

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Veljko V. Blagojević

**Fenotipske karakteristike peritonealnih
makrofaga dva soja pacova tokom razvoja
inflamatornog odgovora: značaj predstavnika
crevne mikrobiote**

**Doktorska disertacija
Beograd, 2022**

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Veljko V. Blagojević

**Phenotypical characteristics of peritoneal
macrophages of two rat strains during
inflammatory response: the importance of gut
microbiota representatives**

Doctoral dissertation
Belgrade, 2022

Mentori:

Dr. Stanislava Stanojević, naučni savetnik

Institut za virusologiju, vakcine, i serume "Torlak"

Prof. Dr. Biljana Božić, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Đorđe Miljković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

Dr Rajna Minić, naučni savetnik

Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Dr Katarina Mitić, viši naučni saradnik

Biološki Fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Eksperimenti čiji su rezultati izloženi u ovoj doktorskoj disertaciji su urađeni na Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine, i serume "Torlak", pomoću sredstava obezbeđenih na projektu "Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena" (175050) pod vođstvom prof. Dr. Gordane Leposavić.

Zahvalio bih se mentorima Stanislavi Stanojević i Biljani Božić na ekspertskom vođenju mog rada u pravom smeru i konstantnim, neiscrpnim savetima u svim formatima. Zahvaljujem se i članovima komisije, Đorđu Miljkoviću, Rajni Minić i Katarini Mitić, na više nego fer količini sugestija i uputa koji su mi doprineli da uvidim dalje od onoga što sam video pre.

Svesrdno se zahvaljujem dr Aleksandri Elbakian, koja je zaslužna za veliku logističku pomoć kako u mom doktoratu, tako i u naučnim radovima širom planete. Zahvaljujem dragim kolegicama Ivani, Raisi, i Ivani koje su svesrdno pomogle u izvođenju eksperimentalnog dela, kao i u usputnim akademskim diskusijama koje su neminovno završile maskirane u moje ideje. Kolegama Emiliji, Ivani, Ivanu, Dušku, Marijani, Luki, Vanji i Ireni zahvaljujem na teoretskoj, praktičnoj i moralnoj podršci svih ovih godina.

Posebno zahvaljujem bivšoj supruzi, Mariji, što mi je dala prostora, vremena i podrške (iz blizine i sa daljine) da završim ovo važno poglavlje svog života. Mojoj dragoj Alisi sam izuzetno zahvalan na ogromnom razumevanju, pružanju vetra u leđa i ohrabrivanja u ključnim momentima finalne izrade ove disertacije, i što je bila ključni usmerivač moje pažnje na prave vrednosti i opravdane ciljeve. Mojim roditeljima bih zahvalio što su me (ne)svesno usmerili na ovaj put koji je (zasad) kulminirao ovom tezom. Iznad svega, zahvaljujem mojim nazolakrimalnim kanalima što su znali kada treba da se aktiviraju (kada niko ne gleda *prim.aut.*). I konačno, zahvaljujem velikom rimskom caru, Marku Aureliju, što me je ohrabrio činjenicom da sam u poređenju sa njim – ja živ.

SAŽETAK

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje promena u fenotipu i aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) pacova tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano delovanjem bakterija mikrobiote creva direktno, intraperitonealnom (*i.p.*) primenom, ili indirektno, tokom razvoja kolitisa, kao i ispitivanje modulacije ovih promena primenom probiotske bakterije *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*).

Rezultati su pokazali da *i.p.* primena umravljenih *E. coli* ili *Enterococcus* spp. dovodi do izraženije inflamatorne polarizacije makrofaga peritonealne šupljine DA pacova u odnosu na AO soj, dok *i.p.* primena *L. rhamnosus* ima veći potencijal da spreči funkcionalne promene do kojih dovodi *in vitro* stimulacija komensalnim bakterijama u makrofagima pacova AO soja. Tokom razvoja kolitisa makrofagi DA pacova proizvode više IL-6 u odnosu na AO soj, a značajno manja smrtnost AO pacova je praćena intenzivnijom produkcijom IL-10 u makrofagima u odgovoru na dodatnu stimulaciju komensalnim bakterijama *in vitro* i višim nivoom antitela klase IgA specifičnih za *E. coli* u serumu. Rani postnatalni oralni tretman bakterijom *L. rhamnosus* u DA pacovima povećava raznovrsnost *Bifidobacterium* vrsta u fecesu, a nakon indukcije kolitisa u adultnom dobu smanjuje stepen ulceracije kolona, povećava zastupljenost rezidentnih makrofaga peritonealne šupljine i suprimira povećanja produkcije NO i IL-10 stimulisanu komensalnim bakterijama *in vitro*.

Nalazi ukazuju na značaj genetski determinisane predispozicije ka određenom obrascu aktivacije makrofaga za promene u fenotipu i aktivnosti tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano delovanjem bakterija mikrobiote creva, kao i za modulaciju ovih promena primenom probiotske bakterije *L. rhamnosus*.

Ključne reči: AO pacovi, DA pacovi, imunomodulacija, inflamacija, komensalne bakterije, kolitis, *Lactobacillus rhamnosus*, makrofagi peritonealne šupljine

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

ABSTRACT

The subject of this doctoral dissertation is the study of changes in the phenotype and activity of peritoneal cavity macrophages from Albino Oxford (AO) and Dark Agouti (DA) rats during the development of inflammatory response induced by intestinal microbiota directly, intraperitoneally (*i.p.*), or indirectly, through development of colitis, as well as study of the modulation of these changes using the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*).

I.p. application of killed *E. coli* or *Enterococcus* spp. leads to a more pronounced inflammatory polarization of the peritoneal cavity macrophages from DA rats compared the AO strain, while *i.p.* application of *L. rhamnosus* has a greater potential to prevent functional changes caused by *in vitro* stimulation with commensal bacteria in AO rat macrophages. During the development of colitis, DA rat macrophages produce more IL-6 than the AO strain, and significantly lower AO rat mortality was accompanied by more intense IL-10 production in macrophages in response to additional stimulation with commensal bacteria *in vitro* and higher levels of IgA-class antibodies specific to *E. coli* in the serum. Early postnatal oral treatment with *L. rhamnosus* in DA rats increased the diversity of *Bifidobacterium* species in feces, and after induction of colitis in adulthood reduced the degree of colonic ulceration, increased the presence of resident peritoneal cavity macrophages and suppressed the increased production of NO and IL-10 stimulated by commensal bacteria .

The findings indicate the importance of genetically determined predisposition to a certain pattern of macrophage activation for changes in phenotype and activity during the development of inflammatory response induced by intestinal microbