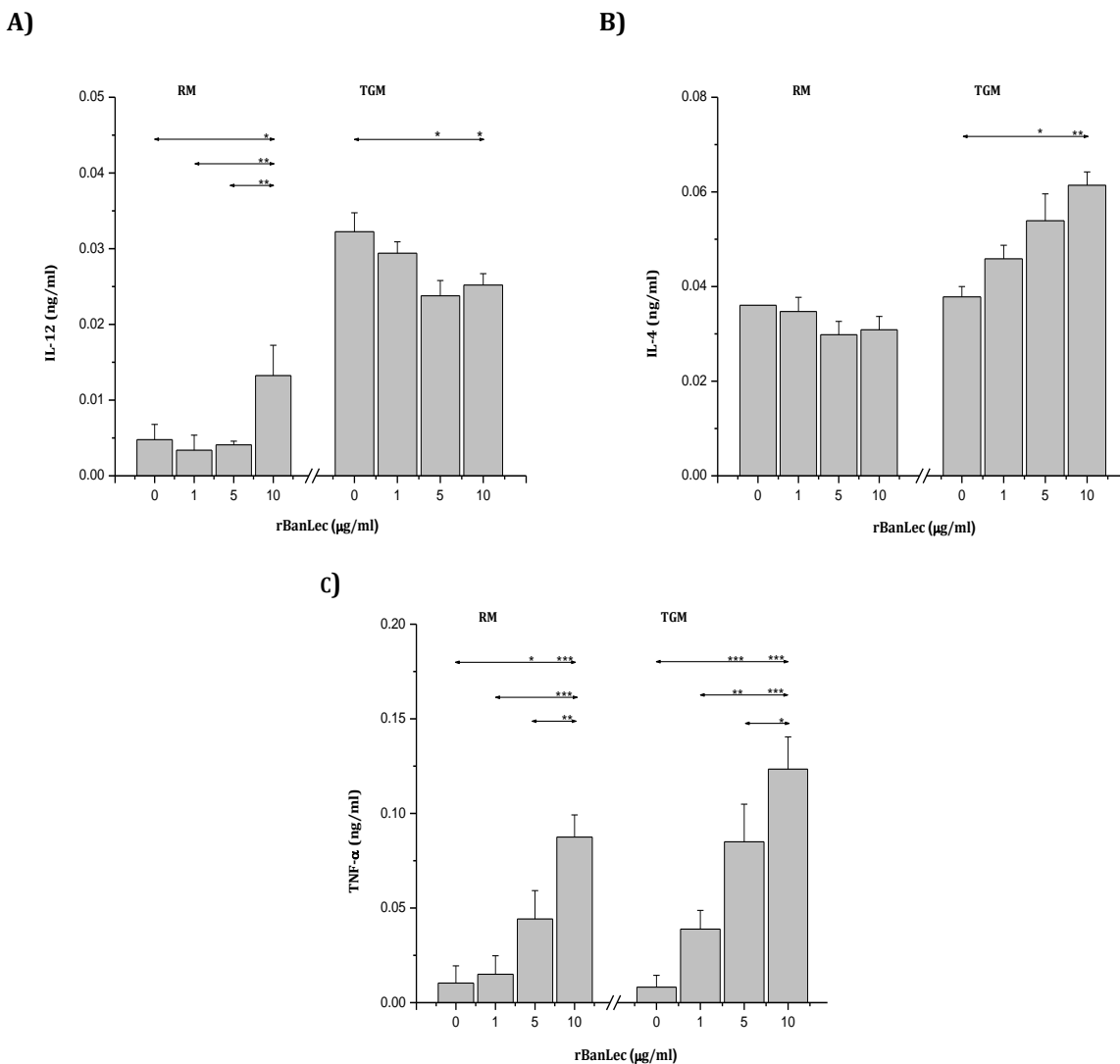
Slika 4.8. Uticaj rBanLec-a (1-10 $\mu\text{g/ml}$) na odnos aktivnosti enzima iNOS i arginaze u kulturama RM i TGM, stimuliranih 48h rBanLec-om u naznačenim koncentracijama. Odnos aktivnosti je procenjen na osnovu koncentracija njihovih produkata u rBanLec-stimuliranim RM i TGM kulturama.

Dobijeni rezultati su pokazali da u svim RM kulturama, arginazna aktivnost dominira nad aktivnošću iNOS-a, dok je obrnuta situacija zabeležena u TGM kulturama (**Slika 4.8**). U rBanLec-stimulisanim kulturama, sa porastom doze, kod RM je uočen trend umanjenja dominacije arginazne aktivnosti, dok je kod TGM postepeno smanjivana dominacija aktivnosti iNOS.

4.1.2.4 Uticaj rBanLec stimulacije na produkcija citokina od strane peritonealnih makrofaga

U cilju ispitivanja uticaja rBanLec stimulacije na produkciju citokina od strane peritonealnih makrofaga, nakon četrdesetosmočasovne rBanLec stimulacije, u supernatantima kultura RM i TGM određivana je koncentracija efektorskih citokina IL-4, IL-12, TNF- α (**Slika 4.9**) i regulatornih citokina IL-10 i TGF- β (**Slika 4.10**). Pokazano je da je bazalna sekrecija citokina IL-4, TNF- α , TGF- β i IL-10 od strane RM i TGM veoma slična dok je bazalna produkcija IL-12 bila značajno veća u kulturama TGM u poređenju sa kulturama RM ($P < 0,005$, **Slika 4.9A**). rBanLec stimulacija je kod RM i TGM uticala na isti način (pozitivno dozno-zavisno) na produkciju IL-10 i TNF- α . Dozno-zavisna uticaj rBanLec stimulacije na produkciju IL-4, IL-12 i TGF- β nije bio jednoznačan nego je zavisio od tipa peritonealnih makrofaga.

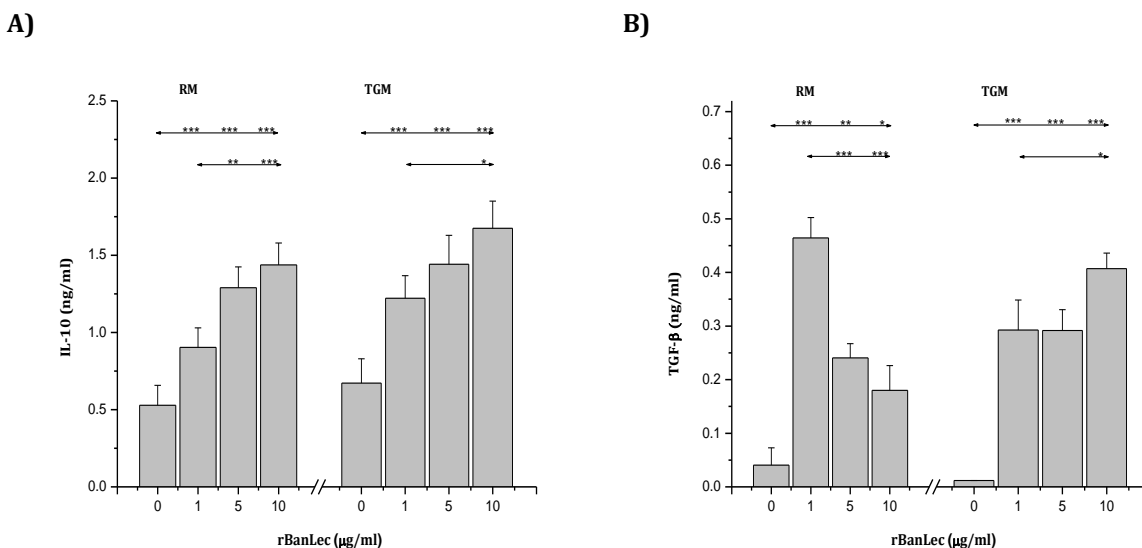
U kulturama RM, rBanLec u najnižoj korišćenoj dozi, 1 $\mu\text{g/ml}$, nije uticao na produkciju efektorskih citokina IL-12 i IL-4. Značajno viša produkcija IL-12, u odnosu na nestimulisane RM, uočena je od strane RM stimulisanih sa 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec-a ($P < 0,005$, **Slika 4.9A**). U istoj kulturi (RM, 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec) produkcija IL-4 je bila niža, ali ne statistički značajno, u odnosu na kulturu nestimulisanih RM (**Slika 4.9B**). U TGM kulturama, u poređenju sa RM, rBanLec je ispoljavao suprotan uticaj na produkciju IL-4 i IL-12. Produkcija IL-4 je u rBanLec-stimulisanim TGM kulturama bila dozno-zavisno povećana (**Slika 4.9B**), dok je visoka bazalna sekrecija IL-12 bila redukovana na pozitivan dozno-zavisna način (**Slika 4.9**).



Slika 4.9. Uticaj rBanLec-a (1-10 μg/ml) na produkciju efektorskih citokina A) IL-12, B) IL-4 i C) TNF-α u kulturama RM i TGM. Nakon 48h duge stimulacije, koncentracije citokina u supernatantima kultura su određene ELISA-om. Koncentracije citokina izračunate su pomoću odgovarajuće standardne krive (odgovarajući rekombinantni citokini korišćeni kao standardi). Uzorci (n=3) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost koncentracije citokina ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

U testiranom opsegu koncentracija, rBanLec je na pozitivan dozno-zavisnan način modulirao produkciju TNF-α (RM, 5 μg/ml rBanLec: $P < 0,05$ u poređenju sa nestimulisanim RM; RM i TGM, 10 μg/ml rBanLec: $P < 0,0001$ u poređenju sa

odgovarajućom nestimulisanom kulturom). Stimulatorni uticaj rBanLec-a na sekreciju TNF- α je bio izraženiji u kulturama TGM (**Slika 4.9C**).



Slika 4.10. Uticaj rBanLec-a (1-10 µg/ml) na produkciju regulatornih citokina A) IL-10 i B) TGF-β u kulturama RM i TGM. Nakon 48h duge stimulacije, koncentracije citokina u supernatantima kultura su određene ELISA-om. Koncentracije citokina izračunate su pomoću odgovarajuće standardne krive (odgovarajući rekombinantni citokini korišćeni kao standardi). Uzorci (n=3) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

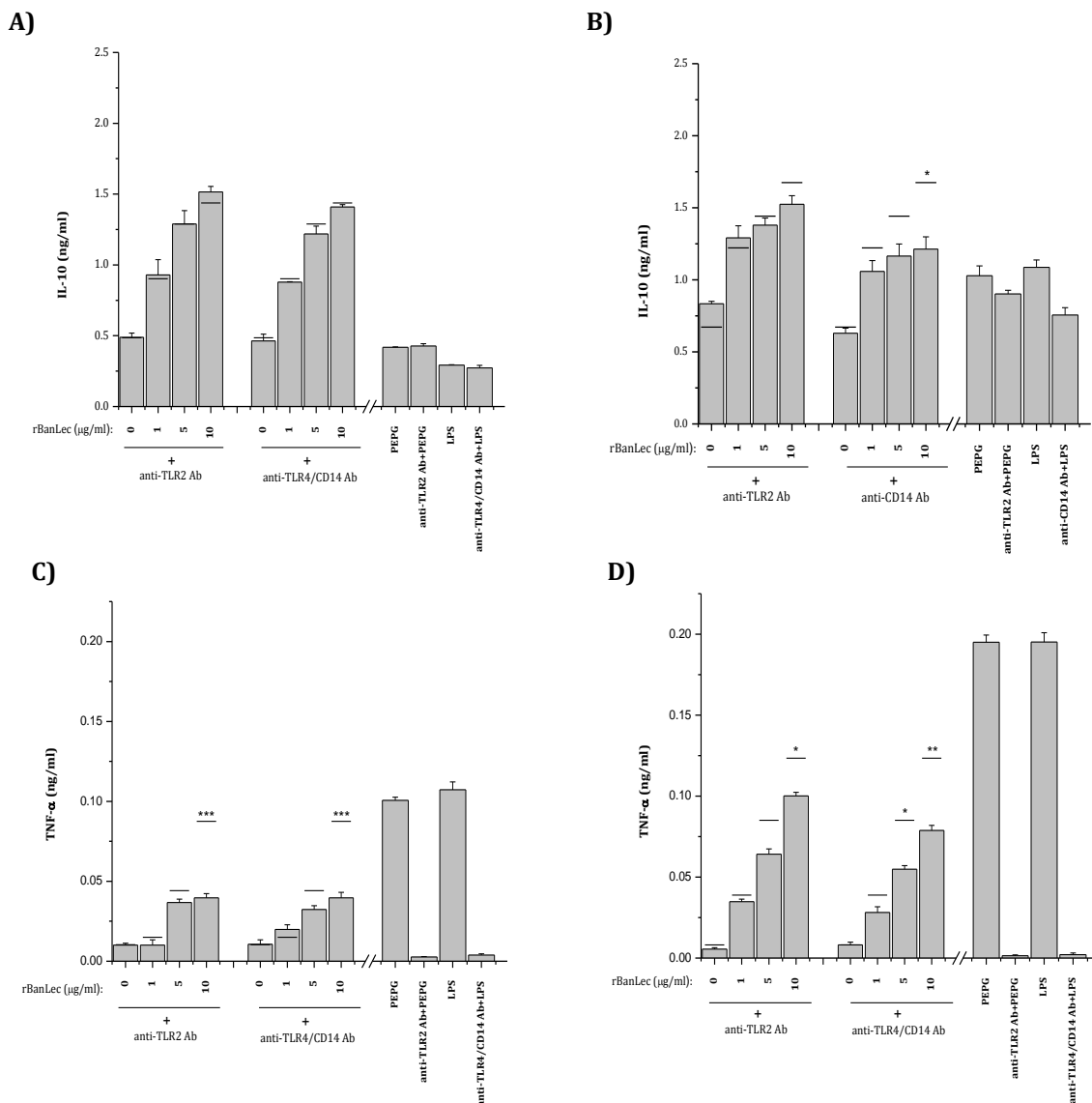
I u kulturama RM i u kulturama TGM porast koncentracije TNF- α , bio je praćen značajnijim porastom koncentracije IL-10 ($P < 0,0001$ za sve rBanLec-om stimulisane kulture u poređenju sa odgovarajućom nestimulisanom kulturom) (**Slika 4.10A**). Proporcionalno koncentraciji, rBanLec je u kulturama peritonealnih makrofaga stimulisao i produkciju TGF- β , s tim što je u kulturama RM i TGM dozno-zavisni uticaj rBanLec stimulacije na produkciju TGF- β bio različit (**Slika 4.10B**). U TGM kulturama, rBanLec je na pozitivan dozno-zavisan način stimulisao sekreciju TGF- β (rBanLec-stimulisani TGM: $P < 0,0001$ u poređenju sa nestimulisanom kulturom TGM). Među rBanLec-stimulisanim RM kulturama najintenzivnija produkcija TGF- β zabeležena u kulturi stimulisanoj sa 1 µg/ml rBanLec-a (vs. nestimulisani RM: $P < 0,0001$; vs. RM, 5 µg/ml rBanLec-a: $P < 0,0001$; vs. RM, 10 µg/ml rBanLec-a: $P < 0,0001$), a najniža u kulturi stimulisanoj rBanLec-om u

koncentraciji od 10 µg/ml rBanLec-a (vs. nestimulisani RM: $P < 0,05$; vs. RM, 10 µg/ml rBanLec-a: $P < 0,0001$).

4.1.2.5 Uloga TLR2 i CD14 u rBanLec-indukovanim promenama u produkciji NO-a i citokina od strane peritonealnih makrofaga

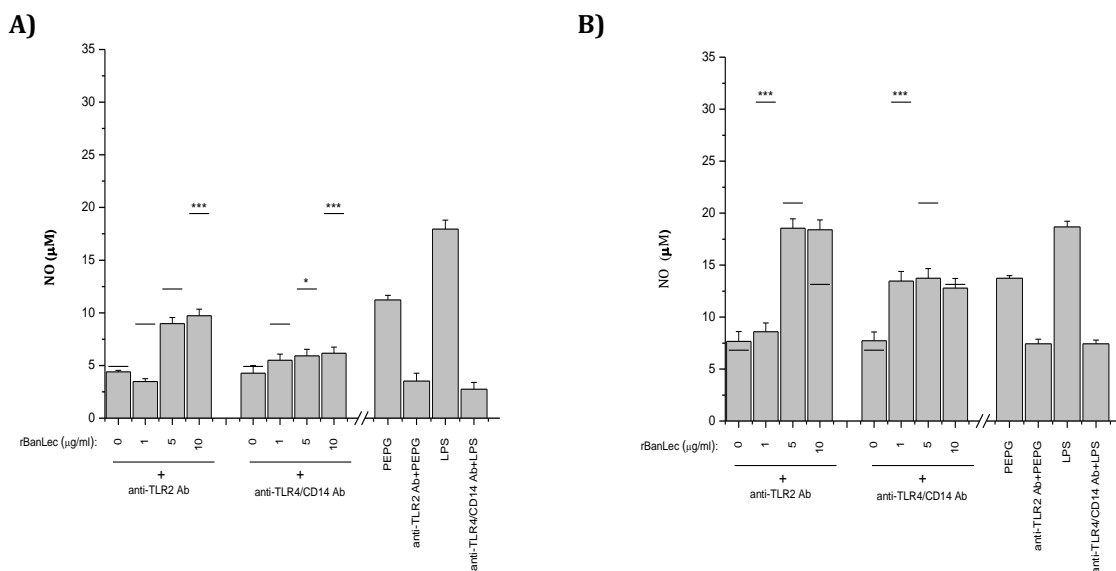
Da bismo utvrdili da li / u kojoj meri promene u produkciji NO i citokina TNF- α i IL-10 zavise od rBanLec-indukovane aktivacije preko TLR2 i TLR4/CD14, koristili smo blokirajuća anti-TLR2 i anti-CD14 antitela (At) u cilju sprečavanja TLR2- i TLR4/CD14-posredovane rBanLec stimulacije. U model sistemu koji je korišćen, primena pomenutih blokirajućih antitela nije značajno uticala na produkciju IL-10 nakon stimulacije klasičnim agonistima TLR2 (PEPG) i TLR4/CD14 (LPS) (**Slika 4.11A,B**). Rezultati primena navedenih blokirajućih At u RM i TGM kulturama pre stimulacije rBanLec-om su bili slični. Ni jedno od korišćenih blokirajućih antitela nije značajno uticalo na produkciju IL-10 u rBanLec-stimulisanim RM kulturama (**Slika 4.11A**), dok je u TGM kulturama značajan uticaj na produkciju IL-10 uočen jedino u kulturi, gde je pre stimulacije rBanLec-om koncentracije 10 µg/ml, dodato anti-CD14 At (TGM, anti-CD14 At + 10 µg/ml rBanLec: $P < 0,05$ u odnosu na TGM, 10 µg/ml rBanLec; **Slika 4.11B**).

Stimulacija RM i TGM PEPG-om ili LPS-om rezultovala je drastičnim porastom produkcije TNF- α (**Slika 4.11C,D**) i NO (**Slika 4.12A,B**), a u kulturama gde su pored odgovarajućih agonista dodata i pomenuta blokirajuća antitela produkcija ovih molekula je bila inhibirana. Preinkubacija RM sa blokirajućim anti-TLR2 At, redukovala je sekreciju TNF- α nakon rBanLec stimulacije i do 55% u poređenju sa RM kulturama stimulisanim istom količinom rBanLec-a ali bez prethodne inkubacije sa blokirajućim At (**Slika 4.11C**; RM, anti-TLR2 At + 10 µg/ml rBanLec: $P < 0,0001$ u odnosu na RM, 10 µg/ml rBanLec). Preinkubacija sa anti-CD14 At uticala je na produkciju TNF- α od strane rBanLec-stimulisanih RM na isti način kao i preinkubacija sa blokirajućim anti-TLR2 At (RM, anti-CD14 At + 10 µg/ml rBanLec: $P < 0,0001$ u odnosu na RM + 10 µg/ml rBanLec bez anti-CD14 At).



Slika 4.11. Uticaj TLR2- i CD14-posredovane aktivacije rBanLec-om na produkciju IL-10 (A, B) i TNF- α (C, D) u kulturijama RM (A, C) i TGM (B, D). RM i TGM su stimulirani rBanLec-om (1-10 $\mu\text{g/ml}$) u prisustvu blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 At. Kao interna kontrola testa korišćene su kulture RM i TGM stimulirane klasičnim agonistima TLR2 (peptidoglikan; PEPG) i TLR4/CD14 (lipopolisaharid; LPS) u prisustvu i bez blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 antitela. Nakon 48h duge stimulacije u supernatantima ćelijskih kultura određene su koncentracije IL-10 i TNF α ELISA-om. Koncentracije citokina izračunate su pomoću odgovarajuće standardne krive (odgovarajući rekombinantni citokini korišćeni kao standardi). Uzorci ($n=3$) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije citokina \pm SE. Statistička značajnost promena u sekreciji IL-10 i TNF α u odnosu na odgovarajuće (RM ili TGM) kulture stimulirane tokom 48h istom koncentracijom rBanLec-a bez prisustva blokirajućih antitela (srednje vrednosti za tri nezavisno analizirana uzorka označene —) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P<0,05^*$, $P<0,005^{**}$, $P<0,0001^{***}$).

Anti-TLR2 i anti-CD14 blokirajuća antitela negativno su uticala i na kapacitet rBanLec-stimuliranih TGM da produkciju TNF- α . U prisustvu blokirajućih At, sekrecija TNF- α se smanjila i do 82% od strane rBanLec-stimuliranih TGM, zavisno od stimulatorne rBanLec koncentracije (**Slika 4.11D**; TGM, anti-TLR2 At + 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec: $P < 0,05$ u odnosu na TGM, 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec; TGM, anti-CD14 At + 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec: $P < 0,05$ u odnosu na TGM, 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec; TGM, anti-CD14 At + 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec: $P < 0,05$ u odnosu na TGM, 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec).



Slika 4.12. Uticaj TLR2- i CD14-posredovane aktivacije rBanLec-om na produkciju NO u kulturama RM (A) i TGM (B). RM i TGM su stimulirani rBanLec-om (1-10 $\mu\text{g/ml}$) u prisustvu blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 At. Kao interna kontrola testa korišćene su kulture RM i TGM stimulirane klasičnim agonistima TLR2 (peptidoglikan; PEPG) i TLR4/CD14 (lipopolisaharid; LPS) u prisustvu i bez blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 antitela. Nakon 48h duge stimulacije u supernatantima ćelijskih kultura izmerena je koncentracija NO pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test). Koncentracija NO izračunata je pomoću odgovarajuće standardne krive (NaNO₂ korišćen kao standard). Uzorci (n=3) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost [NO] \pm SE. Statistička značajnost promena u produkciji NO u odnosu na odgovarajuće (RM ili TGM) kulture stimulirane tokom 48h istom koncentracijom rBanLec-a bez prisustva blokirajućih antitela (srednje vrednosti za tri nezavisno analizirana uzorka označene —) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Na kraju, blokiranjem TLR2 i CD14 na RM (**Grafik 4.12A**) i TGM (**Grafik 4.12B**), značajno je redukovana i produkcija NO nakon rBanLec stimulacije. Dobijeni rezultati su pokazali da je najintenzivnija redukcija NO sekrecije (~70%) zabeležena u kulturama RM

stimulisanim sa 10 µg/ml rBanLec-a (RM, anti-TLR2 At + 10 µg/ml rBanLec: $P < 0,001$ u odnosu na RM, 10 µg/ml rBanLec; RM, anti-CD14 At + 10 µg/ml rBanLec: $P < 0,001$ u odnosu na RM, 10 µg/ml rBanLec; **Grafik 4.12A**) i u kulturama TGM stimulisanim sa 1 µg/ml rBanLec (TGM, anti-TLR2 At + 1 µg/ml rBanLec: $P < 0,001$ u odnosu na TGM, 1 µg/ml rBanLec; TGM, anti-CD14 At + 1 µg/ml rBanLec: $P < 0,001$ u odnosu na TGM, 1 µg/ml rBanLec; **Grafik 4.12B**).

4.1.3 rBanLec kao modulator funkcionalnih karakteristika dendritskih ćelija

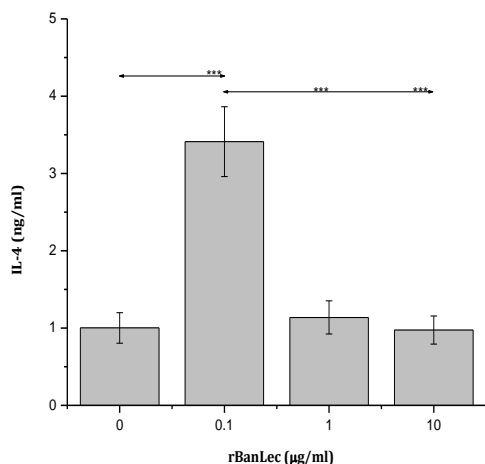
Da bismo ispitali da li i na koji način rBanLec moduliše funkcionalne karakteristike DĆ rađena su *in vitro* testiranja efekata rBanLec stimulacije na DĆ iz slezine BALB/c miša. DĆ koje su korišćene za testiranja izolovane su sortiranjem na protočnom citofluorimetru. Iz pune populacije splenocita sortirane su vijabilne ćelije čiji je fenotip bio $F4/80^-CD19^-CD11c^+CD11b^+MHCII^+$. Naknadnom proverom protočnom citofluorimetrijom ustanovljeno je da 95% sortiranih ćelija ispoljava $CD11c^+CD11b^+MHCII^+$ fenotip.

Imajući u vidu 1) da citokini deluju autokrino na DĆ određujući njihove funkcionalne karakteristike i 2) da DĆ produkcijom citokina utiču na diferencijaciju efektorskih T ćelija i usmeravaju imunski odgovor u određenom pravcu. Fokus ovog dela istraživanja je bio na uticaju rBanLec stimulacije na transkripciju kodirajućih gena i produkciju citokina IFN- γ (autokrini faktor sazrevanja proinflamatornih DĆ, pro-Th1 citokin), IL-4 (autokrini faktor sazrevanja anti-inflamatornih DĆ, pro-Th2 citokin) i IL-10 (marker regulatornih DĆ, regulatorni citokin) (de Jong *et al.*, 2005).

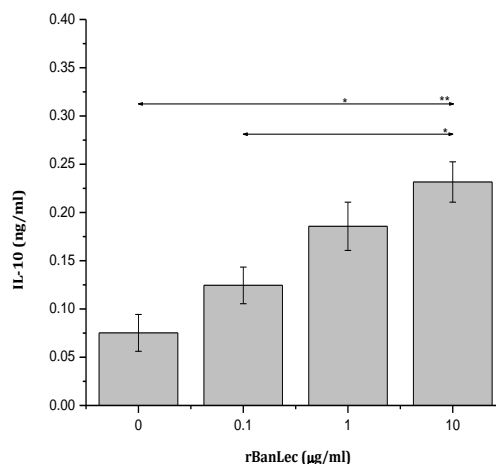
U cilju ispitivanja da li tretman rBanLec-om podstiče DĆ slezine BALB/c miša da produkuju IFN- γ , IL-4 i IL-10, analizirani su supernatanti sakupljeni nakon četrdesetosmočasovne stimulacije (**Slika 4.13**). Stimulacija DĆ rBanLec-om u koncentraciji od 0,1 µg/ml rezultovala je statistički značajnim porastom produkcije IL-4 u odnosu na konstitutivnu produkciju IL-4 u nestimulisanoj kulturi ($P < 0,0001$; **Slika**

4.13A). U rBanLec-stimuliranim (opseg rBanLec koncentracija 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$) kulturama DĆ slezine uočen je pozitivan dozno-zavisni porast sekrecije IL-10 (DĆ stimulirane rBanLec-om koncentracije 1 $\mu\text{g/ml}$: $P < 0,05$ i DĆ stimulirane rBanLec-om u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/ml}$: $P < 0,005$ u poređenju sa nestimuliranom kulturom; **Slika 4.13B).** Koncentracija IFN- γ u supernatantima DĆ kultura bila je ispod granice detekcije.

A)



B)



Slika 4.13. Uticaj rBanLec-a (1-10 $\mu\text{g/ml}$) na produkciju citokina A) IL-4 i B) IL-10 u supernatantima kultura DĆ slezine. Nakon 48h duge stimulacije u supernatantima ćelijskih kultura određene su koncentracije IL-4 i IL-10 ELISA-om. Koncentracije citokina izračunate su pomoću odgovarajuće standardne krive (odgovarajući rekombinantni citokini korišćeni kao standardi). Uzorci ($n=3$) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost koncentracije citokina \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Da bi se stekao uvid koliki je doprinos stimulacije DĆ preko TLR2 u rBanLec-indukovanim promenama ekspresije kodirajućih gena za IL-4, IL-10 i IFN γ , analizirane su promene u količini iRNK za IFN- γ , IL-4 i IL-10 u kulturama DĆ izolovanim iz slezina WT i TLR2 KO BALB/c miševa. Između rBanLec-stimuliranih kultura DĆ poreklom od WT i TLR2 KO životinja nije zabeležena statistički značajna razlika u ekspresije gena za navedene citokine, što ukazuje da u slučaju rBanLec-stimuliranih DĆ slezine stimulacija preko TLR2 nije ključna / neophodna za pokretanje produkcije IFN- γ i IL-4.

Nakon 48h stimulacije rBanLec-om, nivo ekspresije *Il-10* bio je nizak i u WT i u TLR2 KO DĆ i nije zavisio od intenziteta rBanLec stimulacije (**Tabela 4.1**). Nezavisno od izvora DĆ, pokazano je da rBanLec dozno-zavisno utiče na ekspresiju *Ifn-γ* i *Il-4* gena u DĆ slezine (**Tabela 4.1**). U kulturama DĆ (WT i TLR2 KO) stimulisanim rBanLec-om u koncentraciji 0,1 μg/ml, ekspresija gena za IFN-γ se povećala približno 6 puta u odnosu na njegovu bazalnu ekspresiju u nestimulisanoj kulturu DĆ. Sa porastom koncentracije rBanLec-a, zabeležen je pad u ekspresiji *Ifn-γ*. Nivo iRNK za IFN-γ je u kulturama DĆ (WT i TLR2 KO) stimulisanim rBanLec-om u koncentraciji 10 μg/ml bio manji od bazalnog nivoa prisutnog u nestimulisanoj kulturi. Sličan trend je zabeležen i u slučaju ekspresije gena za IL-4. rBanLec u koncentraciji od 0,1 μg/ml značajno je stimulisao *Il-4* ekspresiju u kulturama DĆ (WT i TLR2 KO) – u ovim kulturama nivo ekspresije iRNK za IL-4 je bio približno 75 puta veći od bazalnog. U kulturi DĆ stimulisanom rBanLec-om u koncentraciji od 10 μg/ml ekspresija *Il-4* gena pala je ispod nivoa bazalne ekspresije u nestimulisanim kulturama (**Tabela 4.1**).

Promena nivoa ekspresije citokin specifične iRNK						
rBanLec μg/ml	IFN-γ		IL-4		IL-10	
	WT	TLR2 KO	WT	TLR2 KO	WT	TLR2 KO
0,1	5,95±0,87	5,55±0,5	76,01±16,12	74,30±8,13	1,19±0,26	1,20±0,13
1	0,82±0,34***	1,01±0,34***	2,01±0,17***	1,89±0,12***	1,18±0,27	1,09±0,12
10	0,79±0,01***	0,88±0,02***	0,73±0,01*** ##	0,74±0,01*** ##	1,15±0,14	0,95±0,12

Tabela 4.1. Ekspresije iRNK za citokine IFN-γ, IL-4 i IL-10 u kulturama DĆ stimulisanim 48h različitim koncentracijama rBanLec-a (0,1, 1 i 10 μg/ml). Nivo ekspresije određene iRNK je izrežen kao relativna vrednost u odnosu na odgovarajuću nestimulisanu kulturu. Uzorci (n=3) su analizirani u triplikatu. Statistička značajnost uočenih razlika (poređene grupe: * - u odnosu na kulturu stimulisanu sa 0,1 μg/ml i # - u odnosu na kulturu stimulisanu sa 1 μg/ml označene su strelicama) procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje (P <0,005##, P<0,0001***).

4.1.4 Uticaj rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike antigen-perzentujućih ćelija – diskusija

Rezultati prikazani u ovom delu teze pokazuju da rBanLec ima sposobnost da moduliše funkcionalne karakteristike APC. Prikazana istraživanja predstavljaju prvu detaljnu analizu uticaja neke od izoformi BanLec-a na funkcionalne karakteristike APC i značajna su jer pokazuju, na modelu peritonealnih makrofaga, da ishod stimulacije BanLec-om nije nužno jednoznačan nego zavisi od neposrednog prethodnog „imunološkog iskustva“ stimuliranih ćelija. Takođe, prema dostupnim literaturnim podacima, prvi put je pokazano da BanLec uspostavlja interakciju sa TLR2 i CD14.

rBanLec, specifično prepoznajući oligosaharidne strukture, uspostavlja interakcije sa velikim brojem membranskih proteina APC-a. Pokazano je da među strukturama sa kojima rBanLec uspostavlja interakcije spadaju TLR2 i CD14, koreceptor TLR4. Analize proteinskih sekvenci mišjih i humanih TLR2, TLR4 i TLR4-pridruženog ko-receptora CD14, ukazuju na postojanje više pozicija u njihovim polipeptidnim lancima gde može doći do N-glikozilacije tj. vezivanja razgranatih, manozom bogatih, oligosaharidnih struktura za koje bi se rBanLec mogao vezati. Istraživanja koja su sledila ove nalaze su potvrdila da su i TLR2 i TLR4 glikoproteini kod kojih su na više pozicija N-glikozidnom vezom vezani razgranati, manozom bogati, oligosaharidi (da Silva & Ulevitch, 2002; Kataoka *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2008).

Vrlo sličan obrazac TLR2-CD14-TLR4 prepoznavanja je uočen i u istraživanjima vezanim za ArtinM, manoza-specifičan lektin žakalinske familije lektina koji je izolovan iz biljke *Artocarpus heterophyllus*. Mariano i saradnici su pokazali da ArtinM vezuje TLR2 na šećer-zavisan način i da po uspostavljanju ove interakcije ispoljava svoju imunomodulatornu aktivnost koja se ogleda u pojačanju sekrecije IL-10 i IL-12p40 od strane RM (Mariano *et al.*, 2014).

rBanLec, u koncentracijama do 10 µg/ml, ne deluje citotoksično na makrofage. Šta više, rBanLec stimulacija indukuje njihovu, manje ili više intenzivnu, proliferaciju. Uzimajući u obzir i rezultate ispitivanja uticaja rBanLec-a na funkcionalne karakteristike peritonealnih makrofaga miševa C57BL/6 soja može se zaključiti da mitogeni uticaj

rBanLec-a na makrofage nije *species*-specifičan nego je prvenstveno određen funkcionalnim stanjem makrofaga (Marinković *et al.*, 2017). Naime, kod RM, nezavisno od njihovog porekla, rBanLec u testiranom opsegu koncentracija pokreće relativno slab proliferativni odgovor dok je kod rBanLec-stimuliranih TGM uočena intenzivna proliferacija koja je pozitivno korelirala sa stimulatornom rBanLec dozom. Specifičan dozno-zavisan uticaj rBanLec-a na aktivnosti iNOS i arginaze, kao i na odnos njihovih aktivnosti, mogao bi biti jedno od objašnjenja za uočene razlike u proliferativnom kapacitetu RM i TGM BALB/c miša nakon rBanLec stimulacije. Naime, NO, zavisno od koncentracije, može imati citotoksično dejstvo dok su produkti arginazne aktivnosti bitni u procesima ćelijskog rasta i deobe (Meurus *et al.*, 2003). U svim rBanLec-stimuliranim BALB/c RM kulturama arginazna aktivnost dominira nad iNOS (što je u skladu sa Th2-genetskom osnovom BALB/c miševa, Mills *et al.*, 2000) ali u kulturi stimuliranoj rBanLec-om u koncentraciji od 10 µg/ml, gde je zabeležen najniži intenzitet proliferacije, izmerena je najveća koncentracija NO i najniža aktivnost arginaze. U rBanLec-stimuliranim BALB/c TGM kulturama, gde su uočene značajne dozno-zavisne razlike u proliferativnom odgovoru na rBanLec stimulaciju, uočene su, u poređenju sa RM, i intenzivnije dozno-zavisne promene u odnosu aktivnosti iNOS i arginaze. U skladu sa iznetom pretpostavkom, kod BALB/c TGM, najintenzivnija proliferacija zabeležena je u kulturama stimuliranim rBanLec-om u koncentraciji od 10 µg/ml, gde je i odnos aktivnosti arginaze i iNOS bio najpovoljniji za ćelijsku proliferaciju.

U skladu sa iznetom pretpostavkom da intenzitet proliferativnog odgovora negativno korelira sa odnosom aktivnosti iNOS / arginaza su i rezultati koji se odnose na proliferaciju RM C57BL/6 miševa (Marinković *et al.*, 2017). Međutim, činjenica da kod C57BL/6 TGM intenzitet proliferativnog odgovora pozitivno korelira sa dominacijom iNOS aktivnosti ukazuje da proliferativni odgovor TGM na rBanLec stimulaciju ne može biti objašnjen samo karakteristikama metabolizma arginina (Marinković *et al.*, 2017).

Promene u aktivnosti MPO i iNOS ukazuju da rBanLec stimulacija dovodi, na dozno-zavisan način, do povećana antimikrobnog i tumoricidnog potencijala makrofaga. Moglo bi se reći da je smanjen kapacitet makrofaga da redukuje NBT (proporcionalno

generisanom O_2^-) u suprotnosti sa prethodnom tvrdnjom, ali sa druge strane, on se može posmatrati i kao indikator uključivanja samoograničavajućih mehanizama koji sprečavaju prekomernu produkciju ROS-a. Naime, smanjena produkcija O_2^- može biti direktna posledica povećane aktivnosti MPO ali i ukazivati na ekspresiju enzima odgovornih za antioksidativnu zaštitu ćelije poput superoksid dismutaze (Bogdan *et al.*, 2007). Pored toga, deo generisanih O_2^- može biti neutralisan sa NO koji makrofagi intenzivno generišu nakon rBanLec stimulacije (Valko *et al.*, 2007).

Odnosi aktivnosti iNOS i arginaze u rBanLec-stimulisanim kulturama TGM i RM BALB/c miševa ukazuju da rBanLec, na pozitivan dozno-zavisani način, pojačava proinflamatorni potencijal RM, dok po istom obrascu kod TGM pojačava anti-inflamatorni karakter (Martinez & Gordon, 2014). Međutim, rezultati istraživanja rađenim na makrofagima poreklom iz C57BL/6 miševa ukazuju da obrazac promena u aktivnosti arginaze i iNOS nakon stimulacije rBanLec-om u velikoj meri zavisi od genetske osnove (Marinković *et al.*, 2017) i da se prethodno izneto opaženje, prvenstveno u delu koji se odnosi na TGM, ne može smatrati opštim pravilom. Uzimajući u obzir rezultate dobijene na makrofagima BALB/c i C57BL/6 miševa može se zaključiti da rBanLec, na pozitivan dozno-zavisani način, povećava proinflamatorni kapacitet RM pri čemu odnosi aktivnosti arginaze i iNOS ostaju u genetski predeterminisanim okvirima, dok kod TGM podstiče uspostavljanje inherentnog odnosa arginazne i iNOS aktivnosti koji je narušen prethodnim izlaganjem inflamatornom miljeu.

Poređenje rezultata prikazanih u ovoj tezi sa rezultatima istraživanja uticaja rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike C57BL/6 makrofaga (Marinković *et al.*, 2017) ukazuje na sojno-specifičan doprinos pojedinačnih regulatornih mehanizama ukupnoj kontroli aktivnosti arginaze nakon rBanLec stimulacije. Sojno-specifičan uticaj rBanLec stimulacije je i u skladu sa nalazima da RM BALB/c i C57BL/6 miševa 1) zahtevaju različitu (ko)stimulaciju preko receptora iz sistema urođene imunosti i IFN- γ da bi povećali iNOS aktivnost, i 2) uspostavljaju značajno različit metabolizam arginina (kod BALB/c RM, u skladu sa pro-Th2 genetskom osnovom, konstitutivno aktivnost arginaze dominira nad NOS aktivnošću (Mills *et al.*, 2000)). rBanLec, vezujući se za receptore

sistema urođene imunosti pokreće intracelularne signalne procese, a potrebni IFN- γ može biti produkovan od strane samih makrofaga nakon (autokrine) stimulacije produkovanim IL-12. Očekivano, porast NO produkcije od strane rBanLec-stimuliranih BALB/c makrofaga, kao i kod C57BL/6 makrofaga, je primarno određen intenzitetom proinflamatornog signala na šta ukazuje značajna pozitivna korelacija između količine produkovanog NO i koncentracije IL-12 u medijumu. Sa druge strane, smanjenje produkcije NO u prisustvu blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 antitela potvrđuje i značaj stimulacije preko receptora urođene imunosti. Sa druge strane, dobijeni rezultati ukazuju da bi, za razliku od C57BL/6 RM, intenzitet TGF- β -posredovane stimulacije mogao biti važan za regulaciju arginazne aktivnosti u rBanLec-stimuliranim makrofagima BALB/c miša; kod makrofaga C57BL/6 miševa rBanLec stimulacija je rezultovala smanjenjem aktivnosti arginaze uprkos pojačanoj produkciji TGF- β .

Vezivne karakteristike rBanLec-a (sposobnost vezivanja velikog broja membranskih proteina, uključujući TLR2 i CD14) i citokinski milje generisan nakon rBanLec *in vitro* stimulacije peritonealnih makrofaga ukazuju na tip II aktivacije makrofaga kao dominantan. rBanLec stimulacija i RM i TGM, nezavisno od njihovog porekla (Marinkovic *et al.*, 2017), rezultuje sekrecijom TNF- α koja je praćena porastom sekrecije IL-10, što je karakteristika odgovora makrofaga na tip II aktivacije (Martinez & Gordon, 2014). Rezultati istraživanja gde su korišćena anti-TLR2 i anti-CD14 antitela koja su sprečavala signalizaciju preko TLR2 i TLR4 / CD14 ukazuju da je stimulacija ovih receptora značajna prvenstveno za aktiviranje proinflamatorne komponente odgovora na rBanLec stimulaciju. Nalaz da primena blokirajućih anti-TLR2 i anti-CD14 antitela utiče negativno na produkciju TNF- α i aktivnost iNOS je u skladu sa publikacijama koje pokazuju da lektini, kao agonisti TLR, iniciraju produkciju proinflamatornih medijatora (Bieback *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2008). Sa druge strane generalni izostanak značajnog uticaja blokade stimulacije preko TLR-2 i TLR-4 / CD14 na produkciju IL-10 (produkcija smanjena samo kod TGM u prisustvu anti-CD14 antitela) potvrđuje da veliki broj različitih mehanizama može dovesti do pokretanja produkcije IL-10 i da IL-10-promovišući kapacitet mehanizama nezavisnih od TLR2 i TLR4/CD14 nije zanemarljiv.

Simultani porast sekrecije TNF- α i IL-10 je zajednička karakteristika odgovora mišjih RM i TGM na rBanLec stimulaciju, ali, u skladu sa višestruko dokumentovanom plastičnošću makrofaga, ukupni citokinski profili rBanLec-stimuliranih TGM i RM nisu istovetni. rBanLec različito utiče na produkciju IL-12 (pro-Th1 citokin) i IL-4 (stimulator i marker Th2 tipa imunskog odgovora) od strane RM i TGM BALB/c miša. Stoga se, zavisno od toga da li u oblikovanju adaptivnog imunskog odgovora BALB/c miša učestvuju rBanLec-stimulirani RM ili TGM, može se očekivati uspostavljanje imunskog odgovora različitih karakteristika (RM pro-Th1, TGM pro-Th2). Međutim, poređenje citokinskog miljea koji stvaraju BALB/c RM i TGM nakon stimulacije rBanLec-om sa citokinskim miljeima generisanim od strane istog tipa makrofaga poreklom iz C57BL/6 miša ukazuje da se ne može određen, striktno definisani, citokinski profil pripisati rBanLec-stimuliranim RM ili TGM.

Analiza promena u produkciji efektorskih i regulatornih citokina u kulturama RM i TGM BALB/c miša nakon rBanLec stimulacije ukazuje na postojanje više regulatornih mehanizama čiji je cilj sprečavanje intenzivnog, prekomernog, zapaljenskog procesa. Grupa mehanizama koja bi mogla doprineti smanjenju produkcije IL-12 od strane TGM BALB/c miša nakon rBanLec stimulacije bazira se na uzajamnom uticaju efektorskih citokina. Poznato je da Th2 citokini (IL-4) negativno utiču na produkciju Th1 citokina (IL-12, IFN- γ) i obrnuto (Chensue *et al.*, 1994; Wurtz *et al.*, 2004), ali to nije jedini način regulacije produkcije Th1 i Th2 citokina. Uočeno dozno-zavisno smanjenje produkcije IL-12 od strane rBanLec-stimuliranih TGM moglo bi biti i posledica anti-inflamatornog dejstva TNF- α – kod makrofaga koji su diferencirani u inflamatornom miljeu (TGM) TNF- α utiče negativno na produkciju IL-12 tako što inhibira transkripciju IL-12p40 subjedinice (Zakharova & Ziegler, 2005). Pored toga, rBanLec stimulacija je značajno stimulisala produkciju IL-10 i TGF- β , citokina koji imaju izrazito anti-inflamatorno dejstvo. IL-10 direktno negativno utiče na produkciju proinflamatornih medijatora, u prvom redu IL-12 (Rahim *et al.*, 2005), dok TGF- β daje važan signal za ekspresiju arginaze i favorizuje uspostavljanje M2 funkcionalnog fenotip (Sanjabi *et al.*, 2009). Pored TGF- β , i anti-inflamatorno dejstvo IL-10 i IL-4 obuhvata inhibiciji NO produkcije i simultanu

stimulaciju arginazne aktivnosti (Boutard *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2012). Konačno, IL-10 i TGF- β , kada deluju istovremeno, uzajamno pojačavaju anti-inflamatorno dejstvo (Levings *et al.*, 2002). TGF- β takođe pojačava i opisano anti-inflamatorno dejstvo TNF- α (Masli *et al.*, 2009).

Imajući sve navedeno u vidu, a ako uzmemo dozno-zavisani obrazac promena u NO produkciji nakon rBanLec stimulacije kao indikator aktivnosti proinflamatornih citokina, nameću se zaključci da:

- 1) rBanLec na dozno-zavisani način povećava proinflamatorni kapacitet RM BALB/c miševa kroz stimulaciju produkcije IL-12 i istovremeno negativno utičući na produkciju IL-4. Dozno-zavisnom povećanju proinflamatornog kapaciteta rBanLec-stimulisanih RM doprinosi i slabljenje TGF- β -posredovanog regulatornog signala.
- 2) rBanLec na dozno-zavisani način povećava anti-inflamatorni kapacitet TGM BALB/c miševa kroz stimulaciju produkcije IL-4, IL-10 i TGF- β i istovremeni negativno utičući na inicijalno visoku produkciju IL-12 (rezultat generisanja TGM izazivanjem sterilne inflamacije).

Rezultati prikazani u ovom delu teze potvrđuju da rBanLec, pored toga što može da moduliše funkcionalne karakteristike makrofaga, utiče i na funkcionalne karakteristika DĆ. Istraživanja koja su bila prvenstveno usmerena na evaluaciju rBanLec uticaja na produkciju citokina od strane DĆ pokazuju da rBanLec ima kapacitet da, na dozno-zavisani način, moduliše produkciju pro-Th1, pro-Th2 i regulatornih citokina, ali da taj modulatorni efekat prvenstveno kada je reč o efektorskim citokinima ne zavisi značajno od stimulacije preko TLR2. Takođe, obrazac promena u produkciji IFN- γ , IL-4 i IL-10 od strane rBanLec-stimulisanih DĆ je u skladu sa dosadašnjim rezultatima koji ukazuju da rBanLec u fiziološkim uslovima pokreće balansirani proinflamatorni odgovor.

U poređenju sa uticajem rBanLec stimulacije na produkciju citokina od strane RM BALB/c miša, rBanLec je kod DĆ na isti, pozitivan dozno-zavisani, stimulisao produkciju IL-10 dok se uticaj na produkciju efektorskih citokina razlikovao. Najintenzivnije promene na nivou ekspresije iRNK / produkcije efektorskih citokina IFN- γ i IL-4 uočene su u DĆ kulturama stimulisanim rBanLec-om u niskoj koncentraciji (0,1 $\mu\text{g/ml}$), dok su u

slučaju RM intenzivne promene u produkciji efektorskih citokina podrazumevale i intenzivnu rBanLec stimulaciju (10 µg/ml). Simultana analiza nivoa ekspresije iRNK za IFN-γ, IL-4 i IL-10 i koncentracije ovih citokina u supernatantima kultura DĆ slezine stimuliranih 48h rBanLec-om ukazuje da je promena u produkciji IL-10 deo inicijalnog odgovora DĆ slezine na stimulaciju rBanLec-om, a da potom dolazi do promena u produkciji IL-4 i IFN-γ.

Porast produkcije IL-10 neposredno nakon aktivacije opisan je za različite tipove DĆ. Brojni literaturni podaci ukazuju da su agonisti TLR2 posebno potentni u pokretanju IL-10 sekrecije od strane DĆ (Yanagawa & Onoé, 2007) ali je opisano i više TLR2-nezavisnih puteva koji rezultuju pojačanom produkcijom IL-10 od strane DĆ. Pokazano je da produkcija IL-10 može biti pokrenuta i stimulacijom PAMP-specifičnih receptora različitih od TLR2 (TLR4, TLR9, NOD2, DC-SIGN, dektin I; Saraiva & O'Garra, 2010). Produkcija IL-10 je i kod DĆ, kao i kod drugih IL-10 produkujućih ćelija, regulisana na više nivoa (na nivou ekspresije gena, post-transkripciona regulacija) i veliki broj unutarćelijskih puteva specifično, zavisno od tipa ćelije i njenih funkcionalnih karakteristika, učestvuje u njenom pokretanju (više transkripcionih faktora utiče na transkripciju *Il10*, različiti signalni putevi; Xiaojing *et al.*, 2015). Autokrino / parakrino dejstvo drugih citokina takođe utiče na intenzitet produkcije IL-10 od strane DĆ. Tako IL-12, koji u najvećem broju slučajeva DĆ sekretuju zajedno sa IL-10 neposredno nakon aktivacije, negativno utiče na produkciju IL-10 (O'Garra & Murphy, 2009; Xiaojing *et al.*, 2015). Konačno, i sam IL-10 po principu negativne ili pozitivne povratne sprege, utiče na svoju produkciju, ali mehanizmi koji određuju balans između IL-10-posredovanih pozitivnih i negativnih povratnih sprega nisu još uvek razjašnjeni (Corinti *et al.*, 2001). Rani rast u produkciji IL-10, poput inicijalnog rasta produkcije IL-2 pri stimulaciji T limfocita, mogao bi biti od velikog značaja za aktiviranje regulatorne komponente imunskog odgovora koja će sprečiti razvoj eventualnog autoreaktivnog imunskog odgovora (Saraiva & O'Garra, 2010). Naime, IL-10, delujući autokrino, smanjuje aktivacioni potencijal DĆ (negativno utiče na nivo ekspresije MHCII i kostimulatornih molekula), a i pozitivno deluje na Treg koje, na antigen-specifičan način ili po *by stander*

obrascu, sprečavaju uspostavljanje autoreaktivnog imunskog odgovora (Mittal *et al.*, 2015). Ovo bi pogotovo moglo biti značajno u slučaju DĆ koje, zahvaljujući sposobnosti unakrsne prezentacije, prezentuju antigene ćelija koje odumiru ili mikrobijalne antigene koji su na nivou kratkih peptidnih sekvenci slični strukturama samog organizma.

Promena u ekspresiji iRNK za IFN- γ uočena je nakon 48h stimulacije i ukazuje da bi se u periodu nakon toga mogao očekivati i porast koncentracije IFN- γ u supernatantu rBanLec stimulisanih DĆ kultura. Ovaj nalaz je u skladu sa nalazima velikog broja istraživačkih grupa 1) da DĆ ne proizvode konstitutivno IFN- γ (Kalupahana *et al.*, 2005; Rojas & Krishnan, 2010) i 2) da do porasta produkcije IFN- γ ne dolazi neposredno nakon aktivacije DĆ (Kapsenberg, 2003; Kalupahana *et al.*, 2005). Produkcija IFN- γ nije karakteristika samo jedne populacije DĆ. Pokretanje sekrecije IFN- γ od strane DĆ dolazi nakon specifične stimulacije koja aktivira intracelularne signalne puteve i utiče na karakteristike mikrookoline u kojoj se stimulisana DĆ nalazi. Solubilni faktori iz DĆ mikrookoline autokrino / parakrino doprinose pokretanju produkcije IFN- γ (Pan *et al.*, 2004). IL-12 / IL-18 vezivanje za specifične receptore na DĆ predstavlja najpotentniji signal za pokretanje IFN- γ produkcije u DĆ i ona, kao i kod IFN- γ -produkujućih T limfocita, korelira sa intracelularnim nivoom T-bet transkripcionog faktora (Lighvani *et al.*, 2001). U suprotnosti sa široko prihvaćenim (i u nebrojeno sistema potvrđenim) stavom da citokini Th2 spektra (IL-4) i citokini Th1 spektra (IL-12, IFN- γ) ispoljavaju uzajamno negativno dejstvo, kod DĆ prisustvo IL-4 u mikrookolini pre stimulacije i / ili nakon stimulacije može pojačati produkciju proinflamatornih citokina prvenstveno delujući pozitivno na produkciju IL-12 (Yao *et al.*, 2005). Dugo je smatrano da DĆ ne proizvode IL-4, ali danas se zna da signalni put koji obuhvata aktivaciju STAT-6 dovodi do sekrecije IL-4 koji potom autokrino / parakrino, vezujući se za IL4R na DĆ, stimuliše IL-4 produkciju (Maroof *et al.*, 2006). Sekreciju IL-4 od strane DĆ podstiče i IL-10 delujući autokrino (Corinti *et al.*, 2001). Sa druge strane, sam IL-4, STAT-6 zavisnim putem, postepeno suprimira produkciju IL-10 što dodatno favorizuje usmeravanje diferencijacije aktiviranih T limfocita u Th1 pravcu (Yao *et al.*, 2005). Pitanje koje ostaje za dalja istraživanja odnosi se na primarni izvor IL-4 u rBanLec stimulisanim DĆ kulturama. Da li

su "kontaminirajuće" ćelije (95% ćelija MHCII+CD11b+CD11c+) ili neka specifična DĆ populacija inicijalni izvor IL-4 nakon stimulacije rBanLec-om mogla bi da pokažu istraživanja gde će selektivniji odabir markera karakterističnih za DĆ omogućiti ispitivanja na homogenijim populacijama ćelija.

Ispitivanje uticaja rBanLec-stimulacije na funkcionalne karakteristike APĆ rađeno je na peritonealnim makrofagima i populaciji DĆ slezine miša. Imajući u vidu tkivno-specifične razlike među populacijama makrofaga i DĆ, ekstrapolacija dobijenih rezultata na specifično tkivo kolona morala bi biti rađena sa oprezom. Ipak, rezultati dobijeni u ovim model sistemima mogu u određenoj meri doprineti objašnjenju promena u debelom crevu nakon specifične stimulacije rBanLec-om. Između peritonealne šupljine i mukoze GIT-a, iako su dve anatomski definisane celine, postoji intenzivna ćelijska komunikacija i pretpostavlja se da u fiziološkim uslovima jedan deo ukupnog pula makrofaga u mukozni creva vodi poreklo iz peritonealne šupljine. Pored toga, pokazano je da makrofagi iz peritonealne šupljine, privučeni od strane lokalnih inflamatornih stimulusa, migriraju u debelo crevo i tamo aktivno učestvuju u imunskom odgovoru protiv patogena (Fraga-Silva *et al.*, 2013). Pul DĆ slezine korišćen u prikazanim istraživanjima dominantno sadrži kDC (MHCII+CD11c+F4/80⁻). kDC se međusobno razlikuju po ekspresiji površinskih markera uključujući CD4, CD8 α i CD11b i po funkcionalnim karakteristikama. DĆ slezine koje odlikuje visoka ekspresija CD11b⁺ dominantno ne ekspimiraju CD8 α ⁺, a grubo se dele u dve populacije koje se, između ostalog, razlikuju po ekspresiji CD4. CD8 α ⁺ DĆ najčešće ekspimiraju nizak nivo CD11b u poređenju sa drugim DĆ populacijama i čine 20-40% kDC slezine. Između CD8 α ⁺CD11b^{low} DĆ slezine i CD103⁺CD11b⁻ DĆ u nelimfoidnim tkivima (poput GIT-a) dokumentovan je visok stepen funkcionalne sličnosti (Merad *et al.*, 2013).

4.2 Imunomodulatorno dejstvo rBanLec-a u debelom crevu miša u fiziološkim uslovima

Osnov za razmatranje rBanLec-a kao imunomodulatora u gastrointestinalnom traktu čine: 1) zadovoljavajuća stabilnost rBanLec-a u uslovima digestivnog trakta (Dimitrijević *et al.*, 2010), 2) sposobnost da se veže za epitel tankog creva i prođe do limfoidnog tkiva pridruženog crevnoj mukozi (Dimitrijević *et al.*, 2012), i 3) kapacitet da moduše funkcionalne karakteristike APĆ i efektorskih ćelija imunskog sistema (Stojanović *et al.*, 2010). U ranijim istraživanjima su analizirani određeni aspekti imunomodulatornog dejstva rBanLec-a u tankom crevu dok njegov uticaj na lokalni imunski odgovor u debelom crevu nije izučavan.

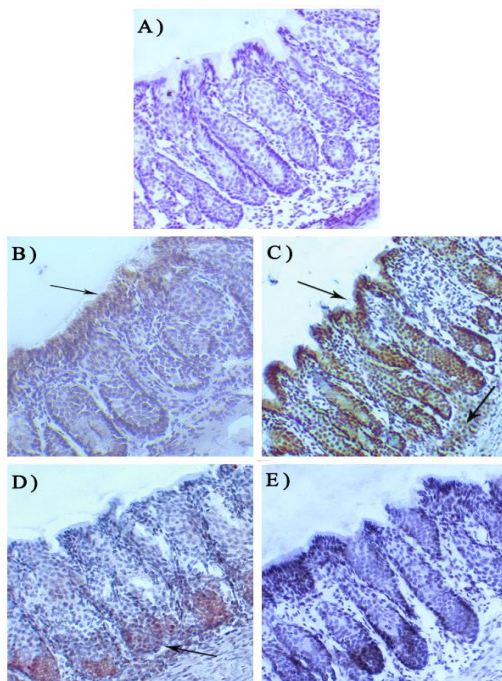
U našoj eksperimentalnoj postavci, rBanLec je primenjen rektalno, u vidu rastvora, jer ovaj način aplikacije omogućava dobru kontrolu lokalno primenjene količine rBanLec-a, a time i sticanje preciznijeg uvida u doznu-zavisnost lokalnih efekata rBanLec stimulacije.

4.2.1 Vezivanje rBanLec-a za epitel debelog creva i dinamika njegovog prolaska u subepitelni kompartment

Spečifično vezivanje rBanLec-a za lumensku površinu debelog creva i brzina translokacije do submukoznog sloja praćeni su tokom 72h od jednokratne rektalne primene rBanLec-a (**Slika 4.14**).

Imunohistohemijska analiza uzdužnog preseka tkiva debelog creva pokazala je da rBanLec interaguje sa epitelom creva i da je 1h nakon aplikacije lokalizovan na vrhovima vila i u gornjem delu kripte debelog creva (**Slika 4.14B**). Nakon 24h, došlo je do značajnih promena u lokalizaciji rBanLec-a - rBanLec je detektovan ne samo na vrhovima vila već i u prostoru unutar kripte (**Slika 4.14C**). Uočene su i male količine rBanLec-a u subepitelnom sloju, LP-i. Kao što se može videti na slike **Slici 4.14D**, 48h nakon aplikacije, rBanLec je i dalje bio prisutan u dnu crevnih kripta ali je dominantno bio lokalizovan u subepitelnom odeljku. rBanLec se nije mogao detektovati ni u jednom mukoznom kompartmentu 72h

nakon rektalne aplikacije (**Slika 4.14E**). Histološka analiza nije ukazala na patološke promene u strukturi tkiva nakon rektalne aplikacije rBanLec-a.



Slika 4.14. Imunohistochemijska analiza lokalizacije rBanLec-a u tkivu debelog creva tokom 72h od jednokratne rektalne aplikacije rastvora rBanLec/PBS (10 µg/ml). Na slici su predstavljene reprezentativne mikrografije uzdužnog preseka tkiva debelog creva A) kontrolnih miševa tretiranih PBS-om i miševa tretiranih rBanLec-om, sakupljeni B) 1h, C) 24h, D) 48h i E) 72h nakon rektalne aplikacije rBanLec-a. rBanLec je korišćen u biotinisanoj formi. Na tkivnim presecima rBanLec je detektovan pomoću sistema extrAvidin-peroksidaza/DAB. Na mestu lokalizacija rBanLec-a na histološkim presecima se uočava braon obojenje (označena strelicama). Tkivni preseki su obojeni hematoksilinom i posmatrani pod mikroskopom na uveličanju 10x.

4.2.2 Uticaj rBanLec-a na citokinski milje u debelom crevu

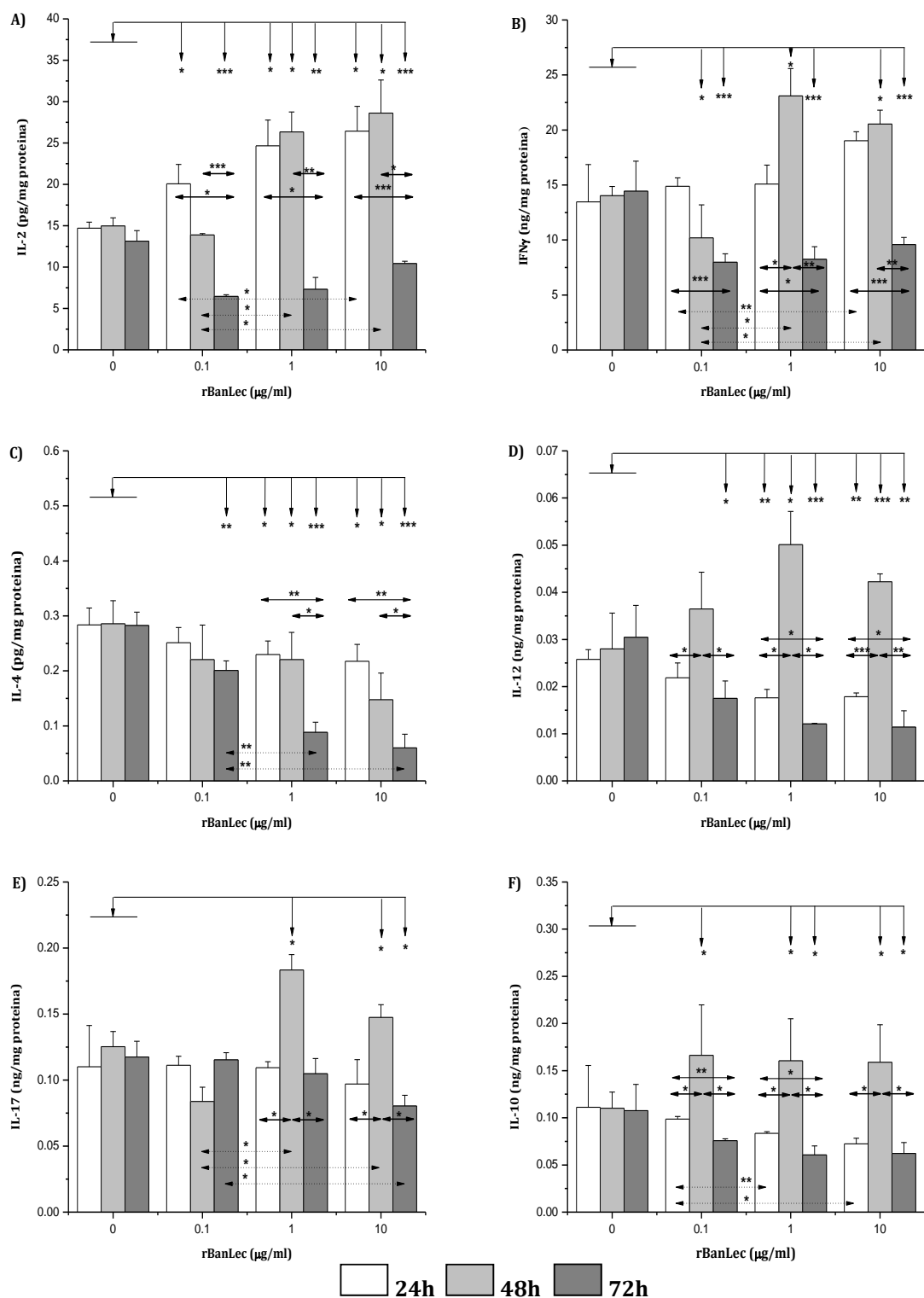
Kako bi se ispitaio uticaj rBanLec stimulacije na citokinski milje, 24h, 48h i 72h nakon jednokratne rektalne aplikacije rBanLec-a u koncentracijama 0,1 µg/ml (rBL0,1 grupa), 1 µg/ml (rBL1 grupa) i 10 µg/ml (rBL10 grupa), analizirana je produkcija glavnih efektorskih (IL-2, IL-4, IL-12, IL-17 i IFN-γ) i regulatornih citokina (IL-10) u debelom crevu. Dobijeni rezultati su pokazali da rBanLec u debelom crevu dozno-zavisno, utiče na lokalnu produkciju navedenih citokina (**Slika 4.15**).

Analiza uzoraka debelog creva sakupljenih 24h nakon tretmana rBanLec-om je pokazala da je u svim eksperimentalnim gupama došlo do statistički značajnog povećanja lokalne produkcije IL-2. IL-2 je bio jedini od testiranih citokina čija se produkcija značajno povećala u svim eksperimentalnim grupama tokom prvih 24h stimulacije (vs. nk: $P < 0,05$ za rBL0,1, rBL1 i rBL10). Porast produkcije IL-2 je pozitivno korelirao sa primenjenom dozom rBanLec-a ($P_{cc}=0,677$, $P < 0,01$; **Slika 4.15A**).

Pored toga, 24h nakon rektalne aplikacije rBanLec-a u naznačenim količinama, uočen je blag pozitivno dozno-zavisn porast lokalne produkcije IFN- γ (**Slika 4.15B**) kao i dozno-zavisna smanjenja produkcije IL-4 (**Slika 4.15C**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i rBL10; rBanLec doza vs lokalna [IL-4]: $P_{cc}=-0,571$, $P < 0,05$), IL-12 (**Slika 4.15D**; vs nk: $P < 0,005$ za rBL1 i rBL10; rBanLec doza vs lokalna [IL-12]: $P_{cc}=-0,501$, $P < 0,05$) i IL-10 (**Slika 4.15F**) koja su bila najizraženija u rBL10 grupi. Smanjenja u lokalnoj koncentraciji IL-10 i IL-12 su bila prolaznog karaktera dok je opadanje lokalne koncentracije IL-4 nastavljeno tokom celog perioda posmatranja (72h).

Najintenzivnije promene u lokalnom citokinskom miljeu zabeležene su 48h nakon rektalne aplikacije rBanLec-a. Urađene analize su pokazale da se u debelom crevu BALB/c miševa tretiranih rBanLec-om u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$ (rBL1 i rBL10 grupe, redom) formira pretežno proinflamatorni milje. U tkivu debelog creva miševa iz rBL1 i rBL10 grupa, 48h nakon aplikacije rBanLec-a izmerena je, u poređenju sa tkivom netretiranih miševa, statistički značajno viša koncentracija IL-2 (**Slika 4.15A**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i rBL10), IL-12 (**Slika 4.15D**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i $P < 0,0001$ za rBL10), IL-17 (**Slika 4.15E**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i rBL10) i IFN- γ (**Slika 4.15B**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i rBL10), a koncentracija IL-4 je bila značajno niža (**Slika 4.15C**; vs nk: $P < 0,05$ za rBL1 i rBL10).

Međutim, pored povećanog intenziteta produkcije proinflamatornih citokina, tretman rBanLec-om je, nezavisno od aplicirane doze, inicirao i značajan porast sekrecije IL-10 (**Slika 4.15F**; vs. nk: $P < 0,05$ za rBL0,1, rBL1 i rBL10).



Slika 4.15. Uticaj rBanLec-a (0-10 µg/ml) na lokalnu produkciju citokina A) IL-2, B) IFN- γ , C) IL-4, D) IL-12, E) IL-17 i F) IL-10 u tkivu debelog creva BALB/c miša. Uzorci tkiva debelog creva su sakupljani 24h (beli stubić), 48h (svetlo sivi stubić) i 72h (tamno sivi stubić) nakon tretmana rBanLec-

om. Koncentracija citokina u supernatantima homogenata tkiva je određena ELISA-om. Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracije citokina izračunate su pomoću odgovarajuće standardne krive (odgovarajući rekombinantni citokini korišćeni kao standardi). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine citokina po 1 mg ukupnih proteina u supernatantu \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika (upoređivane grupe označene su strelicama) određena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Zastupljenost specifičnih citokina u debelom crevu miševa rBL0,1 grupe 48h nakon tretmana ukazivala je, za razliku od rBL1 i rBL10 grupa, na uspostavljanje anti-inflamatornog miljea. U odnosu na netretirane miševe, kod rBL0,1 miševa 48h nakon rBanLec aplikacije izmerene su statistički značajno viša koncentracija IL-10 ($P < 0,05$ vs nk) i značajno niža koncentracija IFN- γ ($P < 0,05$ vs nk), dok su koncentracije IL-2, IL-12 i IL-17, kao i IL-4 bile slične.

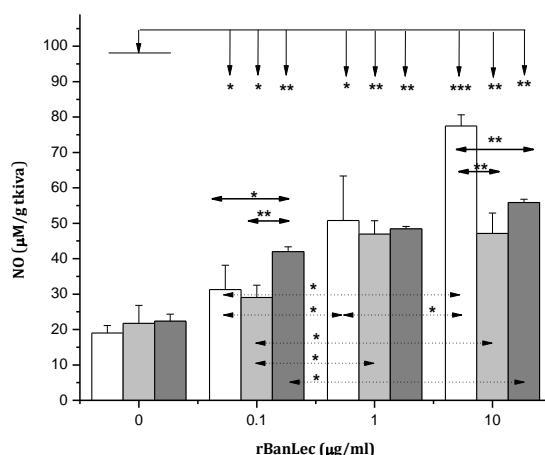
Intenzitet produkcije IL-10 i IL-17 u debelom crevu miševa 72h nakon tretmana rBanLec-om, nezavisno od primenjene koncentracije, nije se značajno razlikovao od onog u uzorcima iz grupe netretiranih životinja. U istom vremenskom periodu nakon rBanLec tretmana nivoi IL-2 (vs nk: $P < 0,0001$ za rBL0,1, rBL1 i rBL10), IL-4 (vs nk: $P < 0,005$ za rBL0,1 i $P < 0,0001$ za rBL1 i rBL10), IL-12 (vs nk: $P < 0,05$ za rBL0,1 i $P < 0,005$ za rBL1 i rBL10) i IFN- γ (vs nk: $P < 0,0001$ za rBL0,1, rBL1, rBL10) su bili značajno niži u poređenju sa nivoima odedenim u tkivu kontrolnih netretiranih miševa.

Generalno, tokom celog perioda posmatranja (72h) lokalna koncentracija IL-12 je značajno korelirala sa lokalnim koncentracijama IFN- γ ($P_{cc} = 0,669$, $P = 0,017$), ali i IL-17 ($P_{cc} = 0,740$, $P = 0,006$) i IL-10 ($P_{cc} = 0,92$, $P < 0,006$). Takođe, promene u produkciji IFN- γ su značajno korelirale sa promenama u lokalnoj produkciji IL-2 ($P_{cc} = 0,920$, $P < 0,0001$).

4.2.3 Uticaj rBanLec-a na aktivnost iNOS i MPO u debelom crevu

Pored promena u lokalnom citokinskom miljeu, rBanLec stimulacija je dovela i do promena u aktivnosti iNOS i MPO u debelom crevu BALB/c miševa. Dobijeni rezultati pokazuju da rBanLec stimulacija u debelom crevu najpre dovodi do značajnih promena u aktivnosti iNOS, a potom i u aktivnosti MPO. Značajan porast aktivnosti iNOS, koji se ogleđa u porastu lokalne koncentracije NO, uočen je već 24h nakon rBanLec aplikacije

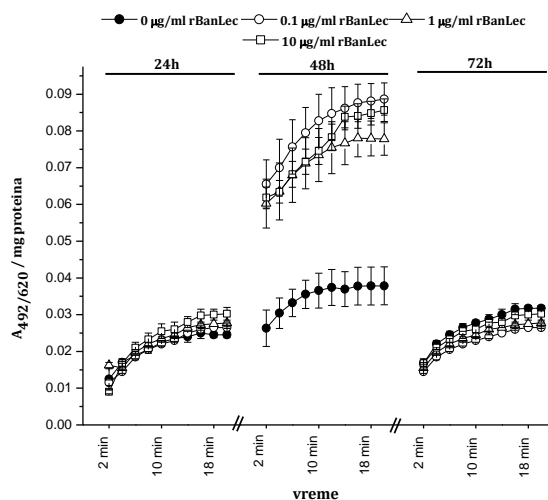
(Slika 4.16.; vs nk: $P < 0,05$ za rBL0,1 i rBL1, $P < 0,0001$ za rBL10) i pozitivno je korelirao sa aplikovanom količinom rBanLec-a. Tokom perioda posmatranja (24h, 48h i 72h) obrazac promena u lokalnoj koncentraciji NO nije bio jednoznačan nego je zavisio od aplikovane doze.



Slika 4.16. Uticaj rBanLec-a (0-10 µg/ml) na lokalnu produkciju NO u tkivu debelog creva miševa kojima je rektalno apliciran rBanLec. Uzorci tkiva debelog creva su sakupljeni 24h (beli stubić), 48h (svetlo sivi stubić) i 72h (tamno sivi stubić) nakon tretmana rBanLec-om. Koncentracija NO u supernatantima homogenata tkiva je određena pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija NO izračunata je pomoću odgovarajućih standardnih kriva (NaNO_2 korišćen kao standard). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po 1 g tkiva \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika (upoređivane grupe označene su strelicama) određena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Kod miševa iz rBL0,1 grupe iNOS aktivnost je rasla tokom vremena tako da je najintenzivnija NO produkcija zabeležena 72h nakon tretmana rBanLec-om. Kod miševa rBL1 grupe, nakon inicijalnog porasta, aktivnost iNOS se nije značajno menjala tokom perioda posmatranja tako da su koncentracije NO u tkivu debelog creva izmerene 24h, 48h i 72h nakon rBanLec aplikacije bile približno iste. Konačno, u uzorcima debelog creva miševa rBL10 grupe uzetim 48h i 72h nakon rBanLec tretmana izmerena je značajno niža koncentracija NO u odnosu na uzorak tkiva uzet 24h nakon nakon tretmana rBanLec-om (Slika 4.16; $P < 0,05$ za rBL10 48h vs 24h i $P < 0,005$ rBL10 72h vs 24h).

Značajna promena u lokalnoj aktivnosti MPO uočena je tek 48h nakon rBanLec tretmana. rBanLec, u svim testiranim dozama, je inicirao značajan prolazni porast aktivnosti lokalne MPO pri čemu je porast MPO aktivnosti bio sličan u svim rBanLec tretiranim grupama tj. nije značajno zavisio od aplicirane rBanLec doze (**Slika 4.17**).

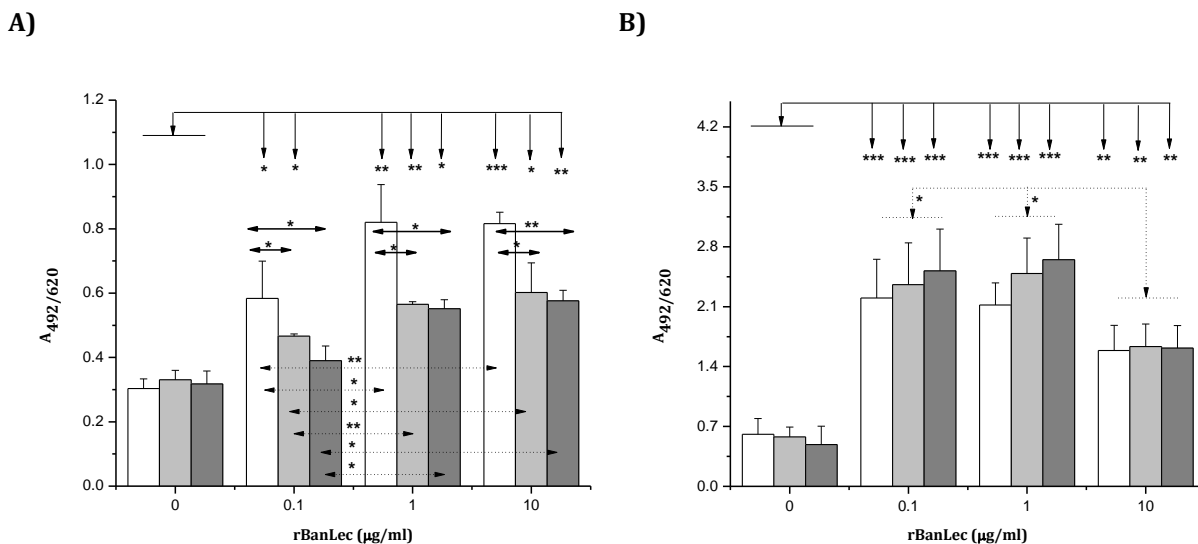


Slika 4.17. Uticaj rBanLec-a (0-10 µg/ml) na aktivnost MPO u tkivu debelog creva miševa kojima je rektalno apliciran rBanLec. Uzorci tkiva debelog creva su sakupljeni 24h (beli stubić), 48h (svetlo sivi stubić) i 72h (tamno sivi stubić) nakon tretmana rBanLec-om. Aktivnost MPO u supernatantima homogenata tkiva određena je kolorimetrijski na osnovu brzine oksidacije o-fenilendiamina. Za svaki uzorak enzimska reakcija je prekidana u vremenskom intervalu od 2 minuta. Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost A_{492/620} izražene po 1 mg ukupnih proteina supernatanta ± SE.

4.2.4 Uticaj rBanLec-a na produkciju IgA i IgG antitela u debelom crevu

Analiza lokalne produkcije IgG i IgA At u debelom crevu netretiranih i rBanLec-om tretiranih miševa, 24h, 48h i 72h nakon primene rBanLec-a, pokazala je značajno veću produkciju antitela nakon rBanLec tretmana (**Slika 4.18**). Tretman rBanLec-om je već nakon 24h, na dozno-zavisani način, povećao lokalnu sekreciju IgA. Najmanji inicijalni (24h nakon tretmana) porast lokalne koncentracije IgA uočeno je u debelom crevu miševa rBL0,1 grupe (**Slika 4.18A**; vs. nk: P<0,05). U tkivima miševa rBL1 i rBL10 grupa, 24h

nakon aplikacije rBanLec-a, izmerena je približno ista koncentracija IgA (**Slika 4.18A**) i ona je bila veća u odnosu na koncentraciju izmerenu u tkivu netretiranih ($P < 0,05$) i miševa rBL0,1 grupe ($P < 0,05$ za rBL1, $P < 0,005$ za rBL10).

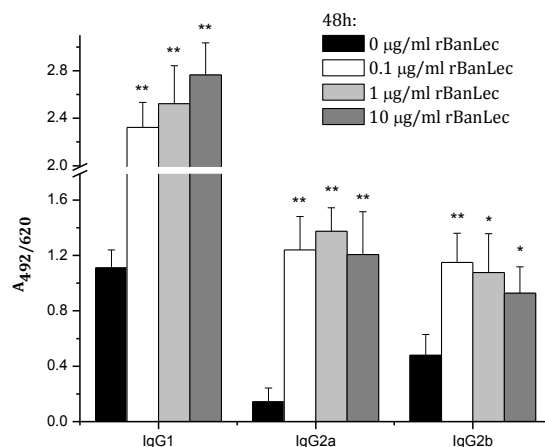


Slika 4.18. Uticaj rBanLec-a (0-10 µg/ml) na koncentraciju ukupnih A) IgA i B) IgG At u debelom crevu miševa. Uzorci tkiva debelog creva su sakupljeni 24h (beli stubić), 48h (svetlo sivi stubić) i 72h (tamno sivi stubić) nakon tretmana rBanLec-om. Količina At u supernatantima homogenata tkiva određena je ELISA-om. Pre testiranja koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je podešena na 0,5 mg/ml. Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm SE$. Statistička značajnost uočenih razlika (upoređivane grupe označene su strelicama) određena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Nakon inicijalnog porasta produkcije IgA kod svih rBanLec tretiranih miševa došlo je do smanjenja lokalne koncentracije IgA (rBL0,1: 24h vs. 48h $P < 0,05$, 24h vs. 72h $P < 0,05$; rBL1: 24h vs. 48h $P < 0,05$, 24h vs. 72h $P < 0,05$; rBL10: 24h vs. 48h $P < 0,05$, 24h vs. 72h $P < 0,005$) ali je ona i 72h nakon tretmana bila značajno viša nego kod netretiranih miševa (vs nk: $P < 0,05$ za rBL1, $P < 0,005$ za rBL10). Takođe, i 48h i 72h nakon tretmana, obrazac zavisnosti lokalne IgA koncentracije od aplicirane rBanLec doze ostao je ne promenjen u odnosu na onaj uočen 24h nakon rBanLec tretmana (**Slika 4.18A**).

rBanLec stimulacija je pozitivno delovala i na produkciju IgG u debelom crevu s tim što je najmanji porast IgG produkcije uočen kod miševa rBL10 grupe. Za razliku od IgA, produkcija IgG je blago rasla tokom 72h od rektalne aplikacije rBanLec-a (**Slika**

4.18B). Tokom trodnevnog perioda posmatranja, koncentracije IgG u tkivu debelog creva miševa rBL0,1 (vs nk: $P < 0,0001$ za 24h, 48h i 72h) i rBL1(vs nk: $P < 0,0001$ za 24h, 48h i 72h) grupa su bile približne i značajno veće od koncentracija izmerenih u tkivu netretiranih (vs nk: $P < 0,001$ za 24h, 48h i 72h) i miševa rBL10 grupe (vs nk: $P < 0,05$ za 24h, 48h i 72h).



Slika 4.19. Uticaj rBanLec-a (0-10 µg/ml) na lokalnu produkciju IgG1, IgG2a i IgG2b u debelom crevu miševa. Zastupljenost IgG potklasa je analizirana u uzorcima sakupljenim 48h nakon aplikacije rBanLec-a. Količina At u supernatantima homogenata tkiva određena je ELISA-om. Pre testiranja koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je podešena na 0,5 mg/ml. Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm SE$. Statistička značajnost uočenih razlika (upoređivane grupe označene su strelicama) određena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$).

Analiza lokalne produkcije IgG At na nivou potklasa (IgG1, IgG2a i IgG2b) 48h nakon primene rBanLec-a pokazala je da lokalna produkcija IgG1 pozitivno korelira sa primenjenom dozom rBanLec-a, dok je u slučaju IgG2b antitela uočena negativna korelacija sa primenjenom koncentracije rBanLec-a (**Slika 4.19**). Sekretija IgG2a u crevima nije bila regulisana po striktno dozno-zavisnom obrascu ali je uočena pozitivna korelacija sa lokalnom koncentracijom IL-12, pro-Th1 citokina ($P_{cc}=0,885$, $P=0,02$).

4.2.5 Imunomodulatorni uticaj rBanLec-a u debelom crevu miša pod fiziološkim uslovima - diskusija

Rezultati proistekli iz druge faze eksperimentalnog rada pokazuju da rBanLec interaguje sa epitelom debelog creva, postepeno prolazi u subepitelni odeljak i direktno ili indirektno moduliše karakteristike lokalnog i ćelijskog i humoralnog imunskog odgovora. Uticaj na ćelijski imunski odgovor se prvenstveno oslikava kroz promene karakteristika lokalnog citokinskog miljea, dok uočeni rast lokalne koncentracije IgG i IgA ukazuje da rektalno apliciran rBanLec (in)direktno dovodi do poliklonske aktivacije lokalno prisutnih B ćelija.

Iako je rBanLec otporan na hidrolizu u uslovima GIT-a (Dimitrijević *et al.*, 2012) i u pojedinim ispitivanjima je primenjivan oralnim putem, za potrebe naših istraživanja izabrali smo rektalnu rutu aplikacije. Obzirom na sposobnost vezivanja za epitel tankog creva, određena količina rBanLec-a bi se nakon oralne primene zadržavala i resorbovala u ovom delu GIT-a. Ova činjenica otežava procenu količine rBanLec-a koja dospeva u debelo crevo. Rektalna ruta aplikacije omogućila je bolju kontrolu lokalno aplikovane količine rBanLec-a, a time i pouzdaniju procenu u kojoj meri lokalni ishod rBanLec stimulacije zavisi od doze rBanLec-a.

Prikazani rezultati potvrđuju da se rBanLec vezuje za površinu epitela debelog creva, ali da je proces translokacije lektina u submukozni sloj (24h nakon tretmana) znatno sporiji od onog koji je opisan u tankom crevu (3h nakon tretmana) (Dimitrijević *et al.*, 2012). Imajući u vidu dinamiku kretanja rBanLec-a kroz tkivo debelog creva, nameće se zaključak da su promene lokalnih imunoloških parametara tokom prvih 24h nakon stimulacije rezultat direktnog dejstva rBanlec-a na epitel debelog creva. U različitim sistemima je pokazano da intraepitelne limfocite (IEL) odlikuje nizak nivo spontane produkcije IL-2 (Ebert, 1990; Francisco *et al.*, 2005), ali da ga nakon stimulacije, (mitogeni, anti-CD3/CD28) IEL mogu proizvoditi u značajnoj količini. S obzirom da i sami IEL, ali i veliki broj ćelija u subepitelnom regionu, eksprimiraju receptore za IL-2 (IL-2R), sekretovani IL-2 autokrino i parakrino utiče na funkcionalne karakteristike ćelija u tkivu debelog creva (Gasteiger & Rudensky, 2014). U literaturi su dostupni na prvi pogled

kontradiktorni podaci o efektima IL-2. Kao univerzalni faktor rasta T limfocita, IL-2 je neophodan za preživljavanje, diferencijaciju i proliferaciju kako efektorskih tako i regulatornih T limfocita (Boyman & Sprent, 2012). IL-2 je pokretač proliferacije lokalno prisutnih efektorskih limfocita i doprinosi nastanku inflamatornog miljea (Gaffen & Liu, 2004; Liao *et al.*, 2011). Takođe, ne mali broj publikacija potvrđuje da IL-2 ima važnu imunoregulatornu ulogu i da njegov nedostatak može dovesti do razvoja prekomerne zapaljenske reakcije. Imajući u vidu plejotropni uticaj IL-2, kao i činjenicu da sa velikim brojem citokina deluje sinergistički, nameće se zaključak da ukupan efekat IL-2 zavisi od celokupnog citokinskog i ćelijskog miljea u kome deluje. Pored toga, aktivirane IEL, ali i epitelne ćelije i NK ćelije, mogu biti značajan izvor IFN- γ prisutnog u debelom crevu u inicijalnoj fazi stimulacije (24h) rBanLec-om. Jedna od opisanih posledica autokrinog / parakrinog dejstva IFN- γ u GIT-u je i porast produkcije NO od strane epitelnih ćelija (Gibson *et al.*, 1996; Peterson & Artis, 2014). Takođe, IFN- γ , kao solubilni medijator, utiče i na funkcionalne karakteristike ćelija lokalizovanih u submukoznom kompartmentu. Pored toga, značajan porast sekrecije IgA antitela, čija sinteza zavisi od TGF- β , ukazuje da je stimulacija rBanLec-om u inicijalnoj fazi pokrenula i produkciju TGF- β . Koliki je značaj TLR2-rBanLec interakcija za nastanak promena koje su uočene u inicijalnoj fazi rBanLec stimulacije imunskog sistema debelog creva moglo bi se pouzdano reći tek nakon istraživanja u modelu gde je TLR2 funkcionalno deletovan poput TLR2 KO miševa. Pretpostavljamo da vezivanje rBanLec-a za epitel debelog creva uključuje i uspostavljanje TLR2-rBanLec interakcija jer ćelije u epitelnoj regiji debelog creva (IEL, NK, epitelne ćelije na apikalnoj površini) eksprimiraju određeni nivo TLR2 receptora (Inatsuka *et al.*, 2013). Takođe, imajući u vidu da je u više sistema pokazan značaj TLR2-posredovanog signala u formiranju proinflamatornog miljea, pretpostvujemo da su inicijalne promene u citokinskom miljeu (porast produkcije IFN- γ) i produkciji NO delom rezultat lokalno uspostavljenih rBanLec-TLR2 interakcija.

Najveće promene lokalnih imunskih parametara, u odnosu na njihov bazalni nivo, uočene su 48h nakon rektalne aplikacije rBanLec-a. Imunske karakteristike lokalnog miljea u debelom crevu 48h nakon rektalne rBanLec aplikacije predstavljaju sumarni

rezultat direktnog i indirektnog uticaja rBanLec-a na funkcionalne karakteristike lokalno prisutnih imunokompetentnih ćelija. Drugog dana nakon primene, rBanLec je dominantno lociran u prostoru ispod epitel creva gde može direktno da deluje na imunske ćelije subepitelnog odeljka. Takođe, milje u kome se te ćelije nalaze sadrži i solubilne medijatore generisane tokom inicijalne faze, usled dejstva rBanLec-a na crevni epitel. Aktivirani makrofagi i dendritske ćelije predstavljaju glavni izvor IL-12 koga proizvode u odgovoru na TLR-posredovanu stimulaciju (Schnare *et al.*, 2001). IL-12 je zajedno sa IFN- γ poreklom od NK ćelija u inicijalnoj fazi razvoja imunskog odgovora neophodan za diferencijaciju T limfocita u Th1 pravcu. 48h nakon rektalne aplikacije rBanLec-a uočen je i porast lokalne produkcije IL-17, marker citokina Th17 ćelija. Lokalna produkcija citokina koji pozitivno utiču na diferenciranje Th17 nije direktno analizirana (IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β). Promene u lokalnoj koncentraciji IgA i IgG2b antitela mogle bi biti posmatrane kao indikator promena u sekreciji TGF- β (produkcija IgA i IgG2b antitela je TGF- β -zavisna) nakon rBanLec stimulacije. Uzimajući produkciju IgA i IgG2b antitela (McLntyre *et al.*, 1993) kao indirektan pokazatelj lokalne TGF- β koncentracije, može se zaključiti da nakon inicijalnog rasta lokalna koncentracija TGF- β opada (nivo IgA nakon 24h vs. nivo IgA nakon 48h) ali je i 48h nakon rBanLec stimulacije idalje značajno iznad bazalnog nivoa. Činjenica da je porast lokalne koncentracije IL-17 uočen tek 48h nakon rBanLec stimulacije kao i da produkcija IL-17 negativno korelira sa lokalnom količinom IgG2b antitela ide u prilog stavu da TGF- β ima bitnu ulogu u diferencijaciji efektorskih Th17 ćelija, ali da je njegov efekat u velikoj meri zavisan od doze (Kingston & Mills, 2008)– u višim koncentracijama on direktno pospešuje generisanje Th17 ćelija dok u nižim koncentracijama dominira njegov anti-inflamatorni uticaj gde on deluje negativno na diferencijaciju Th17, a paralelno podstiče aktivnost Treg ćelija. Konačno, uspostavljanje proinflamatornog miljea predstavlja signal za influks i aktivaciju ćelija koje odlikuje intenzivna aktivnost mijeloperoksidaze (neutrofili, monociti /makrofagi).

Proinflamatorni solubilni medijatori (hemokini, citokini, NO), koji privlače i aktiviraju imunske ćelije, značajni su za održanje fiziološke homeostaze jer prvenstveno doprinose sprečavanju infekcija različitim vrstama patogena. Tako, NO kao signalni

molekul učestvuje u održavanju integriteta epitelne barijere u crevima i ispoljava antimikrobno dejstvo (Walace & Miller, 2000). IFN- γ , pored direktnog antiviralnog dejstva, stimuliše i efektorske mehanizme makrofaga (npr. ROS i RNS produkcija) što dovodi do efikasnijeg suzbijanja intracelularnih bakterijskih infekcija (Nava *et al.*, 2010). Pokazan je i značaj Th17 imunskog odgovora u odbrani od bakterijskih i gljivičnih infekcija gastrointestinalnog trakta (Daniel & Cristina, 2010). Eliminaciji patogenih organizama značajno doprinosi i lokalna MPO aktivnost (Droeser *et al.*, 2013). Međutim, prekomerna i nekontrolisana lokalna zapaljenska reakcija uzrok je određenih vidova patologije debelog creva. Veliki broj publikacija proisteklih iz istraživanja kako na uzorcima humanog porekla tako i u različitim životinjskim modelima ukazuju na vezu između razvoja IBD-a i prekomerne aktivnosti MPO (Ping *et al.*, 2006) i iNOS (Kolios *et al.*, 2004; Soufli *et al.*, 2016), prekomernog Th1 tipa imunskog odgovora i / ili neizbalansiranog Th1/Th17 imunskog odgovora (Xavier & Podolsky, 2007; Soufli *et al.*, 2016).

Činjenica da rBanLec pokreće izbalansiran i samoograničavajući proinflamatorni imunski odgovor veoma je važna za njegovu potencijalnu primenu. Na osnovu prikazanih rezultata nameće se zaključak da je u inicijalnoj fazi (24h) moguća IL-2-posredovana regulacija koja se zasniva na superiornosti Treg ćelija (visok nivo ekspresije visoko afinitetnih IL2R) u kompeticiji za IL-2, čime indirektno suprimiraju ekspanziju efektorskih T limfocita (potreban IL-2) i obezbeđuju sebi faktor potreban za održanje regulatornog kapaciteta (Fontenot *et al.*, 2005). Dugotrajnim održavanjem visoke lokalne koncentracije IL-2 stvaraju se uslovi za njegovo stimulatorno delovanje i na efektorske ćelije koje odlikuje niži nivo površinske ekspresije IL2R u odnosu na Treg (Dooms & Abbas, 2010). Sa druge strane, stimulisane Treg proizvode IL-10, citokin koji bi mogao biti glavni ili jedan od ključnih regulatornih faktora nakon inicijalne faze rBanLec stimulacije. Kao što je napomenuto, promene u lokalnoj sintezi IgA i IgG2b antitela, ukazuju da rBanLec stimuliše i lokalnu produkciju TGF- β , važnog regulatornog citokina u GIT-u, koji bi, delujući sinergistički sa IL-2 u inicijalnoj fazi i IL-10, mogao doprineti kontroli razvoja inflamatornog procesa.

Generalno, tretman rBanLec-om je u debelom crevu inicirao aktivaciju efektorskih mehanizama urođene imunosti (MPO aktivnost i NO produkcija) kao i sekreciju efektorskih molekula adaptivne imunosti (IFN- γ , IL-12, IL-17A, IgA, IgG1, IgG2a i IgG2b). Da li će navedeni fiziološki aktivni molekuli imati štetano ili pozitivno dejstvo zavisi od intenziteta (tj. koncentracije) i / ili trajanja stimulacije. Dobijeni rezultati su pokazali da najniža koncentracije rBanLec-a (0,1 $\mu\text{g/ml}$) pojačava antimikrobnu aktivnost u debelom crevu, bez opasnosti od razvoja prekomernog proinlatorsnog odgovora. Sa druge strane, efekat rBanLec-a u dozama od 1 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$ na citokinski milje u debelom crevu sličan je onim koje ostvaruju tretmani probiotskim sojevima (*Lactobacillus plantarum* 299 (Christensen *et al.*, 2002), *Bifidobacterium longum* (Rigby *et al.*, 2004), i *Lactobacillus rhamnosus* GG (Long Yan Fong *et al.*, 2015)) za koje je pokazano da ublažuju zapaljensku reakciju u crevima. Mnogobrojne studije su pokazale da ovi probiotski sojevi, pored pozitivnog uticaja na CD ublažavanjem simptoma bolesti, inhibiraju i proces karcinogeneze u debelom crevu, ublažuju dijareju i produžavaju fazu remisije u UC (Zocco *et al.*, 2006).

Imajući u vidu strukturnu i funkcionalnu sličnosti rekombinantne i prirodnih izoformi BanLec-a, može se očekivati da bi i BanLec koji se konzumira putem hrane mogao ispoljiti sličan, dozno-zavisan, imunomodulatorni / imunostimulatorni efekat u debelom crevu. Nije moguće precizirati tačnu količinu banana koju bi trebalo konzumirati kako bi unete količine BanLec-a bile približno jednake koncentracijama rBanLec-a korišćenim u ovim istraživanjima jer sadržaj BanLec-a u banani prilično varira u zavisnosti od stepena zrelosti ploda (Peumans *et al.*, 2002). Takođe, zbog razlika u afinitetima prema oligosaharidnim strukturama, mogle bi se očekivati i određene varijacije u dozno-zavisnim efektima između rBanLec-a i prirodnih izoformi BanLec-a (Gavrović-Jankulović *et al.*, 2008) ili među različitim izoformama BanLec-a (Koshte *et al.*, 1990). Ako uzmemo u obzir da je prosečan sadržaj BanLec-a u banani približno 4 mg na 100 g ploda banane (Koshte *et al.*, 1990) i zanemarimo interakciju sa epitelom tankog creva, da bi se u kolonu čoveka obezbedila količina lektina srazmerna količini koju smo

koristili u našem eksperimentu (0,5-50 µg/ml po kg telesne mase) bilo bi potrebno da čovek od 70 kg pojede minimum 100 g banane.

Rezultati proistekli iz ovih istraživanja ukazuju da je BanLec, pored nedigestivnih oligosaharida i antimikrobnih supstanci, još jedna od bioaktivnih supstanci banane koja ima imunomodulatorno dejstvo u debelom crevu. Prikazana istraživanja predstavljaju prvu detaljnu analizu imunomodulatornog uticaja neke od izoformi BanLec-a u debelom crevu u fiziološkim uslovima. Imunostimulatorni / imunomodulatorni potencijal rBanLec-a opisan u ovom delu teze ukazuje na opravdanost daljih istraživanja mogućnosti primene BanLec-a za prevenciju patoloških stanja debelog creva posredovanih neadekvatnim imunskim odgovorom i za prevenciju invazije patogenih mikroorganizama preko mukozne površine debelog creva.

4.3 Ispitivanje profilaktičkog i terapijskog potencijala rBanLec-a na mišjem modelu akutnog zapaljenja debelog creva

Iako je pokazano da rBanLec pokreće izbalansirani, samoograničavajući proinflamatorni imunski odgovor, da bi mogao da se primenjuje u tretmanu IBD-a potrebno je detaljnije ispitati njegov imunomodulatorni potencijal u adekvatnom eksperimentalnom modelu bolesti. Brojni primeri pokazuju da imunski sistem ne funkcioniše na isti način u zdravlju i u bolesti (Brodin & Davis, 2017). Imajući u vidu do sada publikovane rezultate i rezultate koji su predstavljeni u okviru ove teze koji se odnose na 1) potencijal rBanLec-a da moduliše funkcionalne karakteristike APC i efektorskih ćelija imunskog sistema i 2) prethodni set rezultata u kojima je pokazano da rBanLec ispoljava imunomodulatorno dejstvo na imunski sistem debelog creva kao i veliki broj literaturnih podataka o potencijalnoj upotrebi lektina kao terapeutika, pretpostavljeno je da bi se rBanLec mogao koristiti u profilaktičke ili terapijske svrhe u mišjem modelu TNBS-indukovanog kolitisa, akutnog zapaljenja debelog creva kod

BALB/c miševa u čijoj osnovi je prekomerna zapaljenska reakcija posredovana prvenstveno Th1-zavisnim mehanizmima.

Profilaktički i terapijski efekti primene rBanLec-a analizirani su u modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša. rBanLec je primenjivan jednokratno (profilaktička primena) i na dnevnoj bazi (terapijska primena), u vidu rastvora rBanLec-a koncentracije 0,1, 1 ili 10 µg/ml tako da je jednom dozom aplikovano 0,5, 5 ili 50 µg rBanLec-a/kg telesne težine (TT), redom.

4.3.1 Evaluacija profilaktičkog potencijala rBanLec-a u mišjem modelu TNBS-om indukovano kolitisa

Ispitivanje profilaktičkog potencijala rBanLec-a u modelu TNBS-indukovanog kolitisa u BALB/c miševa je urađeno tako što je miševima 24h (24) i 48h (48) pre indukcije kolitisa jednokratno rektalno apliciran rastvor koji sadrži 0,1 µg/ml (BL0,1), 1 µg/ml (BL1) ili 10 µg/ml (BL10) rBanLec-a. Zavisno od vremena pretretmana u odnosu na indukciju eksperimentalnog kolitisa i doze rBanLec-a korišćene za pretretman, eksperimentalne grupe miševa su označene 24BL0,1, 24BL1, 24BL10, 48BL0,1, 48BL1 i 48BL10.

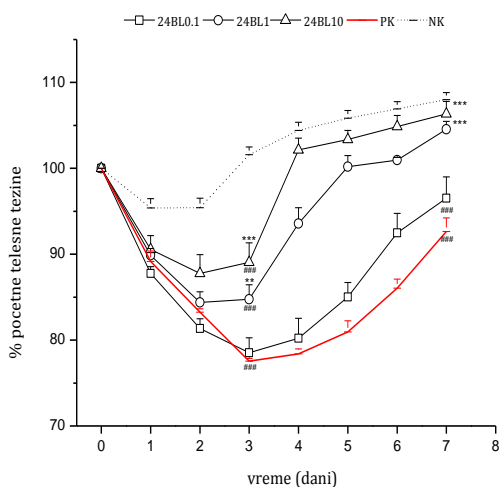
Kao referentne, formirane su dve grupe BALB/c miševa odgovarajuće starosti: grupa miševa kojima je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om (PK) i grupa miševa kod kojih nije indukovano eksperimentalni kolitis niti su tretirani rBanLec-om, ali im je rektalno primenjen 50% etanolni rastvor (NK).

4.3.1.1 Uticaj profilaktičke primene rBanLec-a na opšte stanje miševa

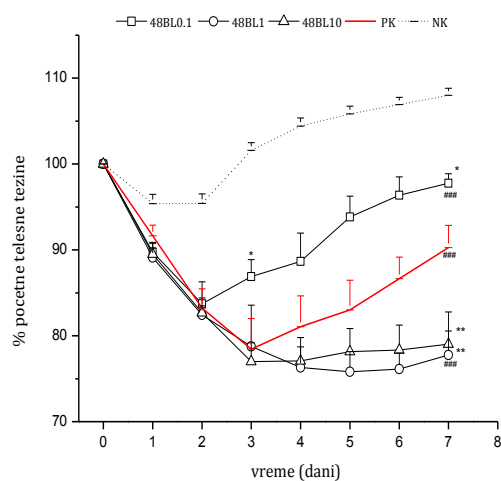
Intenzitet patologije nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa procenjen je na osnovu makroskopskih parametara kao što su gubitak telesne težine (TT) i aktivnost životinje, konzistencija fecesa kao i vidljivo prisustvo krvi u njemu. Stepen gubitka TT se

smatra glavnim indikatorom intenziteta patologije s obzirom da je u sprezi sa ostalim parametara i da se je najlakše kvantifikuje. Analiza promena u TT nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa, pokazala je da jednokratni tretmani rBanLec-om u opsegu koncentracija 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$, 24h ili 48h pre rektalne primene etanolnog rastvora TNBS-a, nije u potpunosti uspelo da spreče razvoj bolesti ali je u određenoj meri, zavisno od doze i vremena pretretmana, ublažio njen intenzitet (**Slika 4.20**). Dobijeni rezultati su pokazali da je pretreman rBanLec-om u nekim grupama uticao i na sam tok bolesti, u smislu pomeranja pika bolesti i dinamike oporavka životinja (**Slika 4.20**).

A)



B)



Slika 4.20. Promene telesne težine miševa kojima je 24h (A) i 48h (B) pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupe 24BL0,1 i 48BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupe 24BL1 i 48BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupe 24BL10 i 48BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da profilaktička doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovan jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0). Telesna težina svakog miša je merena u naznačenim vremenskim tačkama ($n=5$ miševa/grupa) i izražavana kao procenat njegove telesne težine u trenutku indukcije kolitisa. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti procenta početne telesne težine \pm SE u naznačenim vremenskim tačkama. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK ($P<0,05^*$, $P<0,005^{**}$, $P<0,0001^{***}$) i NK ($P<0,05^{\#}$, $P<0,005^{\#\#}$, $P<0,0001^{\#\#\#}$) grupe korišćene kao referentne; PK- grupa gde je TNBS-om indukovan eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovan eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Dozno-zavisan profilaktički uticaj rBanLec-a nije bio jednoznačan nego je zavisio od vremenskog intervala između pretretmana i indukcije bolesti. U slučaju pretretmana

24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, procentualni gubitak TT u piku bolesti (3. dan nakon indukcije) bio je obrnuto srazmeran primenjenoj koncentraciji rBanLec-a, dok je suprotan trend u istoj vremenskoj tački (3. dan nakon indukcije) uočen kod miševa koji su rBanLec-om tretirani 48h pre indukcije bolesti. Analiza smanjenja telesne težine miševa tretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa pokazala je da u piku bolesti do najvećeg procentualnog gubitka u TT dolazi kod miševa 24BL0,1 grupe i on je bio približan smanjenju TT u PK grupi. Značajno manje smanjenje TT u poređenju sa PK grupom uočeno je kod miševa 24BL1 i 24BL10 grupe (**Slika 4.20A**; vs PK: $P < 0,005$ za 24BL1 i $P < 0,0001$ za 24BL10). Kod miševa pretretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije bolesti, najveći pad TT u piku bolesti zabeležen je u grupama 48BL1 i 48BL10 i bio je u nivou gubitka TT miševa PK grupe (**Slika 4.20B**).

Kod većine miševa 4. dana nakon indukcije bolesti uočeni su znaci oporavka (porast TT u odnosu na pik bolesti). Očekivano, brzina oporavka miševa, procenjena na osnovu dinamike porasta TT nakon pika bolesti, generalno je bila obrnuto srazmerna intenzitetu patologije u piku bolesti. U grupama 48BL1 i 48BL10 ni 7. dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa nije uočen porast TT u odnosu na pik bolesti .

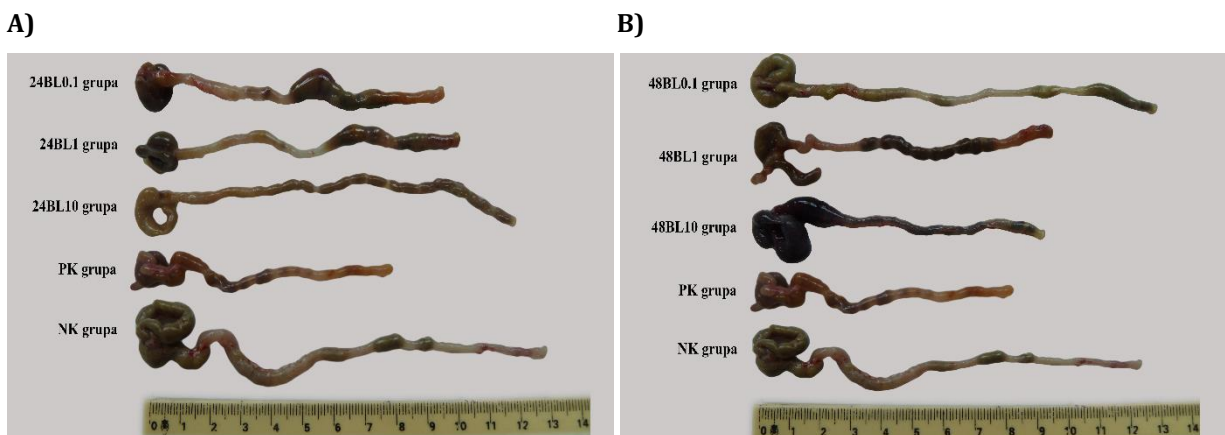
Poređenje maksimalnog procentualnog gubitka težine i dinamike oporavka miševa tretiranih istom količinom rBanLec-a 24h i 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa pokazalo je da:

- a) maksimalan gubitak TT miševa 48BL0,1 grupe (dan 2) je manji nego maksimalan gubitak TT miševa 24BL0,1 grupe (dan 3) i miševi 48BL0,1 grupe ranije ulaze u fazu oporavka
- b) smanjenje TT u piku bolesti (dan 3) je bilo značajno veće kod miševa 48BL1 i 48BL10 ($P < 0,005$) grupa u poređenju sa grupama tretiranim istom količinom rBanLec-a 24h pre indukcije bolesti; do 7. dana od indukcije bolesti nisu uočeni znaci oporavka miševa 48BL1 i 48BL10, dok su miševa 24BL1 i 24BL10 grupa u fazu oporavka ušli 4. dana od indukcije bolesti

4.3.1.2 Histološka analiza debelog creva miševa nakon profilaktičke primene rBanLec-a

Kao što je napomenuto u Uvodu, rektalna aplikacija etanolnog rastvora TNBS-a izaziva jaku zapaljensku reakciju u debelom crevu i dovodi do oštećenja tkiva koje se karakteriše makroskopskim promenama, formiranjem edema i vidljivih ulcera, i mikroskopskih promena u tkivu kao što su nekroza ćelija, atrofija kripti i infiltracija neutrofila, makrofaga / monocita i T limfocita na mesto zapaljenja. Kao posledica formiranja submukoznog edema i hipertrofije mukozne muskulature dolazi do skraćivanja dužine debelog creva koja je posebno izražena u akutnom zapaljenju, u periodu najintenzivnije inflamacije. Analiza dužine debelog creva miševa u piku bolesti (Slika 4.21) pokazala je da:

- 1) kod životinja pretretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa dolazi do redukcije dužine debelog creva u odnosu na NK, ali je redukcija dužine bila manja nego kod PK grupe i bila je obrnuto srazmerna primenjenoj dozi rBanLec-a (Slika 4.21A).
- 2) kod životinja pretretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa dolazi do redukcije dužine debelog creva u odnosu na NK, ali je redukcija dužine bila manja nego kod PK grupe i bila je direktno srazmerna primenjenoj dozi rBanLec-a (Slika 4.21A).



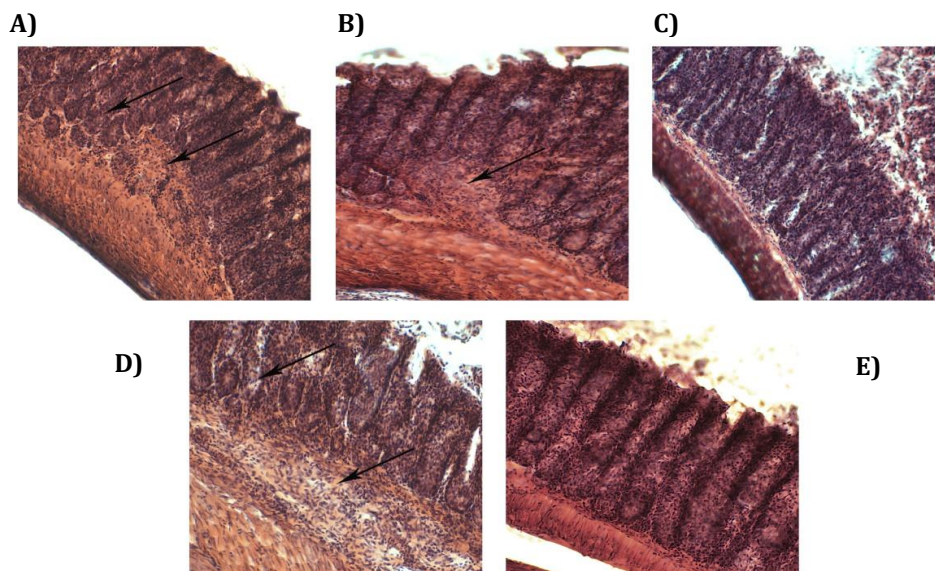
Slika 4.21. Dužina debelog creva u piku bolesti kod miševa kojima je 24h (A) i 48h (B) pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 µg/ml (grupe 24BL0,1 i 48BL0,1),

1 $\mu\text{g/ml}$ (grupe 24BL1 i 48BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupe 24BL10 i 48BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da profilaktička doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovano jednomratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0) a dužina debelog creva je analizirana u piku bolesti (dan 3). Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi; PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Redukcija dužine debelog creva u odnosu na NK grupu je bila u pozitivnoj korelaciji sa procentualnim smanjenjem TT u piku bolesti prikazanom na **Slici 4.20**.

HE bojenje uzoraka tkiva debelog creva uzetih od miševa u piku bolesti (dan 3 od indukcije eksperimentalnog kolitisa) i u fazi oporavka (dan 7 od indukcije eksperimentalnog kolitisa) pokazuju da količina lokalnih ćelijskih infiltrata generalno korelira sa intenzitetom patologije procenjenom na osnovu smanjenja TT.

Kod miševa PK grupe u piku bolesti su uočeni masivni infiltrati ćelija u subepitelnom sloju (**Slika 4.22D i Slika 4.23D**) dok u uzorcima tkiva miševa NK grupe te vrste promena nisu uočene (**Slika 4.22E i Slika 4.23E**).

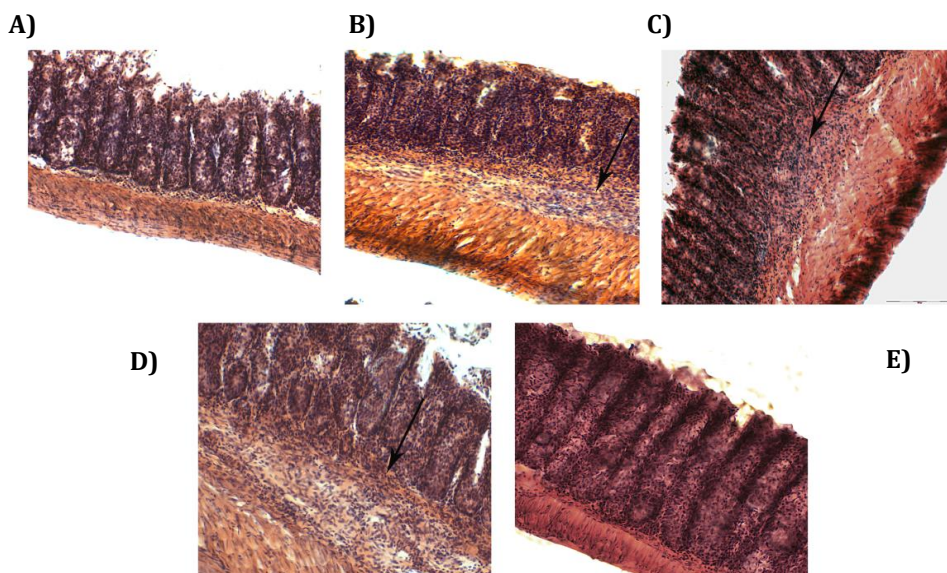


Slika 4.22. Uzdužni preseki tkiva debelog creva u piku bolesti kod miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednomratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila (A) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g/kg}$ TT), (B) 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g/kg}$ TT) i (C) 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g/kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednomratnom rektalnom primenom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a analizirani preparati su napravljeni od uzoraka

tkiva uzetih u piku bolesti (dan 3). Histološki preparati su bojeni hematoksilinom i eozinom i posmatrani pri uveličanju 20x. Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi, kao i reprezentativni uzorci (D) debelog creva u piku bolesti miševa gde indukciji eksperimentalnog kolitisa nije prethodio profilaktički tretman (grupa PK) i (E) debelog creva miševa kod kojih nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om (grupa NK). Strelice na slici pokazuju lokaciju ćelijskog infiltrata.

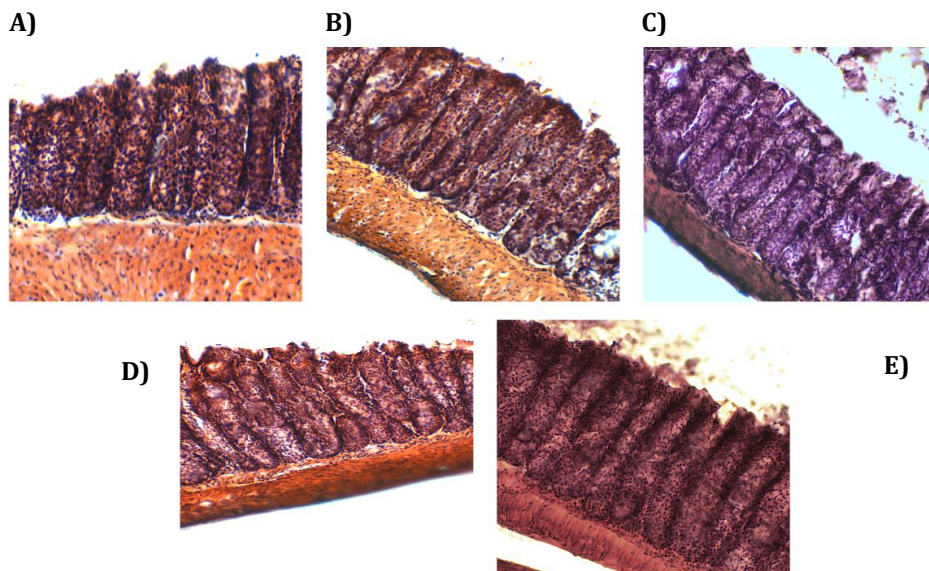
U uzorcima tkivima debelog creva miševa tretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije eksperimentalnog stepen infiltracije ćelija je bio direktno srazmeran primenjenoj koncentraciji rBanLec-a (Slika 4.23). Masivna infiltracija leukocita uočena je u LP miševa 48BL1 (Slika 4.23B) i 48BL10 (Slika 4.23C) grupa.

Analiza uzoraka tkiva debelog creva uzetih 7 dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa pokazala je da kod svih miševa iz grupa gde su uočeni znaci oporavka (porast TT nakon pika bolesti) nema uočljivog prisustva ni edema ni ćelijskih infiltrata (Slika 4.24A-D i Slika 4.25A,D). Ćelijski infiltrati uočeni su samo u LP miševa 48BL1 (Slika 4.25B) i 48BL10 (Slika 4.25C) grupa.



Slika 4.23. Uzdužni preseki tkiva debelog creva u piku bolesti kod miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila (A) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g/kg TT}$), (B) 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g/kg TT}$) i (C) 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g/kg TT}$). Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom primenom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a analizirani preparati su napravljeni od uzoraka tkiva uzetih u piku bolesti (dan 3). Histološki preparati su bojeni hematoksilinom i eozinom i posmatrani pri uveličanju 20x. Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi, kao i reprezentativni uzorci (D) debelog

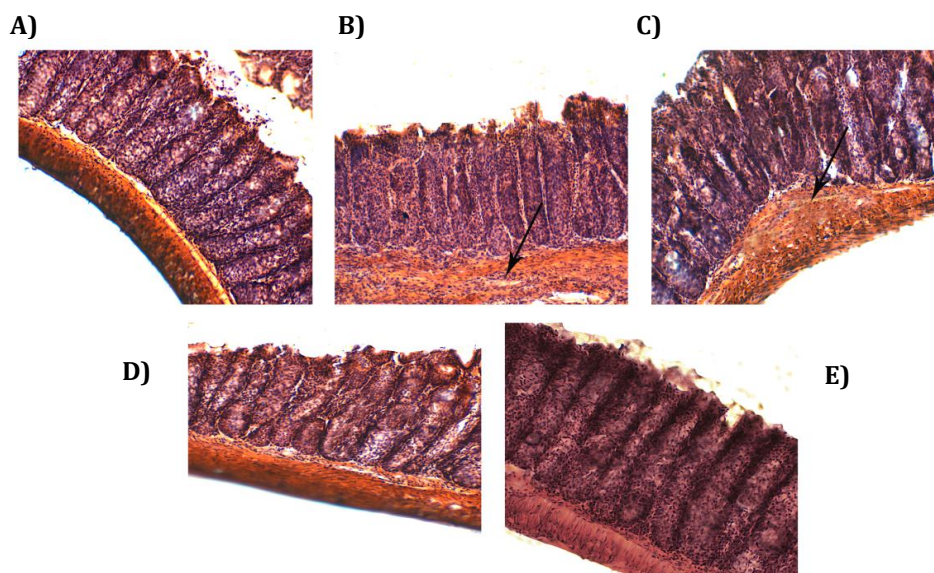
creva u piku bolesti miševa gde indukciji eksperimentalnog kolitisa nije prethodio profilaktički tretman (grupa PK) i (E) debelog creva miševa kod kojih nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om (grupa NK). Strelice na slici pokazuju lokaciju ćelijskog infiltrata.



Slika 4.24. Uzdužni preseki tkiva debelog creva u fazi oporavka miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila (A) 0,1 µg/ml (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), (B) 1 µg/ml (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i (C) 10 µg/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom primenom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a analizirani preparati su napravljeni od uzoraka tkiva uzetih u piku bolesti (dan 7). Histološki preparati su bojeni hematoksilinom i eozinom i posmatrani pri uveličanju 20x. Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi, kao i reprezentativni uzorci (D) debelog creva u fazi oporavka miševa gde indukciji eksperimentalnog kolitisa nije prethodio profilaktički tretman (grupa PK) i (E) debelog creva miševa kod kojih nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om (grupa NK). Strelice na slici pokazuju lokaciju ćelijskog infiltrata.

Sumiranjem prikazanih rezultata može se zaključiti da rBanLec, zavisno od doze i vremena aplikacije, ispoljava određeno profilaktičko dejstvo u modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša. Procentualno smanjenje TT, kao indikator intenziteta patologije u specifičnoj vremenskoj tački nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa, pozitivno korelira sa redukcijom dužine debelog creva i količinom ćelijskih infiltrata u subepitelnom odeljku, što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima.

Odsustvo vidljivog zapaljenja u nekim tkivima sugeriraju da rBanLec u dozama od 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (u slučaju 24h pretretmana) i 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (u slučaju 48h pretretmana) imaju anti-inflamatorni efekat.



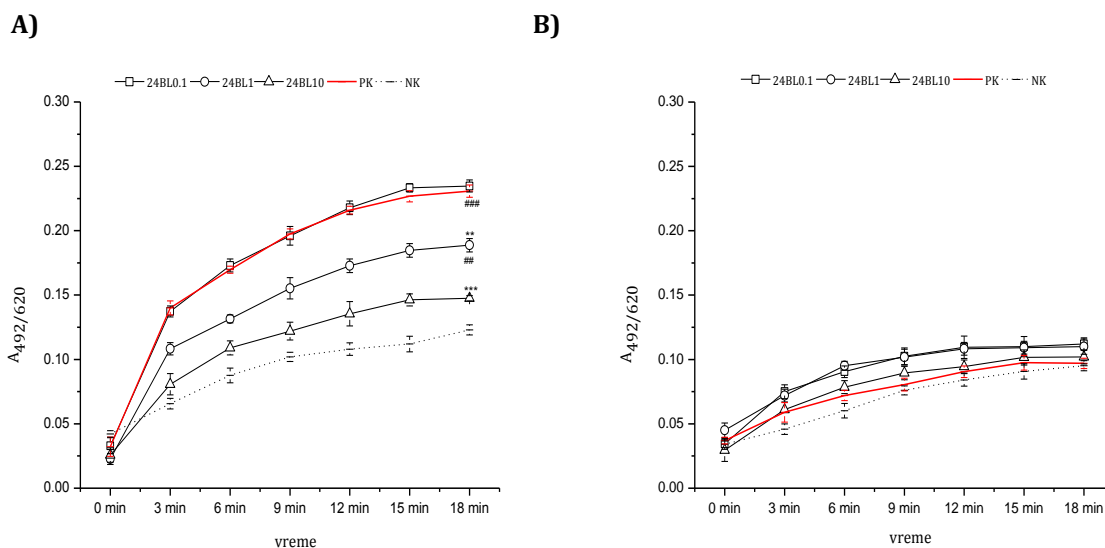
Slika 4.25. Uzdužni preseki tkiva debelog creva u fazi oporavka miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila (A) 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), (B) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i (C) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom primenom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a analizirani preparati su napravljeni od uzoraka tkiva uzetih u piku bolesti (dan 7). Histološki preparati su bojani hematoksilinom i eozinom i posmatrani pri uveličanju 20x. Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi, kao i reprezentativni uzorci (D) debelog creva u fazi oporavka miševa gde indukciji eksperimentalnog kolitisa nije prethodio profilaktički tretman (grupa PK) i (E) debelog creva miševa kod kojih nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om (grupa NK). Strelice na slici pokazuju lokaciju ćelijskog infiltrata.

4.3.1.3 Uticaj profilaktičke primene rBanLec-a na aktivnost MPO u debelom crevu miševa

S obzirom da MPO najviše prisutna u granulama neutrofilima, kao što je u prethodnim odeljcima napomenuto, lokalna MPO aktivnost se smatra merom infiltracije neutrofila i stepena akutnog zapaljenja.

Generalno, dobijeni rezultati su pokazali da je lokalna aktivnost MPO veća u tkivu debelog creva miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis u poređenju sa debelim crevom miševa NK grupe.

Profilaktički primenjen rBanLec je značajno uticao na lokalnu aktivnost MPO u piku bolesti, ali je, kao i u slučaju prethodne grupe rezultata, korelacija između doze rBanLec-a i aktivnosti MPO zavisi od vremena pretretmana (**Slika 4.26A** i **Slika 4.27A**).

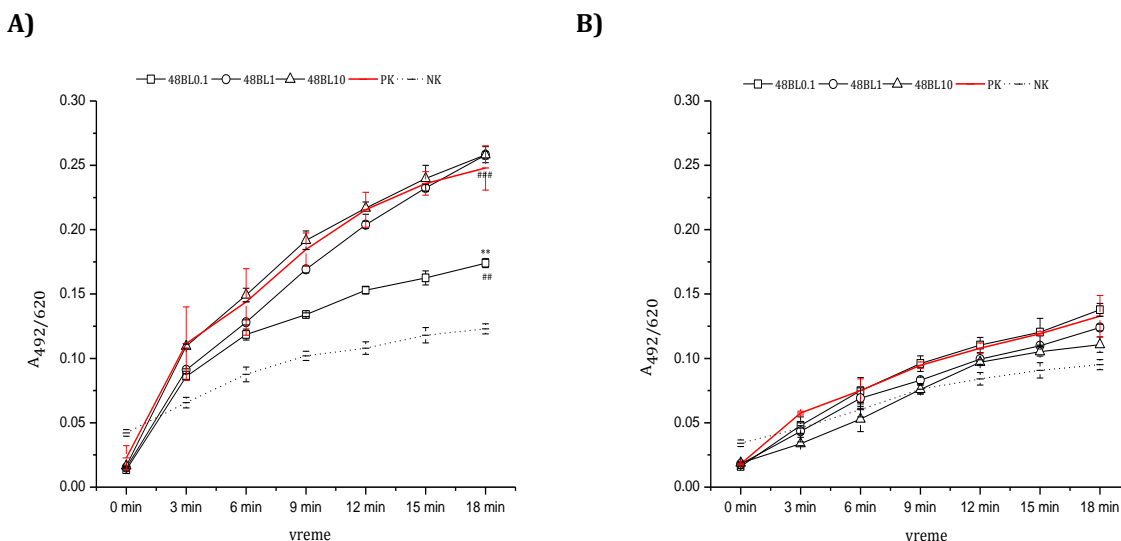


Slika 4.26. Aktivnost MPO u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i 10 µg/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a MPO aktivnost je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Aktivnost MPO u supernatantima homogenata tkiva određena je kolorimetrijski na osnovu brzine oksidacije o-fenilendiamina. Pre određivanja aktivnosti MPO koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je podešena na 10 mg/ml. Za svaki uzorak enzimska reakcija je prekidana u vremenskom intervalu od 2 minuta. Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm SE$. Statistička značajnost uočenih razlika u 18. minutu procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$) i NK ($P < 0,05^{\#}$, $P < 0,005^{\#\#}$, $P < 0,0001^{\#\#\#}$) grupe korišćene kao referentne; PK- grupa gde je TNBS-om indukovani eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod životinja pretretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, aktivnost MPO u piku bolesti (dan 3) je negativno korelirala sa primenjenom koncentracijom rBanLec-a (**Slika 4.26A**)-najveća aktivnost MPO, jednaka aktivnosti

izmerenoj kod miševa PK grupe, zabeležena kod miševa 24BL0,1 grupe. Aktivnost MPO u uzorcima debelog creva miševa 24BL1 i 24BL10 grupa bile su niže od aktivnosti izmerene u PK grupi, ali značajno više u odnosu na NK grupu ($P < 0,005$ za 24BL1; **Slika 4.26A**).

Kod životinja pretretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, aktivnost MPO u piku bolesti (dan 3) je pozitivno korelirala sa primenjenom koncentracijom rBanLec-a (**Slika 4.27A**) - najveća aktivnost MPO, približna aktivnosti izmerenoj kod miševa PK grupe, zabeležena kod miševa 48BL1 i 48BL10 grupa. Najniža aktivnost MPO izmerena je u uzorcima debelog creva miševa 48BL0,1 grupe, ali je i ona bila značajno viša u odnosu na MPO aktivnost izmerenu u uzorcima NK grupe ($P < 0,005$; **Slika 4.27A**).



Slika 4.27. Aktivnost MPO u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0) a MPO aktivnost je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Aktivnost MPO u supernatantima homogenata tkiva određena je kolorimetrijski na osnovu brzine oksidacije o-fenilendiamina. Pre određivanja aktivnosti MPO koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je podešena na 10 mg/ml. Za svaki uzorak enzimska reakcija je prekidana u vremenskom intervalu od 2 minuta. Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm SE$. Statistička značajnost uočenih razlika u 18. minutu procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$) i NK ($P < 0,05^{\#}$, $P < 0,005^{\#\#}$, $P < 0,0001^{\#\#\#}$) grupe korišćene kao referentne; PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Sedmog dana od indukcije eksperimentalnog kolitisa u uzorcima tkiva debelog creva rBanLec-pretretiranih miševa ali i miševa PK grupe uočeno je smanjenje MPO aktivnosti u odnosu na pik bolesti. MPO aktivnost kod svih miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis bila je približna MPO aktivnosti u tkivu miševa NK grupe (**Slika 4.26B** i **Slika 4.27B**).

Poređenje nivoa aktivnosti MPO u piku bolesti u tkivu debelog creva miševa tretiranih istom količinom rBanLec-a 24h i 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa pokazuje da je lokalna MPO aktivnost bila veća u miševa 24BL0,1 nego u miševa 48BL0,1 grupe, a da lokalna aktivnosti MPO u tkivu miševa 24BL1 i 24BL10 grupa bile manja u odnosu na 48BL1 i 48BL10 grupe.

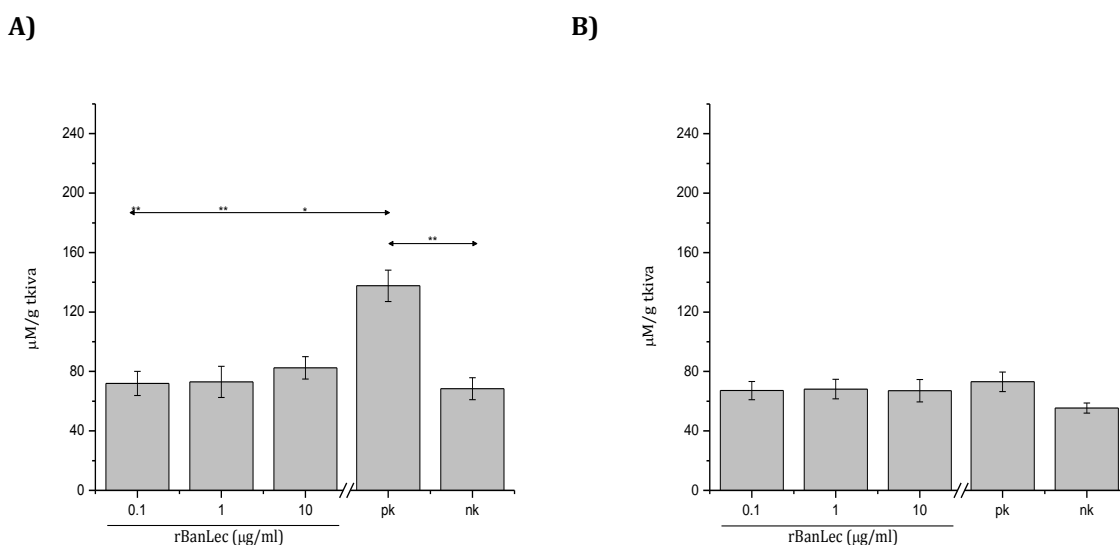
4.3.1.4 Uticaj profilaktičke primene rBanLec-a na aktivnost iNOS u debelom crevu miševa

Analiza lokalne aktivnosti iNOS, procenjena na osnovu NO produkcije, je pokazala da u modelu TNBS-indukovanog kolitisa kod BALB/c miša u piku bolesti dolazi do značajnog porasta iNOS aktivnosti, a da profilaktička primena rBanLec-a generalno dovodi do smanjenja iNOS aktivnosti u piku eksperimentalnog kolitisa.

Uočene promene lokalne iNOS aktivnosti nakon eksperimentalne indukcije kolitisa aplikovanjem etanolnog rastvora TNBS-a su (PK grupa; **Slika 4.28** i **Slika 4.29**) u saglasnosti sa literaturno dostupnim podacima (Neurath *et al.*, 2000; Kiesler *et al.*, 2015).

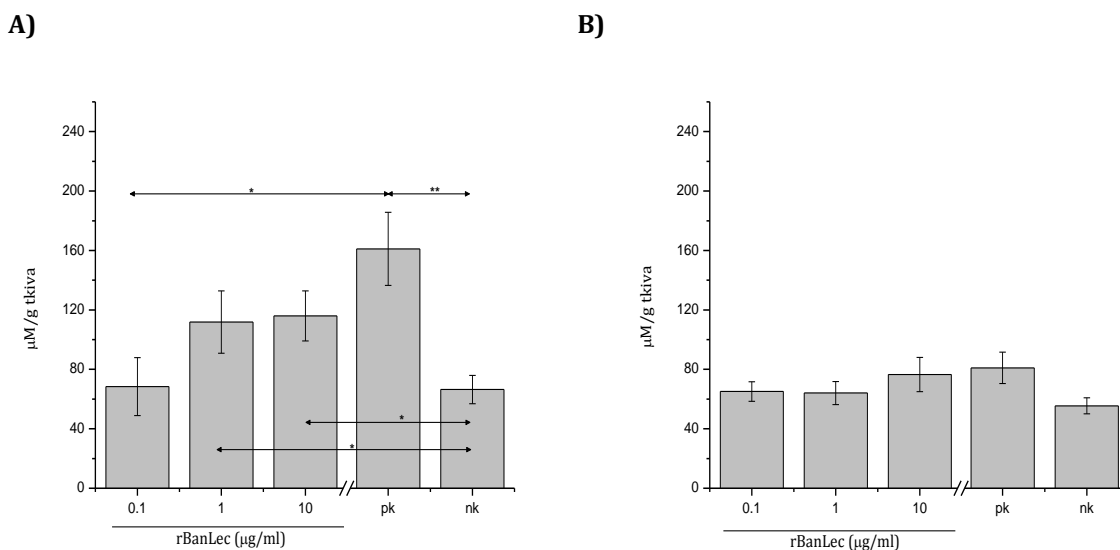
Kod svih miševa pretretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, lokalna produkcija NO u piku bolesti je bila značajno niža u poređenju sa PK grupom, približna NO produkciji zabeleženoj u NK grupi. Takođe, u testiranom opsegu koncentracija rBanLec-a, količina profilaktički primenjenog rBanLec-a nije imala značajan uticaj na stepen smanjenja iNOS aktivnosti (**Slika 4.28A**). Sedmog dana od indukcije kolitisa, lokalna produkcija NO je u svim eksperimentalnim grupama, uključujući i PK, bila približna NO produkciji u tkivu debelog creva miševa NK grupe (**Slika 4.28B**).

I kod miševa pretretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, lokalna produkcija NO u piku bolesti je bila niža u poređenju sa PK grupom, ali je stepen smanjenja NO produkcije bio obrnuto srazmeran profilaktički aplikovanoj količini rBanLec-a (**Slika 4.29A**). U uzorcima miševa 48BL0,1 grupe NO produkcija je bila u nivou NK grupe. U uzorcima miševa 48BL1 i 48BL10 grupa produkcija NO je bila viša u odnosu na NK grupu, ali i u odnosu na lokalnu NO produkciju u piku bolesti kod miševa koji su profilaktički tretirani istim količinama rBanLec-a 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa.



Slika 4.28. Produkcija NO u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i 10 µg/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a produkcija NO je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Koncentracija NO u supernatantima homogenata tkiva je određena pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test). Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija NO izračunata je pomoću odgovarajućih standardnih kriva (NaNO₂ korišćen kao standard). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po 1 g tkiva ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne (P < 0,05*, P < 0,005**, P < 0,0001***); PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kao i u slučaju pretretmana 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, u testiranom opsegu koncentracija rBanLec-a, količina profilaktički apliciranog rBanLec-a nije imala značajan uticaj na stepen smanjenja iNOS aktivnosti. Sedmog dana od indukcije kolitisa, lokalna produkcija NO, u svim grupama pretretiranim rBanLec-om 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, bila je približna NO produkciji u tkivu debelog creva miševa NK grupe (**Slika 4.29B**).

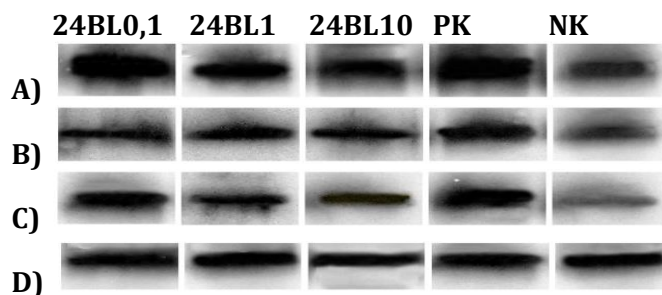


Slika 4.29. Produkcija NO u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i 10 µg/ml (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0) a produkcija NO je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Koncentracija NO u supernatantima homogenata tkiva je određena pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test). Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija NO izračunata je pomoću odgovarajućih stanardnih kriva (NaNO₂ korišćen kao standard). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost količine NO po 1 g tkiva ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne (P <0,05*, P <0,005**, P <0,0001***); PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

4.3.1.5 Uticaj profilaktičke primene rBanLec-a na ekspresiju T-bet, GATA-3 i ROR γ t u debelom crevu miševa

Ekspresija transkripcionih faktora T-bet, GATA-3 i ROR γ t, bitnih za sintezu marker citokina Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) i Th17 (IL-17) tipa imunskog odgovora, analizirana je u uzorcima tkiva debelog creva sakupljenim u piku bolesti, trećeg dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa.

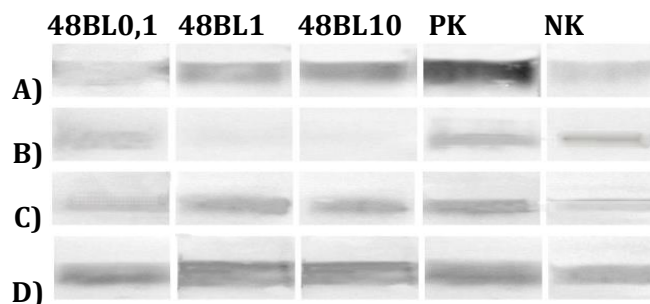
Western blot analiza ekspresije transkripcionih faktora u uzorcima tkiva miševa PK grupe, pokazala je da u TNBS-indukovanom kolitisu kod BALB/c miševa u piku bolesti dolazi do uspostavljanja imunskog odgovora Th1/Th17 tipa (**Slika 4.30** i **Slika 4.31**).



	24BL0,1	24BL1	24BL10	PK	NK
T-bet	1,21	0,94	0,86	1,28	0,79
GATA-3	0,94	0,97	0,94	0,95	0,82
RORγt	1,01	0,97	0,81	1,10	0,69

Slika 4.30. Western blot detekcija transkripcionih faktora (A) T-bet, (B) GATA-3, (C) ROR γ t u piku bolesti u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 μ g/kg TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 μ g/kg TT) i 10 μ g/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 μ g/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovan jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a ekspresija transkripcionih faktora je analizirana u piku bolesti (dan 3). Analiziran je pul od 3 uzorka po grupi. Količina transkripcionih faktora T-bet, GATA-3 i ROR γ t je normalizovane prema količini (D) β -aktina. Relativne količine transkripcionih faktora navedene su u tabeli; PK- grupa gde je TNBS-om indukovan eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovan eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod miševa tretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije kolitisa, kao i kod PK grupe, u piku bolesti dolazi do povećanja ekspresija T-bet (**Slika 4.30A**) i ROR γ t (**Slika 4.30C**), ali je samo u uzorcima miševa 24BL0,1 grupe porast njihove ekspresije bio u nivou porasta uočenog kod PK grupe. U uzorcima miševa 24BL1 i 24BL10 grupa porast ekspresije T-bet i ROR γ t je bio niži i obrnuto srazmeran profilaktički aplikovanoj dozi rBanLec-a. Nivo ekspresije GATA-3 nije se bitno razlikovao među grupama tretiranim rBanLec-om i bio je približno jednak nivo ekspresije u PK grupi, nešto viši u odnosu na NK grupu (**Slika 4.30B**).



	48BL0,1	48BL1	48BL10	PK	NK
T-bet	0,84	0,93	0,96	1,21	0,72
GATA-3	0,88	0,61	0,66	0,93	0,86
RORγt	0,88	0,99	1,09	1,09	0,70

Slika 4.31. Western blot detekcija transkripcionih faktora (A) T-bet, (B) GATA-3, (C) ROR γ t u piku bolesti u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 μ g/kg TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 μ g/kg TT) i 10 μ g/ml (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 μ g/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovan jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a ekspresija transkripcionih faktora je analizirana u piku bolesti (dan 3). Analiziran je pul od 3 uzorka po grupi. Količina transkripcionih faktora T-bet, GATA-3 i ROR γ t je normalizovane prema količini (D) β -aktina. Relativne količine transkripcionih faktora navedene su u tabeli; PK- grupa gde je TNBS-om indukovan eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovan eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod miševa tretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije kolitisa, takođe je uočeno povećanje ekspresije T-bet (**Slika 4.31A**) i ROR γ t (**Slika 4.31C**), ali je samo u uzorcima

miševa 24BL0,1 grupe porast njihove ekspresije bio u nivou porasta uočenog kod PK grupe. U uzorcima miševa 24BL1 i 24BL10 grupa porast ekspresije T-bet i ROR γ t je bio niži i obrnuto srazmeran profilaktički aplikovanoj dozi rBanLec-a. Za razliku od miševa tretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, kod ovih miševa je uočena smanjena ekspresija GATA-3 u odnosu na NK i stepen tog smanjenja je pozitivno korelirao sa količinom rBanLec-a koja je profilaktički aplicirana 48h pre indukcije bolesti. Jedino u uzorcima miševa 48BL0,1 grupe ekspresija GATA-3 je bila u nivou NK (**Slika 4.31B**).

4.3.1.6 Uticaj profilaktičke primene rBanLec-a na lokalnu produkciju citokina

Koncentracija citokina za koje je pokazano da doprinose inicijaciji i progresiji zapaljenske bolesti creva (IL-12 i TNF- α) i citokini za koje je pokazano da imaju važnu ulogu u kontroli pokrenutog zapaljenskog procesa (IL-10 i TGF- β) određivana je u piku bolesti i u fazi oporavka u uzorcima tkiva debelog creva miševa kojima je, nakon specifičnog jednokratnog profilaktičkog tretmana, indukovani eksperimentalni kolitis.

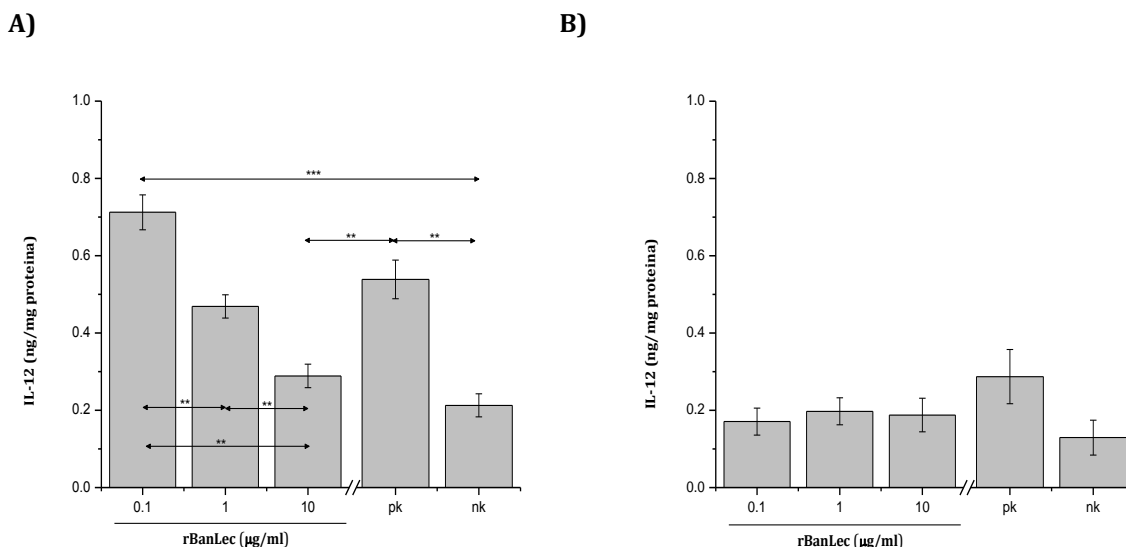
IL-12

U uzorcima debelog creva miševa PK grupe uzetim u piku bolesti izmerena je statistički značajno veća koncentracija IL-12 u odnosu na NK grupu (**Slika 4.32A** i **Slika 4.33A**; $P < 0,005$). Oporavak miševa PK grupe uključivao je i smanjenje lokalne koncentracije IL-12 te je u uzorcima skupljenim nedelju dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa izmerena značajno niža koncentracija IL-12 u odnosu na pik bolesti ($P < 0,05$). Dobijeni rezultati pokazuju da je profilaktički tretman rBanLec-om na specifičan način, zavisno od vremena izvođenja i upotrebljene doze, uticao na lokalnu produkciju IL-12 prvenstveno u fazi razvoja bolesti.

U debelom crevu miševa pretretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, u piku bolesti izmerena je veća koncentracija IL-12 u odnosu na NK grupu ($P < 0,005$ za 24BL0,1, $P < 0,05$ za 24BL1), ali je ona zavisila od profilaktičke doze rBanLec-a. Lokalna koncentracija IL-12 je negativno korelirala sa količinom

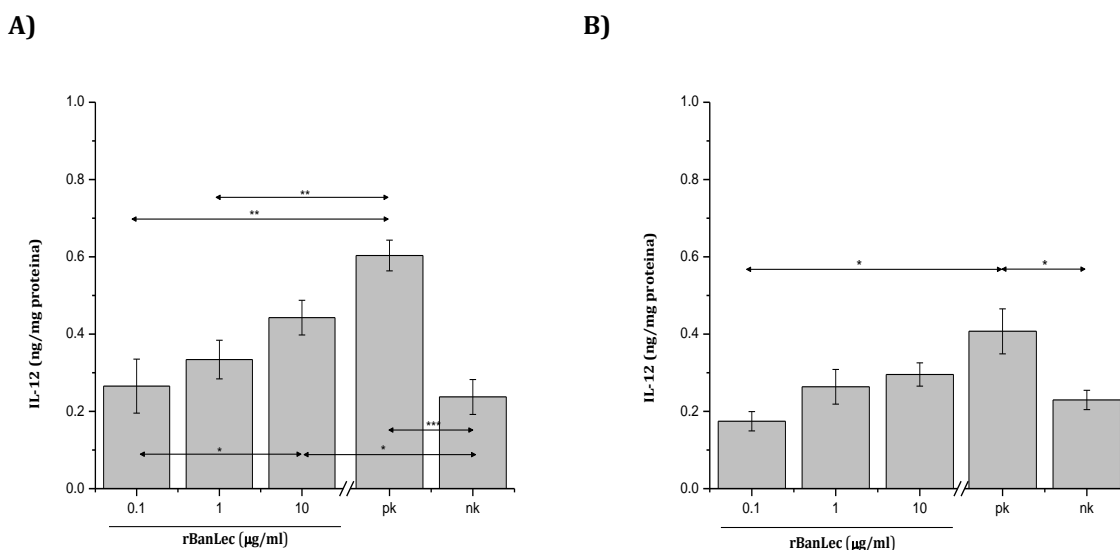
rBanLec-a koja je aplicirana 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa (**Slika 4.32A**). U debelom crevu miševa 24BL0,1 grupe izmerena je najveća koncentracija IL-12 (vs. NK $P < 0,001$, vs. PK $P < 0,05$, vs. 24BL1 $P < 0,05$, vs. 24BL10 $P < 0,001$), a najniža koncentracija IL-12 izmerena je u uzorcima 24BL10 grupe i bila je u nivou NK grupe (vs. PK $P < 0,05$, vs. 24BL0,1 $P < 0,001$, vs. 24BL1 $P < 0,05$).

Nivoi IL-12 izmereni 7 dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa u uzorcima debelog creva miševa 24BL0,1, 24BL1 i 24BL10 grupa bili su slični, približni nivou IL-12 u uzorcima NK grupe (**Slika 4.32B**). Kao i kod PK grupe, tokom faze oporavka došlo je do značajnog smanjenja lokalne produkcije IL-12 i kod miševa 24BL0,1 (dan 3 vs. dan 7 $P < 0,005$) i kod miševa 24BL1 (dan 3 vs. dan 7 $P < 0,05$) grupe.



Slika 4.32. Koncentracija IL-12 u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i 10 µg/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija IL-12 je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija IL-12 je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina IL-12 po 1 mg proteina supernatanta ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Za razliku od grupa pretereiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, gde je produkcija IL-12 u piku bolesti negativno korelirala sa profilaktičkom dozom rBanLec-a, kod miševa tretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije bolesti produkcija IL-12 u piku bolesti je pozitivno korelirala sa profilaktičkom rBanLec dozom (**Slika 4.33A**). Među 48BL grupama, najintenzivnija produkcija IL-12 uočena je kod miševa 48BL10 grupe, a izmerena lokalna koncentracija IL-12 je bila između koncentracija izmerenih u uzorcima miševa NK i PK grupe (vs. NK $P < 0,05$, vs. PK $P < 0,05$, vs. 24BL0,1 $P < 0,05$).



Slika 4.33. Koncentracija IL-12 u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija IL-12 je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija IL-12 je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljani kao srednja količina IL-12 po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

I kod miševa 48BL grupa je tokom faze oporavka došlo do smanjenja lokalne produkcije IL-12 (**Slika 4.33**), s tim da se i u fazi oporavka zadržala pozitivna korelacija

između lokalne koncentracije IL-12 i profilaktički primenjene doze rBanLec-a (**Slika 4.33B**).

Poređenje prosečne lokalne koncentracije IL-12 sa ekspresijom transkripcionih faktora bitnih za sintezu efektorskih citokina u piku bolesti, očekivano ukazuju na značajnu korelaciju između intenziteta lokalne produkcije IL-12 i ekspresije T-bet (pretretman 24h: $P_{cc}=0,875$, $P=0,05$; pretretman 48h: $P_{cc}=0,933$, $P=0,02$).

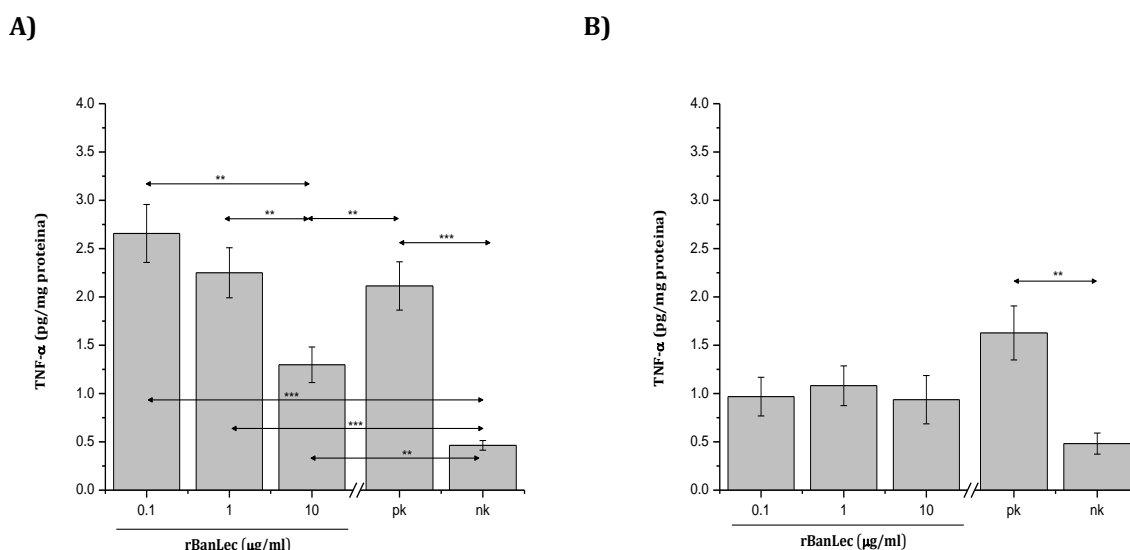
TNF- α

Uzimajući u obzir brojne rezultate dobijene na životinjskim modelima IBD-a gde se TNF- α spominje kao proinflamatorni citokin koji doprinosi patogenezi, očekivano, u uzorcima debelog creva miševa PK grupe uzetim u piku bolesti izmerena je statistički značajno veća koncentracija TNF- α u odnosu na NK grupu (**Slika 4.34A i Slika 4.35A**; $P<0,0001$). Oporavak miševa PK grupe uključivao je i značajno smanjenje lokalne koncentracije TNF- α , te je u uzorcima skupljenim nedelju dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa izmerena značajno niža koncentracija TNF- α u odnosu na pik bolesti ($P<0,05$). Dobijeni rezultati pokazuju da je profilaktički tretman rBanLec-om na specifičan način, zavisno od vremena izvođenja i upotrebljene doze, uticao na lokalnu produkciju TNF- α u fazi razvoja bolesti.

U debelom crevu miševa pretretiranih rBanLec-om 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, u piku bolesti izmerena je veća koncentracija TNF- α u odnosu na NK grupu ($P<0,0001$ za 24BL0,1, $P<0,005$ za 24BL1, $P<0,05$ za 24BL10) i zavisila je od profilaktičke doze rBanLec-a. Lokalna koncentracija TNF- α negativno je korelirala sa količinom rBanLec-a koja je aplicirana 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa (**Slika 4.34A**). Među 24BL grupama, u debelom crevu miševa 24BL0,1 grupe izmerena je najveća koncentracija TNF- α (vs. NK $P<0,0001$, vs. 24BL10 $P<0,005$), a najniža koncentracija IL-12 izmerena je u uzorcima 24BL10 grupe (vs. 24BL0,1 $P<0,005$, vs. 24BL1 $P<0,05$).

U fazi oporavka miševa 24BL grupa intenzitet lokalne produkcije TNF- α se smanjivao u odnosu na pik bolesti. Sedam dana nakon indukcije bolesti lokalni nivo TNF- α bio je i dalje viši od nivoa u NK grupi, ali značajno niži nego u piku bolesti u odgovarajućoj

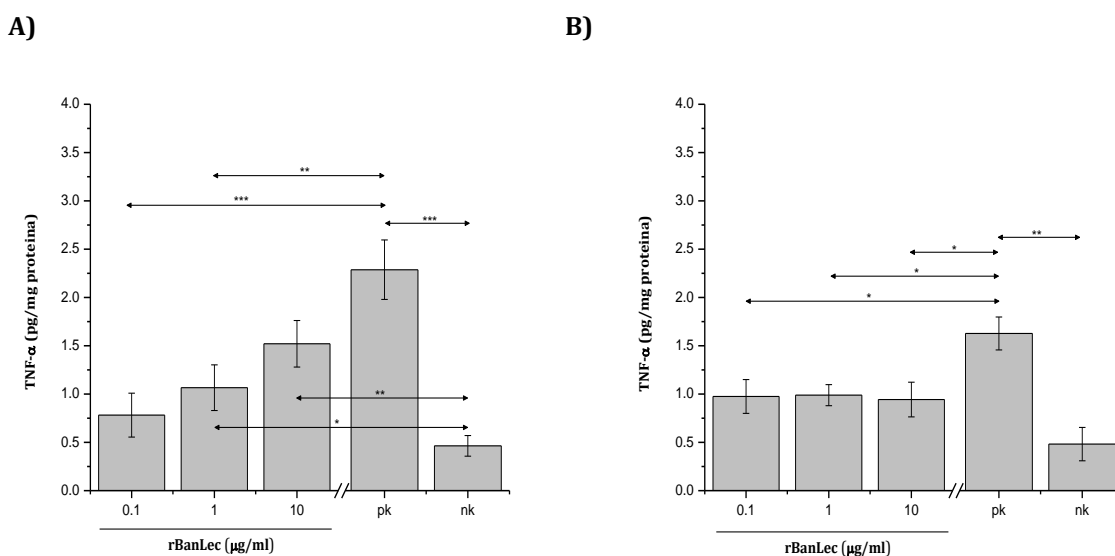
grupi i značajno niži nego kod miševa PK grupe u istoj fazi ($P < 0,0001$ za 24BL0,1 (3. dan) vs. 24BL0,1 (7.dan) i za 24BL1 (3. dan) vs. 24BL0,1 (7.dan); **Slika 4.34B**). Takođe, sedam dana nakon indukcije bolesti koncentracije TNF- α u debelom crevu miševa 24BL grupa bile su približne tj. nisu zavisile od profilaktički primenjene doze rBanLec-a.



Slika 4.34. Koncentracija TNF- α u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija TNF- α je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija TNF- α je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina TNF- α po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod miševa tretiranih rBanLec-om 48h pre indukcije bolesti produkcija TNF- α u piku bolesti je pozitivno korelirala sa profilaktičkom rBanLec dozom (**Slika 4.35A**). Među 48BL grupama, najintenzivnija produkcija TNF- α uočena je kod miševa 48BL10 grupe, a izmerena lokalna koncentracija TNF- α je bila između koncentracija izmerenih u uzorcima miševa NK i PK grupe (vs. NK $P < 0,005$, vs. PK $P < 0,05$, vs. 24BL0,1 $P < 0,05$).

Generalno, u fazi oporavka miševa 48BL grupa intenzitet lokalne produkcije TNF- α se smanjivao u odnosu na pik bolesti (dan 3 vs. dan 7 $P < 0,05$ za 48BL10). Sedam dana nakon indukcije bolesti koncentracije TNF- α u debelom crevu miševa 48BL grupa bile su približne tj. nisu zavisile od profilaktički primenjene doze rBanLec-a, a bile su značajno više od koncentracija u NK grupi i niže nego kod miševa PK grupe u istoj fazi (Slika 4.35B).

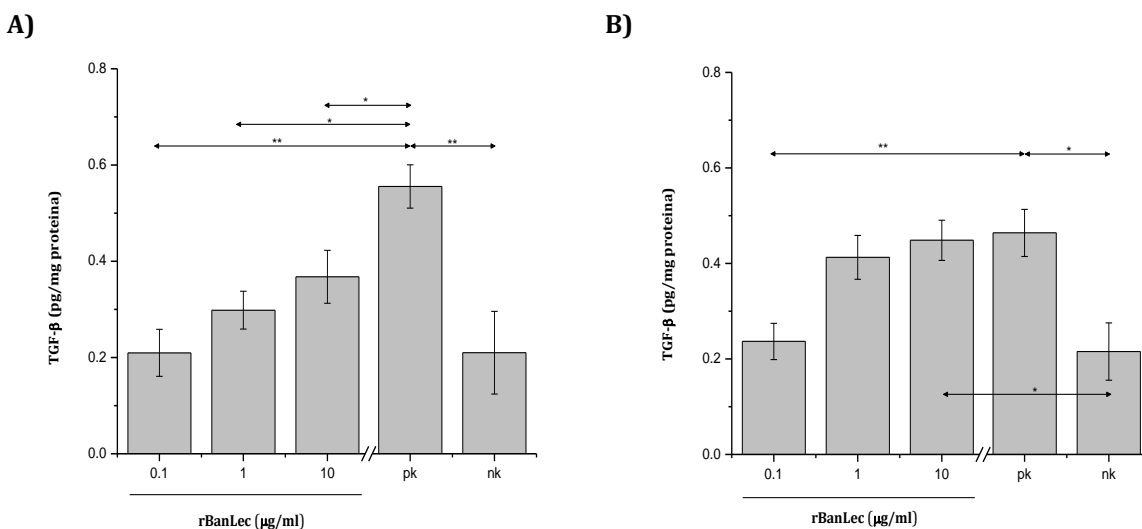


Slika 4.35. Koncentracija TNF- α u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 μ g/kg TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 μ g/kg TT) i 10 μ g/ml (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 μ g/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija TNF- α je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija TNF- α je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina TNF- α po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

TGF- β

Analiza produkcije TGF- β u debelom crevu BALB/c miša nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a pokazala

je da tokom razvoja bolesti dolazi do intenziviranja njegove produkcije, a da se tokom faze oporavka lokalna produkcija TGF- β postepeno smanjuje. Nivo TGF- β u debelom crevu miševa PK grupe u piku bolesti (dan 3) bio je značajno viši nego 7. dana od indukcije bolesti (**Slika 4.36** i **Slika 4.37**; $P < 0,05$). Pored toga, tokom celog perioda posmatranja (7 dana nakon indukcije bolesti) lokalni nivo TGF- β u miševa PK grupe je bio značajno viši u odnosu na NK grupu (NK vs. PK, dan 3: $P < 0,005$, NK vs. PK, dan 7: $P < 0,05$).

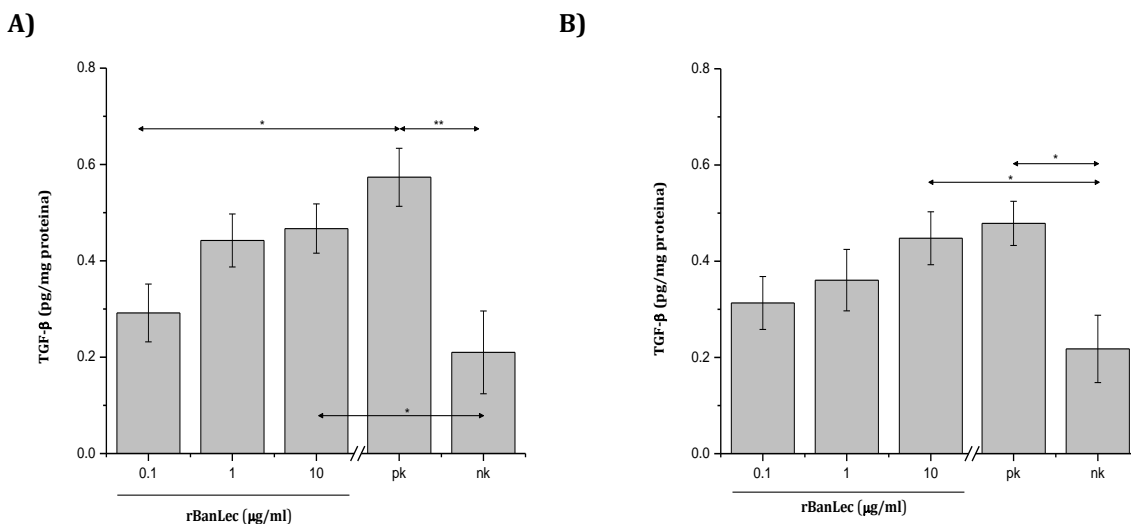


Slika 4.36. Koncentracija TGF- β u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g/kg}$ TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g/kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g/kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija TGF- β je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija TGF- β je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina TGF- β po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK- grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK- grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod miševa pretretiranih rBanLec-om u opsegu koncentracija 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, nezavisno od vremena profilaktičkog tretmana, u piku bolesti uočena je manja produkcija TGF- β u poređenju sa miševima PK grupe u istoj fazi bolesti, s tim da je lokalna produkcija TGF- β bila nešto intenzivnija kod miševa 48BL grupa u poređenju sa odgovarajućom 24BL grupom ($P < 0,05$ 24BL vs. 48BL). Poređenje

eksperimentalnih grupa pretretiranih istovremeno rBanLec-om pokazuje da je sekrecije TGF β u piku bolesti najviše inhibirana kod miševa BL0,1 grupa (**Slika 4.36A** i **Slika 4.37A**). Lokalna produkcija TGF- β u piku bolesti miševa 24BL0,1 i 48BL0,1 bila je u nivou NK grupe. Kod miševa profilaktički tretiranih većim dozama rBanLec-a uočen je dozno-zavisni porast lokalne produkcije TGF- β u piku bolesti, ali je on i dalje bio niži u odnosu na PK grupu u istoj fazi bolesti.

Isti obrazac dozno-zavisnog uticaja rBanLec-pretretmana na lokalnu produkciju TGF- β uočen je i u fazi oporavka (**Slika 4.36B** i **Slika 4.37B**). Takođe, kod miševa 24BL grupa je izostao pad lokalne koncentracije TGF- β tokom faze oporavka, dok je kod miševa 48BL grupa bio znatno manji u poređenju sa PK grupom.

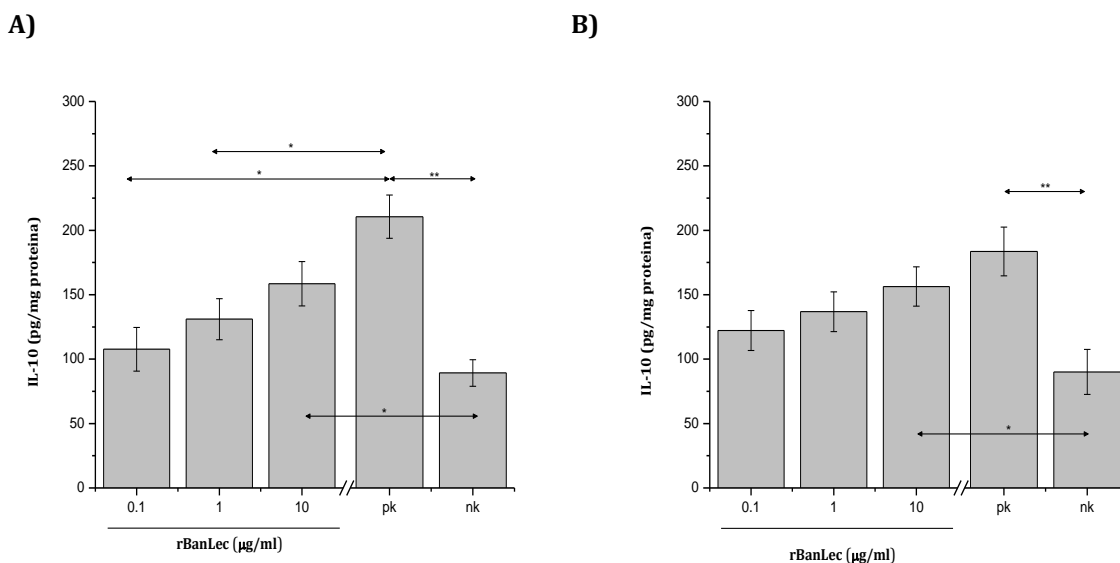


Slika 4.37. Koncentracija TGF- β u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija TGF- β je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija TGF- β je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina TGF- β po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Poređenje prosečne lokalne koncentracije TGF- β sa ekspresijom transkripcionih faktora bitnih za sintezu efektorskih citokina u piku bolesti, ukazuje na značajnu korelaciju između intenziteta lokalne produkcije TGF- β i ekspresije ROR γ t kada se profilaktički tretman rBanLec-om izvodi 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa (pretretman 24h: $P_{cc}=0,547$, $P=0,26$; pretretman 48h: $P_{cc}=0,948$, $P=0,01$).

IL-10

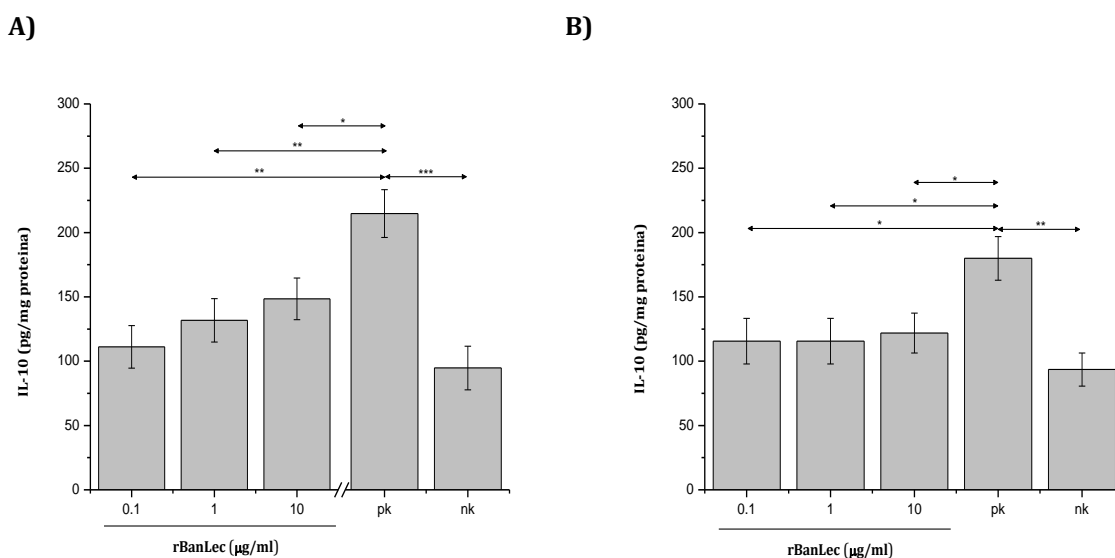
Analiza produkcije IL-10 u debelom crevu BALB/c miša nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a pokazala je da tokom razvoja bolesti dolazi do intenziviranja njegove produkcije (PK vs NK $P<0,005$ u piku bolesti) i da se njegova produkcija, kao i u slučaju produkcije TGF- β , smanjuje tokom faze oporavka (**Slika 4.38** i **Slika 4.39**; $P<0,05$ PK (dan 3) vs. PK (dan 7)).



Grafik 4.38. Koncentracija IL-10 u debelom crevu miševa kojima je 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 μ g/kg TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 μ g/kg TT) i 10 μ g/ml (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 μ g/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija IL-10 je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija IL-10 je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljani kao srednja količina IL-10 po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalno kolitis bez ikakvog

prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovao eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kod miševa jednokratno tretiranih rBanLec-om u opsegu koncentracija 0,1-10 µg/ml 24h i 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa, uočena je manja produkcija IL-10 u piku bolesti u poređenju sa miševima PK grupe u istoj fazi bolesti i to smanjenje nije zavisilo od vremena pretretmana nego samo od doze rBanLec-a koja je profilaktički primenjena. Lokalna koncentracija IL-10 u piku bolesti i kod 24BL grupa i kod 48BL grupa pozitivno je korelirala sa profilaktički primenjenom dozom rBanLec-a.

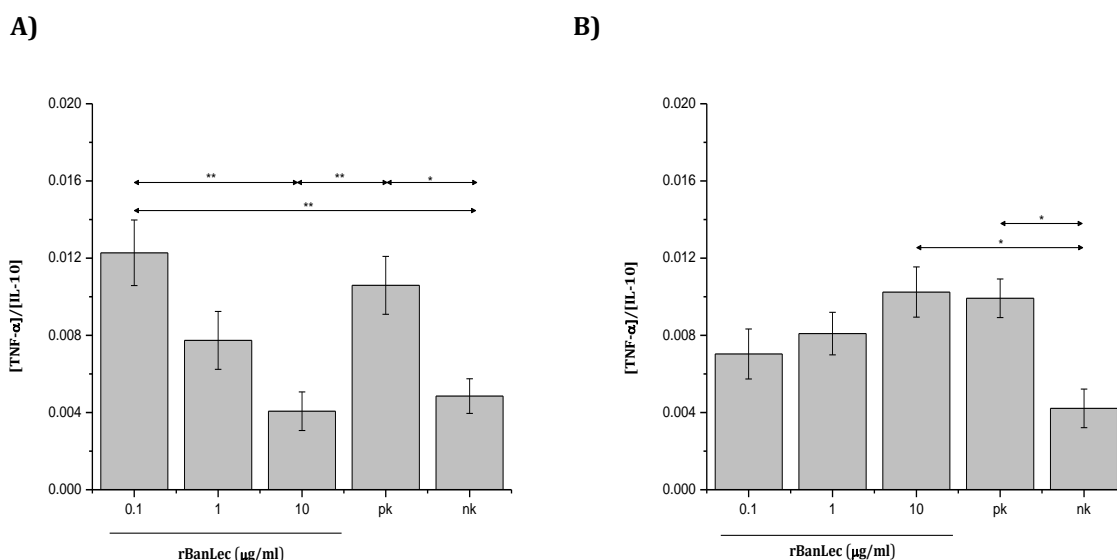


Grafik 4.39. Koncentracija IL-10 u debelom crevu miševa kojima je 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 48BL0,1, profilaktička doza 0,5 µg/kg TT), 1 (grupa 48BL1, profilaktička doza 5 µg/kg TT) i 10 µg/ml (grupa 48BL10, profilaktička doza 50 µg/kg TT). Eksperimentalni kolitis je indukovao jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija IL-10 je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija IL-10 je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljani kao srednja količina IL-10 po 1 mg proteina supernatanta ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne (P <0,05*, P <0,005**, P <0,0001***); PK-grupa gde je TNBS-om indukovao eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovao eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Za razliku od ostalih miševa koji su pre indukcije eksperimentalnog kolitisa profilaktički tretirani rBanLec-om, kod miševa 48BL1 i 48BL10 uočen je značajan pad

lokalne koncentracije IL-10 tokom faze oporavka ($P < 0,05$; dan 3 vs dan 7 (48BL1 i 48BL10)) tako da je koncentracija IL-10 u debelom crevu miševa 48BL grupa 7 dana nakon indukcije bolesti bila ista (**Slika 4.39B**).

Sve više studija rađenih na eksperimentalnim modelima IBD-a, pokazuju da za razvoj patologije apsolutne lokalne koncentracije TNF- α i IL-10 imaju manji značaj od odnosa njihovih koncentracija. Analiza odnosa koncentracija [TNF- α]/[IL-10] (**Slika 4.40**) pokazala je da je profilaktičkom primenom rBanLec-a na specifičan način, zavisno od vremena pretretmana i primenjene doze, modulisan odnos [TNF- α]/[IL-10] u debelom crevu u piku bolesti (3. dan nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa, **Slika 4.20**).



Slika 4.40. Odnos koncentracija TNF α i IL-10 u debelom crevu miševa kojima je (A) 24h i (48h) pre indukcije eksperimentalnog kolitisa jednokratno rektalno aplikovan rastvor rBanLec-a. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za pretretman je bila 0,1 (grupa 24BL0,1, profilaktička doza 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT), 1 (grupa 24BL1, profilaktička doza 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT) i 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (grupa 24BL10, profilaktička doza 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TT). Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a odnos koncentracija TNF α i IL-10 je analiziran u piku bolesti (dan 3). Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis bez ikakvog prethodnog tretmana rBanLec-om, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Poređenje odnosa lokalnih koncentracija TNF α i IL-10 sa intenzitetom patologije (procenjeno na osnovu procentualnog smanjenja TT) u piku bolesti nameće zaključak da povećanje udela TNF- α odnosno smanjenje udela IL-10 u lokalnom citokinskom miljeu

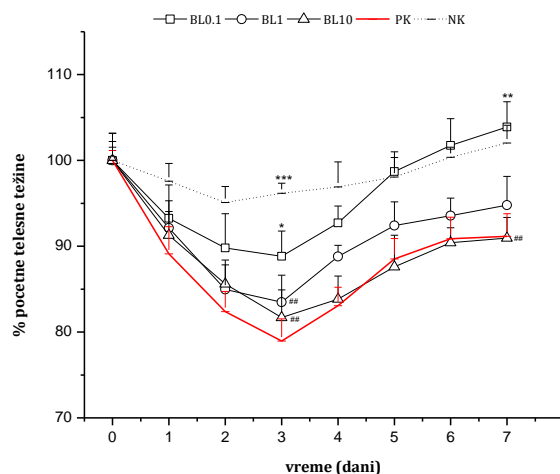
pozitivno korelira sa intenzitetom patologije (pretretman 24h: $P_{cc}=0,827$, $P=0,05$; pretretman 48h: $P_{cc}=0,953$, $P=0,01$).

4.3.2 Evaluacija terapijskog potencijala rBanLec-a u mišjem modelu TNBS-om indukovano kolitisa

4.3.2.1 Uticaj oralno primenjenog tretmana rBanLec-a na opšte stanje miševa

Ispitivanje da li i u kojoj dozi rBanLec ispoljava pozitivno terapijsko dejstvo u slučaju IBD-a urađeno je takođe na modelu TNBS-indukovanog kolitisa kod BALB/c miša gde je miševima svakodnevno, tokom 7 dana počevši od dana indukcije bolesti (dan 0), oralno davan rastvor koji je sadržao rBanLec u koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). U ovoj fazi istraživanja rađen je oralni tretman rBanLec-om jer bi rektalni tretman povećavao verovatnoću dodatnog, fizičkog oštećenja, inflamiranog tkiva. Takođe, rektalni tretman zahtevao bi svakodnevno sediranje životinja što bi moglo da značajno utiče na ishod tretmana i svakako predstavljalo dodatni stres za životinje.

Dobijeni rezultati pokazuju da navedeni terapijski tretman nije sprečio pojavu patologije ali je, zavisno od doze rBanLec-a, ublažio simptome bolesti i ubrzao oporavak životinja. Analiza promena u TT miševa nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa (**Slika 4.41**) pokazuje da se bolji terapijski efekat postiže primenom rBanLec-a u nižim dozama. U piku bolesti (dan 3) kod svih miševa tretiranih rBanLec-om procentualni gubitak TT (indikator intenziteta patologije) je bio manji nego kod miševa PK grupe, s tim što je pozitivno korelirao sa terapijski primenjenom dozom rBanLec-a - najmanji gubitak TT uočen je u BL0,1 grupi. Takođe, i oporavak miševa BL0,1 grupe je bio najbrži tako da su oni, poput miševa NK grupe, petog dana nakon indukcije bolesti povratili svoju početnu TT. Nasuprot BL0,1 grupi, oporavak miševa BL10 grupe bio je značajno sporiji, sličan oporavku miševa PK grupe.



Slika 4.41. Promene telesne težine miševa kod kojih je indukovani eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om.

Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0). Telesna težina svakog miša je merena u naznačenim vremenskim tačkama ($n=5$ miševa/grupa) i izražavana kao procenat njegove telesne težine u trenutku indukcije kolitisa. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti procenta početne telesne težine \pm SE u naznačenim vremenskim tačkama. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK ($P<0,05^*$, $P<0,005^{**}$, $P<0,0001^{***}$) i NK ($P<0,05^{\#}$, $P<0,005^{\#\#}$, $P<0,0001^{\#\#\#}$) grupe korišćene kao referentne; PK-grupa gde je TNBS-om indukovani eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK-grupa gde nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Kao što je u prethodnim poglavljima pomenuto, skraćivanje debelog creva predstavlja jedan od makroskopskih parametara koji ukazuje na stepen lokalne inflamacije. Kod svih miševa kod kojih je indukovani eksperimentalni kolitis uočeno je skraćivanje debelog creva u piku bolesti (**Slika 4.42**) ali je ono bilo najmanje kod miševa BL0,1 grupe. Generalno, rezultati uticaja specifičnih tretmana na dužinu debelog creva u saglasnosti su sa uočenim gubitkom TT u piku bolesti.



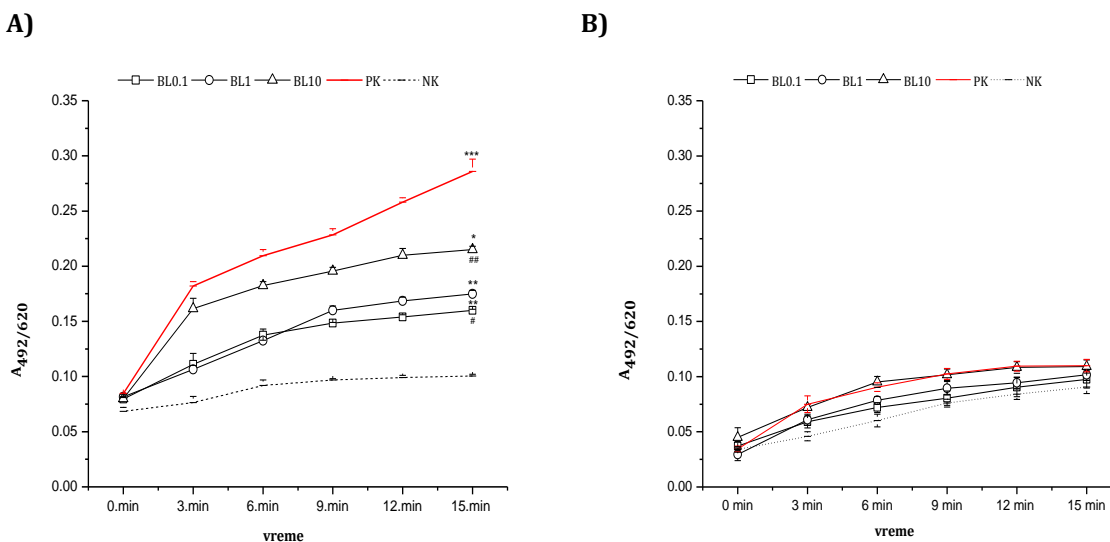
Slika 4.42. Dužina debelog creva u piku bolesti kod miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a dužina debelog creva je analizirana u piku bolesti (dan 3). Na slici su prikazani reprezentativni uzorci po grupi; PK- grupa gde je TNBS-om indukovani eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK- grupa gde nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

4.3.2.2 Uticaj oralno primenjenog rBanLec-a na promene u MPO i iNOS aktivnosti u debelom crevu miševa

Kao što je već pokazano, u modelu TNBS-indukovanog kolitisa kod BALB/c miša u piku bolesti lokalna aktivnost MPO, koja se smatra merom infiltracije neutrofila, značajno raste u odnosu na fiziološko stanje. Takođe, dostupni literaturni podaci, a i rezultati koji su prikazani u prethodnom poglavlju pokazuju da tokom faze oporavka dolazi do smanjenja lokalne MPO aktivnosti.

Rezultati koji su dobijeni potvrđuju značajan rast lokalne MPO aktivnosti kod miševa PK grupe u piku bolesti (vs. NK: $P < 0,005$) i pokazuju da terapijska primena rBanLec-a u koncentracijama 1-10 $\mu\text{g/ml}$ dovodi do značajnog smanjenja lokalne MPO aktivnosti u piku bolesti (**Slika 4.43A**). U rBanLec tretiranim grupama, smanjenje MPO aktivnosti u odnosu na PK grupu bilo je obrnuto srazmerno terapijskoj dozi rBanLec-a. Tokom faze oporavka uočen je pad lokalne MPO aktivnosti kako u miševa PK grupe tako i kod rBanLec-tretiranih miševa. Ipak, sedam dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa lokalna MPO aktivnost kod PK miševa je i dalje bila iznad nivoa NK grupe ($P < 0,05$). Takođe, 7 dana nakon indukcije ekperimentalnog kolitisa lokalna aktivnost MPO

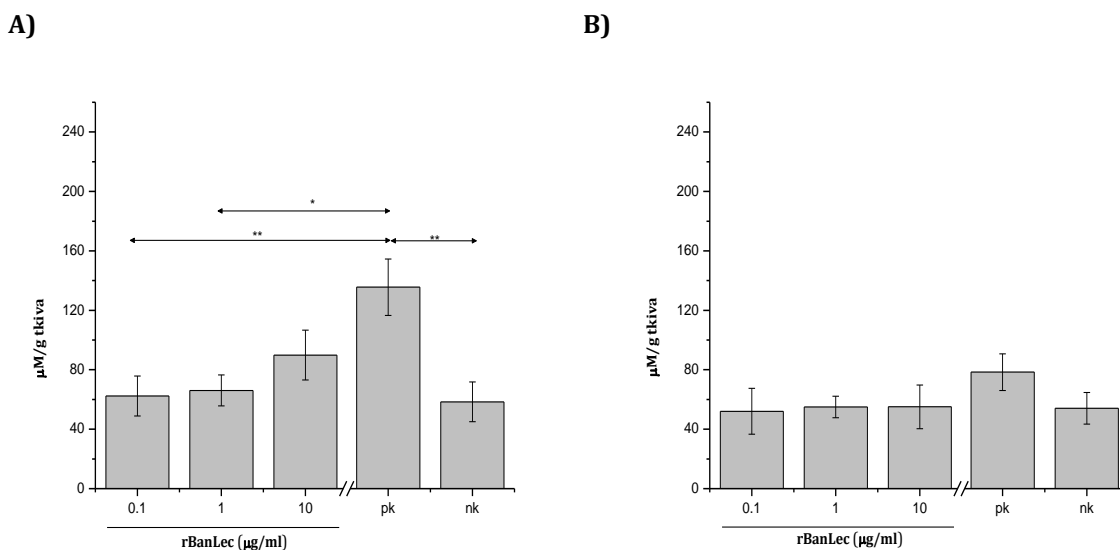
je kod miševa iz BL10 grupe bila u nivou PK grupe u istoj fazi bolesti. Kod miševa BL0,1 i BL1 grupa lokalna aktivnost MPO bila je u fiziološkim granicama (**Slika 4.43B**).



Slika 4.43. Aktivnost MPO u debelom crevu miševa kojima je indukovano eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovano jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a MPO aktivnost je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Aktivnost MPO u supernatantima homogenata tkiva određena je kolorimetrijski na osnovu brzine oksidacije o-fenilendiamina. Pre određivanja aktivnosti MPO koncentracija ukupnih proteina u svim uzorcima je podešena na 10 mg/ml. Za svaki uzorak enzimski reakcija je prekidana u vremenskom intervalu od 3 minuta. Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $A_{492/620} \pm SE$. Statistička značajnost uočenih razlika u 15. minutu procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$) i NK ($P < 0,05^\#$, $P < 0,005^{\#\#}$, $P < 0,0001^{\#\#\#}$) grupe korišćene kao referentne; PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Saglasno sa literaturnim podacima i rezultatima prikazanim u prethodnim poglavljima, tri dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa, u piku bolesti, kod miševa PK grupe je uočena značajno veća iNOS aktivnost, koja se ogleda u porastu lokalne koncentracije NO, u odnosu na NK grupu. Kod životinja terapijski tretiranih rBanLec-om, u odnosu na PK grupu, uočena je manja lokalna produkcija NO i stepen smanjenja produkcije NO bio je obrnuto srazmeran terapijski primenjenoj dozi rBanLec-a (**Slika**

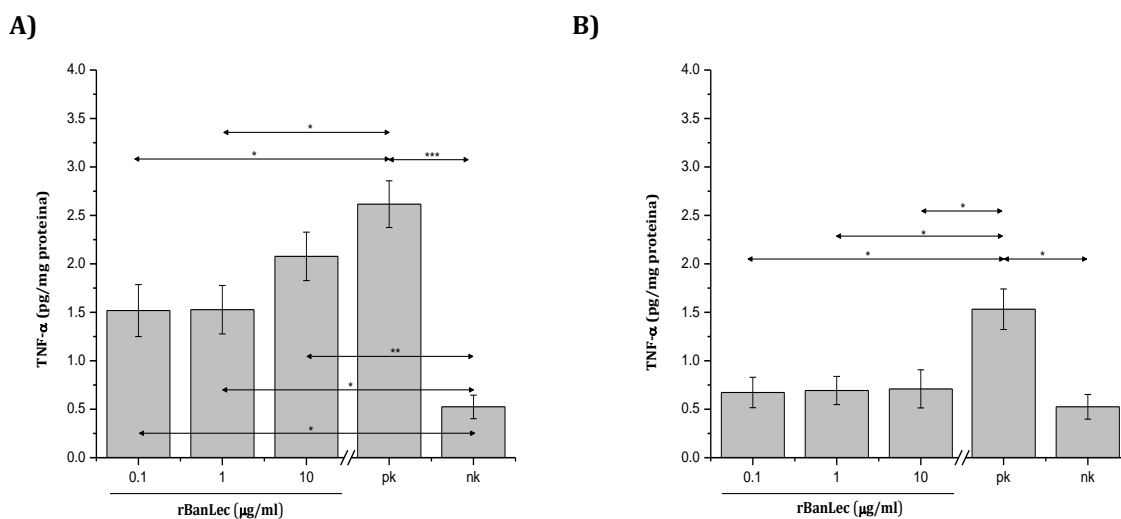
4.44A; vs. PK, dan 3: $P < 0,05$ za BL10, dan 3, $P < 0,005$ za BL1, dan 3 i BL0,1, dan 3). Tokom faze oporavka uočen je pad lokalne iNOS aktivnosti kako u miševa PK grupe tako i kod rBanLec-tretiranih miševa. Ipak, sedam dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa lokalna NO produkcija kod PK miševa je i dalje bila iznad nivoa NK grupe ($P < 0,05$) dok je kod svih rBanLec-tretiranih miševa, nezavisno od terapijske doze, bila u nivou NK grupe (**Slika 4.44B**).



Slika 4.44. Produkcija NO u debelom crevu miševa kojima je indukovao eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 µg/ml (grupa BL0,1), 1 µg/ml (grupa BL1) ili 10 µg/ml (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) µg/kg TT. Eksperimentalni kolitis je indukovao jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0) a produkcija NO je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Koncentracija NO u supernatantima homogenata tkiva je određena pomoću Greiss-ovog reagensa (NO test). Uzorci (n = 5 miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija NO izračunata je pomoću odgovarajućih standardnih kriva (NaNO₂ korišćen kao standard). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost količine NO po 1 g tkiva ± SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05$ *, $P < 0,005$ ***, $P < 0,0001$ ***); PK- grupa gde je TNBS-om indukovao eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK- grupa gde nije indukovao eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

4.3.2.3 Uticaj oralno primenjenog rBanLec-a na produkciju citokina TNF- α i IL-10 u debelom crevu miševa

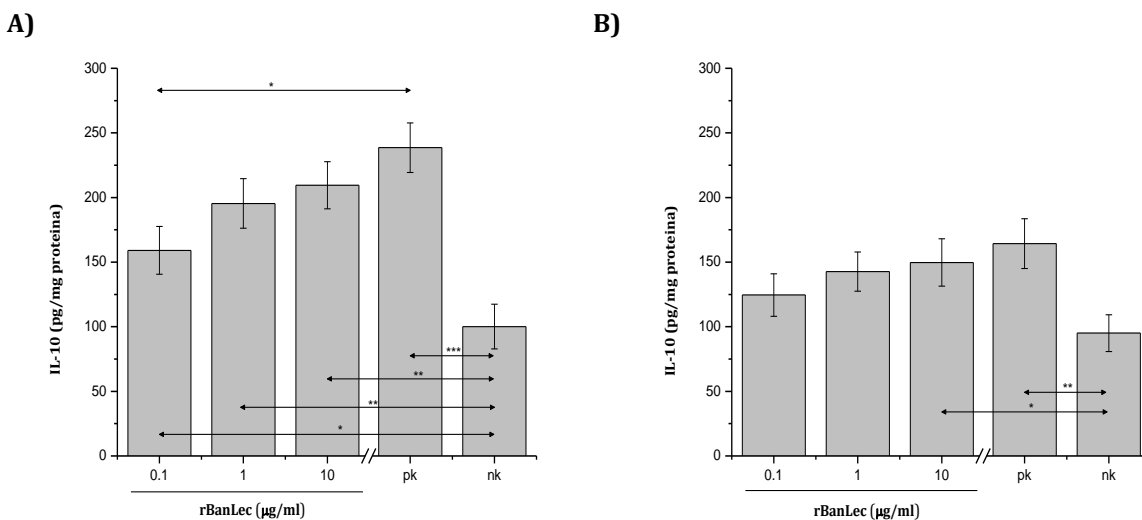
Saglasno sa literaturnim podacima i rezultatima prikazanim u prethodnim poglavljima, tri dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa, u piku bolesti, kod miševa PK grupe je uočena značajno veća lokalna produkcija TNF- α u odnosu na NK grupu ($P < 0,0001$). Kod životinja terapijski tretiranih rBanLec-om, u odnosu na PK grupu, uočena je manja lokalna produkcija TNF- α i stepen smanjenja produkcije TNF- α bio je obrnuto srazmeran primenjenoj dozi rBanLec-a (**Slika 4.45A**; vs. PK, dan 3: $P < 0,05$ za BL10, dan 3, $P < 0,005$ za BL1, dan 3 i BL0,1, dan 3). Takođe, i u rBanLec tretiranim grupama lokalna produkcija TNF- α u piku bolesti bila je značajno veća u odnosu na NK grupu.



Slika 4.45. Koncentracija TNF- α u debelom crevu miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija TNF- α je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija TNF- α je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina TNF- α po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovani eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK-grupa gde nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Tokom faze oporavka uočen je pad lokalne produkcije TNF- α kako kod miševa PK grupe tako i kod miševa tretiranih rBanLec-om (dan 3 vs dan 7: $P < 0,05$). Ipak, sedam dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa lokalna produkcija TNF- α kod PK miševa je i dalje bila iznad nivoa NK grupe ($P < 0,05$), dok je kod svih rBanLec-tretiranih miševa, nezavisno od terapijske doze, bila u nivou NK grupe (**Slika 4.45B**).

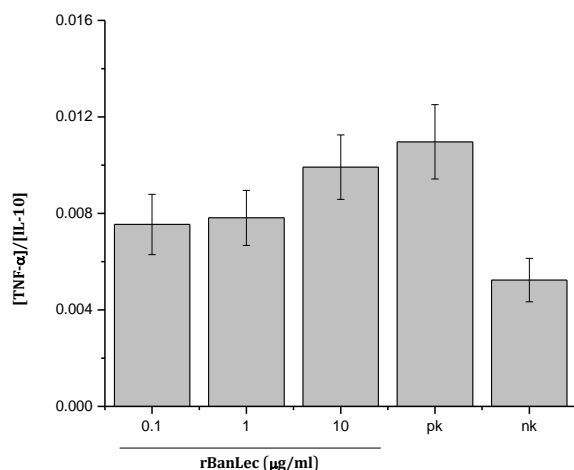
Svakodnevni oralni tretman rBanLec-om u opsegu koncentracija 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$, rezultovao je, u odnosu na PK grupu, smanjenom produkcijom IL-10 u debelom crevu u piku bolesti. Stepenn smanjenja produkcije IL-10 bio je obrnuto srazmeran terapijski primenjenoj dozi rBanLec-a (**Slika 4.46A**; vs. PK, dan 3: $P < 0,05$ za BL10, dan 3, $P < 0,005$ za BL1, dan 3 i BL0,1, dan 3).



Slika 4.46. Koncentracija IL-10 u debelom crevu miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL0,1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL1) ili 10 $\mu\text{g/ml}$ (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) $\mu\text{g/kg}$ TT. Eksperimentalni kolitis je indukovani jednokratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a lokalna koncentracija IL-10 je analizirana (A) u piku bolesti (dan 3) i (B) u fazi oporavka (dan 7). Uzorci ($n = 5$ miševa po grupi po vremenskoj tački) su analizirani u duplikatu. Koncentracija IL-10 je određivana ELISA-om, u supernatantima homogenata tkiva. Rezultati su predstavljeni kao srednja količina IL-10 po 1 mg proteina supernatanta \pm SE. Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK- grupa gde je TNBS-om indukovani eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK- grupa gde nije indukovani eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Ipak, i u rBanLec tretiranim grupama lokalna produkcija IL-10 u piku bolesti bila je značajno veća u odnosu na NK grupu.

Tokom faze oporavka, kod miševa terapijski tretiranih rBanLec-om, kao i kod miševa PK grupe, uočen je pad lokalne koncentracije IL-10. Smanjenje lokalne koncentracije IL-10 bilo je srazmerno u svim grupama te je i 7 dana nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa zadržan isti obrazac dozno-zavisnog uticaja rBanLec-tretmana na lokalnu produkciju IL-10 kao i u piku bolesti (**Slika 4.46B**). Takođe, i kod miševa PK grupe i kod onih terapijski tretiranih rBanLec-om lokalna koncentracija IL-10 izmerena 7 dana nakon indukcije bolesti bila je značajno veća u odnosu na NK grupu (vs. NK, dan 7: $P < 0,05$ za BL10 i $P < 0,005$ za PK; **Slika 4.46B**).



Slika 4.47. Odnos koncentracija TNF- α i IL-10 u debelom crevu miševa kojima je indukovani eksperimentalni kolitis i koji su svakodnevno tokom faza razvoja i rezolucije bolesti oralno tretirani rBanLec-om. Koncentracija rBanLec-a u rastvorima korišćenim za terapiju je bila 0,1 µg/ml (grupa BL0,1), 1 µg/ml (grupa BL1) ili 10 µg/ml (grupa BL10). Rastvori rBanLec-a su aplicirani u zapremini tako da dnevna terapijska doza bude 0,5 (BL0,1 grupe), 5 (BL1 grupe) i 50 (BL10 grupe) µg/kg TT. Eksperimentalni kolitis je indukovano jednomratnom rektalnom aplikacijom etanolnog rastvora TNBS-a (dan 0), a odnos koncentracija TNF- α i IL-10 je analizirano u piku bolesti (dan 3). Statistička značajnost uočenih razlika procenjena je one-way ANOVA testom, praćena Bonferroni testom za višestruko poređenje, gde su PK i NK grupe korišćene kao referentne ($P < 0,05^*$, $P < 0,005^{**}$, $P < 0,0001^{***}$); PK-grupa gde je TNBS-om indukovano eksperimentalni kolitis a koji nisu terapijski tretirani, NK-grupa gde nije indukovano eksperimentalni kolitis (rektalno aplikovan 50% etanolni rastvor) niti su tretirani rBanLec-om.

Poređenje uticaja rBanLec terapijskog tretmana na produkciju IL-10 i TNF- α u debelom crevu u piku bolesti ukazuje na iste dozno-zavisne trendove promena. Međutim, kao što je rečeno i u prethodnim odeljcima, veliki broj studija pokazuje da za razvoj

patologije značajan je odnos koncentracija TNF- α i IL-10. Analiza odnosa koncentracija [TNF- α] / [IL-10] (**Slika 4.47**) pokazala je da je svakodnevni oralni tretman rBanLec-om na dozno-zavisani način modulirao odnos [TNF- α] / [IL-10] u debelom crevu u piku bolesti (3. dan nakon indukcije eksperimentalnog kolitisa). Poređenje odnosa lokalnih koncentracija TNF- α i IL-10 sa intenzitetom patologije (procenjeno na osnovu procentualnog smanjenja TT, **Slika 4.41**) ukazuje da je oralni tretman rBanLec-om u opsegu koncentracija 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ generalno doveo do porasta udela IL-10 odnosno smanjenja udela TNF- α u lokalnom citokinskom miljeu u piku bolesti i na taj način doprineo ublažavanju intenziteta patologije. Porasta udela IL-10, odnosno smanjenje udela TNF- α , u lokalnom citokinskom miljeu u piku bolesti bilo je obrnuto srazmerno primenjenoj terapijskoj dozi rBanLec-a i pozitivno je korelirao sa intenzitetom patologije ($P_{cc}=0,951, P=0,01$).

4.3.3 Profilaktički i terapijski potencijal rBanLec-a na mišjem modelu akutnog zapaljenja debelog creva-diskusija

Rezultati prikazani u ovom delu doktorske teze pokazuju da primena rBanLec-a u tretmanu IBD-a može imati pozitivne efekte. Ispitivanja rađena u eksperimentalnom modelu TNBS-om indukovano kolitisa u BALB/c miša, su pokazala da rBanLec u opsegu doza od 0,5-50 $\mu\text{g/kg}$ telesne težine, primenjen jednokratno profilaktički ili kao terapeutik tokom faza razvoja i rezolucije bolesti, ne može u potpunosti da spreči razvoj eksperimentalnog kolitisa ali može da u određenoj meri, zavisno od protokola primene, ublaži kliničku sliku bolesti i ubrza oporavak.

Analiza rezultata profilaktičke primene rBanLec-a je pokazala da ishod tretmana zavisi i od doze rBanLec-a i od vremena njene aplikacije. Štaviše, obrazac dozno-zavisnosti efekta profilaktičkog tretmana nije bio istovetan kod životinja profilaktički tretiranih rBanLec-om 24h i 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa.

Odluka da se analiziraju efekti profilaktičke primene rBanLec-a 24h i 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa doneta je na osnovu činjenica da:

- 1) ishod stimulacije određene ćelijske populacije bioaktivnim supstancama često nije jednoznačan nego u velikoj meri zavisi od funkcionalnih karakteristika ćelije u trenutku stimulacije (pokazano i u ovoj tezi na primeru rBanLec-om stimulisanih peritonealnih makrofaga)
- 2) rBanLec u fiziološkim uslovima pokreće kaskadu promena imunoloških parametara u debelom crevu i dovodi do toga da se tokom vremena značajno menjaju karakteristike lokalnog miljea.

Na osnovu rezultata prikazanih u delu ove teze koji se odnosi na efekat jednokratne primene rBanLec-a u fiziološkim uslovima pokazano je da postoji generalno značajna razlika u imunološkim karakteristikama lokalnog miljea u debelom crevu 24h i 48h nakon stimulacije rBanLec-om. Sumiranjem rezultata dobijenih u tom delu istraživanja može se zaključiti da tokom prva 24h dominira aktivnost regulatornih mehanizama posredovanih aktivnošću IL-2 i eventualno TGF- β (nije direktno određivan, pretpostavka na osnovu promene u lokalnoj koncentraciji imunoglobulina) dok tokom naredna 24h (analizirano 48h nakon primene rBanLec-a) dolazi do značajnog porasta i produkcije proinflammatoryh citokina. U oba slučaja navedene karakteristike pozitivno su korelirale sa dozom rBanLec-a korišćenom za tretman. Dozna zavisnost je naročito bila izražena u slučaju pokretanja sekrecije proinflammatoryh citokina – kod životinja tretiranih rBanLec-om u koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (0,5 $\mu\text{g/ml}$) značajan porast produkcije IFN- γ i IL-17 je izostao tako da je kod tih miševa i 48h nakon rBanLec aplikacije očuvana dominantna aktivnost regulatornih mehanizama.

Imajući u vidu karakteristike lokalnog miljea u trenutku indukcije eksperimentalnog kolitisa, mehanizam nastanka bolesti i konačno zabeleženu kliničku sliku, nameće se zaključak da je pozitivan ishod profilaktičkog tretmana rBanLec-om bio direktno srazmeran kapacitetu regulatornih mehanizama u trenutku indukcije eksperimentalnog kolitisa. Naime, mukozni imunski sistem, uključujući i GALT, predstavlja kompleksnu mrežu ćelija urođene i adaptivne imunosti koje međusobno komuniciraju direktnim kontaktom ili putem solubilnih medijatora (citokini, faktori rasta, antitela i mali molekuli poput NO) i koje zajedno učestvuju u održavanju lokalne

homeostaze (Tomasello & Bedoui, 2013; Mowat & Agace, 2014). Balans aktivnosti proinflamatornih i anti-inflamatornih citokina u crevnoj mukozii je esencijalan za održavanje homeostaze. Poremećaj te ravnoteže, usled prekomerne sekrecije proinflamatornih citokina, dovodi do razvoja zapaljenskih reakcija u crevima (Neurath, 2014).

U grupama gde je profilaktički rBanLec tretman imao pozitivan ishod tj. ublažio intenzitet bolesti i / ili ubrzao oporavak (24BL10, 24BL1, 24BL0,1 i 48BL0,1), u odnosu na PK grupu, u piku bolesti bila je smanjena ekspresija transkripcionih faktora odgovornih za sintezu proinflamatornih citokina (T-bet i ROR γ t) i sekrecija proinflamatornih citokina (IL-12 i TNF- α). Niža lokalna koncentracija medijatora zapaljenske reakcije predstavljala je slabiji signal za infiltraciju ćelija iz cirkulacije te je kod ovih životinjama na histološkim presecima uočen manji broj i veličina ćelijskih infiltrata i niža lokalna aktivnost MPO (mera infiltracije neutrofila i monocita) i iNOS (IFN- γ stimuliše aktivnost iNOS).

Za sve prethodno navedene faktore je pokazano da na specifičan način pospešuju razvoj patologije u slučaju IBD-a. Prekomerna lokalna produkcija NO dovodi do masivnog oštećenja epitelne barijere usled nagomilavanja peroksinitrita (Koliso *et al.*, 1998), izrazito reaktivnog jedinjenja koje nastaje reakcijom NO-a sa superoksid anjonom (Kiss *et al.*, 1997, Koliso *et al.*, 2004).

Smatra se da je razvoj patologije u eksperimentalnom modelu TNBS-om indukovano g kolitisa, koji je vrlo sličan Kronovoj bolesti kod čoveka, prvenstveno posledica prekomernog Th1 / Th17 imunskog odgovora (Stober *et al.*, 1998; Neurath *et al.*, 2000). U prilog ovom stavu ide činjenica da terapijska primena antitela specifičnih za IL-12 kod pacijenata sa CD dovodi do značajnog smanjenja lokalne zapaljenske reakcije i poboljšanja kliničke slike (Neurath *et al.*, 1995; Niederreiter *et al.*, 2013). IL-12, čiji glavni izvor u crevnoj mukozii predstavljaju aktivirani makrofagi i DĆ, svoje proinflamatorno dejstvo ispoljava tako što, vezujući se za IL-12R, podstiče diferencijaciju Th1 ćelija (pojačava ekspresiju T-bet, transkripcionog faktora potrebnog za sintezu IFN- γ , Th1 marker citokina) (Liu *et al.*, 2001) i produkciju TNF- α od strane ćelija urođenog imunskog

sistema (npr. makrofagi diferencirani od infiltriranih monocita) (Pallone & Monteleone, 1998; Santaolalla & Abreu, 2012; Mowat, 2014). IFN- γ doprinosi proinflamatornom kapacitetu makrofaga podstičući aktivnost iNOS tj. produkciju NO i zajedno sa IL-12, inicira i sekreciju TNF- α u aktiviranim T limfocitima (Soufli *et al.*, 2016). Pored direktnog citotoksičnog dejstva, TNF- α omogućava amplifikaciju zapaljenske reakcije tako što 1) doprinosi održanju ekspresije adhezivnih molekula u tkivu koji omogućavaju kontinuiranu infiltraciju ćelija imunskog sistema na mesto zapaljenja i 2) stimuliše sekreciju citokina poput IL-1 i IL-6 koji sami imaju proinflamatorno dejstvo, anuliraju anti-inflamatorno dejstvo TGF β , i zajedno sa njim stimulišu diferencijaciju Th17 ćelija (ROR γ t⁺ ćelije) (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). Generalno, TNF- α se smatra centralnim citokinom koji održava inflamatorni proces u crevima kod pacijenata sa CD, a anti-TNF- α antitela su se danas pokazala veoma efikasnim sredstvom u terapiji ove bolesti (Yapali & Hamzaoglu, 2007).

Zapaljenska reakcija, koja podrazumeva i mehanizme navedene u prethodnom pasusu, predstavlja fiziološki odgovor organizma na različite infektivne agense i druge promene koje mogu da naruše homeostazu. Pored toga, NO, čija povećana produkcija se smatra jednim od markera inflamacije, nije sam po sebi citotoksičan za intestinalno tkivo i, kao solubilni medijator, bitan je za održavanje homeostaze u GIT-u jer u fiziološkim uslovima pozitivno utiče na integritet epitelne barijere (Walace & Miller, 2000). Međutim, u slučaju odsustva ili nedovoljnog kapaciteta regulatornih mehanizama da kontrolišu zapaljensku reakciju dolazi do pojave patologije. Imajući to u vidu, ne iznenađuje i stav da je razvoj IBD-a posledica prekomerne zapaljenske reakcije i / ili nedovoljnog kapaciteta regulatornih mehanizama da kontrolišu zapaljensku reakciju (Maloy & Powrie, 2011). Kao glavni regulatorni citokini u GALT-u navode se IL-10 i TGF- β , ali i regulatorna uloga IL-2 se ne može zanemariti. IL-2 često biva izostavljen sa spiska regulatornih citokina s obzirom da je on dugi niz godina posmatran kao citokin odgovoran za stimulaciju proliferacije i efektorskih funkcija limfocita. Danas je poznato da IL-2 predstavlja faktor rasta Treg i da je potreban za održavanje njihovog punog supresornog potencijala (Dooms & Abbas, 2010). U prilog stavu da je IL-2 kao regulatorni citokin bitan

za sprečavanje IBD idu i rezultati istraživanja koja su pokazala da se kod IL-2KO miševa, kao odgovor na stimulaciju intestinalnom mikroflorom, spontano razvijaju patologije slične IBD-u usled defekta u regulatornim mehanizmima (Poussier *et al.*, 2000). Da IL-10 predstavlja važan regulatorni citokin u GALT-u ukazuje činjenica da animalni modeli gde dolazi do spontanog razvoja IBD uključuju i IL-10 KO životinje. IL-10 produkuje različite vrste ćelija imunskog sistema, a on svoju regulatornu ulogu ispoljava prvenstveno kroz inhibiciju sinteze IL-12 i lokalne sekrecije TNF- α (Mittal *et al.*, 2015). Takođe, zajedno sa TGF- β , IL-10 učestvuje u diferencijaciji Treg i tako posredno suprimira Th1 imunski odgovor (Levings *et al.*, 2002). TGF- β je citokin sa širokim spektrom dejstva koji, pored toga što pozitivno deluje na funkcionalne karakteristike Treg, ima važnu ulogu u procesu reparacije tkiva gastrointestinalnog trakta (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). Međutim, u zavisnosti od mikrokruženja i tipa ćelija koji ga proizvodi, TGF- β može imati proinflamatornu ili anti-inflamatornu ulogu. Tako u prisustvu proinflamatornih citokina kao što su IL-6 i IL-23, TGF- β podstiče diferencijaciju Th17 ćelija (Kingston & Mills, 2008).

Rezultati prikazani u ovoj tezi pokazuju da i u grupama gde je profilaktički rBanLec tretman imao pozitivan ishod tj. ublažio intenzitet bolesti i / ili ubrzao oporavak (24BL10, 24BL1, 24BL0,1 i 48BL0,1) u piku bolesti dolazi do smanjenja lokalne produkcije IL-10 i TGF- β u odnosu na PK grupu. Ovaj, na prvi pogled kontradiktoran rezultat, ide u prilog stavu da su za razvoj patologije manje bitne apsolutne lokalne koncentracije proinflamatornih i regulatornih citokina nego da je važaniji njihov odnos koji predstavlja rezultatnu aktivnosti proinflamatornih i anti-inflamatornih mehanizama. I naši rezultati i rezultati drugih istraživača pokazuju da tokom razvoja IBD-a, pored rasta proinflamatornih citokina, dolazi i do porasta produkcije regulatornih citokina, naročito IL-10, kao pokušaja sistema da kontroliše zapaljensku reakciju. Međutim, razvoj patologije je pokazatelj da je kapacitet uspostavljenih regulatornih mehanizama nedovoljan da kontroliše zapaljenski proces. U prilog stavu da je odnos lokalnih koncentracija proinflamatornih i anti-inflamatornih citokina determinišući faktor za intenzitet patologije idu i naši rezultati koji pokazuju da je stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolesti pozitivno korelirao sa povećanjem udela IL-10 odnosno smanjenjem

udela TNF- α u lokalnom miljeu. Takođe, TGF- β u inflamatornom miljeu koji je karakterističan za pik bolesti može dodatno favorizovati zapaljensku reakciju stimulišući diferencijaciju Th17 ćelija (Brand, 2009; Neurath *et al.*, 2014). U skladu sa ovom pretpostavkom je i činjenica da u piku bolesti lokalna ekspresija ROR γ t, transkripcionog faktora potrebnog za sintezu IL-17 (marker citokin Th17 ćelija), pozitivno korelirala sa lokalnom koncentracijom TGF- β .

Takođe, u ovom delu teze je pokazano, u mišjem modelu TNBS-indukovanog kolitisa u BALB/c miša, da rBanLec, u niskim dozama, ima i terapijski potencijal. Analiza imunoloških parametara u piku bolesti je pokazala, kao i u slučaju profilaktičke primene, da se pozitivan terapijski efekat rBanLec-a zasniva na pospešivanju uspostavljanja regulatornih mehanizama tako da oni svojom aktivnošću mogu da kontrolišu zapaljensku reakciju. Terapijska primena rBanLec-a je, kao i u slučaju profilaktičke primene, u odnosu na PK grupu, paralelno sa smanjenjem sekrecije proinflamatornih citokina (IL-12 i TNF- α) i lokalne aktivnost MPO i iNOS, rezultovala i padom lokalne koncentracije IL-10 u piku bolesti. Međutim, smanjenje aktivnosti proinflamatornih i anti-inflamatornih mehanizama usled terapije rBanLec-om nije bilo srazmerno nego je rezultovalo i promenom njihovih lokalnih koncentracija. I u slučaju terapijske primene rBanLec-a, stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolesti je pozitivno korelirao sa dozno-zavisnim povećanjem udela IL-10 (anti-inflamatorno dejstvo) odnosno smanjenjem udela TNF- α (proinflamatorno dejstvo) u lokalnom miljeu u piku bolesti. Činjenica da je najbolji terapijski efekat postignut primenom rBanLec-a u najnižoj dozi (0,5 μ g/ kg TT) mogla bi biti objašnjena rezultatima ispitivanja imunomodulatornog dejstva rBanLec-a u debelom crevu u fiziološkim uslovima. U navedenim istraživanjima je pokazano da rBanLec u dozi od 0,5 μ g/kg TT (0,1 μ g/ml) nema kapacitet da pokrene produkciju proinflamatornih citokina, ali pozitivno utiče na produkciju regulatornih citokina. Takođe, u istraživanjima uticaja rBanLec stimulacije na funkcionalne karakteristike APĆ je pokazano da rBanLec stimulacija na pozitivan dozno-zavisnan način stimuliše proinflamatorni kapacitet RM. Drugim rečima, što je niža stimulatorna rBanLec doza to je proinflamatorni kapacitet

lokalno prisutnih makrofaga, koji nisu imali prethodno „inflamatorno iskustvo“, manji, što je od posebnog značaja u fazi inicijacije bolesti.

Rezultati dobijeni u modelu TNBS-om indukovano kolitisa u BALB/c miševa pokazuju da, pored profilaktičkog, rBanLec ima i terapijski potencijal ali da je pravilno doziranje esencijalno za pozitivan ishod. Pri određivanju doze rBanLec-a za oralnu primenu treba imati na umu da je količina rBanLec-a koja dospe u debelo crevo i tu ispoljava direktno imunomodulatorno dejstvo manja od oralno unete, zbog adsorpcije u tankom crevu, ali i da, pri svakodnevnom kontinuiranom unosu rBanLec-a, izvesno dolazi do kumulativnog efekta s obzirom da se rBanLec u tkivu debelog creva zadržava 2-3 dana. Takođe, imajući u vidu da ishod specifične rBanLec stimulacije nije jednoznačan nego zavisi od neposrednog „imunološkog iskustva“ ciljnih ćelija, mogao bi se očekivati drugačiji dozno-zavisani uticaj na intenzitet i tok bolesti ukoliko bi se sa terapijskom primenom otpočelo nakon njene same inicijacije. Pored toga, eventualnim razlikama u dozno zavisnom uticaju rBanLec-a mogu doprineti i značajne promene u glikozilaciji membranskih i solubilnih proteina koje su karakteristične za inflamatorne bolesti creva (Theodoratou *et al.*, 2014).

Iskustvo akumulirano tokom višedecenijskog korišćenja banana u redovnoj ishrani čoveka je pokazalo blagotvorno dejstvo konzumiranja banana u različitim patološkim stanjima sistema za varenje. Nedigestibilni oligosaharidi i supstance sa antimikrobnim dejstvom su najčešće navođeni kao bioaktivne supstance odgovorne za te blagotvorne efekte. Prebiotsko dejstvo nedigestibilnih oligosaharida se navodi kao glavni mehanizam njihovog pozitivnog uticaja, ali neki od njih, poput plantaina (Roberts *et al.*, 2013), mogu interferirati sa uspostavljanjem lektin – oligosaharid interakcija koji predstavljaju jedan od glavnih mehanizama adhezije bakterija na crevni epitel (Richman & Rhodes, 2013). Prikazani rezultati pokazuju da je BanLec, zbog svog imunomodulatornog dejstva, još jedna bioaktivna supstanca koja doprinosi blagotvornom dejstvu banane. Imajući u vidu ulogu lokalne mikroflore u funkcionisanju sistema za varenje, bilo bi značajno da se u budućim istraživanjima ispita da li i na koji način (r)BanLec uspostavlja interakcije sa lokalno mikroflorom i u kojoj meri to doprinosi pozitivnim efektima njegove primene.

5. ZAKLJUČCI

I Na osnovu rezultata ispitivanja modulatornog dejstva rBanLec-a na funkcionalne karakteristike antigen-prezentujućih ćelija, koristeći peritonealne makrofage i dendritske ćelije slezine BALB/c miša kao *in vitro* model sisteme, može se zaključiti da rBanLec na specifičan, dozno-zavisan način moduliše funkcionalne karakteristike antigen-prezentujućih ćelija. Takođe, rezultati istraživanja na peritonealnim makrofagima dovode do zaključka da ishod stimulacije određene ćelijske populacije rBanLec-om nije jednoznačan već zavisi od funkcionalnog stanja ćelija u trenutku stimulacije. Tako, rBanLec na pozitivan dozno-zavisan način pospešuje proinflamatorni kapacitet rezidentnih makrofaga, a na isti način umanjuje proinflamatorni kapacitet tioglikolatom-indukovanih makrofaga BALB/c miša. rBanLec stimuliše antigen-prezentujuće ćelije, vezujući se za oligosaharidne komponente njihovih membranskih proteina pri čemu stimulacija preko pojedinačnih receptora specifično doprinosi pokretanju određenih intracelularnih mehanizama u definisanim ćelijskim populacijama. Tako je vezivanje rBanLec-a za TLR2 i TLR4 / CD14 značajno za pokretanje produkcije proinflamatornih medijatora, ali ne i IL-10, u peritonealnim makrofagima. Sa druge strane, kod dendritskih ćelija slezine, TLR2-posredovana stimulacija nije ključna za promene u ekspresiji *Ifn-γ* i *Il-4*. Navedeni opšti zaključak proizilazi iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata ovog dela istraživanja:

1. Vezivanjem za oligosaharidne strukture rBanLec uspostavlja interakcije sa velikim brojem membranskih proteina makrofaga među kojima su TLR2 i CD14.
2. U koncentracijama od 1 do 10 µg/ml rBanLec ne deluje citotoksično na peritonealne makrofage. U navedenom opsegu koncentracija rBanLec stimuliše proliferaciju makrofaga, ali intenzitet proliferacije zavisi od njihovog funkcionalnog stanja.

3. Stimulacija rBanLec-om u koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ indukuje porast aktivnosti iNOS i arginaze kod peritonealnih makrofaga ali dozna zavisnost ovih porasta zavisi od funkcionalnog stanja makrofaga. Kod makrofaga u stanju funkcionalnog mirovanja (rezidentni makrofagi), rBanLec dozno-zavisno stimuliše produkciju NO, a negativno dozno-zavisno utiče na aktivnost arginaze; na ovaj način rBanLec kod RM pozitivno dozno-zavisno smanjuje dominanciju aktivnosti arginazne nad iNOS-om. Kod makrofaga koji su već iskusili proinflamatorno okruženje (tioglikolatom-indukovani makrofagi), dominantna aktivnost iNOS je redukovana na pozitivan dozno-zavisan način nakon stimulacije rBanLec-om, na račun porasta aktivnost arginaze.
4. *In vitro* stimulacija rBanLec-om u koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$, nezavisno od funkcionalnog stanja makrofaga, pozitivno dozno-zavisno utiče na aktivnost MPO i tako pojačava antimikrobni i tumoricidni potencijal peritonealnih makrofaga.
5. *In vitro* stimulacija rBanLec-om u koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$, nezavisno od funkcionalnog stanja makrofaga, pozitivno dozno-zavisno umanjuje sposobnost peritonealnih makrofaga da generišu O_2^- što ukazuje na pokretanje mehanizama koji sprečavaju prekomernu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.
6. U koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec moduliše sekreciju efektorskih citokina IL-4 i IL-12 od strane peritonealnih makrofaga. rBanLec na pozitivan dozno-zavisan način povećava proinflamatorni kapacitet RM stimulacijom sekrecije IL-12 i inhibicijom produkcije IL-4, i umanjuje proinflamatorni potencijal TGM stimulacijom produkcije IL-4 i inhibicijom produkcije IL-12.
7. U koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec na pozitivan dozno-zavisan način stimuliše produkciju TNF- α od strane peritonealnih makrofaga, nezavisno od njihovog funkcionalnog stanja.
8. U koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec dozno-zavisno stimuliše produkciju IL-10 od strane peritonealnih makrofaga, nezavisno od njihovog funkcionalnog stanja.

9. Stimulacija rBanLec-om u koncentracijama od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ indukuje porast produkcije TGF- β od strane peritonealnih makrofaga i zavisi od funkcionalnog stanja makrofaga. rBanLec negativano dozno-zavisano utiče na produkciju TGF- β kod RM, a na pozitivan dozno-zavisnan način stimuliše njegovu produkciju kod TGM.
10. Inhibicija vezivanja rBanLec-a za TLR2 i TLR4/CD14 negativno utiče na produkciju TNF- α i aktivnost iNOS u peritonealnim makrofazima, nezavisno od njihovog funkcionalnog stanja.
11. Inhibicija vezivanja rBanLec-a za TLR2 i TLR4/CD14 ne utiče značajno na pokretanje produkcije IL-10 od strane peritonealnih makrofaga stimulisanih rBanLec-om.
12. U koncentracijama od 0,1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec dozno-zavisno moduliše sekreciju IFN- γ , IL-4 i IL-10 od strane dendritskih ćelija slezine, ali je dinamika promena u ekspresiji gena i produkciji navedenih citokina bila različita. Nakon stimulacije rBanLec-om najpre dolazi do dozno-zavisnog porasta sekrecije IL-10 koji je praćen negativno dozno-zavisnim promenama u produkciji IL-4 i IFN- γ .
13. TLR2-posredovana aktivacija DĆ nije ključna za promene u ekspresiji *Ifn- γ* i *Il-4*.

II Na osnovu rezultata ispitivanja imunomodulatornog uticaja jednokratno primenjenog rBanLec-a u debelom crevu BALB/c miša u fiziološkim uslovima može se zaključiti da se rBanLec vezuje za lumensku površinu debelog creva miševa, postepeno prolazi u subepitelni odeljak i na specifičan, dozno-zavisnan način, moduliše lokalne karakteristike imunskog sistema. Pored toga što stimuliše aktivnost lokalnih mehanizama urođene imunosti koji deluju antimikrobno (MPO i iNOS aktivnost), rBanLec utiče i na lokalnu produkciju citokina. Primenjen u niskoj koncentraciji (0,1 $\mu\text{g/ml}$), rBanLec stimuliše produkciju citokina koji imaju regulatornu ulogu ali ne dovodi do značajnih promena u produkciji proinflamatornih citokina. Jednokratno aplikovan rBanLec-a u višim koncentracijama ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$) stimuliše lokalno uspostavljanje proinflamatornog imunskog odgovora, dominantno Th1 / Th17 tipa čija je aktivnost kontrolisana

sekrecijom IL-10. Navedeni opšti zaključak proizilazi iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata pojedinačnih analiza:

1. U koncentracijama od 0,1 do 10 µg/ml rBanLec ne deluje citotoksično na tkivo debelog creva.
2. Tokom prva 24h od rektalne aplikacije rBanLec prvenstveno uspostavlja interakcije sa ćelijama epitela debelog creva, 48h nakon aplikacije rBanLec je lociran u subepitelnom sloju debelog creva, a 72h nakon aplikacije rBanLec biva potpuno resorbovan.
3. Jednokratno rektalno primenjen rBanLec u koncentracijama od 0,1 do 10 µg/ml u debelom crevu stimuliše mehanizme urođene imunosti koji deluju antimikrobno (MPO i iNOS aktivnost).
4. Jednokratno primenjen rBanLec u koncentracijama od 0,1 do 10 µg/ml već tokom prvih 24h dovodi do značajnog porasta koncentracije IL-2 u debelom crevu i ovaj porast pozitivno korelira sa aplikovanom dozom rBanLec-a. Jednokratna stimulacija rBanLec-om u koncentraciji 0,1 µg/ml nije dovoljna da se očuva značajno viša lokalna koncentracija IL-2 i tokom drugog dana nakon tretmana.
5. Do značajnog porasta koncentracije IFN-γ, IL-12 i IL-17 u debelom crevu dolazi tek drugog dana nakon jednokratne primene rBanLec-a u koncentracijama 1 i 10 µg/ml i ovaj porast je prolaznog karaktera. Stimulacija 0,1 µg/ml rBanLec-a ne dovodi do značajne stimulacije lokalne produkcije IFN-γ, IL-12 i IL-17. Takođe, dinamika promena u ekspresiji IFN-γ, IL-12 i IL-17 nakon aplikacije rBanLec-a pokazuje da su glavni izvor ovih citokina, ćelije locirane u subepitelnom odeljku debelog creva.
6. Stimulacije rBanLec-om u koncentracijama od 0,1 do 10 µg/ml dovodi do postepenog smanjenja koncentracije IL-4 u debelom crevu i ovo smanjenje pozitivno korelira sa primenjenom dozom rBanLec-a.
7. Do značajnog porasta koncentracije IL-10 u debelom crevu dolazi tek drugog dana nakon jednokratne primene rBanLec-a u koncentracijama 0,1-10 µg/ml. Ovaj

porast je prolaznog karaktera i njegov intenzitet, u navedenom opsegu koncentracija rBanLec-a, nije dozno-zavisan.

8. rBanLec u koncentracijama od 0,1 do 10 µg/ml moduliše produkciju IgA i IgG u debelom crevu. Porast lokalne produkcije IgA i IgG je rezultat poliklonske stimulacije *in situ* prisutnih B ćelija s obzirom da do njega dolazi već tokom prvih 24h nakon aplikacije rBanLec-a.

III Na osnovu rezultata ispitivanja profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a na modelu TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša može se zaključiti da u dozama od 0,5 do 50 µg/kg TT rBanLec može imati profilaktički i pozitivan terapijski efekat u tretmanu inflamatornih bolesti creva. Jednokratno lokalno primenjen rBanLec u navedenim dozama ne može sprečiti razvoj TNBS-om indukovano kolitisa kod BALB/c miša, ali određeni režimi (specifična doza i vreme primene) njegove primene rezultuju poboljšanjem opšte kliničke slike tj. blažom kliničkom slikom u piku bolesti i bržim oporavkom u odnosu na miševe kojima je eksperimentalni kolitis indukovano bez pretretmana rBanLec-om. Terapijska primena rBanLec-a koja je podrazumevala svakodnevnu oralnu primenu rBanLec-a u navedenim dozama počevši od dana indukcije eksperimentalnog kolitisa, takođe, na dozno-zavisan način, doprinosi poboljšanju opšte kliničke slike. U oba slučaja, kod profilaktičke i terapijske primene rBanLec-a, opšte poboljšanje kliničke slike rezultat je ne samo smanjenja intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa, nego i promene odnosa aktivnosti proinflamatornih i regulatornih mehanizama. Stepenu poboljšanja kliničke slike u piku bolesti usled specifičnog rBanLec tretmana pozitivno korelira sa smanjenjem odnosa [TNFα] / [IL-10] u debelom crevu. Navedeni opšti zaključak proizilazi iz sledećih zaključaka donetih na osnovu rezultata pojedinačnih analiza:

1. Ukoliko se profilaktička jednokratna aplikacija rBanLec-a u dozama 0,5–50 µg/kg TT sprovodi 24h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa u svim slučajevima dolazi do poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i bržeg oporavka, s tim što se bolji rezultati postižu primenom većih doza rBanLec-a (eksperimentalne grupe

24BL0,1, 24BL1, 24BL10). U slučaju profilaktičkog tretmana 48h pre indukcije eksperimentalnog kolitisa samo primena rBanLec-a u niskoj dozi (0,5 µg/kg TT) dovodi do poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i bržeg oporavka (eksperimentalna grupa 48BL0,1).

2. Poboljšanje kliničke slike u piku bolesti usled profilaktičkog tretmana rBanLec-om u dozama 0,5–50 µg/kg obuhvata manji gubitak u telesnoj težini, manje skraćivanje dužine debelog creva, manji otok submukoznog sloja i manji stepen infiltracije ćelija u tkivo debelog creva u odnosu na eksperimentalni kolitis indukovao bez pretretmana rBanLec-om.
3. Stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolesti usled profilaktičkog tretmana rBanLec-om srazmeran je smanjenju intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa u odnosu na eksperimentalni kolitis indukovao bez pretretmana rBanLec-om. Smanjenje intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa se ogleda u smanjenju: aktivnosti MPO i iNOS, ekspresije transkripcionih faktora T-bet i ROR γ t kao i koncentracije IL-12 i TNF- α .
4. Kod miševa kod kojih je došlo do poboljšanja kliničke slike i bržeg oporavka usled profilaktičkog tretmana rBanLec-om, kao i kod miševa kod kojih je eksperimentalni kolitis indukovao bez pretretmana rBanLec-om, u piku bolesti dominira Th1 / Th17 tip imunskog odgovora ali je njegov intenzitet manji.
5. Kod miševa kod kojih je došlo do poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i bržeg oporavka usled profilaktičkog tretmana rBanLec-om lokalna koncentracija IL-10 je bila niža ali je njegov udeo u citokinskom miljeu bio viši u odnosu na eksperimentalni kolitis indukovao bez pretretmana rBanLec-om. Pozitivan uticaj profilaktičkog tretmana rBanLec-om obuhvata modulisanje odnosa lokalnih koncentracija proinflamatornog citokina TNF- α i regulatornog citokina IL-10. Stepen poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i brzina oporavka su obrnuto srazmerni [TNF- α]/[IL-10] odnosu.
6. Tokom faze oporavka, i kod miševa koji su profilaktički tretirani rBanLec-om i kod miševa kod kojih je eksperimentalni kolitis indukovao bez profilaktičkog tretmana,

aktivnost lokalnih efektorsko-regulatornih mehanizama opada težeći da se vrate u ravnotežno stanje. Intenzitet efektorsko-regulatornih mehanizama tokom oporavka je obrnuto srazmeran brzini oporavka.

7. Svakodnevni oralni tretman rBanLec-om u dozama od 0,5 do 5 µg/kg TT tokom faza razvoja i rezolucije TNBS-om indukovanog kolitisa doveo je do dozno-zavisnog poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i ubrzanja oporavka (eksperimentalne grupe BL0,1 i BL1). Pozitivan uticaj oralne terapije rBanLec-om je bio obrnuto srazmeran terapijskoj dozi. Svakodnevni terapijski tretman rBanLec-om u dozi 50 µg/kg TT nije doveo do poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i ubrzanja oporavka (eksperimentalna grupa BL10).
8. Poboljšanje kliničke slike u piku bolesti usled terapijskog tretmana rBanLec-om u dozama od 0,5 do 5 µg/kg obuhvata manji gubitak u telesnoj težini, blaže smanjenje dužine debelog creva, manji otok submukoznog sloja i manji stepen infiltraciju ćelija u tkivo debelog creva u odnosu na eksperimentalni kolitis koji nije terapijski tretiran rBanLec-om.
9. Stepem poboljšanja kliničke slike u piku bolesti usled terapijskog tretmana rBanLec-om srazmeran je smanjenju intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa u odnosu na eksperimentalni kolitis koji nije terapijski tretiran rBanLec-om. Smanjenje intenziteta lokalnog zapaljenskog procesa se ogleda u smanjenju aktivnosti MPO i iNOS i koncentracija IL-12 i TNF-α.
10. Kod miševa kod kojih je došlo do poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i bržeg oporavka usled terapijskog tretmana rBanLec-om lokalna koncentracija IL-10 je bila niža ali je njegov udeo u citokinskom miljeu bio viši u odnosu na eksperimentalni kolitis koji nije terapijski tretiran rBanLec-om. Pozitivan uticaj terapijskog tretmana rBanLec-om obuhvata modulisanje odnosa lokalnih koncentracija proinflamatornog citokina TNF-α i regulatornog citokina IL-10. Stepem poboljšanja kliničke slike u piku bolesti i brzina oporavka su obrnuto srazmerni [TNF-α] / [IL-10] odnosu.

11. Tokom faze oporavka, i kod miševa koji su terapijski tretirani rBanLec-om i kod miševa bez terapijskog tretmana, aktivnost lokalnih efektorsko-regulatornih mehanizama opada težeći da se vrate u ravnotežno stanje. Intenzitet efektorsko-regulatornih mehanizama tokom oporavka je obrnuto srazmeran brzini oporavka.

6. LITERATURA

Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *J Immunol* 2005; 174(8): 4453-4460.

Ajouba A, Causse H, Van Damme EJM, Peumans WJ, Cambillau C, Rouge P. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem System Ecol* 1994; 22: 153-159.

Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet* 2007; 369(9573):1627-40.

Banwell JG, Howard R, Cooper D, Costerton JW. Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin lectins (*Phaseolus vulgaris*) to rats. *J Appl Environ Microbiol* 1985, 50:68-80.

Becker C, Dornhoff H, Neufert C. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 2006; 77: 2760-2764.

Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Pulverer G. Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo* 1991; 5(1): 29-32.

Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor b 2 signaling. *J Virol* 2002; 76: 8729-3876.

- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1):64-76.
- Boismenu, R, Chen Y. Insights from mouse models of colitis. *J leukoc biol* 2006; 67(3): 267-278.
- Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 1995;155(4): 2077-84.
- Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12; 180-190.
- Bradford 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(1): 248-254.
- Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58(8): 1152-1167.
- Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 21-29.
- Bryan NS, Grisham MB. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(5): 645-657.
- Cassado AA, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, de Lima Buzzo C, Faustino L, Nascimento R. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoSOne* 2011; 6(7): e22141.

- Cassado AA, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* 2015; 6: 225.
- Charungchitrak C, Petsom A, Sangvanich P, Karnchanatat A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chem* 2011; 126: 1025-1032.
- Chensue SW, Warmington KS, Ruth J, Lincoln PM, Kunkel SL. Cross-regulatory role of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and IL-10 in schistosome egg granuloma formation: in vivo regulation of Th activity and inflammation. *Clin Exp Immunol* 1994; 98(3):395-400.
- Cheung AHK, Wong JH, Ng TB. *Musa acuminata* (Del Montebanana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine* 2009; 16:594–600.
- Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem* 2006; 27(1): 31-44.
- Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168(1): 171-178.
- Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, Vendruscolo PE, Goldman MH, Panunto-Castelo A, Roque Barreira MC. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol* 2010; 48(6): 792-799.
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+

- regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204: 1757–1764
- Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(6):435-446.
- Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001; 166(7): 4312-4318.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; 174: 231.
- Daniel JC, Cristina MT. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10, 479–489.
- da Silva CJ, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 586 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem.* 2002; 277:1845-1854.
- da Silva LCN, Correia MTS. Plant lectins and Toll-like receptors: Implication for therapy of microbial infections. *Front Microbiol* 2014; 5:20.
- de Araujo TH, Okada SS, Ghosn EEB, Taniwaki NN, Rodrigues MR, de Almeida SR, Mortara RA, Russo M, Campa A, Albuquerque RC. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. *Cell Immunol* 2013; 281:27–30.
- de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26(3): 289-307.
- del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Förster R. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol Rev* 2010; 234: 268–281.

- Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* 2015; 144(4): 541-548.
- Dimitrijević R, Jadranin M, Burazer L, Ostojić S, Gavrović-Jankulović M. Evaluation of the thermal stability and digestibility of heterologously produced banana lectin. *Food Chem* 2010; 120:1113–1118.
- Dimitrijević R, Stojanović M, Mičić M, Dimitrijević Lj, Gavrović-Jankulović M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. *J Funct Foods* 2012; 4:636-641.
- Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun* 2005; 73: 166–173.
- Dooms H, Abbas A. Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1538-1540.
- Droeser RA, Hirt C, Eppenberger-Castor S, Zlobec I, Viehl CT, Frey DM, Nebiker CA, Rosso R, Zuber M, Amicarella F. High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e64814.
- Ebert EC. Intra-epithelial lymphocytes: interferon-gamma production and suppressor/cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 1990; 82:81-85.
- Els JM, Van Damme EJM, Peumans W, Pusztai A, Bardocz S. Handbook of Plant lectins: Properties and Biomedical Application. 1998; 466.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005; 206:260-276.

- Farache J, Zigmond E, Shakhar G, Jung S. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol Cell Biol* 2013;91(3):232-239.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6 (11): 1142-1151.
- Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001; 22(4-5): 189-216.
- Fraga-Silva TF, Venturini J, de Arruda MS. Trafficking of phagocytic peritoneal cells in hypoinsulinemic-hyperglycemic mice with systemic candidiasis. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 147.
- Francisco LL, Sanchez C, Camarero GR. Cytokine Production by Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Subsets in Celiac Disease. *Dig dis sci* 2005; 50(3): 593-600.
- Gaffen SL, Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 2004; 28 (3): 109–23.
- Gasteiger G, & Rudensky AY. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 631–639.
- Gavrović-Jankulović M, Poulsen K, Brckalo T, Bobić S, Linder 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.
- Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutic. *Acta Histochem* 2011; 113(3): 236-47.

- Ghosn EEB, Cassadoc AA, Govonid GR, Fukuharaa T, Yanga Y, Monackd DM, Bortolucic KR, Almeidab SR, Herzenberga LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107:2568-2573.
- Gibson PR, Anderson RP, Mariadason JM, Wilson AJ. Protective role of the epithelium of the small intestine and colon. *Inf Bow Dis* 1996; 279-302.
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin? *Nature* 1980; 285:66.
- Goldstein IJ, Winter HC, Mo H, Misaki A, Van Damme EJM, Peuman WJ. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and β -glucans containing β 1,6-glucosyl end groups. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2616-2619.
- Gong D, Shi W, Yi S, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol* 2012; 13: 31.
- Gordon S & Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-964.
- Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacol* 2014; 22(4): 219-233.
- Guangwei L, Yanh H. Modulation of Macrophage Activation and Programming in Immunity. *J Cel Physiol* 2013; 228: 502-512.
- Gupta G, Sinha S, Surolia A. Unfolding energetics and stability of banana lectin. *Proteins* 2008; 72(2): 754-760.
- Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, et al. Alternative macrophage activation is essential

for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 2004; 20:623–635.

Hey YY, O'Neill HC. Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *J Cell Mol Med* 2012; 16(11): 2611-2619.

Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, Van Es LA, Daha MR. The IgA-binding lectin jacalin induces complement activation by inhibition of C-1-inactivator function. *Scand J Immunol* 1997; 26(2): 111-117.

Hoover DL, Nacy CA. Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: Defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. *J Immunol* 1984;132:1487–1491.

Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* 2008; 181: 5829 - 5835.

Ighodaro OM. Evaluation study on Nigerian species of Musa paradisiac peels: Phytochemical screening, proximate analysis, mineral composition and antimicrobial activities. *Researcher* 2012; 4:17–20.

Inatsuka C, Yang Y, Gad E, Rastetter L, Disis ML, Lu H. Gamma delta T cells are activated by polysaccharide K (PSK) and contribute to the anti-tumor effect of PSK. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(8): 1335-1345.

Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs functional differentiation. *Front Immunol* (2014) 5:514 (1-22).

Jakobi V, Petry F. Humoral immune response in IL-12 and IFN-gamma deficient mice after infection with *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol* 2008; 30:151–61.

- Jones SE, Paynich ML, Kearns DB, Knight KL. Protection from Intestinal Inflammation by Bacterial Exopolysaccharides. *J Immunol* 2014; 192:4813-4820.
- Kalupahana RS, Mastroeni P, Maskell D, Blacklaws BA. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology* 2005; 115(4): 462-472.
- Kang TB, Yoo YC, Lee KH, Yoon HS, Her E, Kim JB, Song SK. Korean mistletoe lectin (KML-IIU) and its subchains induce nitric oxide (NO) production in murine macrophage cells. *J Biomed Sci* 2008; 15: 197-204.
- Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12(12): 720-727.
- Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 984-993.
- Karsunky H, Merad M, Mende I, Manz M, Engleman E. Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors. *Exp Hematol* 2005; 33 (2):173-81.
- Kataoka H, Yasuda M, Iyori M, Kiura K, Narita M, Nakata T, Shibata K. Roles of N584 linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1199-1209.
- Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015; 1(2): 154-170.
- Kingston H, Mills G. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2636-2649.

- Kiss J, Lamarque D, Delchier JC, Whittle BJ. Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 336(2-3):219-24.
- Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DAF, Westwick J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998; 43: 56-63.
- Kolios G, Valatas V, Ward S. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004; 113: 427-437.
- Koshte VL, van Dijk V, van der Stelt ME, Aalberse RC. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochem J* 1990; 272(3): 721-726.
- Koshte VL, Aalbers M, Calkhoven PG, Aalbers RC. The potent IgG4-inducing antigen in banana is a mannose-binding lectin BanLec-I. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97: 17-24.
- Lannoo N, Van Damme EJM. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 2014; 5: 397.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(4): 263-276.
- Li H, Zhang GX, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, Rostami A. CD11c+ CD11b+ Dendritic Cells Play an Important Role in Intravenous Tolerance and the Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181(4): 2483-2493.

- Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 2011; 23(5): 598–604.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *PNAS* 2001; 98(26): 15137-15142.
- Liu Z, Beboes K, Heremans H, et al. Role of interleukin-12 in the induction of mucosal inflammation and abrogation of regulatory T cell function in chronic experimental colitis. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1550–1560.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25(4):402 – 408.
- Loddo I, Romano C. Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Front Immunol* 2015; 6: 551.
- Long Yan Fong F, Kirjavainen P, Ho YeeWong V, El-Nezami H. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *J Func Food* 2015; 13: 71–79.
- Mariano VS, Zorzetto-Fernandes AL, da Silva TA, Ruas LP, Nohara LL, de Almeida IC, Roque-Barreira M. Recognition of TLR2 N-Glycans: Critical Role in ArtinM Immunomodulatory Activity. *PLoS One* 2014; 9: e98512.
- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 1999; 189(3): 587-592.

- Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298-306.
- Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunol* 2011; 4(6): 603-611.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2012; 23(11):549–555.
- Marinković E, Đokić R, Lukić I, Filipović A, Inić-Kanada A, Kosanović D, Gavrović-Jankulović M, Stojanović M. Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PloS One* 2017; 12(2): e0172469.
- Maroof A, Penny M, Kingston R, Murray C, Islam S, Bedford PA, Knight SC. Interleukin-4 can induce interleukin-4 production in dendritic cells. *Immunology* 2006; 117(2): 271–279.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 13.
- Masli S, Turpie B. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology* 2009;127(1): 62-72.
- McLntyre TM, Klinman DR, Rothman P, Lugo M, Dasch JR, Mond JJ, Snapper MC. Transforming growth factor β 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated, murine B cells. *J Exp Med* 1993; 9(177): 1031–1103.

- Meagher JL, Winter HC, Ezell P, Goldstein IJ, Stuckey JA. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. *Glycobiology* 2005; 15(10): 1033-1042.
- Meng J, Parroche P, Golenbock DT, McKnight CJ. The differential impact of disulfide bonds and N-linked glycosylation on the stability and function of CD14. *J Biol Chem.* 2008; 283: 3376-3384.
- Meo SD, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016; article ID 1245049.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 563-604.
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 450-455.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164: 6166-6173.
- Mittal SK, Cho KJ, Ishido S, Roche PA. Interleukin 10 (IL-10) - mediated Immunosuppression. *J Biol Chem* 2015; 290: 27158-27167.
- Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Proq Mol Bio Transl Sci* 2012; 105: 263-320.
- Mohamed S, Hassan Z, Hamid HA. Antimicrobial activity of some tropical fruit wastes (guava, starfruit, banana, papaya, passionfruit, langsat, duku, rambutan and rambai). *Pert J Trop Agric Sci* 1994; 17(3): 219-227.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leu Biol* 2003; 73: 209-212.

- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958-969.
- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 331-341.
- Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 667-685.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4 + T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998; 160: 5347-5354.
- Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A. Interferon- γ regulates intestinal epithelial homeostasis through converging β -catenin signaling pathways. *Immunity* 2010; 32: 392-402.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182:1281-1290.
- Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000; 19(1): 51-62.
- Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 329-342.
- Niederreiter L, Adolph TE, Kaser A. Anti-IL-12/23 in Crohn's disease: bench and bedside. *Curr Drug Targets* 2013; 14(12): 1379-1384.
- O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T_H1 development. *Nat Immunol* 2009; 10: 929 - 932.

- Olendzki BC, Silverstein TD, Persuitte GM, Ma Y, Baldwin KR, Cave D. An anti-inflammatory diet as treatment for inflammatory bowel disease: a case series report. *Nutr J* 2014; 13:5.
- Pallone F, Monteleone G. Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 43(6):735-736.
- Pan J, Zhang M, Wang J, Wang Q, Xia D, Sun W, Zhang L, Yu H, Liu Y, Cao X. Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett* 2004; 94(1-2):141-51.
- Pannangpetch P, Vuttivirojana A, Kularbkaew C, Tesana S, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan V. The antiulcerative effect of Thai Musa species in rats. *Phytother Res* 2001; 15(5):407-10.
- Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. 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(12):1035-42.
- Park HJ, Hong JH, Kwon HJ, Kim Y, Lee KH, Kim JB, Song SK. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(3):721-5.
- Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3): 141–153.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing

macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000371.

Peumans WJ. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters* 2000; 477(3): 186-192.

Peumans WJ, Zhang W, Barre A, Houlès Astoul C, Balint-Kurti PJ, Rovira P, Rougé P, May GD, Van Leuven F, Truffa-Bachi P, Van Damme EJ. Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta* 2000; 211(4): 546-554.

Peumans WJ, Proost P, Swennen RL, Van Damme EJM. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening associated proteins. *Plant Physiol* 2002; 130: 1063-1072.

Peumans WJ, Els JM, Van Damme. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 1995; 109: 347-352.

Ping X, Dongsheng X, Jiang C, Nonghua L, Wang C. Clinical importance of myeloperoxidase (MPO) monitoring in activity of inflammatory bowel disease. *Pract Clin Med* 2006; 7:34-37.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 481-489.

Poussier P, Ning T, Chen J, Banerjee D, Julius M. Intestinal inflammation observed in IL-2R/IL-2 mutant mice is associated with impaired intestinal T lymphopoiesis. *Gastroenterology* 2000; 118: 880 - 891.

- Prattis S, Jurjus A. Spontaneous and transgenic rodent models of inflammatory bowel disease. *Lab Anim Res* 2015; 31(2): 47-68.
- Rahim SS, Khan N, Boddupalli CS, Hasnain SE, Mukhopadhyay S. Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. *Immunology* 2005; 114(3): 313-321.
- Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 279-288.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 2014; 5: 532.
- Richman E, Rhodes JM. Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 1156-1171.
- Rigby RJ, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. *Clin Exp Immunol* 2004; 139(2): 245-256.
- Roberts CL, Keita AV, Parsons BN, Prorok-Hamon M, Knight P, Winstanley C, Niamh O, Söderholm JD, Rhodes JM, Campbell BJ. Soluble plantain fibre blocks adhesion and M-cell translocation of intestinal pathogens. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 97-103.
- Rogério AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Silva EV, Koyama NS, Basei FL, Soares EG, Calixto JB, Stowell SR, Dias-Baruffi M, Faccioli LH. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology* 2007; 17(8): 795-804.

- Rojas D, Krishnan R. IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation. *Immunol Lett* 2010; 132(1-2):31-7.
- Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5): 313-323.
- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(27):4280-4288.
- Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:447-453.
- Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28(2): 124-129.
- Sansone AC, Sansone M, Dos Santos Dias CT, Oliveira do Nascimento JR. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. *Int J Biol Macromol* 2017; 89:19-24.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(3): 170-181.
- Scheiffele F, Fuss I. Induction of TNBS colitis in mice, *Curr Protoc Immunol* 2001; 49:15.9.1.-15.9.4.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2(10):947-950.

- Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14(11): 53-62.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3): 151-161.
- Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(1): 19-30.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122:787-795.
- Singh H, Sarath SP. Insight of lectins-a review. *Int J Sci Eng Res* 2012 3(4): 1-9.
- Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7(3): 353–360.
- Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J* 2013; 30(7): 641-57.
- Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003; 52(10): 1522-1529.
- Stojanovic M, Zivkovic I, Petrusic V, Kosec D, Dimitrijevic R, Jankov R, Dimitrijevic L, Gavrovic-Jankulovic M. In vitro stimulation of Balb/c and C57BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform result in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *Int Immunophar* 2010; 10: 120–129.

- Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. *Ann Intern Med* 1998; 128(10): 848-856.
- Sumner JB, Howell SF. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J Bacteriol* 1936; 32: 227-237.
- Swanson MD, Winter HC, Goldstein IJ, Markovitz DM. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *J Biol Chem* 2010; 285:8646–8655.
- Tavernier SJ, Osorio F, Janssens S, Lambrecht BN. Isolation of Splenic Dendritic Cells Using Fluorescence-activated Cell Sorting. *Bio-protoc* 2015; 5(5): e1415.
- Theodoratou E, Campbell H, Ventham NT, Kolarich D, Pučić-Baković M, Zoldoš V, Fernandes D, Pemberton IK, Rudan I, Kennedy NA, Wuhrer M, Nimmo E, Annesse V, McGovern DP, Satsangi J, Lauc G. The role of glycosylation in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11(10): 588-600.
- Tomasello E, Bedoui S. Intestinal innate immune cells in gut homeostasis and immunosurveillance. *Immunol Cell Biol* 2013; 91: 201–203.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci* 1998; 17(6):575–692.
- Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Plant Lectins. *Adv Bot Res* 2008; 48:107–209.

- Vasconcelos IM, Oliveira JT. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 2004; 44(4): 385-403.
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, i Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000; 164 (6): 2978-2986.
- Walace JL, Miller JSM. Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; 119: 512–520.
- West P, Brodsky I, Rahner C, Woo D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011; 472: 476-480.
- Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Bio* 2011; 89: 873-891.
- Winter HC, Oscarson S, Slättegård R, Tian M, Goldstein IJ. Banana lectin is unique in its recognition of the reducing unit of, 3-O- β -glucosyl/mannosyl disaccharides: A calorimetric study. *Glycobiology* 2005; 15: 1043–1050.
- Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, Schouten LJ. *et al.* Crohn's disease: increased mortality 10 years after diagnosis in a Europe-wide population based cohort. *Gut* 2006; 55: 510–518.
- Wong JH, Ng TB. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with immunostimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 234–243.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006; 203(3): 519-529.

Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 112–118.

Wurtz O, Bajénoff M, Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int Immunol* 2004;16(3):501-508.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448(7152): 427–34.

Xiaojing Ma, Wenjun Yan, Hua Zheng, Qinglin Du, Lixing Zhang, Yi Ban, Na Li, Fang Wei. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res* 2015; 4: F1000 Faculty Rev-1465.

Yan-Cun L, Xian-Biao Z, Yan-Fen C, Yong-Ming Y. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int J Biol Sci* 2014; 10(5):520-529.

Yanagawa Y, Onoé K. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* 2007; 178(10): 6173-6180.

Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med* Vol 2005; 201(12): 1899-1903.

Yapali S, Hamzaoglu HO. Anti-TNF Treatment in Inflammatory Bowel Disease. *Ann Gastroenterol* 2007; 20(1): 48-53.

Yi-Zhen Z, Yong-Yu L. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(1):91–99.

Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch Pharm Res* 2003; 26(10): 861-867.

Zakharova M, Ziegler KH. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175: 5024-5033.

Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alim Phar Therap* 2006; 23(11): 1567-1574.

BIOGRAFIJA

Emilija M. Marinković rođena je 22. oktobra 1984. godine u Smederevu, Republika Srbija. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je Smederevu. Školske 2003/04. godine upisala je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar. Diplomirala je u februaru 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,03 i ocenom 10 na diplomskom radu. Školske 2009/10. godine upisala je akademske specijalističke studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na modulu Mikrobiologija sa imunologijom. Akademske specijalističke studije završila je u maju 2012. godine. Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Imunobiologija upisala je školske 2010/11. godine.

Od januara 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odseku za naučno-istraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak, a od juna 2012. godine kao istraživač saradnik u okviru projekta osnovnih istraživanja „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Do danas je objavila 13 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od toga 2 rada iz doktorske teze kao prvi autor, jedan M21a, a drugi M21 kategorije. Ima 5 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 2 saopštenja na domaćim skupovima.

Изјава о ауторству

Потписана **Емилија Маринковић**

број индекса **Б3057/2010**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Имуномодулаторна активност рекомбинантне изоформе лектина из банане у физиолошким и патолошким условима у дебелом цреву мишева *BALB/c* соја

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

У Београду, 20.07.2017.

Потпис докторанда

Е. Маринковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Емилија Маринковић**

Број индекса **Б3057/2010**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **Имуномодулаторна активност рекомбинантне изоформе лектина из банане у физиолошким и патолошким условима у дебелом цреву мишева *BALB/c* соја**

Ментор **др Маријана Стојановић**
проф. др Биљана Божић Недељковић

Потписани/а **Емилија Маринковић**

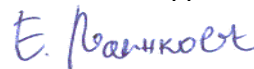
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 20.07.2017.

Потпис докторанда



Изјава о коришћењу

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

Имуномодулаторна активност рекомбинантне изоформе лектина из банане у физиолошким и патолошким условима у дебелом цреву мишева *BALB/c* соја

која је моје ауторско дело.

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

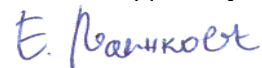
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

У Београду, 20.07.2017.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon

Emilija Marinković^a, Ivana Lukić^a, Dejana Kosanović^a,
Aleksandra Inić-Kanada^{a,1}, Marija Gavrović-Jankulović^b,
Marijana Stojanović^{a,*}

^a Institute of Immunology, Virology, Vaccine and Sera – Torlak, Vojvode Stepe 458, 11152 Belgrade, Serbia

^b Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12–16, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2015

Received in revised form 7 October 2015

Accepted 14 October 2015

Available online

Keywords:

Banana lectin

Colon

Immunostimulation

ABSTRACT

Recombinant banana lectin isoform (rBanLec) attaches specifically to the mucosal surface, crosses the epithelial barrier and then directly affects the immune response in mouse colon. Structural characteristics, specificity and physiological impacts of rBanLec reported until now highly resemble those of its natural counterpart. Here, we demonstrated that a dose-dependent stimulation of the colon with rBanLec skewed the immune response towards Th1/Th17 direction and this effect was counterbalanced by the rise in IL-10 production. Qualitative and quantitative characteristics of the established cytokine network were dependent on the applied rBanLec concentration. In addition, rBanLec enhanced local NO production and myeloperoxidase activity and promoted an increase in local IgA and IgG production. Stimulation with rBanLec can be beneficial in prevention of pathologies raised due to inappropriate cell-mediated immune response as well as in prevention of the pathogen invasion via the colon.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nutrition affects the whole organism, including the modulation of immune functions, in multiple ways. Numerous studies have demonstrated a beneficial role of essential nutrients and functional food ingredients within the immune system (Calder & Kew, 2002). Functional food components, beneficial components found naturally in foods or added as functional

ingredients, include probiotics and a variety of molecules such as poly- and oligosaccharides, polyols, plant proteins, plant stanols and sterols, carotenoids, fatty acids, flavonoids, isothiocyanates, phenolic acids, phytoestrogens, vitamins and minerals.

Functioning of the gastrointestinal tract (GIT), a food entry place, and juxtaposed gut-associated lymphoid tissue (GALT) is mostly affected by food constituents. Gut epithelium serves as a dynamic barrier, which regulates the uptake of

* Corresponding author. Department of Research and Development, Institute of Virology, Vaccine and Sera – Torlak, Vojvode Stepe 458, 11152 Belgrade, Serbia. Tel.: +381 11 39 75 501; fax: +381 11 39 75 501.

E-mail address: mstojanovic@torlak.rs (M. Stojanović).

¹ Present address: OCUVAC – Center of Ocular Inflammation and Infection; Laura Bassi Centers of Expertise; Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology; Medical University of Vienna; Vienna, Austria.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.019>

1756-4646/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

nutrients, minerals and water. The small intestine is mainly responsible for the absorption of nutrients, while resorption of minerals and water is dominant in the colon (Sandle, 1998). The other important function of the gut epithelium is exclusion of potential pathogen entry (Peterson & Artis, 2014). Proper functioning of an immune system in the gut is very important, especially in the colon, which is a portal of entry for many infectious agents but also susceptible to the infections. Therefore, bioactive substances that could properly stimulate/modulate immune response in the colon and adjacent mucosa would be beneficial.

Functioning of local immune response in the colon is highly influenced by microbiota as well as bioactive food constituents. Lectins represent a broad group of bioactive molecules that can bind the gut epithelium and influence processes within the gut (Lavelle, Grant, Pusztai, Fuller, & O'Hagan, 2001; Majee & Biswass, 2013; Souza, Carvalho, Ruas, Ricci-Azevedo, & Roque-Barreira, 2013). They are present in plant-based foods in appreciable amount. Lectins are defined as (glyco)proteins which can specifically bind to carbohydrate structures. Due to their unique specificity they discriminate sugars based on the subtle structural differences. Consequently, lectins exert very specific mode of action, including distinctive immunostimulatory/immunomodulatory effects. As they are highly abundant in everyday nutrition, it would be important to clarify in more details which events are triggered upon their ingestion.

Banana lectin (BanLec) was isolated for the first time from a natural source *Musa paradisiac* by Koshte, van Dijk, van der Stelt, and Aalberse (1990). It is reported to be a glucose-mannose-specific lectin, which is a potent mitogen of both human and mouse T cells (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008; Peumans et al., 2000), a promoter of pro-inflammatory cytokines expression within splenocytes (Cheng, Wong, & Ng, 2009), and enhancer of NO production in macrophages (Wong & Ng, 2006).

Our research is focused on the evaluation of immunomodulatory and immunostimulatory potential of recombinantly produced banana lectin isoform (rBanLec). The pI value calculated for rBanLec is in the range of those recorded for naturally occurring BanLec (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). The alignment of rBanLec 141 amino acids long sequence to the one of BanLec isolated from natural sources shows a high degree of similarity (~95%). The rBanLec at C-terminus possess GSRSHHHHHH sequence that originates from the expression vector used, Q to N exchange at position 2 due to cloning strategy, and K to N exchange at position 98 as unique for rBanLec. However, the sequences coding its ligand binding loops are highly preserved. The sequence of the first binding loop of rBanLec differed from corresponding sequence in naturally occurring counterparts only at positions 130 (D replaced by K) and 132 (L replaced by I), while the second ligand binding loop (GDVVD) is completely preserved in rBanLec (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008).

The data from the literature show that rBanLec specificity and certain physiological impacts (T cells mitogen, recognition by human IgG4) are the same as those of its natural counterpart (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008; Stojanovic et al., 2010). Moreover, rBanLec (i) is resistant to proteolysis and denaturation within the GIT, (ii) binds to the luminal surface of small intestine and passes across the epithelium, and (iii) is

significantly less immunogenic when applied orally than parenterally (Dimitrijevic, Stojanovic, Micic, Dimitrijevic, & Gavrovic-Jankulovic, 2012).

Previous studies have demonstrated that the consumption of bananas is helpful in treatments of diarrhoea, gastric ulcers and preventions of some cancer types (review in Sampath Kumar, Bhowmik, Duraivel, & Umadevi, 2012). These beneficial effects could be due to the large amount of non-digestible fructooligosaccharides, substances with antioxidant and antimicrobial activity, but also due to the BanLec influence. Thus, the aim of this study was to characterize a local immune response in the colon of healthy mice after a single rectal application of rBanLec in various concentrations. To evaluate local immunostimulatory/immunomodulatory impact of rBanLec, we analysed the production of major effector and regulatory cytokines, antimicrobial substances and antibodies.

2. Materials and methods

2.1. Production of rBanLec

rBanLec used in this study is 6His-tagged protein (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). It was produced in *Escherichia coli* SG13009 [pREP4] transformed with expression vector pQE70 (Qiagen, Hilden, Germany) which contained BanLec-encoding insert (GenBank accession number EU055641; Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). The protocol for isolation of total RNA from banana pulp (*Musa acuminata*, Cavendish) and amplification of the BanLec gene is given in Gavrovic-Jankulovic et al. (2008). Production of rBanLec was performed according to already described procedures (Dimitrijevic et al., 2012; Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). Briefly, rBanLec production proceeded through three main stages:

- (i) Cultivation of transformed *E. coli* SG13009 and induction of rBanLec synthesis – Transformed *E. coli* SG13009 were grown in 2 × YT-medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with ampicillin (50 µg/ml; Sigma) and kanamycin (25 µg/ml; Sigma) at 37 °C until OD₆₀₀ 0.7. Then rBanLec synthesis was induced by addition of isopropyl-d-thio-galactopyranoside (1 mM; Sigma), bacterial suspension was incubated at 37 °C for additional 5 h and stored at 4 °C overnight (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008).
- (ii) Disruption of rBanLec-producing bacterial cells – After pelleting (5000 × g for 15 min, 4 °C), rBanLec-producing *E. coli* SG13009 were resuspended in TBS (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4). Disruption of rBanLec-producing bacterial cells proceeded through lysozyme treatment (1 mg/ml lysozyme (Sigma) in TBS, 1 h at room temperature (RT) plus centrifugation at 5000 × g, 15 min at 4 °C), treatment with Na-deoxycholate containing solution (0.1% Na-deoxycholate (Sigma) in TBS, 1 h at 4 °C, plus centrifugation at 5000 × g, 15 min at 4 °C) and 3 freezing/thawing cycles. rBanLec-containing solution which is used for its purification is obtained upon centrifugation at 5000 × g for 15 min at 4 °C (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008).
- (iii) Purification of rBanLec from the obtained supernatant by combination of chromatographic methods – immobilized metal-affinity chromatography (IMAC)

using Ni²⁺-loaded IMAC column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was followed by chromatography on Sephadex G 50 column (Pharmacia). For IMAC, column was equilibrated in 20 mM imidazole/300 mM NaCl/50 mM Tris (pH 7.4), rBanLec-containing supernatant (with NaCl and imidazole adjusted to 300 mM and 20 mM, respectively) was loaded onto the column, and rBanLec was eluted with 500 mM imidazole/300 mM NaCl/50 mM Tris (pH 7.4). rBanLec was eluted from Sephadex G50 column with 500 mM glucose in PBS. Dialysis of rBanLec-containing fractions against PBS was performed after both chromatographic steps (Dimitrijevic et al., 2012).

All rBanLec preparations were determined by the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) to contain endotoxin contamination less than 0.3 ng/ml.

2.2. Animals

Female BALB/c mice, used in the experiments were between 8 and 12 weeks old, body weight (BW) ~20 g. All experiments were approved by Ethics Committee for the Welfare of Experimental Animals and by the committee section at the Institute of Virology, Vaccines and Sera – Torlak and conformed to the Serbian laws and European regulations on animal welfare (Approval No. 011-00-00510/2011-05/5). Animals were allowed to take food and water *ad libitum*. The weight of animals was monitored on a daily basis and no weight loss was registered.

2.3. Rectal administration of rBanLec and collection of samples

One-day fasted mice were anaesthetized with ketamine and xylazine and catheter was carefully inserted into the colon via anus approximately 4 cm deep. Doses of 0.1, 1 and 10 µg/ml of rBanLec in PBS were slowly administrated into the lumen via catheter fitting onto the 1 ml syringe in a volume of 100 µl (equal to 0.5, 5 and 50 µg/kg BW, respectively). According to the received amount of rBanLec, mice were divided into groups assigned rBL0.1, rBL1 and rBL10 (n = 15 mice/group). In age-matched control group (nc), mice received only PBS. Then, mice were euthanized at different time points (24 h, 48 h and 72 h; 5 from each group per time point) and their colon specimens were further analysed.

Weight of each colon sample was recorded and they were further processed individually. Tissue was homogenized in 1 ml of ice-cold buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1% NP-40, and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma). Homogenates were centrifuged (12,000 × g, 15 min, 4 °C) and the supernatants were collected and stored at -80 °C. Total protein concentration for each supernatant was determined following Bradford's colorimetric method. Obtained supernatants were used for measurement of cytokines, antibodies, NO and myeloperoxidase (MPO) activity.

2.4. Immunohistochemical detection of rBanLec in the colon

To analyse rBanLec binding in mice colon tissue, single dose of rBanLec (10 µg in 100 µl PBS) was administered rectally. Mice

were euthanized 1 h, 24 h, 48 h and 72 h upon rBanLec treatment and colon tissue samples were collected (n = 3 mice per time-point). Age matched non-treated mice (n = 3) were used as control. Colon cryosections were prepared and used for immunochemical staining. Briefly, dissected colonic samples were flushed with ice-cold PBS (pH 7.4) to remove the luminal contents. Then, colonic tissue was placed into concentric circles and embedded in OCT compound prior to snap-freezing. Frozen sections (5 µm) were mounted on glass slides coated with polylysine, air-dried for 2 h at RT, fixed in chilled acetone (Merck, Darmstadt, Germany) for 10 min and air-dried again for 1 h. Slides were washed in PBS, treated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 15 min to block endogenous peroxidase and then washed again three times in PBS. To avoid nonspecific binding, sections were treated with 5% normal goat serum in PBS for 30 min. After three washes in PBS, rabbit anti-rBanLec polyclonal antibodies were added (diluted 1:1000 in 5% goat serum in PBS) and incubated overnight at 4 °C. Sections were washed three times in PBS, treated with goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (Sigma) at dilution 1:500 in 5% goat serum in PBS and incubated for 1 h at RT. After the same washing step, peroxidase substrate reaction was performed using the DAB peroxidase substrate kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Afterward, sections were washed in water and counterstained with haematoxylin. Stained tissue sections were analysed on Olympus BH2-RFL microscope (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) at 40× magnification. High-resolution images were obtained by digital colour camera (Color View III, Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Germany) mounted on an Olympus BH2-RFL microscope.

2.5. Determination of local concentration of cytokines

The concentrations of IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, and IL-17A in supernatants (section 2.3) were determined using sandwich ELISA protocol. Briefly, 96-well plates (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated (50 µl/well) with commercially available monoclonal capture antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA) specific for IFN γ (1 µg/ml), IL-2 (1 µg/ml), IL-4 (2 µg/ml), IL-10 (1 µg/ml), IL-12 (1 µg/ml) or IL-17A (1 µg/ml). After overnight adsorption (4 °C), plates were blocked with 200 µl/well of 1% bovine serum albumin (Sigma) in PBS for 2 h at RT. Blocking and all subsequent ELISA steps were followed by a wash step with 0.05% Tween 20 in PBS (200 µl/well, four times). Supernatants of homogenized colonic tissues and cytokine standards were incubated for 1 h at RT. Biotin-labelled Abs specific for IFN γ (1 µg/ml), IL-2 (1 µg/ml), IL-4 (1 µg/ml), IL-10 (1 µg/ml), IL-12 (1 µg/ml) or IL-17A (1 µg/ml) diluted in 1% BSA/PBS were added (50 µl/well) into the wells and incubated for 1 h at RT. The extrAvidin-alkaline phosphatase (Sigma) at dilution 1:20 000 (50 µl/well) in 1% BSA/PBS was incubated for 1 h at RT. The colour product was developed using p-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma). The absorbance was measured at wavelength of 405 nm (A_{405}). The concentration of cytokine was calculated from standard curve.

2.6. Measurement of total IgG and IgA

Total IgA and IgG in homogenized samples were detected using direct ELISA protocol. MaxiSorp plates (Nunc) were coated (50 µl/

well) with supernatants (section 2.3) of homogenized samples (all samples have been adjusted to 0.5 mg/ml of total proteins) by overnight adsorption at 4 °C, and 1% BSA/PBS was applied as a blocking reagent for 2 h at RT. The plates were washed four times with 200 µl/well of 0.05% Tween 20 in PBS and 50 µl/well of biotin-labelled rat anti-mouse IgA (BioLegend, San Diego, CA, USA) and biotin-labelled goat anti-mouse IgG (Sigma) were incubated for 1 h at RT. The extrAvidin-alkaline phosphatase/p-nitrophenyl phosphate system (Sigma) was used to visualize antigen–antibody interactions. The absorbance was measured at 405 nm (A_{405}).

2.7. Assessment of NO production

To determine level of stable NO end product, nitrite, Griess reagent was used. An equal volume of Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) and supernatants of homogenized samples (100 µl/well) was added to the 96-well plate to start reaction. After 10 min of incubation at RT the absorbance was measured at 545 nm (A_{545}). Concentrations were calculated from a linear standard curve prepared by using sodium nitrite.

2.8. Measurement of myeloperoxidase activity

MPO activity was measured in supernatants of homogenized colonic tissues. This assay is based on the oxidation of o-phenylenediamine (Sigma) by myeloperoxidase. All supernatants were adjusted to the same protein concentration (1 mg/ml) before analysis. The reaction was carried out in a 96-well plate by adding 75 µl/well of substrate solution (1 mg/ml o-phenylenediamine, 0.01% hydrogen peroxide, 50 mM citric acid) and 75 µl/well supernatants of homogenized samples. The reaction was terminated by addition of 50 µl/well of 1M sulphuric acid every two minutes. The absorbance was measured at 492 nm and 620 nm ($A_{492/620}$).

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm standard error (SE). Statistical analysis was performed by t-test. A P value of <0.05 was considered statistically significant. Correlation between some parameters was evaluated by bivariate Pearson's correlation analyses. All analyses were performed using the SPSS 19.0 Software.

3. Results

3.1. rBanLec crosses colon epithelial barrier and reaches juxtaposed lymphoid tissue

A specific binding of rBanLec to the colon epithelium and the rate of its translocation to submucosa were studied up to 72 h after administration (Fig. 1). Immunohistochemical staining at 1 h was confined to region of epithelium along the villus from its tips to the crypt-villus junction but not in the crypt region (Fig. 1b). Later, 24 h after exposure, the general pattern of stain-

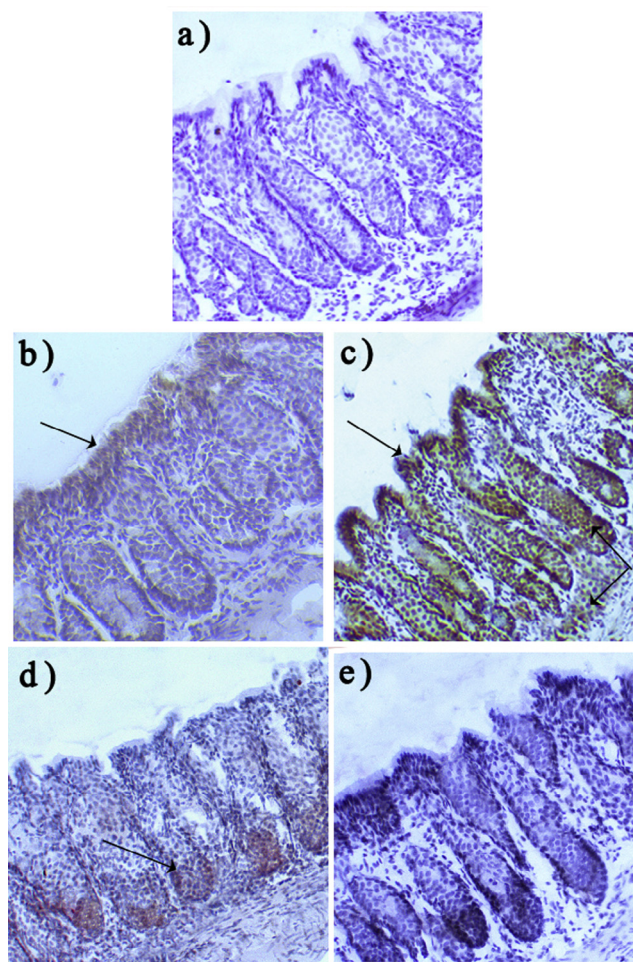


Fig. 1 – Immunohistochemical detection of rBanLec binding to the colon tissue during 72 h long follow-up period upon its rectal application. Representative pictures of the colon sections obtained from the age matched control mice (a) and rBanLec-treated mice collected 1 h (b), 24 h (c), 48 h (d) and 72 h (e) upon rBanLec rectal administration are presented. rBanLec was labelled by biotin and it was detected in tissue sections by extrAvidin-peroxidase/DAB staining (indicated by arrows). Tissue was counterstained with haematoxylin. Stained tissue sections were analysed at 10 \times magnification.

ing was dramatically changed and rBanLec was localized not only on the villus' tips but also inside the crypts (Fig. 1c). Small amounts of rBanLec were detected beneath the basal surface of the epithelial cells, in lamina propria. At 48 h after application, rBanLec was still visible only on the floor of the crypts (Fig. 1d). By 72 h, the presence of rBanLec was no longer detectable in any of the mucosal compartments (Fig. 1e). We did not observe any of the pathology changes of the tissues upon the application of rBanLec.

3.2. rBanLec alters local secretion of effector and regulatory cytokines in colon and associated lymphoid tissue

Abundance of six cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN γ) were analysed in homogenates of colon prepared 24 h, 48 h and

72 h upon rectal application of rBanLec-containing solutions (Fig. 2).

The obtained results revealed that rBanLec influences a local production of cytokines in a dose dependent manner. We showed that the rise in IL-2 production is an initial event upon rBanLec stimulation. In all samples collected 24 h upon treatment, concentration of IL-2 was significantly higher than in samples obtained from control non-treated mice and it was strongly positively correlated with the applied rBanLec concentration ($P_{cc} = 0.677$, $P < 0.01$). Twenty-four hours upon rBanLec application we also detected a decline in IL-4 production ($P < 0.05$ for rBL1 and rBL10 group comparing to nc) and it proceeded till the end of follow up period (72 h). In addition, transitional fall in IL-12 production during the first 24 h was marked as well ($P < 0.005$ for rBL1 and rBL10 group comparing to nc). Concentration of IL-12 and IL-4 detected in homogenates of colon prepared 24 h upon treatment negatively correlated to the applied rBanLec concentration ($P_{cc}(\text{IL-12}) = -0.501$, $P < 0.05$; $P_{cc}(\text{IL-4}) = -0.571$, $P < 0.05$).

Two days upon treatment, in mice treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rBanLec (rBL1 and rBL groups, respectively) IL-2 level was still significantly higher than in control mice and a significantly enhanced secretion of Th1-driving cytokine IL-12 ($P < 0.05$ for rBL1, $P < 0.005$ for rBL10) as well as IFN γ and IL-17A (Th1 and Th17 marker cytokines) was marked ($P < 0.05$ in both cases). This rise in production of pro-inflammatory cytokines was accompanied by enhanced production of IL-10 ($P < 0.05$ comparing to nc). In mice treated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rBanLec (rBL0.1) a significant rise in IL-10 production occurred as well, but the enhancement of IFN γ and IL-17A secretion was not observed.

Levels of IL-10 and IL-17A in homogenates of colon prepared 72 h upon rBanLec treatment were similar to their levels determined in control samples ($P < 0.05$ only for IL-17A in rBL10 group). At the same time point (72 h) levels of other tested cytokines were significantly lower in colon samples collected from rBanLec-treated mice comparing to the ones from untreated control mice.

Generally, rBanLec, in a dose-dependent manner, induced significant fall in IL-4 production. Similar pattern of changes, including transitional burst at 48 h upon rBanLec administration, in secretion of IFN γ , IL-17A and IL-10 has been marked. During whole follow up period, concentrations of these cytokines were in significant positive correlation with local concentration of IL-12 (IFN γ : $P_{cc} = 0.669$, $P = 0.017$; IL-17A: $P_{cc} = 0.74$, $P = 0.006$; IL-10: $P_{cc} = 0.92$, $P < 0.0001$). In addition, changes in IFN γ production paralleled to the alterations in local concentration of IL-2 ($P_{cc} = 0.92$, $P < 0.0001$).

3.3. rBanLec augments local production of antibodies

Measurement of total IgG and IgA in homogenates of colons collected from control and rBanLec-treated mice revealed significantly enhanced production of antibodies after the treatment with rBanLec. Significantly higher contents of both IgA and IgG were detected even in samples collected 24 h upon treatment (Fig. 3). The concentration of IgA gradually decreased over time upon a treatment and 72 h later it was still significantly higher than in control mice (Fig. 3A). In addition, initial rise in IgA production was in positive correlation with the applied

rBanLec dose. At the contrary, rise in IgG production was the lowest in rBL10 mice (Fig. 3B).

Analysis of IgG subclasses in samples collected 48 h after the treatment showed that secretions of IgG1, IgG2a and IgG2b were enhanced (Fig. 4). Production of IgG1 was enhanced in a positive dose-dependant manner, while recorded amount of IgG2b was negatively correlated to the rBanLec amount used for the treatment. Production of IgG2a was not regulated in a strict dose-dependant manner but it was in a good correlation with the locally recorded concentration of Th1 driving cytokine IL-12 ($P_{cc} = 0.885$, $P = 0.02$).

3.4. rBanLec stimulation raises local NO concentration and transitionally enhances myeloperoxidase activity

Measurement of NO concentration (Fig. 5) and activity of MPO (Fig. 6) in samples collected from control and rBanLec-treated mice revealed that rBanLec influences their local production/activity in colon.

In comparison with the control samples, elevated NO concentration was detected even in samples collected 24 h upon our treatment. Concentrations of NO measured in samples collected 72 h upon the treatment were also significantly higher than the ones in control samples. In addition, with rBL0.1 mice, NO concentration rose during 72 h after the treatment, while in rBL10 mice, we marked a significant initial rise (registered 24 h upon a treatment) followed by the decline in NO concentration (Fig. 5).

Local activity of MPO was transitionally elevated with all rBanLec-treated mice (Fig. 6). Significantly higher MPO activity than with control mice was recorded only in samples collected 48 h after the treatment. In addition, local MPO activity among rBanLec-treated mice was similar.

4. Discussion

Results presented in this paper show that rBanLec in the colon acts as a polyclonal stimulator that affects (in)directly the humoral and cellular arms of the immune system. Beyond the rise in local IgA and IgG production, rBanLec in a dose-dependent manner stimulates the establishment of a balanced Th1/Th17 immune response, i.e. simultaneous rise in IFN γ , IL-17A, and IL-10 production and decline in IL-4 production. Induction of balanced pro-inflammatory immune response could be assigned as a general characteristic of rBanLec stimulation in the colon but qualitative and quantitative characteristics of the established cytokine network were dependent on the applied rBanLec concentration. In addition, rBanLec stimulation also enhanced local NO production and MPO activity, two events that are beneficial when coping with the infection.

rBanLec is resistant to harsh conditions within the gastrointestinal tract (Dimitrijevic et al., 2012) and could be orally administered. However, in our experimental setting, we chose the rectal administration route because the focus of our research was on the rBanLec immunostimulatory/immunomodulatory effects in the colon. This route of application enabled us to better control a local amount of

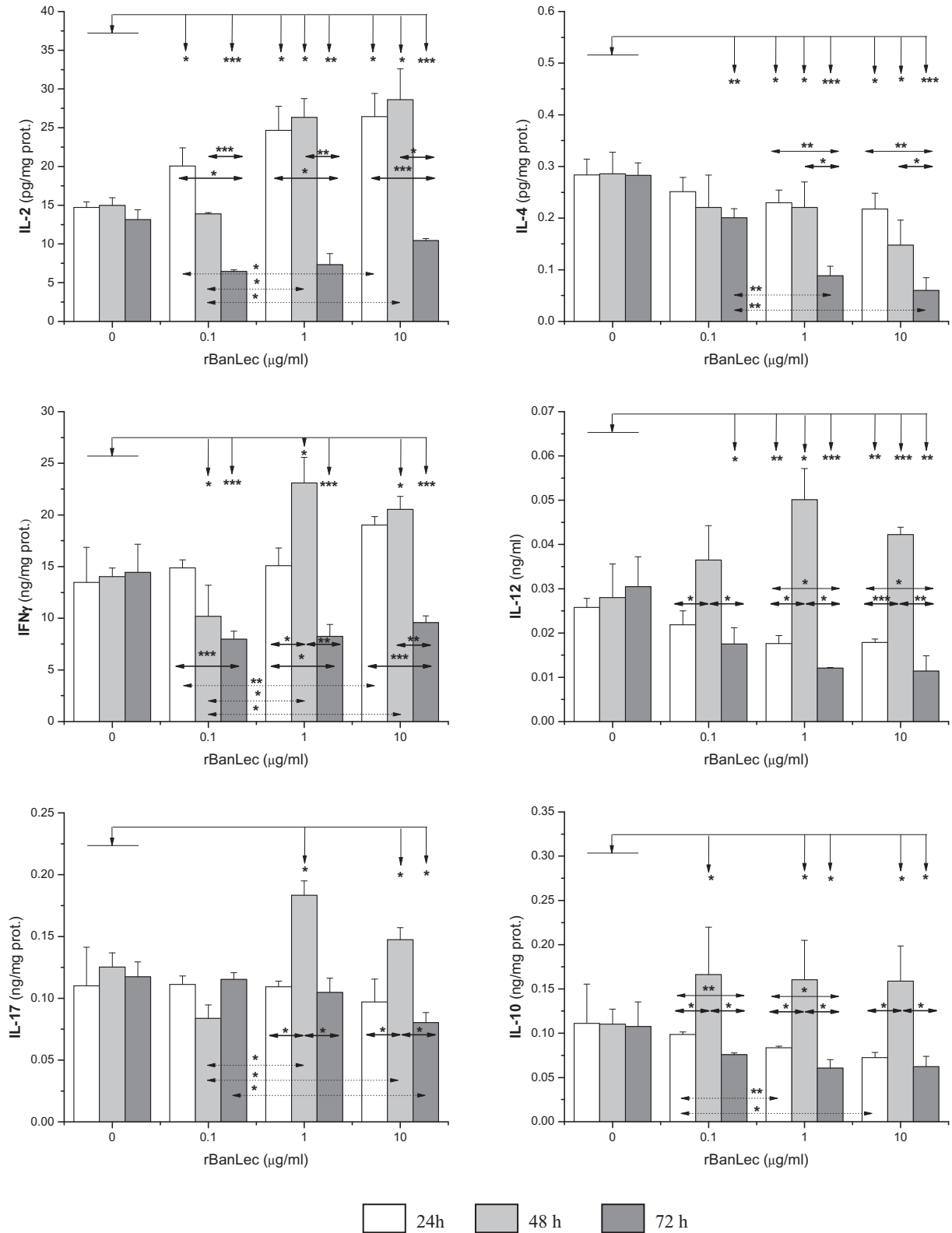


Fig. 2 – Concentrations of IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A and IFN γ in the colon of mice treated rectally by rBanLec in specified concentration and age-matched non-treated mice (nc). Colons are collected at 24 h (white bars), 48 h (light grey bars) and 72 h (grey bars) upon rBanLec treatment (n = 5 mice/group for each time point), homogenates are prepared and cytokines are measured in supernatants. Concentration of particular cytokine is determined for individual samples by ELISA and expressed per 1 mg of total proteins (determined for each supernatant by Bradford method). Results are presented as mean amount of cytokine per 1 mg of total proteins \pm SE. The significance of the observed differences was calculated by t-test (*P < 0.05, **P < 0.005, *P < 0.0005). The compared groups are indicated by two-head arrows.**

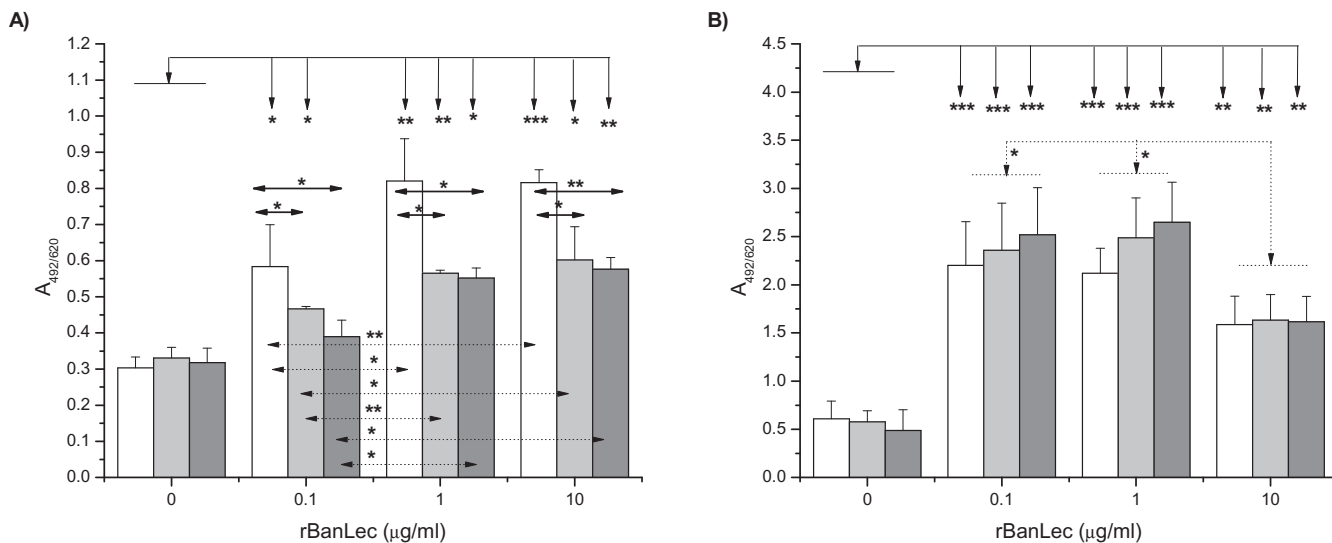


Fig. 3 – Concentrations of IgA (a) and IgG (b) in the colon of mice treated rectally by rBanLec and age-matched non-treated ones (nc). Colons are collected at 24 h (white bars), 48 h (light grey bars) and 72 h (grey bars) upon rBanLec treatment ($n = 5$ mice/group for each time point), homogenates are prepared and antibodies are measured in supernatants. Concentration of antibodies is determined for individual samples by ELISA (total protein concentration was adjusted to 0.5 mg/ml in each analysed sample). Results are presented as mean $A_{405} \pm SE$. The significance of the observed differences was calculated by t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$). The compared groups are indicated by two-head arrow.

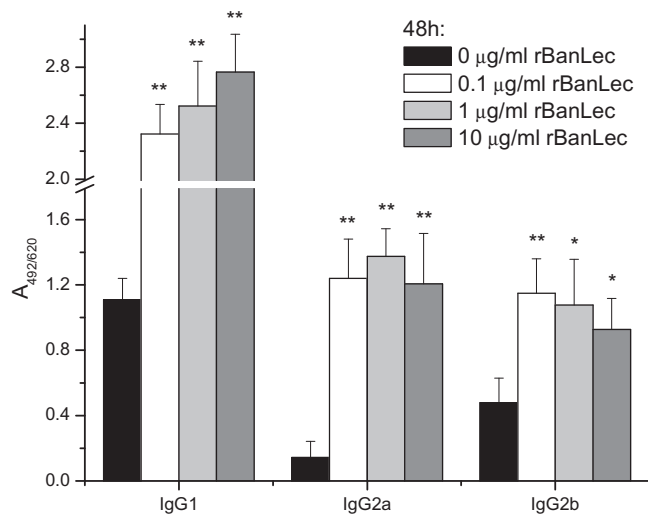


Fig. 4 – Concentrations of IgG1, IgG2a and IgG2b in the colon of mice 48 h upon rectal administration of solution (100 µl) containing rBanLec in a specified concentration. Concentration of particular IgG subclass is determined in supernatants collected upon colon tissue processing (see section 2.3). Concentration of antibodies is determined for individual samples ($n = 5$ mice/group) by ELISA (total protein concentration was adjusted to 0.5 mg/ml in each analysed sample). Results are presented as mean $A_{405} \pm SE$. The significance of the observed differences was calculated by t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$) taking the particular IgG subclass level in age-matched non-treated group (0 µg/ml rBanLec) as a reference.

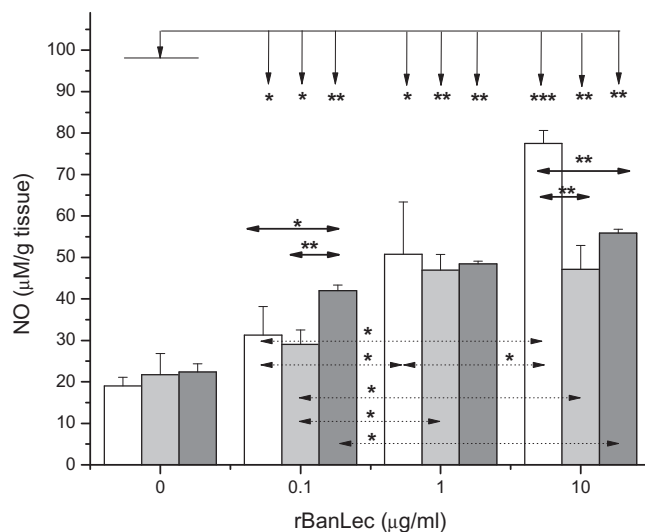


Fig. 5 – Concentration of NO in the colon of mice treated rectally by rBanLec and age-matched non-treated mice (nc). Colons are collected at 24 h (white bars), 48 h (light grey bars) and 72 h (grey bars) upon rBanLec treatment ($n = 5$ mice/group for each time point), homogenates are prepared and NO is measured in supernatants. Results are presented as mean amount of NO produced per 1 g of tissue $\pm SE$. The significance of the observed differences was calculated by t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$). The compared groups are indicated by two-head arrows.

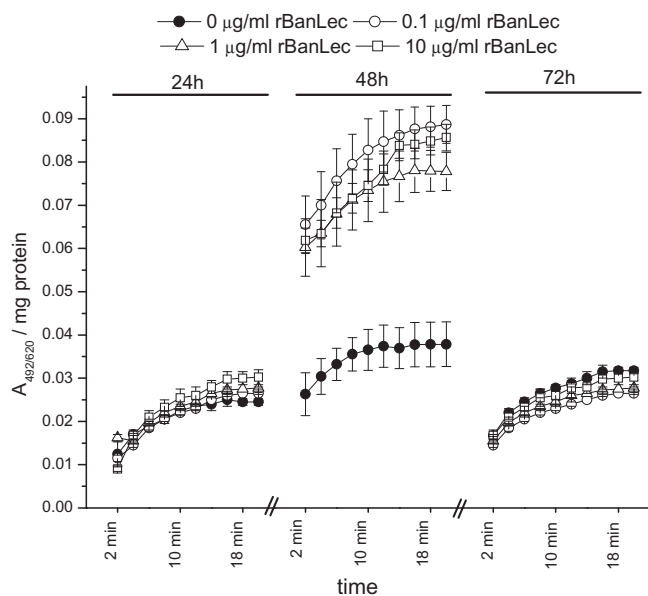


Fig. 6 – Activity of myeloperoxidase (MPO) in the colon of mice treated rectally by rBanLec in specified concentration and age-matched non-treated mice (nc). Colons are collected at 24 h, 48 h and 72 h upon rBanLec treatment (n = 5 mice/group for each time point), homogenates are prepared and MPO activity is measured in supernatants (total protein concentration was adjusted to 1 mg/ml) via oxidation of o-phenylenediamine ($A_{492/620}$). MPO activity is measured for individual samples by stopping reaction in 2 minute intervals. Results are presented as mean $A_{492/620}$ per 1 mg of total proteins \pm SE.

rBanLec, which consequently made our evaluation of its concentration-dependent effects more reliable. We have previously shown that orally applied rBanLec binds to the epithelium of the small intestine where it exerts its immunomodulatory influence (Dimitrijevic et al., 2012). These characteristics of rBanLec could have possibly hampered us to assess accurately the exact rBanLec concentration that reached the colon upon oral administration and to evaluate clearly its local effects. In addition, due to rBanLec's ability to bind the epithelium of a small intestine, it is to be expected that higher amount of rBanLec has to be taken orally to have rBanLec in tested dose range in the colon. A precise correlation between the amount of rBanLec applied via the rectal and the oral route, to achieve the same effect in the colon, cannot be made, as the amount that would be retained in the small intestine is not defined. Furthermore, the communication of the adjacent mucosa-associated lymphoid tissues has also to be taken into account.

Similar to the small intestine, rBanLec binds to the luminal surface of colon epithelium, but in the colon its passage over the epithelium was slower than in the small intestine. Actually, in the small intestine rBanLec was located in submucosal area 3 h after the treatment (Dimitrijevic et al., 2012) while in the colon submucosa it was detected in traces 24 h after the treatment. Hence, we think that all changes detected in the colon 24 h upon rBanLec stimulation resulted mainly as a consequence of an epithelial cell and intraepithelial lymphocyte

stimulation. Both could be a source of cytokines, which in turn trigger NO production in epithelial cells and affect their functioning as well as the function of the cells within juxtaposed submucosal compartment (Gibson, Anderson, Mariadason, & Wilson, 1996; Peterson & Artis, 2014; Wallace & Miller, 2000).

The obtained results imply that rise in IL-2 production has a pivotal role in the establishment of rBanLec-induced immune response in colon. IL-2 is important for the functioning of innate immune system, indispensable in differentiation of effector T cells and has essential role in differentiation and maintenance of regulatory T cells (Gasteiger & Rudensky, 2014). The presence and activity of regulatory T cells is important for the prevention of autoreactive and extensive inflammatory immune response, which both can result in pathology.

However, pro-inflammatory cytokines analysed herein as well as NO and MPO could have dual, beneficial and deleterious, role in the colon. Numerous data are reporting on pathological manifestations of Th17 response at mucosal surfaces (Feng et al., 2011), but protective role of Th17 cytokines in defence against extracellular bacteria is clearly demonstrated (Daniel & Cristina, 2010). Furthermore, $IFN\gamma$ is the hallmark of Th1-directed immune response essential for fighting viruses and infections by intracellular parasites but its raised level is reported in inflammatory bowel disease (IBD). $IFN\gamma$ is accused for increased gut permeability in IBD as it induces changes in the expression of proteins forming tight junctions, which results in the disruption of epithelial barrier integrity (Nava et al., 2010; Naydenov et al., 2013). However, $IFN\gamma$ is a promoter of the cell-mediated immune response and an enhancer of the production of antimicrobial molecules such as NO.

Upon rBanLec stimulation, we registered the rise in NO production as well as the enhancement of MPO activity. Although the extreme rise of both NO concentration and MPO activity is associated with some pathologies of the colon, their beneficial roles in colon are clearly demonstrated (review in Kolios, Valatas, & Ward, 2004; Wallace & Miller, 2000). NO is involved in cell-to-cell communication (neurotransmitter), regulation of mucosal barrier integrity, and vascular tone in the gut. Increased MPO activity contributes to combat pathogenic microbes and parasites and is also a favourable diagnostic factor in colorectal cancer (Droeser et al., 2013). Our results show that rBanLec promotes a transitional rise in MPO activity that coincides with the peak in concentration of pro-inflammatory cytokines and most probably occurs due to the influx of the cells attracted by pro-inflammatory milieu.

Whether the impact of the above mentioned physiologically active molecules would be beneficial or deleterious depends on the intensity (i.e. concentration) and/or duration of the stimulation. Hence, we found simultaneous rise in IL-10 production as very important. IL-10 is a regulatory cytokine which acts anti-inflammatory through suppression of the pro-inflammatory cytokines production (Izcue, et al., 2009; Jarry et al., 2008). TGF β is another cytokine that has immunoregulatory role in the GIT (Ince et al., 2009). Its production was not directly analysed herein, but the rise in IgA and IgG2b secretion detected in rBanLec-treated mice implies the enhancement of its production (switch to both IgA and IgG2b in mice is TGF β -dependent; McIntyre et al., 1993).

In banana fruit, BanLec can be found in multiple isoforms, more or less differing in their physico-chemical properties and potential to trigger some physiological mechanisms (Cheng et al., 2009). Generally, the specificity towards oligosaccharides is preserved among BanLec isoforms but the affinities towards target structures and their effective dose ranges may be different (Koshte et al., 1990). Others (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008) are shown that both rBanLec and BanLec isolated from natural sources target the same immune system cell populations. Additionally, the outcomes of these interactions are highly similar (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). Similar to rBanLec (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008; Stojanovic et al., 2010), the naturally occurring BanLec is also capable of promoting T cell proliferation (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008; Peumans et al., 2000), initiating pro-inflammatory cytokine response (Cheng et al., 2009), and enhancing NO production (Wong & Ng, 2006).

Based on the high structural and functional similarity between rBanLec isoform we used in our experiments and the naturally occurring BanLec (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008), we propose that BanLec taken through the consumption of banana fruit could exert a similar immunomodulatory/immunostimulatory influence on the colon as we described in this contribution. It is not possible to precisely calculate the amount of bananas that have to be consumed to get a total intake of BanLec within a dose range analysed herein, as BanLec content varies and primarily depends on their ripening stage (Peumans, Proost, Swennen, & Van Damme, 2002). In addition, a certain variance in amount–outcome dependency pattern (effective dose range) could be expected due to differences in affinity towards targeted saccharides structures between natural isoforms and rBanLec (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008) as well as among natural isoforms (Koshte et al., 1990). Approximately, if we consider the average content of BanLec in bananas to be ~4 mg/100 g of banana fruit (Koshte et al., 1990), the amount of lectin we used in our experiments (0.5–50 µg/kg BW) could be consumed by a human of 70 kg BW by eating up to 100 g of bananas. For discussion about BanLec's impact on the colon based to the regular consumption of bananas, we found results obtained for rBL 0.1 and rBL1 groups more relevant than those for rBL10 group. Namely, as for rBanLec (Dimitrijevic et al., 2012), a large amount of BanLec would be bound in the small intestine and only a small amount would reach the colon. In mice stimulated with rBanLec in the lowest concentration (0.5 µg/kg BW; rBL0.1 group), the production of IL-4 was not significantly affected, significant rise in production of pro-inflammatory cytokines (IFN γ and IL-17A) was not observed, while the enhanced production of IL-10 and anti-microbial activity occurred. According to our results, it could be expected that BanLec in low concentration would promote antimicrobial activity without threat of extensive inflammation. On the other hand, cytokine pattern recorded in rBL1 and rBL10 groups (>5 µg rBanLec/kg BW) resembles the ones observed upon stimulation with certain probiotic strains (*Lactobacillus plantarum* 299, Christensen, Frøkiær, & Pestka, 2002; *Bifidobacterium longum*, Rigby, Knight, Kamm, & Stagg, 2004; *Lactobacillus rhamnosus* GG, Long Yan Fong, Kirjavainen, Ho Yee Wong, & El-Nezami, 2015) whose positive impact in resolving colon-associated pathologies are documented. It is shown that

these probiotic strains exert numerous beneficial effects in colon including attenuation of previously established colonic inflammation (Christensen et al., 2002; Takeda et al., 2009), inhibition of colon carcinogenesis (Orlando et al., 2012; Reddy & Rivenson, 1993), amelioration of diarrhoea (Preidis et al., 2011), and maintenance of remission of ulcerative colitis (Zocco et al., 2006).

Our results showed that BanLec is an additional banana constituent, besides non-digestible oligosaccharides and antimicrobial substances, which modulates the functioning of local immune system in the colon. BanLec immunostimulatory/immunomodulatory potential in the colon described in this study can serve as a platform for its further exploration in prevention of pathologies raised due to inappropriate cell-mediated immune response as well as in the prevention of pathogen invasion via the colon.

5. Conclusion

rBanLec even in low dosage could affect local immune response in the colon. The power of rBanLec to stimulate both cellular and humoral immune responses in the colon, as well as to enhance antimicrobial activity, implies that rBanLec could be a valuable tool firstly in the prevention of pathogen invasion via the colon, and also in the prevention of other pathologies caused by an inadequate immune response. Furthermore, the fact that rBanLec initiates locally a balanced self-limiting immune response is extremely important for the safety of its application. Its application as a therapeutic requires deeper and broader studies on its mechanisms of action because there are numerous examples showing that the immune system function is not the same in health and disease. Finally, based on the high structural and functional similarity between rBanLec and its naturally occurring counterpart, it is very likely that phenomena described herein take place upon consumption of bananas.

Acknowledgements

Authors thank Slobodan Zivkovic for technical assistance. This research has been supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant No. 172049).

M. Gavrovic-Jankulovic and M. Stojanovic acknowledge the COST Action CM-1102 MultiGlycoNano.

REFERENCES

- Calder, P. C., & Kew, S. (2002). The immune system: A target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88, s165–s176.
- Cheng, A. H. K., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2009). *Musa acuminata* (Del Montebanana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 16, 594–600.

- Christensen, H. R., Frøkiær, H., & Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 168, 171–178.
- Daniel, J. C., & Cristina, M. T. (2010). Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 10, 479–489.
- Dimitrijevic, R., Stojanovic, M., Micic, M., Dimitrijevic, L. J., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2012). Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. *Journal of Functional Foods*, 4, 636–641.
- Droeser, R. A., Hirt, C., Eppenberger-Castori, S., Zlobec, I., Viehl, C. T., Frey, D. M., Nebiker, C. A., Rosso, R., Zuber, M., & Amicarella, F. (2013). High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS ONE*, 8(5), e64814.
- Feng, T., Qin, H., Wang, L., Benveniste, E. N., Elson, C. O., & Cong, Y. (2011). Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6313–6318.
- Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Reviews. Immunology*, 14, 631–639.
- Gavrovic-Jankulovic, M., Poulsen, K., Brckalo, T., Bobic, S., Linder, B., & Petersen, A. (2008). 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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 929–941.
- Gibson, P. R., Anderson, R. P., Mariadason, J. M., & Wilson, A. J. (1996). Protective role of the epithelium of the small intestine and colon. *Inflammatory Bowel Disease*, 2, 279–302.
- Ince, M. N., Elliott, D. E., Setiawan, T., Metwali, A., Blum, A., Chen, H. L., Urban, J. F., & Weinstock, J. V. (2009). Role of T cell TGF- β signaling in intestinal cytokine responses and helminthic immune modulation. *European Journal of Immunology*, 39(7), 1870–1878.
- Izcue, A., Coombes, J. L., & Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology*, 27, 313–398.
- Jarry, A., Bossard, C., Bou-Hanna, C., Masson, D., Espaze, E., Denis, M. G., & Laboisse, C. L. (2008). Mucosal IL-10 and TGF- β play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN- γ -mediated epithelial damage in human colon explants. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(3), 1132–1142.
- Kolios, G., Valatas, V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: A universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113, 427–437.
- Koshte, V. L., van Dijk, W., van der Stelt, M. E., & Aalberse, R. C. (1990). Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochemical Journal*, 272, 721–726.
- Lavelle, E. C., Grant, G., Puzstai, A., Pfuller, U., & O'Hagan, D. T. (2001). The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology*, 102, 77–86.
- Long Yan Fong, F., Kirjavainen, P., Ho Yee Wong, V., & El-Nezami, H. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *Journal of Functional Food*, 13, 71–79.
- Majee, S. B., & Biswass, G. (2013). Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. *Journal of Medicinal Plant Research*, 7(47), 3444–3451.
- McLntyre, T. M., Klinman, D. R., Rothman, P., Lugo, M., Dasch, J. R., Mond, J. J., & Snapper, M. C. (1993). Transforming growth factor β 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177, 1031–1103.
- Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M. G., Lee, W. Y., Kolegraff, K., Capaldo, C. T., Beeman, N., Addis, C., Gerner-Smidt, K., Neumaier, I., Skerra, A., Li, L., Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2010). Interferon- γ regulates intestinal epithelial homeostasis through converging β -catenin signaling pathways. *Immunity*, 32, 392–402.
- Naydenov, N. G., Baranwal, S., Khan, S., Feygin, A., Gupta, P., & Ivanov, A. I. (2013). Novel mechanism of cytokine-induced disruption of epithelial barriers: Janus kinase and protein kinase D-dependent downregulation of junction protein expression. *Tissue Barriers*, 1(4), e25231.
- Orlando, A., Refolo, M. G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V., & Russo, F. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutrition and Cancer*, 64(7), 1103–1111.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(3), 141–153.
- Peumans, W. J., Proost, P., Swennen, R. L., & Van Damme, E. J. M. (2002). The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiology*, 130, 1063–1072.
- 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. (2000). Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta*, 211, 546–554.
- Preidis, G. A., Hill, C., Guerrant, R. L., Ramakrishna, B. S., Tannock, G. W., & Versalovic, J. (2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. *Gastroenterology*, 140(1), 8–14.
- Reddy, B. S., & Rivenson, A. (1993). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Research*, 53, 3914–3918.
- Rigby, R. J., Knight, S. C., Kamm, M. A., & Stagg, A. J. (2004). Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. *Clinical & Experimental Immunology*, 139(2), 245–256.
- Sampath Kumar, K. P., Bhowmik, D., Duraivel, S., & Umadevi, M. (2012). Traditional and medicinal uses of banana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(3), 51–63.
- Sandle, G. I. (1998). Salt and water absorption in the human colon: A modern appraisal. *Gut*, 43, 294–299.
- Souza, M. A., Carvalho, F. C., Ruas, L. P., Ricci-Azevedo, R., & Roque-Barreira, M. C. (2013). The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate Journal*, 30, 641–657.
- Stojanovic, M. M., Zivkovic, I. P., Petrusic, V. Z., Kosec, D. J., Dimitrijevic, R. D., Jankov, R. M., Dimitrijevic, L. A., & Gavrovic-Jankulovic, M. D. (2010). In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform result in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *International Immunopharmacology*, 10, 120–129.
- Takeda, J., Nakase, H., Namba, K., Inoue, S., Ueno, S., Uza, N., & Chiba, T. (2009). Upregulation of T-bet and tight junction molecules by *Bifidobacterium longum* improves colonic inflammation of ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Disease*, 15(11), 1617–1618.
- Walace, J. L., & Miller, J. S. M. (2000). Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. *Gastroenterology*, 119, 512–520.

Wong, J. H., & Ng, T. B. (2006). Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with immunostimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 234–243.

Zocco, M. A., dal Verme, L. Z., Cremonini, F., Piscaglia, A. C., Nista, E. C., Candelli, M., Novi, M., Rigante, D., Cazzato, I. A., Ojetti, V., & Gasbarrini, A. (2006). Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(11), 1567–1574.

RESEARCH ARTICLE

Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin

Emilija Marinkovic¹, Radmila Djokic¹, Ivana Lukic¹, Ana Filipovic¹, Aleksandra Inic-Kanada², Dejana Kosanovic¹, Marija Gavrovic-Jankulovic³, Marijana Stojanovic^{1*}

1 Department of Research and Development; Institute of Virology, Vaccines and Sera—TORLAK; Belgrade, Serbia, **2** OCUVAC—Center of Ocular Inflammation and Infection, Laura Bassi Centres of Expertise; Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology; Medical University of Vienna; Vienna, Austria, **3** Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade; Belgrade, Serbia

* mstojanovic@torlak.rs



OPEN ACCESS

Citation: Marinkovic E, Djokic R, Lukic I, Filipovic A, Inic-Kanada A, Kosanovic D, et al. (2017) Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. PLoS ONE 12(2): e0172469. doi:10.1371/journal.pone.0172469

Editor: Alexandre Boissonnas, "INSERM", FRANCE

Received: October 13, 2016

Accepted: February 6, 2017

Published: February 24, 2017

Copyright: © 2017 Marinkovic et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was funded by the Ministry of Education, Science, and Technological Development of the Republic of Serbia (grant number 172049) (<http://www.mpn.gov.rs/>). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

We demonstrated that a recombinant banana lectin (rBanLec), which structural characteristics and physiological impacts highly resemble those reported for its natural counterparts, binds murine peritoneal macrophages and specifically modulates their functional characteristics. By using rBanLec in concentrations ranging from 1 µg to 10 µg to stimulate resident (RMs) and thioglycollate-elicited (TGMs) peritoneal macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice, we have shown that effects of rBanLec stimulation depend on its concentration but also on the functional status of macrophages and their genetic background. rBanLec, in a positive dose-dependent manner, promotes the proliferation of TGMs from both BALB/c and C57BL/6 mice, while its mitogenic influence on RMs is significantly lower (BALB/c mice) or not detectable (C57BL/6 mice). In all peritoneal macrophages, irrespective of their type and genetic background, rBanLec, in a positive dose dependent manner, enhances the secretion of IL-10. rBanLec stimulation of RMs from both BALB/c and C57BL/6 resulted in a positive dose-dependent promotion of proinflammatory phenotype (enhancement of NO production and IL-12 and TNFα secretion, reduction of arginase activity). Positive dose-dependent skewing toward proinflammatory phenotype was also observed in TGMs from C57BL/6 mice. However, the enhancement of rBanLec stimulation promotes skewing of TGMs from BALB/c mice towards anti-inflammatory profile (reduction of NO production and IL-12 secretion, enhancement of arginase activity and TGFβ and IL-4 secretion). Moreover, we established that rBanLec binds oligosaccharide structures of TLR2 and CD14 and that blocking of signaling via these receptors significantly impairs the production of TNFα and NO in BALB/c macrophages. Since the outcome of rBanLec stimulation depends on rBanLec concentration as well as on the functional characteristics of its target cells and their genetic background, further studies are needed to investigate its effects under physiological and specific pathological conditions.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Macrophages represent large, morphologically and functionally heterogeneous, immune cell population that is often regarded as a bridge between innate and adaptive immunity [1, 2]. As part of innate immunity, they provide a first line of defense against invading pathogens due to their inherent abilities to phagocytose pathogens and mount various anti-microbial mechanisms. Instead, by acting as antigen-presenting cells, they exert an important role in initiation and shaping of the adaptive immune response [3]. The mode of macrophages activation, their previous immunological experience and surrounding milieu highly influence their functional characteristics [4–8]. Moreover, genetic background-dependent qualitative and quantitative differences in the macrophage responses to external stimuli are reported [9].

Depending primarily on their morphological characteristics, peritoneal macrophages, most often used as a model system in macrophages-related functional studies, are divided into two groups assigned as large peritoneal macrophages (LPMs) and small peritoneal macrophages (SPMs). Beside different morphology, a difference in phenotype and functional characteristics of LPMs and SPMs was marked as well [8, 10]. Although the SPMs are generally considered as more responsive to proinflammatory stimulation, it is difficult to associate a specific type of a response exclusively with LPMs or SPMs as the response to (re)stimulation depends also on genetic background and environment.

There are various ways to activate macrophages; one of the most important ways is the stimulation of macrophages via Toll-like receptors (TLRs), which are able to bind specific evolutionary conserved molecules associated with groups of pathogens, known as pathogen-associated molecular patterns [1]. Sensing of bacterial antigens such as lipopeptides or lipopolysaccharides (LPS) via TLR2 or TLR4, respectively, can initiate the production of bactericidal molecules (reactive oxygen and nitrogen species; ROS and RNS, respectively) and proinflammatory cytokines (IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6), and enhance antigen-presenting capabilities of macrophages [11].

As macrophages are part of innate and adaptive immune responses, any bioactive substance able to modulate their functional characteristics can exert strong influence on the characteristics of the immune response. Lectins of various origins are shown to be potent modulators of macrophages' functioning due to their structural and functional characteristics. They exert modulatory influence upon binding to oligosaccharide motives within structures expressed on the surface of macrophages, including TLRs [12]. Various outcomes of lectin–macrophage interaction have been reported: (i) stimulation of nitric oxide (NO) production as well as production of proinflammatory cytokine IL-12, followed by secretion of IL-10 [13, 14], (ii) creation of pro-Th1 milieu characterized by the enhanced secretion of IFN- γ [15,16,17] and, (iii) creation of pro-Th2 milieu characterized by the enhanced secretion of IL-5 [18].

Banana lectin (BanLec), a mannose-specific lectin that belongs to the jackalin superfamily, is among the lectins which are shown to exert immunomodulatory activity [19–25]. There are several naturally occurring and isolated BanLec isoforms. BanLec produced in *E. coli* by recombinant technology and assigned as recombinant BanLec (rBanLec), possesses structural and functional characteristics that highly resemble those reported for its natural counterparts. The alignment of rBanLec sequence to the one of BanLec isolated from natural sources shows a high degree of similarity (~95%) with particular emphasize on the preservation of sequences coding rBanLec's binding loops [19]. Both BanLec and rBanLec are reported to be a potent mitogen of human and mouse T cells [19, 21, 22] and a promoter of proinflammatory cytokines expression within splenocytes [21, 22]. It is also reported that BanLec initiated enhancement of NO production by macrophages [23], but its influence on macrophages is not extensively evaluated.

In this paper we first evaluated the influence of rBanLec stimulation on the functional characteristics of murine peritoneal resident (RMs) and thioglycollate-elicited macrophages (TGMs) in two genetically different inbred mouse strains BALB/c and C57BL/6; second, we identified rBanLec target membrane structures, specifically TLR2 and CD14; and third, the functional effects of these interactions were examined in fine detail.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments were performed according to a protocol approved by the Ethics Committee for the Welfare of Experimental Animals of Institute of Virology, Vaccines and Sera–Torlak (approval no. 20/2016). All experiments conformed to the Serbian laws and European regulations on animal welfare. Every effort was made to minimize animal suffering. Prior collection of peritoneal macrophages, mice were euthanized by cervical dislocation. We did not observe any unexpected deaths of animals during this study.

rBanLec

rBanLec used in this study is 6His-tagged protein [19]. It was produced in *E. coli* SG13009 [pREP4] transformed with expression vector pQE70 (Qiagen, Hilden, Germany), which contained BanLec-encoding insert (GenBank accession number EU055641). The protocol for isolation of total RNA from banana pulp (*Musa acuminata*, Cavendish) and amplification of the BanLec gene is given in Gavrovic-Jankulovic et al., 2008 [19]. Production of rBanLec was performed according to already described procedures [24]. All rBanLec preparations were determined by limulus amoebocyte lysate (Charles River Laboratories, USA) assay to contain an endotoxin contamination of less than 0.5 ng/ml.

Animals

The research was conducted on BALB/c mice (10–12 weeks old females). All mice were purchased from Institute of medical research at the Military medical academy, Belgrade, Serbia. Animals were housed at the Animal Facility of the Institute of Virology, Vaccines and Sera “Torlak”, kept at a temperature of 21°C under a 12 h:12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to water and food. Health status (food and water intake, body weight measurement) of animals was monitored daily by trained animal care staff.

C57BL/6 mice (10–12 weeks old females) were also used but only for specific experiments in this study. As it is already known that L-arginine metabolism and profile of secreted cytokines are highly dependent on the genetic background [9] we decided to evaluate the characteristics of L-arginine metabolism (NO production by nitric oxide synthase (NOS) and urea production by arginase) and cytokine production upon specific BanLec stimulation in BALB/c (Th2-prone) and age-matched C57BL/6 (Th1-prone) mice.

Macrophages collection

Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of mice. RMs, used as a model system for macrophages under resting conditions, were isolated by washing the peritoneal cavity with 5 ml of sterile ice-cold phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. Individual cell suspensions were washed 2 times with RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS; PAA, Pasching, Austria) (centrifugation at 300 x g, 10 min at 4°C). TGMs, also known as inflammatory macrophages, were obtained in the same manner from mice that were intraperitoneally injected with 1 ml of sterile 3% thioglycollate medium

(Torlak, Belgrade, Serbia) 4 days earlier. The viability of these cell preparations, as determined by trypan blue exclusion, was greater than 95%.

Cell culture

Aliquots of RMs and TGMs were diluted to the final concentration of 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium and plated to 24-well flat-bottomed tissue culture plates (1 ml of each suspension per well, 1×10^6 cells/well). Then, the cell suspensions are incubated at 37°C, 5% CO₂ for 2h, allowing the cells to adhere. Non-adherent cells were discarded by washing the plates twice with warm RPMI 1640 medium.

RMs and TGMs were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol, 100 μg/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin, in the presence of different concentrations of rBanLec (1, 5 or 10 μg/ml) or without any stimulation (incubation at 37°C, 5% CO₂). After 48h incubation, culture supernatants of stimulated and non-stimulated RMs and TGMs were collected and frozen at -70°C until assayed for cytokines.

For NO, arginase and myeloperoxidase (MPO) assays, the cells were seeded (1×10^6 cells/ml, 100 μl per well) in a flat bottom 96-well tissue culture plates, left the cells for 2h to adhere and cultured in the absence or in the presence of rBanLec (1, 5 and 10 μg/ml). The culture supernatants were collected after 48h of incubation and immediately analyzed for NO. Subsequently, 96-well plates were rinsed twice with warm PBS and centrifuged for 5 min at 250 x g for each wash/rinse step. Cells were lysed with 0.1% Triton X-100 / PBS containing protease inhibitors (50 μl/well) and plates were shaken gently for 30 min at room temperature (RT; 23±1°C). The 96-well culture plates with the obtained cell lysates were frozen at -20°C until assayed for arginase and MPO activity.

Additional 96-well tissue culture plates were seeded with RMs and TGMs (100 μl/well, 1×10^6 cell/ml), stimulated and incubated in the same way as above mentioned and used individually for proliferation and nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assays.

Proliferation assay

Proliferative response of RMs and TGMs to rBanLec stimulation was assessed using Cell Counting Kit-8 reagent (CCK-8; Sigma). CCK-8 (10 μl/well) was added into cell cultures upon 48h long incubation, and the cells were incubated for additional 4h. Reactions were stopped by the addition of 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (100 μl/well), and absorbance values were measured at wavelength of 450/650 nm ($A_{450/650}$) using a spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finland).

The number of viable macrophages per well was calculated using a standard curve $A_{450/650} = f(\text{number of cells})$. Discrete pool of non-stimulated macrophages was used as standard after counting in the presence of trypan blue (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Standard suspension was plated in serial dilutions prior to addition of CCK-8 and further treated identically as the experimental wells.

A proliferation index (PI) for each specifically stimulated sample was calculated as the ratio of number of macrophages per well present in stimulated (S) to number of corresponding (RMs or TGMs) viable macrophages per well incubated without stimulation (S₀), such that $PI = S/S_0$.

MPO assay

Enzymatic activity of MPO was measured in cell lysates of rBanLec-stimulated and non-stimulated RMs and TGMs (section *Cell culture*). This assay is based on the oxidation of *o*-phenylenediamine (Sigma) by MPO. Once the 96-well tissue culture plates with cell lysates were

thawed at 37°C, 50 µl of substrate solution (1 mg/ml *o*-phenylenediamine, 0.01% hydrogen peroxide, 50 mM citric acid, pH 5) was added into the wells. The reaction was stopped by the addition of 1 M sulfuric acid and the absorbance was measured at wavelength 492/620 nm ($A_{492/620}$) using an ELISA reader (Multiskan Ascent).

NBT reduction assay

Intracellular generation of superoxide anion (O_2^-) was measured by NBT reduction assay [26]. after 48h long incubation RMs and TGMs with rBanLec in discrete concentrations or without any stimulation.

NO assay

Activity of NOS was measured via the production of NO. Nitrite, a stable NO metabolite, was quantified in the culture supernatants by Griess reagent [27].

Arginase activity

Arginase activity was determined for cell lysates of rBanLec-stimulated and non-stimulated RMs and TGMs (section *Cell culture*) by measuring the concentration of urea, a conversion product of L-arginine, as previously described [28].

Cytokine assay

The production of IL-4, IL-10, IL-12, TNF α and TGF β in culture supernatants was determined by sandwich ELISA, using commercially available monoclonal Abs, as it is described in Marin-kovic et al. [24].

Identification of rBanLec-targeted structures by Western blot

The mouse peritoneal TGMs (5×10^6 cells/ml) were washed twice with ice-cold PBS, pelleted, and lysed for 30 min, 4°C in 300 µl of buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40 (RIPA lysis buffer; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and protease inhibitors. After centrifugation at 14,000 x g (15 min at 4°C), supernatants containing whole cell extract were mixed with SDS-sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, and 0.04% bromophenol blue). 30 µl of each sample was loaded onto 9% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAG) and the electrophoresis (SDS-PAGE) performed with a MiniProtean electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 120 V for 2h. After SDS-PAGE, proteins were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Serva, Heidelberg, Germany). Then, the membrane was saturated in 3% skimmed milk/PBS 18 h at 4°C. After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, the membrane was incubated with 10 µg/ml of biotinylated rBanLec prepared in 3% skimmed milk/PBS for 1h. The proteins were detected using extrAvidine-alkaline phosphatase/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/NBT system.

Western blot analysis was also performed to rule out the presence of TLR2, TLR4 and CD14 in lysates used in ELISA. TLR2-, TLR4- and CD14-specific monoclonal antibodies were used in these experiments (Biolegend, San Diego, CA, USA).

Cell immunostaining and confocal microscopy

Isolated peritoneal RMs and TGMs were centrifuged at 300 x g, 10 min at 4°C and resuspended in Ca²⁺/Mg²⁺-free Hank balanced salt solution to the final concentration of 1×10^5 cells/ml. For each cell suspension was prepared a cytospin slide (centrifugation 250 x g, 10

min, onto glass slides coated with poly-L-lysine, dried for 1 h at RT, fixed in cold acetone for 10 min, and stored at -20°C). For staining, slides were rehydrated for 5 min in PBS and then blocked with 3% skimmed milk in PBS for 30 min. Then, slides were incubated individually with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-TLR2-FITC Ab (Biolegend) or anti-TLR4-FITC Ab (Biolegend), anti-CD14-FITC Ab (Biolegend) and the appropriate isotype controls (diluted in 3% skimmed milk in PBS), 18 h at 4°C . After three washes in PBS, biotin-labeled rBanLec was added to each slide (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dissolved in 3% skimmed milk/PBS). The slides were incubated 2 h at RT and after three washes with PBS, the slides were stained with streptavidine-rhodamineB (diluted 1:60 in 3% skimmed milk/PBS; Sigma) and incubated for 1 h at RT. After rinsing in PBS, the slides were mounted with Fluorescent Mounting Medium (Dako, Glostrup, Denmark). Images were captured by inverted confocal microscope Zeiss Laser scanning system LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany) and processed with Zeiss LSM Image Browser software.

ELISA-based testing of rBanLec binding to TLR2, TLR4 and CD14

Lysates of TGMs were prepared using RIPA lysis buffer (ThermoFisher Scientific) with protease inhibitors and, were added to the 96-well microtiter plates (MaxiSorp, Nunc) previously coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-TLR2 Ab, anti-TLR4 Ab and anti-CD14 Ab, separately (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 18 h at 4°C). Following four washes with PBS after each incubation step, biotin-labeled rBanLec (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), previously incubated with and without 0.5 M methyl- α -D-mannopyranoside was then added to the wells. Individual interactions of rBanLec with TLR2, TLR4 and CD14 were visualized with extrAvidin-alkaline phosphatase/p-nitrophenyl phosphate system (Sigma). The absorbance was measured at wavelength of 405 nm (A_{405}).

Macrophages culturing in the presence of TLR2- and CD14-specific blocking antibodies (neutralizing test)

RMs and TGMs (1×10^6 cells/well, 24-well flat-bottomed tissue culture plates) were pre-incubated (1 h at 37°C) separately with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-TLR2 (clone T2.5, Biolegend) and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD14 (clone M14-23, Biolegend) monoclonal Abs before stimulation with different concentrations of rBanLec (0, 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Used monoclonal Abs have been declared to block signaling via TLR2 and CD14, respectively. After 48 h incubation at 37°C , 5% CO_2 , culture supernatants of rBanLec-stimulated and non-stimulated RMs and TGMs were collected and frozen at -70°C until assayed for cytokines (procedure as described in section *Cytokine assay*). Aliquots of each supernatant (100 μl) were immediately tested for NO (procedure as described in section *NO assay*).

RMs and TGMs stimulated individually with peptidoglycan (PEPG; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LPS (100 ng/ml; agonists for TLR2 and TLR4/CD14, respectively) were used as a positive control of macrophages activation.

Statistical analysis

The results are presented as mean value \pm standard error (SE) calculated for at least three independent measurements. The statistical significance of the observed differences was evaluated using one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Results

rBanLec acts as a mitogen for RMs and TGMs

rBanLec, in concentrations ranging from 1 to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, induced proliferation of RMs and TGMs from BALB/c mice. Viable cells counts for both types of macrophages upon rBanLec

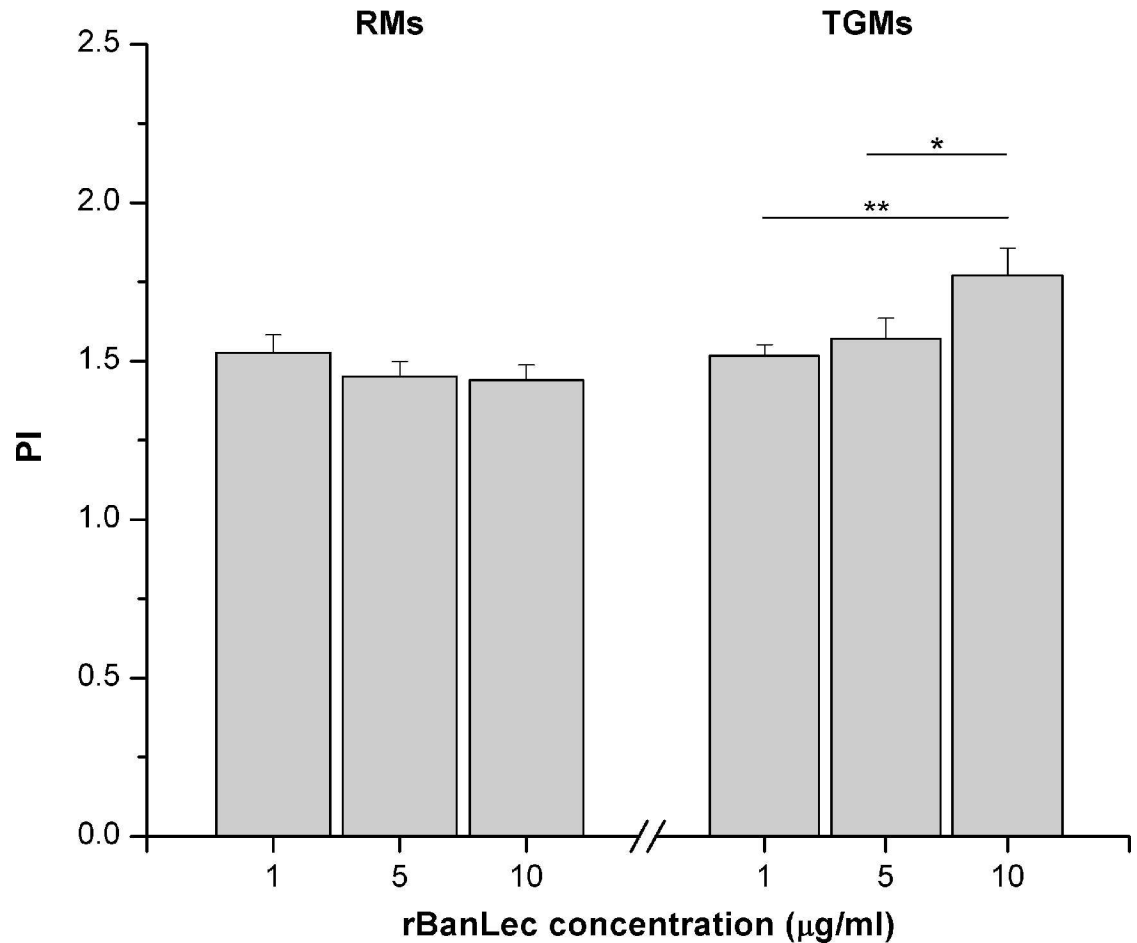


Fig 1. Proliferation index (PI) of rBanLec-stimulated peritoneal RMs and TGMs from BALB/c mice. Macrophages were incubated without any stimulation or with 1, 5 and 10 µg/ml rBanLec. Number of viable cells was determined by CCK-8 assay after 48h long incubation and used for PI calculations. The results were presented as mean PI ± SE. The significance of the observed differences was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($P < 0.05^*$, $P < 0.005^{**}$, $P < 0.0001^{***}$). Solid lines indicate compared groups.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g001

stimulation were significantly increased in comparison with the corresponding non-stimulated culture ($P < 0.05$ for RMs and $P < 0.005$ for TGMs).

Within tested range of concentrations, rBanLec did not significantly influence the proliferation intensity of RMs. On the contrary, TGMs showed a positive, dose-dependent, mitogenic-like response to rBanLec stimulation ($P < 0.005$ for 10 µg/ml vs. 1 µg/ml, $P < 0.05$ for 10 µg/ml vs. 5 µg/ml; Fig 1). Positive dose-dependent mitogenic-like influence of rBanLec on TGMs was confirmed in C57BL/6 mice (S1 Fig)

rBanLec alters MPO activity and intensity of superoxide anions generation in macrophages

rBanLec in concentrations ranging from 1 to 10 µg/ml in RMs and TGMs cultures influenced the MPO activity and intensity of O_2^- production (Fig 2). Positive correlation between rBanLec stimulatory concentration and MPO activity was marked in both RMs and TGMs cultures (Fig 2A). Results of NBT reduction assay showed that macrophages, irrespective to their

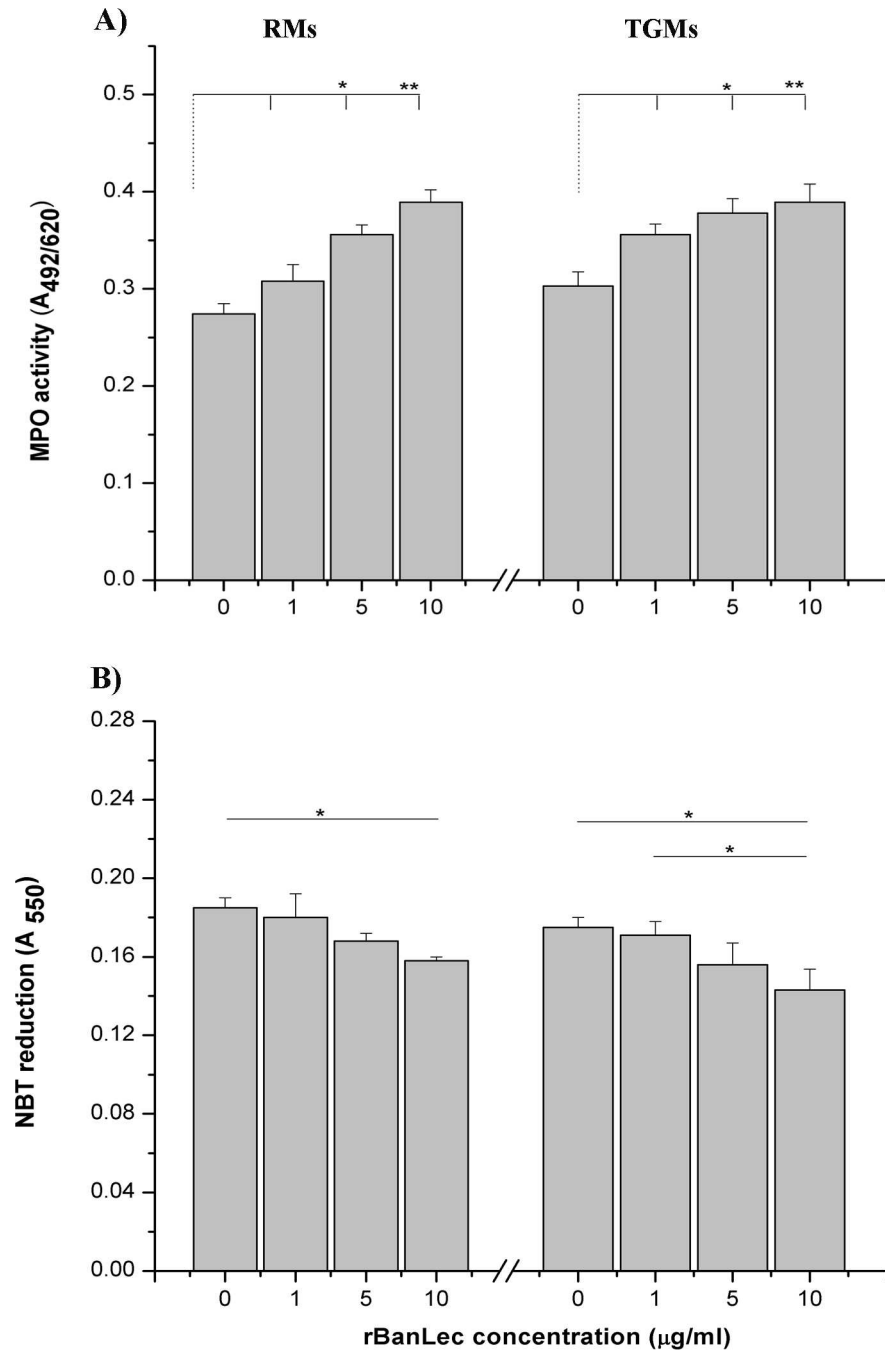


Fig 2. Activity of MPO (A) and reduction of NBT (B) in peritoneal RMs and TGMs from BALB/c mice stimulated with 1, 5 and 10 µg/ml rBanLec or incubated without any stimulation for 48h. The bars represent mean values of absorbance (A_{492/620} or A₅₅₀) ± SE. Statistical significance of the observed differences was evaluated using one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test (p < 0.05*, p < 0.005**, p < 0.0001***). Solid lines indicate compared groups.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g002

activation status, produced less amount of O₂⁻ upon rBanLec stimulation. The highest levels of O₂⁻ were recorded in non-stimulated RMs and TGMs cultures and in rBanLec-stimulated cultures its level negatively correlated to the applied rBanLec concentration (Fig 2B).

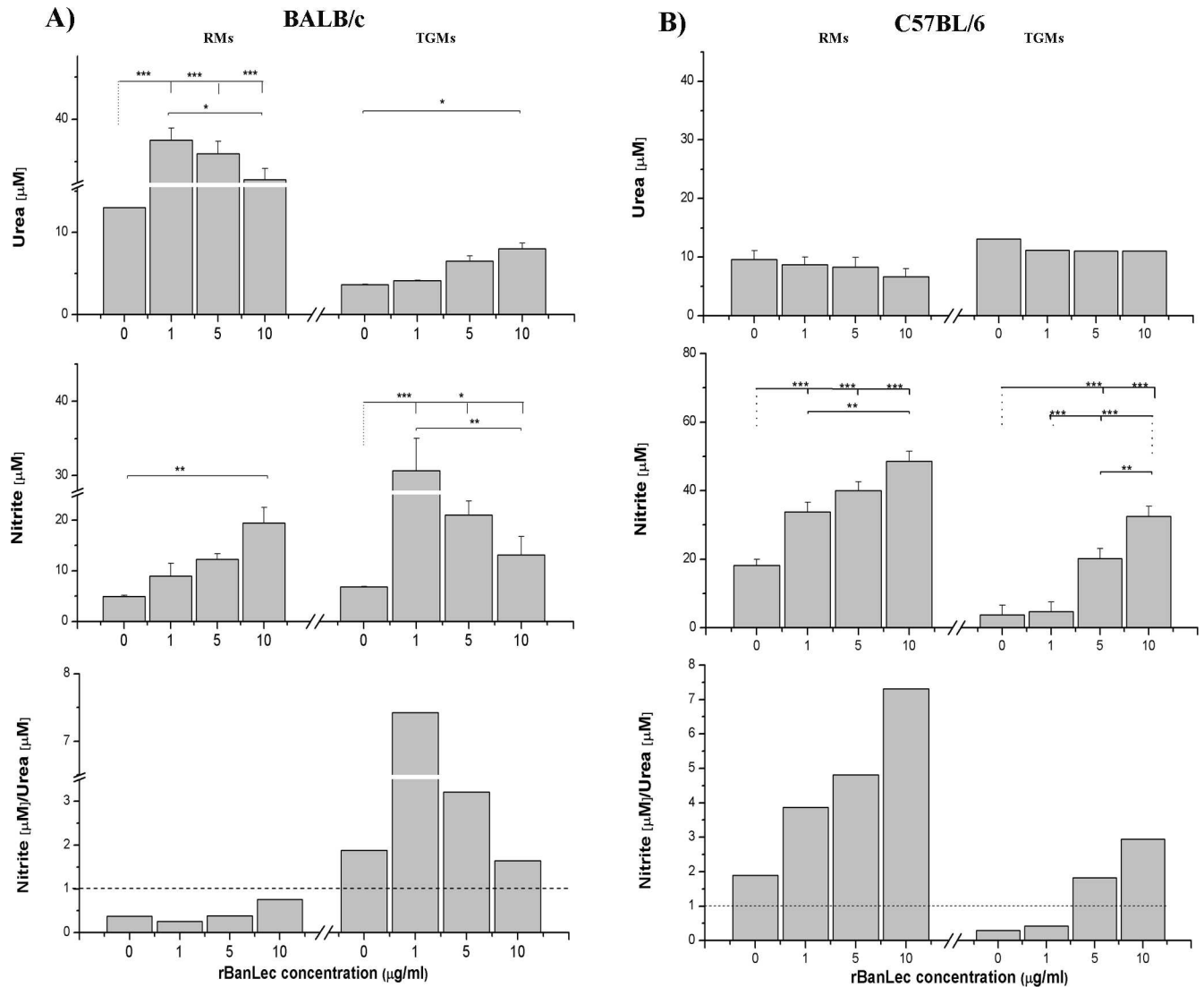


Fig 3. Activity of arginase and NO production in peritoneal RMs and TGMs from (A) BALB/c and (B) C57BL/6 stimulated with 1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec or incubated without any stimulation for 48h. Arginase activity being assessed via measuring the production of urea while NO production was measured using Griess reagents (proportional to the concentration of nitrates). Relationship between NOS (producer of NO) and arginase activities is presented as a ratio of concentrations of their products. Data are presented as mean concentration \pm SE. The significance of the observed differences was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($P < 0.05^*$, $P < 0.005^{**}$, $P < 0.0001^{***}$). Solid lines indicate compared groups.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g003

rBanLec influence on arginase activity and NO production depends on the activation status of macrophages

The influence of rBanLec on NO production and arginase activity were assessed on RMs and TGMs obtained from two genetically different mouse strains: BALB/c (Fig 3A) and C57BL/6 (Fig 3B).

rBanLec-stimulation significantly elevated arginase activity in all RMs from BALB/c mice cultures ($P < 0.001$ vs. non-stimulated RMs) and it was negatively correlated to the applied rBanLec concentration. On the contrary, a positive dose-dependent enhancement of NO production was marked with rBanLec-stimulated RMs from BALB/c mice ($P < 0.05$ for 10 $\mu\text{g/ml}$ vs. non-stimulated RMs). In TGMs from BALB/c mice, basal NO production was higher,

while arginase activity was lower in comparison to non-stimulated RMs (NO: $P < 0.05$, arginase: $P < 0.005$). Upon rBanLec stimulation, the highest arginase activity was recorded in TGMs stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec ($P < 0.05$ vs. non-stimulated TGMs), while NO production in the same culture was significantly lower comparing to the culture stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec ($P < 0.005$ 10 $\mu\text{g/ml}$ vs. both 1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$).

rBanLec, in the same concentration range, significantly enhanced NO production in both RMs and TGMs from C57BL/6 mice; the enhancement positively correlated with the applied rBanLec concentration. Contrary to the BALB/c macrophages, the enhancement of arginase activity upon rBanLec stimulation was not detected in both RMs and TGMs from C57BL/6 mice (Fig 3B). In addition to the analysis of dose-dependent influence of rBanLec on NOS and arginase activities, we also investigated the ratios of their activities within a particular culture in order to determine which enzyme activity is a dominant one. The obtained results showed that in all cultures of RMs from BALB/c mice the arginase dominated over the NOS activity while the opposite situations were recorded for RMs from C57BL/6 mice. In TGMs, NOS activity dominated over the activity of arginase in all cultures of TGMs from BALB/c mice and in TGMs from C57BL/6 mice stimulated with 5 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec.

rBanLec stimulation differently influences the cytokine secretion pattern in RMs and TGMs

To determine whether the treatment with different concentrations of rBanLec would promote RMs and TGMs from BALB/c and C57 BL/6 mice to produce cytokines, the supernatants of these cultures were analyzed (Fig 4). The constitutive production of IL-4, TNF α , TGF β , and IL-10 was comparable in RMs and TGMs from BALB/c mice, while constitutive production of IL-12 by TGMs was significantly higher in comparison to RMs ($P < 0.001$; Fig 4A). As depicted at Fig 4A, rBanLec stimulation exerted the opposite effects on the production of IL-4, IL-12 and TGF β in BALB/c RMs and TGMs. The production of effector cytokines (IL-4 and IL-12) in RMs from BALB/c mice were affected only upon stimulation with 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec—comparing to the non-stimulated RMs IL-4 secretion was diminished, while IL-12 secretion was enhanced ($P < 0.05$; Fig 4A). In all tested concentrations, rBanLec modulated the production of IL-4 and IL-12 in TGMs from BALB/c mice—a dose-dependent enhancement was marked in the case of IL-4 ($P < 0.05$ for 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec vs. non-stimulated TGMs and $P < 0.005$ for 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec vs. non-stimulated TGMs; Fig 4A), while constitutively high IL-12 production was reduced in a dose-dependent manner within rBanLec-stimulated cultures ($P < 0.05$ for 5 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec vs. non-stimulated TGMs; Fig 4A). Production of TGF β was enhanced in all BALB/c-originated rBanLec-stimulated cultures comparing to the non-stimulated corresponding cultures ($P < 0.05$). However, the comparison of TGF β concentrations recorded upon rBanLec stimulation of RMs from BALB/c mice showed negative correlation to the applied rBanLec concentration, while a positive correlation was marked in rBanLec-stimulated TGMs (Fig 4A). Further, rBanLec stimulation, in a positive dose-dependent manner, enhanced the production of IL-10 ($P < 0.01$ for all rBanLec-stimulated vs. corresponding non-stimulated; Fig 4A) and TNF α ($P < 0.05$ for 5 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec and 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec vs. corresponding non-stimulated; Fig 4A) in both RMs and TGMs from BALB/c mice. In BALB/c mice, the stimulatory influence on TNF α production was more pronounced in TGMs in comparison with RMs.

RMs and TGMs from C57BL/6 mice secreted the same levels of IL-10 and IL-12, while production of other tested cytokines was higher in TGMs cultures (Fig 4B). Besides, in both rBanLec-stimulated RMs and TGMs from C57BL/6 mice, a positive dose-dependent enhancement in secretion of cytokines was marked for all tested cytokines except in TNF α cultures (Fig 4B).

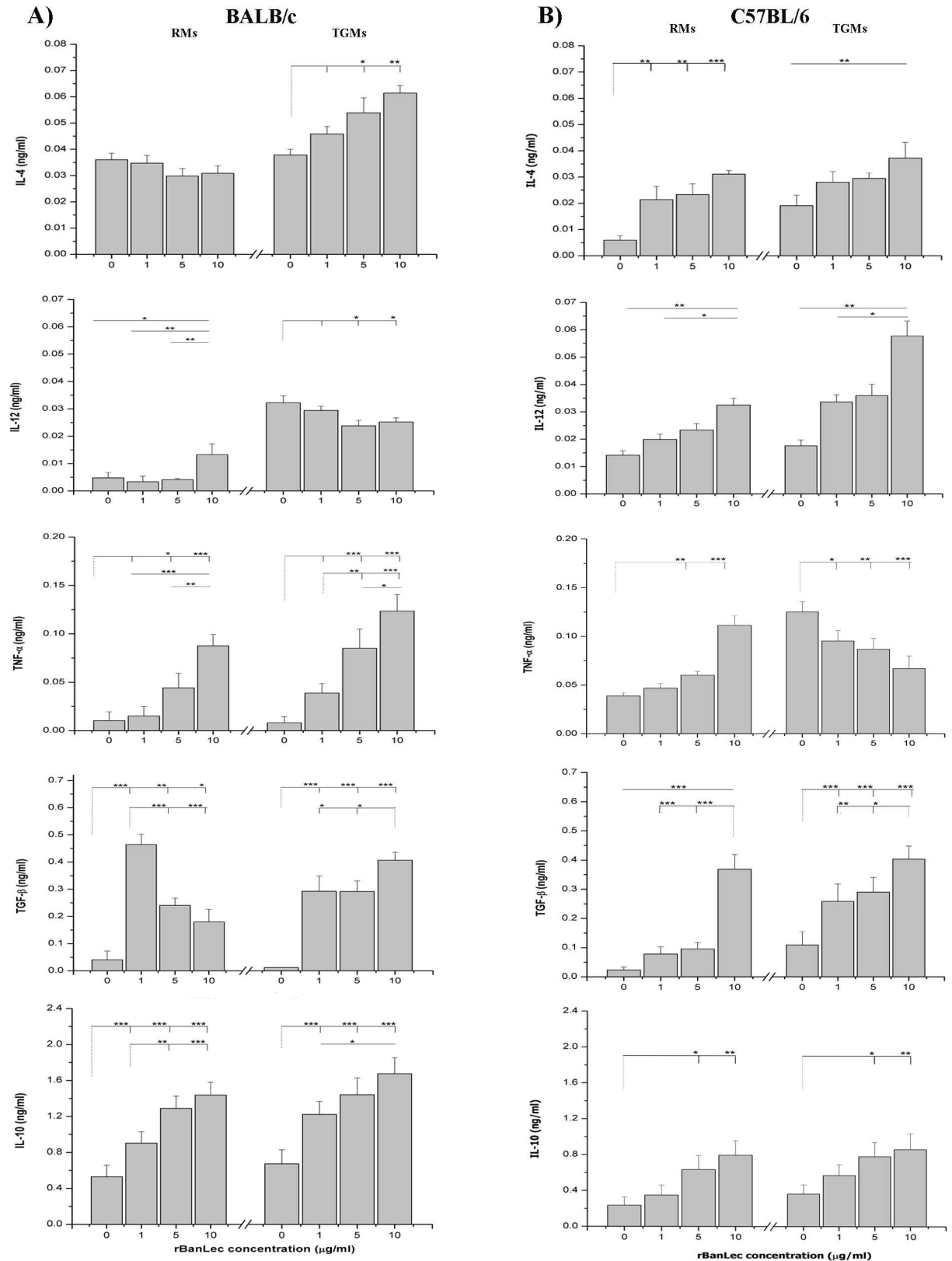


Fig 4. Production of IL-4, IL-12, TNF- α , TGF β and IL-10 by RMs and TGMs from (A) BALB/c and (B) C57BL/6 stimulated with 1, 5 and 10 μ g/ml rBanLec or incubated without any stimulation for 48h. Concentration of cytokines is determined in

supernatants by ELISA. All data are presented as mean concentration of cytokine \pm SE. The significance of the observed differences was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$, $p < 0.0001^{***}$). Solid lines indicate compared groups.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g004

Comparing to the corresponding non-stimulated cultures, the enhanced secretion of TNF α was recorded in RMs stimulated with 10 μ g/ml rBanLec ($P < 0.001$; Fig 4B), while the production of TNF α was diminished in all rBanLec-stimulated TGMs cultures from C57BL/6 mice ($P < 0.005$; Fig 4B).

rBanLec binds the oligosaccharide structures of TLR2 and CD14

To identify structure(s) on macrophages targeted by rBanLec we combined Western blot, ELISA-based testing and confocal microscopy. Preliminary experiment, where lysates of TGMs were resolved by reducing SDS-PAGE and assessed by Western blot for recognition by rBanLec, showed multiple-lane reactivity of rBanLec (S3 Fig). Confocal microscopy showed that rBanLec intensively co-localizes with TLR2 and CD14 but not with TLR4 on the surface of both RMs and TGMs (a representative staining is depicted in Fig 5).

To be able to confirm rBanLec binding to TLR2 and CD14 and to explore in fine detail the nature of these interactions, we performed ELISA where Abs specific for mouse TLR2 and CD14 were used as capture Abs and cell lysates prepared from TGMs as a source of TLR2 and CD14 (S4 Fig). We showed that rBanLec bound to TLR2 and CD14 and those interactions were inhibited by α -D-mannopyranosid (Fig 6). In line with the results of confocal microscopy, we did not mark any specific rBanLec binding to TLR4 in our ELISA system (Fig 6).

TLR2 and CD14 are involved in the production of cytokines and NO by rBanLec in macrophages

To determine whether the NO and cytokines (TNF- α and IL-10) production were mediated through rBanLec-activated TLR2 and (TLR4)/CD14 signaling pathways, we used blocking Abs to these receptors. Stimulation of RMs and TGMs with LPS or PEPG resulted in a dramatic increase of TNF- α and NO concentrations and the increases in TNF- α and NO production were inhibited when TLR2 and CD14 were blocked (Fig 7A, 7B, 7E and 7F, respectively). Inhibition of TLR2 on RMs with blocking Ab (Fig 7C) resulted in up to 55% reduction in TNF- α secretion depending on rBanLec concentrations (10 μ g/ml rBanLec, with vs. without blocking TLR2: $P < 0.001$). Preincubation of RMs with anti-CD14 Abs (Fig 7C) also affected the production of TNF- α (10 μ g/ml rBanLec, with vs. without blocking CD14: $P < 0.001$) in the same way as anti-TLR2 Abs. Reduced TNF- α production (ranging from 48–82%) was also confirmed in TGMs when blocking Abs to TLR2 (10 μ g/ml rBanLec, with vs. without blocking TLR2: $P < 0.05$) and CD14 (with vs. without blocking CD14: $P < 0.05$ for 5 μ g/ml rBanLec, $P < 0.005$ for 10 μ g/ml rBanLec) were applied separately, prior to stimulation with rBanLec (Fig 7D). Addition of the same blocking Abs did not affect rBanLec-stimulated IL-10 production in RMs cultures (Fig 7A), while a small reduction of IL-10 secretion was observed in the culture of rBanLec-stimulated TGMs blocked with anti-CD14 antibodies (Fig 7B; 10 μ g/ml rBanLec, without blocking CD14: $P < 0.05$).

Blocking of TLR2 or CD14 on RMs (Fig 7E) and TGMs (Fig 7F) significantly reduced the production of NO comparing to the corresponding rBanLec stimulated cultures without blocking Abs. The most prominent reduction in NO secretion (~70%) was observed in RMs stimulated with 10 μ g/ml of rBanLec (Fig 7E; with vs. without blocking TLR2 or CD14: $P < 0.001$) and TGMs stimulated with 1 μ g/ml of rBanLec (Fig 7F; with vs. without blocking TLR2 or CD14: $P < 0.001$).

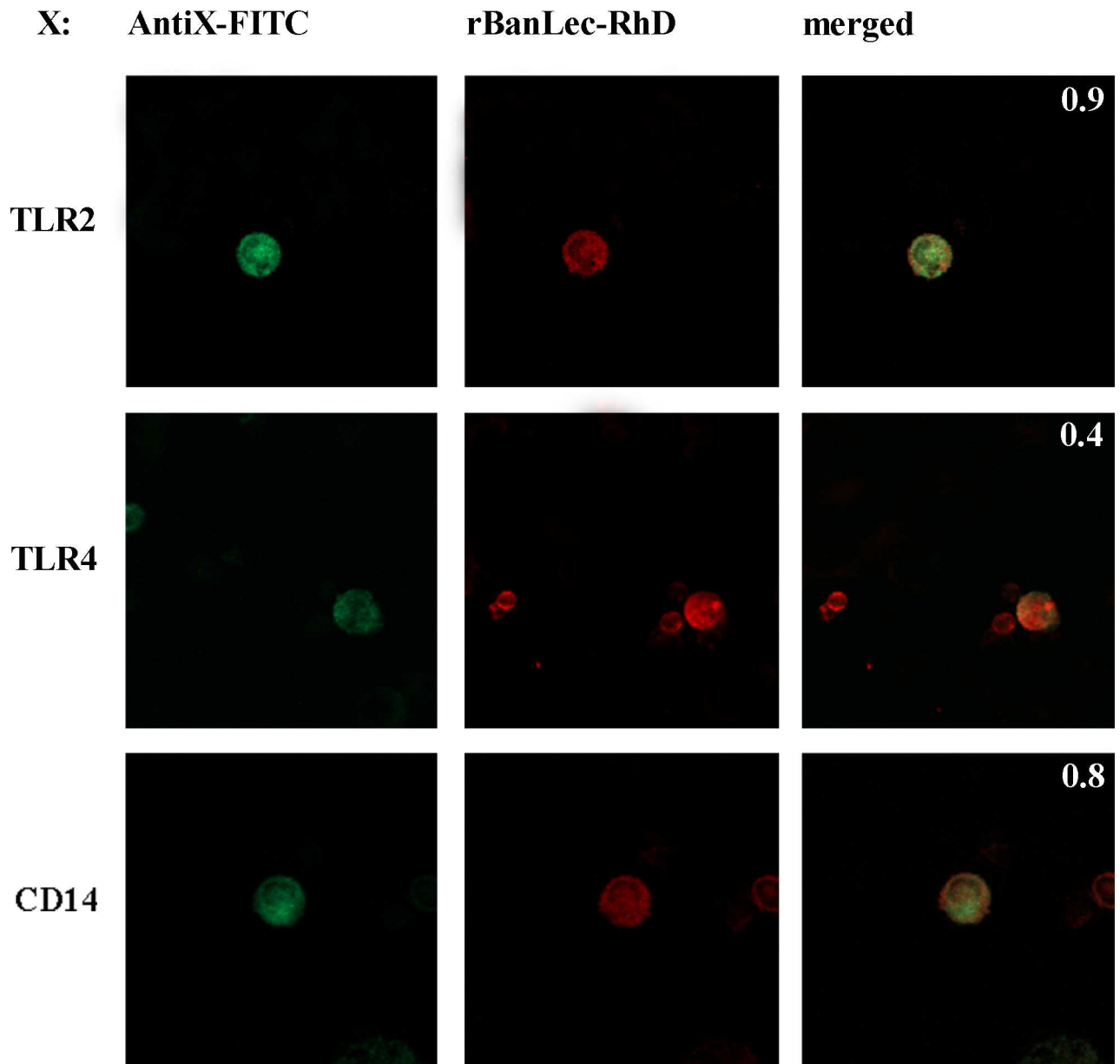


Fig 5. Co-localization of rBanLec binding with TLR2, TLR4 and CD14 expressed on peritoneal macrophages. TLR2, TLR4 and CD14 were detected with FITC-labeled monoclonal antibodies (green color): anti-TLR2-FITC antibody, anti-TLR4-FITC antibody and anti-CD14-FITC, respectively. rBanLec (biotin-labeled) was detected with streptavidin-rhodamineB (red color). Staining of the cells with adequate isotype control antibodies as well with streptavidin-rhodamine, rBanLec- streptavidin-rhodamineB and FITC-labeled antibodies are presented in [S2 Fig](#). The yellow color in the merged image and overlap coefficient (upper right corner of merged image) indicate the extent of the co-localization of rBanLec binding with TLR2, TLR4 and CD14.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g005

Discussion

In this paper, we present that rBanLec binds murine peritoneal macrophages and modulates their functional characteristics. To the best of our knowledge, this is the first study addressing the specific influence of any BanLec isoform on macrophages' functional characteristics depending on their previous experience, and showing BanLec interaction with TLR2 and CD14.

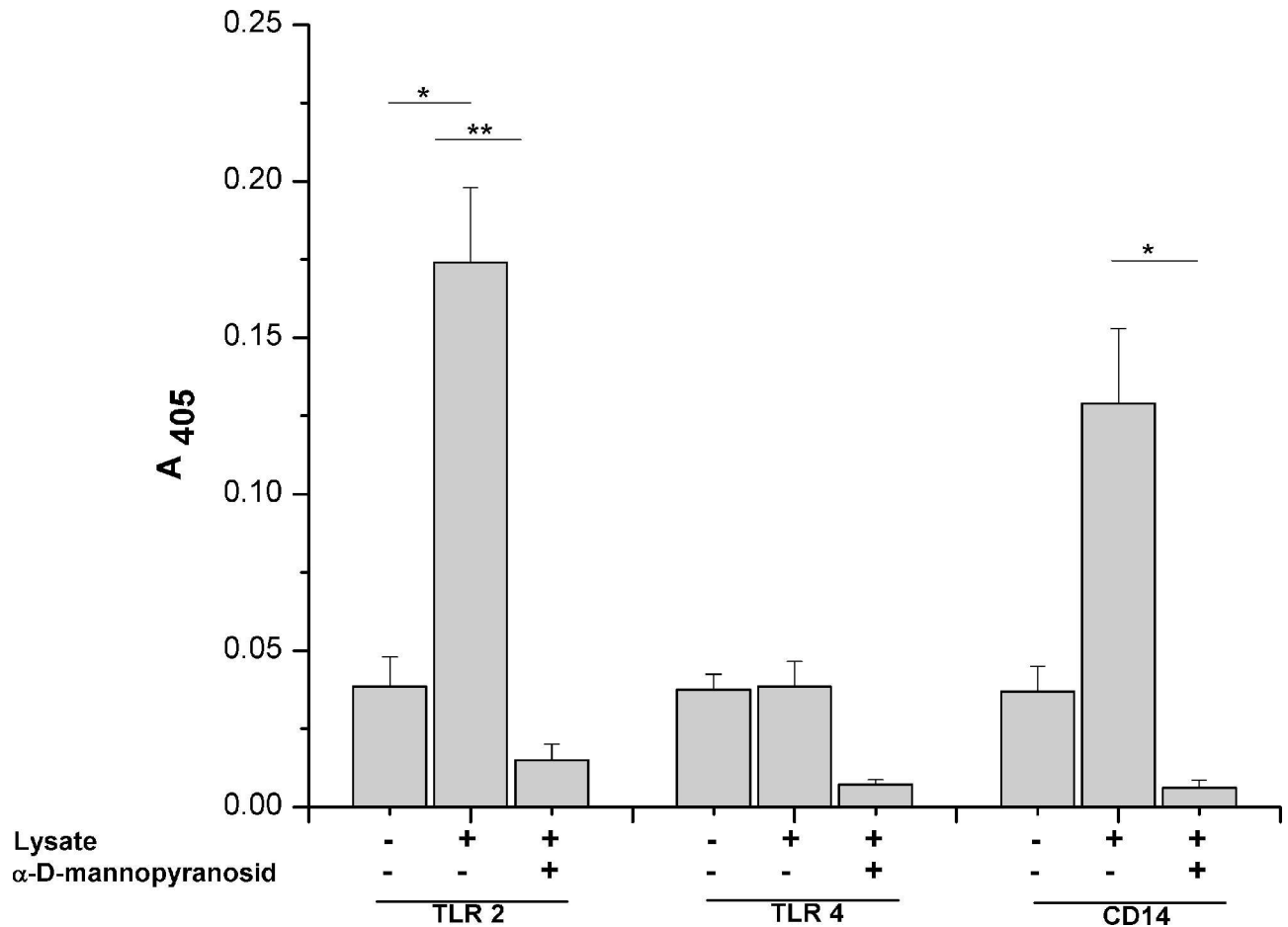


Fig 6. Binding of rBanLec to TLR2, TLR4 and CD14—the effect of methyl- α -D-mannopyranoside. TLR2, TLR4 and CD14 were extracted from TGMs lysate with specific monoclonal antibodies adsorbed onto microplate. Biotin-labeled rBanLec (10 μ g/ml), pre-incubated with or without 0.5 M methyl- α -D-mannopyranoside (α -D-Man), was added to the wells. Alkaline phosphatase / *p*-nitrophenylphosphate system was used for the visualization of rBanLec binding. Results are presented as mean $A_{405} \pm$ SE. The significance of the observed differences was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$, $p < 0.0001^{***}$). Solid lines indicate compared groups.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g006

Peritoneal macrophages can be enriched from peritoneal lavage fluid due to their high adhesive capacity. In that way macrophage population is significantly deprived from other cells population which reside peritoneal cavity (B cells, dendritic cells, eosinophils, mast cells, neutrophils, T cells, NK cells, invariant NK T cells). Under resting conditions LPMs account for the majority of peritoneal macrophages [8], while upon exposure to proinflammatory stimuli (e.g. thioglycollate, zymosan, bacterial infection) SPMs are dominant subset of macrophages within peritoneal cavity. Hence, studies on RMs mainly reflect behavior of LPMs while studies on TGMs reflect behavior of SPMs under specific conditions.

Production of ROS and RNS are hallmark of macrophages activity. ROS and RNS may exert direct microbicidal and tumoricidal effects, but also, through mutual interactions and interactions with various intra- and extra-cellular signaling molecules, they regulate immune response and physiological processes [29, 30]. Although being essential in protection against various types of infection and for creation of a protective inflammatory milieu, the excessive, uncontrolled, production of ROS and RNS results in tissue damage and is associated with numerous pathological conditions [31]. Based on the enhanced activity of MPO, an enzyme

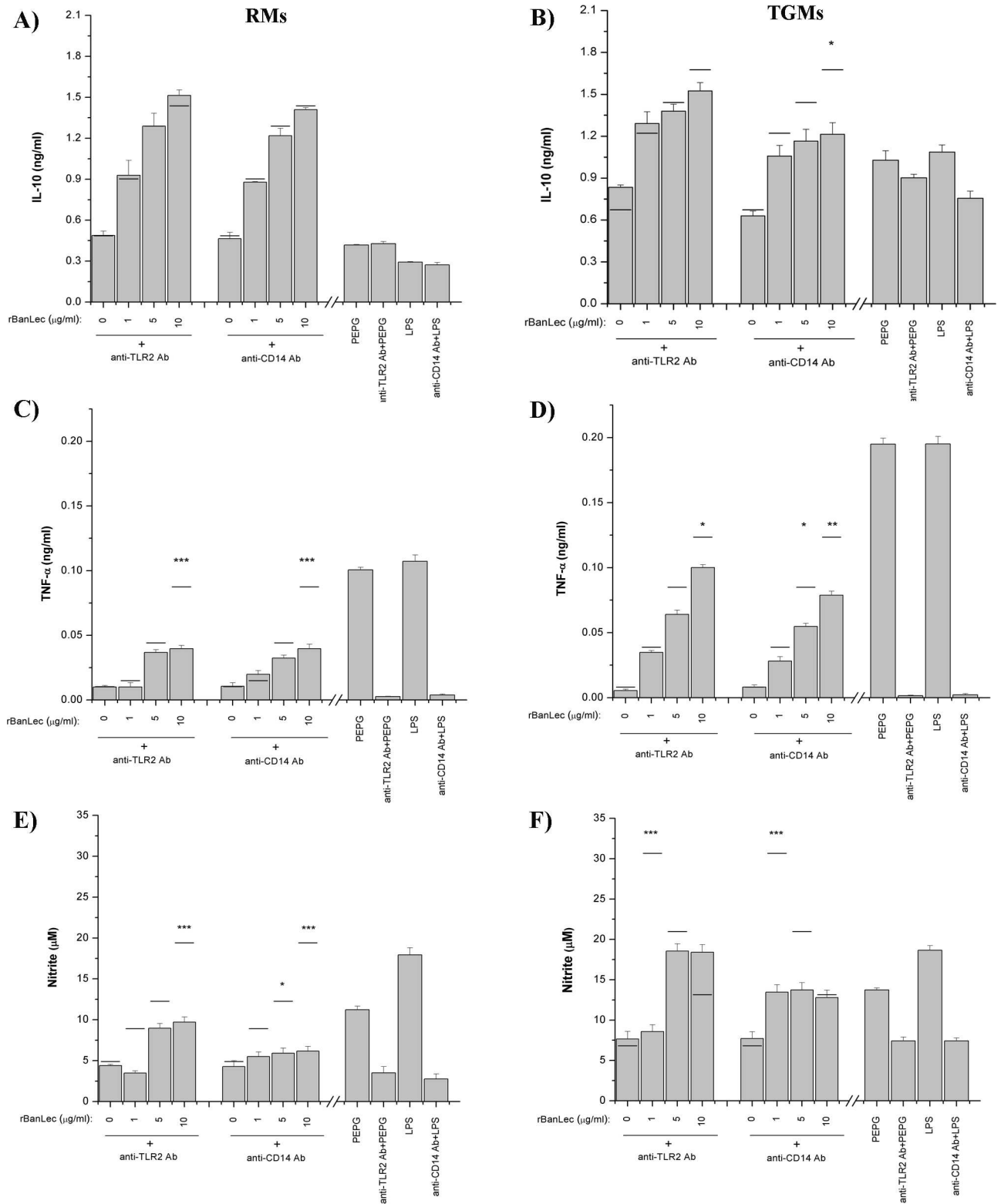


Fig 7. Impact of TLR2- and CD14-triggered mechanisms in production of IL-10 (A, B), TNFα (C, D) and NO (E, F) upon rBanLec stimulation of peritoneal RMs (A, C, E) and TGMs (B, D, F) from BALB/c. RMs and TGMs were stimulated with rBanLec (1, 5 and 10 μg/ml) in the presence of anti-TLR2 or anti-CD14 blocking monoclonal antibodies (20 μg/ml) for 48h. Cytokines and NO were measured in supernatant by ELISA and colorimetric method using Griess reagent, respectively. Bars presented mean concentration ± SE. Corresponding

mean concentrations of IL-10, TNF α and NO measured upon incubation under the same conditions but without blocking antibodies are indicated by black solid line and are considered as referent. The significance of the observed differences, due to incubation with particular blocking antibody, was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$, $p < 0.0001^{***}$). LPS—lipopolysaccharide, PEPG—peptidoglycan.

doi:10.1371/journal.pone.0172469.g007

involved in ROS and hypochlorous acid generation [32, 33], in both rBanLec-stimulated RMs and TGMs from BALB/c mice, it could be expected that rBanLec augments antimicrobial potential of macrophages. On the other hand, the lower capacity of macrophages to reduce NBT (proportional to the availability of O $_2^-$) upon rBanLec stimulation implies on the initiation of self-limiting mechanisms for ROS production in both RMs and TGMs. Decreased availability of O $_2^-$ may result from the enhanced MPO activity [33], but it may also imply on eventual concomitant enhancement in superoxide-dismutase activity [34]. Besides, some portion of O $_2^-$ may be quenched with NO produced upon rBanLec stimulation [29].

It is generally accepted that the initiation of NO production requires the stimulation via innate receptors and inflammatory milieu i.e. IFN γ [9]. It is reported that RMs from BALB/c and C57BL/6 mice (i) require different specific (co)stimulation via innate receptors and IFN γ to enhance NOS activity i.e. NO production in RMs from BALB/c and C57 BL/6, and (ii) set up significantly different net arginine metabolism (NOS vs. arginase activity) in the response to the same stimuli.

Per our results, rBanLec, due to its binding characteristics, could trigger signaling via innate receptors, while IFN γ can be produced mainly by macrophages, upon (autocrine) action of IL-12 [35–37]. Our results imply that upon rBanLec stimulation, irrespectively to the macrophages origin and type, pro-inflammatory signal primarily drive NO production as the intensity of NO production positively correlated with the IL-12 concentration in all tested systems (macrophages of the same type and genetic background). Although in all rBanLec-stimulated systems arginase activity (produced urea) was regulated in an opposite dose-dependent way comparing to the NO production, the strain-specific differences between the ratios of NOS and arginase activity were marked. We hypothesize that rBanLec stimulation, in a positive dose-dependent manner, augments proinflammatory potential in RMs (enhancement of NO production paralleled by reduction of arginase activity) but, in line with already reported results [9], in RMs from BALB/c mice, arginase activity was dominant, while in RMs from C57BL/6 dominated NOS activity.

The impact of genetic background on the NO-related outcome of rBanLec-stimulation seems to be more pronounced with TGMs. rBanLec stimulation, in a positive dose-dependent manner, enhanced proinflammatory potential of TGMs from C57BL/6 mice, while, in the same manner, promoted anti-inflammatory characteristics in TGMs from BALB/c mice. In other words, rBanLec, in a positive dose dependent manner, promoted the acquirement of inherent ratio of NOS and arginase activities, which was compromised by thyoglycollate treatment.

The specific ratio of NOS and arginase activities could be one of the explanations for differences in the proliferative responses of RMs and TGMs upon rBanLec stimulation. The NO, depending on its concentration, could be cytotoxic while arginase activity comprises to the cell growth and division [38]. In all rBanLec stimulated RMs cultures from BALB/c mice, arginase activity dominated over the NOS activity and it was higher comparing to the corresponding non-stimulated cells. In 10 μ g/ml rBanLec-stimulated RMs from BALB/c mice (the lowest PI among rBanLec-stimulated RMs), arginase activity was significantly lower than in RMs from BALB/c mice stimulated with 1 μ g/ml of rBanLec. In addition, 10 μ g/ml rBanLec-stimulated RMs from BALB/c mice produced significantly higher amount of NO than the RMs stimulated with ten times lower concentration of rBanLec. Further, more significant dose-dependent

changes in the ratio of NOS and arginase activities as well as more drastic dose-dependent differences in proliferative responses upon rBanLec stimulation were recorded for TGMs from comparing to RMs from BALB/c mice; the most proliferation-favorable ratio of NOS and arginase activities was recorded for TGMs stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ rBanLec, in the same cell culture where the highest proliferation index was recorded. The results related to the proliferation of RMs from C57BL/6 mice (S1 Fig) are in line with the explanation of the rBanLec-induced proliferation by the ratio of NOS and arginase activities). However, results obtained for rBanLec-stimulated TGMs from C57BL/6 mice, where both proliferation indices and domination of NOS activity positively correlated to the rBanLec concentration, imply that characteristics of arginine metabolism could not be the sole explanation for proliferation of macrophages upon rBanLec stimulation.

The binding characteristics of rBanLec (multiband reactivity on immunoblot, TLR2 and CD14 are spotted as some of target structures) and cytokine milieu recorded upon *in vitro* stimulation of peritoneal RMs and TGMs with rBanLec imply on the dominant occurrence of type II-like activation of macrophages [4]. Secretion of $\text{TNF}\alpha$ paralleled by dose-dependent enhancement of IL-10 secretion, characteristic for type II activated macrophages, has been marked with all rBanLec stimulated macrophages irrespective to their genetic background. However, cytokine profiles secreted by RMs and TGMs with the same genetic background were different, which confirms macrophages' plasticity [1,5].

The comparison of effector and regulatory cytokines between macrophages of the same type but with different genetic background revealed that there is no cytokine profile which could be exclusively associated with rBanLec-stimulated either RMs or TGMs. This finding emphasizes the importance of genetic background when studying macrophage functional characteristics upon stimulation. For example, based only on the results obtained from BALB/c macrophages, we could conclude that rBanLec differently influence IL-12 (pro-Th1) and IL-4 (stimulator and marker of Th2 type of immune response) secretion, which could consequently cause different Th skewing when rBanLec-stimulated RMs and TGMs participate in shaping of the adaptive immune response. However, the same conclusion cannot be applied to C57BL/6-originated macrophages as rBanLec, in a positive dose-dependent manner, enhanced the production of both IL-4 and IL-12 by RMs and TGMs from C57BL/6 mice.

Besides, cytokine profiles recorded in analyzed cultures imply that various regulatory mechanisms are included to prevent exaggerated inflammatory response upon rBanLec stimulation and their different contribution to the balancing of inflammatory response under specific (activation state and origin of macrophages) conditions. First, the regulation based on the mutual influences of effector cytokines could be expected upon rBanLec stimulation. It is well-known that Th2 cytokines (IL-4) in certain situations inhibit the production of Th1 cytokines (IL-12) and *vice versa*, but the (autocrine) action of IL-4 is not always necessary or might be insufficient for the inhibition of IL-12 production. The decrease in IL-12 production might happen due to the anti-inflammatory action of $\text{TNF}\alpha$ [39]. Namely, it is shown that macrophages obtained under inflammatory conditions (such as TGMs), are susceptible to $\text{TNF}\alpha$ anti-inflammatory activity, which is accomplished through the inhibition of transcription of IL-12p40 subunit. Second, the productions of regulatory cytokines were specifically modulated by rBanLec stimulation. IL-10 and $\text{TGF}\beta$ are cytokines, which can exert anti-inflammatory mode of action [40]. $\text{TGF}\beta$ and IL-10 when acting synergistically exert more pronounced anti-inflammatory effects than each of them, in equivalent amount, promote separately [41]. Also, already mentioned $\text{TNF}\alpha$ inhibitory influence on IL-12 production by TGMs could be enhanced by $\text{TGF}\beta$ [42]. Finally, anti-inflammatory influences of $\text{TGF}\beta$ and IL-10 as well as IL-4 based on the inhibition of NO production and concomitant enhancement of arginase activity are reported as well [40, 43].

If we take the rBanLec dose-dependent pattern of changes in NO production within a specific system (macrophages of the same origin and type) as an indicator for the prevalent activity of proinflammatory cytokines, three main conclusions could be drawn. First, RMs from BALB/c mice upon rBanLec stimulation in a positive dose-dependent manner augment proinflammatory capacity primarily due to the enhancement of IL-12 production and concomitant reduction in production of IL-4 and TGF β , while positive dose-dependent enhancement in IL-10 tend to prevent exaggerated inflammatory response. Second, lessening the proinflammatory capacity of TGMs from BALB/c mice by increasing stimulatory rBanLec dose results from the decrease in IL-12 production and concomitant enhancement of IL-4, TGF β and IL-10 production. Third, despite positive dose-dependent enhancement of IL-4, TGF β and IL-10 production, the domination of the effects of proinflammatory cytokines was more apparent in cultures of RMs and TGMs from C57BL/6 mice when the rBanLec stimulatory dose was increased.

Abovementioned cytokine pattern, reported analyses of TLR2, TLR4 and its co-receptor CD14 protein sequences (implying on several amino-acid residues as potential spots for N-glycosylation [14]) and confirmed occurrence of N-linked mannose-rich oligosaccharides on mouse TLR2 [17, 44–46], TLR4 [17, 45] and CD14 [46, 47] lead us to envisage that rBanLec might bind these structures. Our observation that rBanLec does not bind TLR4 but binds TLR2 and CD14 by forming interactions which can be prevented by addition of mannose is in line with the results reported for ArtinM, a mannose-specific lectin isolated from *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit). Mariano et al. showed that ArtinM binds TLR2 in a carbohydrate recognition-dependant manner and that this is crucial for its immunomodulatory activity, including the enhancement in production of IL-10 and IL-12p40 by RMs [14]. We have further shown that interactions of rBanLec with TLR2 and CD14 are important for initiation of TNF α secretion and NOS activity. The blockades of CD14 exerted significant negative impact on IL-10 production only with TGMs, which may be explained by a variety of signals that could promote IL-10 production in macrophages [48] and their specific contribution to overall IL-10 promotion depending on the functional state of the target cell. Finally, our results are in line with numerous data showing that TLR ligation is important to produce mediators of inflammation [49].

In conclusion, we have unequivocally demonstrated that the outcome of rBanLec stimulation depends on rBanLec concentration as well as on the functional characteristics of its target cells and their genetic background. Before considering rBanLec as an eventual therapeutic, it would be of utter importance not only to investigate its effects under physiological conditions but to include rBanLec immunomodulatory activity within specific pathological conditions.

Supporting information

S1 Fig. Proliferation index (PI) of rBanLec-stimulated peritoneal RMs and TGMs from C57BL/6 mice. Macrophages were incubated either without any stimulation or with 1, 5 and 10 μ g/ml rBanLec. Number of viable cells was determined by CCK-8 assay after 48h long incubation and used for PI calculations. The results were presented as mean PI \pm SE. The significance of the observed differences was calculated by one-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test ($P < 0.05^*$, $P < 0.005^{**}$, $P < 0.0001^{***}$). Solid lines indicate compared groups.

(TIF)

S2 Fig. Control staining for TLR2, TLR4, CD14 and rBanLec as well as appropriate isotype controls. TLR2, TLR4 and CD14 were detected with specific FITC-labeled monoclonal antibodies (green color) and rBanLec (biotin-labeled) was detected with streptavidin-rhodamineB

(red color). Isotype-matched controls for each antibody as well as streptavidin-rhodamine were used for negative staining controls.

(TIF)

S3 Fig. Western blot analysis of rBanLec binding to proteins in TGMs lysate. Whole cell lysate was prepared after collecting TGMs from peritoneum, resolved on 9% polyacrylamide gel by non-reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membrane. Binding of biotin-labeled rBanlec to the proteins from TGMs lysate was visualized with extrAvidine-alkaline phosphatase / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/NBT system.

(TIF)

S4 Fig. Western blot detection of TLR2 (A), TLR4 (B) and CD14 (C) in cell lysate prepared from peritoneal TGMs. Whole cell lysate was prepared after collecting TGMs from peritoneum, resolved on 9% polyacrylamide gel by non-reducing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membrane. TLR2, TLR4 and CD14 were detected using the specific biotin-labeled monoclonal antibodies. extrAvidine-alkaline phosphatase /5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium chloride system was used for visualization.

(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: MS EM.

Formal analysis: EM RDj AIK.

Investigation: EM RDj IL AF DK.

Resources: MGJ MS.

Visualization: EM AF RDj IL DK.

Writing – original draft: MS EM.

Writing – review & editing: AIK MGJ.

References

1. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 958–969. doi: [10.1038/nri2448](https://doi.org/10.1038/nri2448) PMID: [19029990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19029990/)
2. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*. 2007; 37: S9–S17. doi: [10.1002/eji.200737638](https://doi.org/10.1002/eji.200737638) PMID: [17972350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17972350/)
3. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008; 181: 5829–5835. PMID: [18941170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18941170/)
4. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leu Biol* 2003; 73: 209–212.
5. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012; 122: 787–795. doi: [10.1172/JCI59643](https://doi.org/10.1172/JCI59643) PMID: [22378047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22378047/)
6. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014; 6: 13. doi: [10.12703/P6-13](https://doi.org/10.12703/P6-13) PMID: [24669294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24669294/)
7. Cassado AA, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, de Lima Buzzo C, Faustino L, Nascimento R, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLOSOne* 2011; 6(7): e22141
8. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107: 2568–2573. doi: [10.1073/pnas.0915000107](https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107) PMID: [20133793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133793/)

9. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000; 164: 6166–6173 PMID: [10843666](#)
10. Cassado AA, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol.* 2015; 6: 225. doi: [10.3389/fimmu.2015.00225](#) PMID: [26042120](#)
11. West P, Brodsky I, Rahner C, Woo D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011; 472: 476–480. doi: [10.1038/nature09973](#) PMID: [21525932](#)
12. da Silva LC, Correlia MTS. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–3.
13. Kang TB, Yoo YC, Lee KH, Yoon HS, Her E, Kim JB, et al. Korean mistletoe lectin (KML-IIU) and its subchains induce nitric oxide (NO) production in murine macrophage cells. *J Biomed Sci.* 2008; 15: 197–204. doi: [10.1007/s11373-007-9210-2](#) PMID: [17940853](#)
14. Mariano VS, Zorzetto-Fernandes A L, da Silva TA, Ruas LP, Nohara LL, de Almeida IC, et al. Recognition of TLR2 N-Glycans: Critical Role in ArtinM Immunomodulatory Activity. *PLoSOne* 2014; 9: e98512.
15. de Melo CM, de Castro MC, de Oliveira AP, Gomes FO, Pereira VR, Correia MT, et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytother Res.* 2010; 24: 1631–1636. doi: [10.1002/ptr.3156](#) PMID: [21031620](#)
16. Reis EA, Athanazio DA, Cavada BS, Teixeira EH, de Paulo Teixeira Pinto V, Carmo TM, et al. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. *Acta Trop.* 2008; 108: 160–165. doi: [10.1016/j.actatropica.2008.05.025](#) PMID: [18579103](#)
17. Sodhi A, Keshewani V. Production of TNF-alpha, IL-1beta, IL-12 and IFN-gamma in murine peritoneal macrophages on treatment with wheat germ agglutinin in vitro: involvement of tyrosine kinase pathways. *Glycoconj J.* 2007; 24: 573–582. doi: [10.1007/s10719-007-9054-z](#) PMID: [17668318](#)
18. Lavelle EC, Grant G, Puzsai A, Pfüller U, Leavy O, McNeela E, et al. Mistletoe lectins enhance immune responses to intranasally co-administered herpes simplex virus glycoprotein D2. *Immunology* 2002; 107: 268–274. doi: [10.1046/j.1365-2567.2002.01492.x](#) PMID: [12383207](#)
19. Gavrovic-Jankulovic M, Poulsen K, Brckalo T, Bobic S, Linder 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](#) PMID: [18083059](#)
20. Peumans WJ, Zhang W, Barre A, Houllès Astoul C, Balint-Kurti PJ, Rovira P, et al. Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta* 2000; 211: 546–554. doi: [10.1007/s004250000307](#) PMID: [11030554](#)
21. Cheng AHK, Wong HJ, Ng TB. *Musa acuminata* (Del Montebanana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine* 2009; 16: 594–600. doi: [10.1016/j.phymed.2008.12.016](#) PMID: [19195858](#)
22. Stojanovic M, Zivkovic I, Petrusic V, Kosec D, Dimitrijevic R, Jankov R, et al. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform result in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10: 120–129. doi: [10.1016/j.intimp.2009.10.007](#) PMID: [19874914](#)
23. Wong JH, Ng TB. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with immunostimulatory 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](#) PMID: [16226049](#)
24. Marinkovic E, Lukic I, Kosanovic D, Inic-Kanada A, Gavrovic-Jankulovic M, Stojanovic M. Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon. *J Funct Foods* 2016; 20: 68–78.
25. Brito Sansonea ACM, Sansonea M, dos Santos Dias CT, do Nascimento JRO. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. *Int J Biol Macromol.* 2016; 89: 19–24. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2016.04.049](#) PMID: [27106589](#)
26. Pick E, Charon J, Mizel D. A rapid densitometric microassay for the nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages. *J Reticuloendothel Soc.* 1981; 30: 581–593. PMID: [6281430](#)
27. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131–138. PMID: [7181105](#)
28. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; 174: 231. PMID: [8083527](#)

29. Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 873–891. doi: [10.1189/jlb.1010550](https://doi.org/10.1189/jlb.1010550) PMID: [21233414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21233414/)
30. Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37: 955–989. doi: [10.1111/1574-6976.12026](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026) PMID: [23802986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23802986/)
31. Meo SD, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 1245049.
32. Kettle AJ, Winterbourn JJ. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem J*. 1988; 252: 529–536. PMID: [2843172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2843172/)
33. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reaction of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome, Implication for Microbial Killing. *J Biol Chem*. 2006; 281: 39860–39869. doi: [10.1074/jbc.M605898200](https://doi.org/10.1074/jbc.M605898200) PMID: [17074761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17074761/)
34. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. *J Immunol*. 2003; 170: 2993–3001. PMID: [12626552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12626552/)
35. Bastos KRB, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, D'Imerio Lima MR. Role of Endogenous IFN- in Macrophage Programming Induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res*. 2007; 27: 399–410. doi: [10.1089/jir.2007.0128](https://doi.org/10.1089/jir.2007.0128) PMID: [17523872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17523872/)
36. Bastos KRB, Marinho CRF, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Império Lima MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Mic Infect* 2004; 6: 630–636.
37. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine Macrophages Secrete Interferon γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. *J Exp Med*. 1998; 187: 2103–2108. PMID: [9625771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9625771/)
38. Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24: 450–455. doi: [10.1016/S0165-6147\(03\)00227-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00227-X) PMID: [12967769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12967769/)
39. Zakharova M, Ziegler KH. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175: 5024–5033. PMID: [16210605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16210605/)
40. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9: 447–453. doi: [10.1016/j.coph.2009.04.008](https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.008) PMID: [19481975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19481975/)
41. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. The role of the combination of IL-2 and TGF β or IL-10 in the generation and function of CD4+CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leu Biol*. 2003; 74: 471–478.
42. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007; 178: 6725–6729. PMID: [17513718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17513718/)
43. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 1101–1104. doi: [10.1002/eji.1830250436](https://doi.org/10.1002/eji.1830250436) PMID: [7537672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7537672/)
44. Kataoka H, Yasuda M, Iyori M, Kiura K, Narita M, Nakata T, et al. Roles of N-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by TLR2. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 1199–1209. doi: [10.1111/j.1462-5822.2006.00702.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00702.x) PMID: [16819971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16819971/)
45. da Silva Correia J, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem*. 2002; 277:1845–1854. doi: [10.1074/jbc.M109910200](https://doi.org/10.1074/jbc.M109910200) PMID: [11706042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11706042/)
46. Meng J, Parroche P, Golenbock DT, McKnight CJ. The differential impact of disulfide bonds and N-linked glycosylation on the stability and function of CD14. *J Biol Chem*. 2008; 283: 3376–3384. doi: [10.1074/jbc.M707640200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707640200) PMID: [18057002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18057002/)
47. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002; 4: 903–14. PMID: [12106783](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12106783/)
48. Hedrich CM, Bream JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol Res*. 2010; 47: 185–206. doi: [10.1007/s12026-009-8150-5](https://doi.org/10.1007/s12026-009-8150-5) PMID: [20087682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20087682/)
49. Velasco G, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RSS, et al. Toll-Like Receptor 4 or 2 Agonists Decrease Allergic Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 218–224. doi: [10.1165/rcmb.2003-0435OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0435OC) PMID: [15576672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15576672/)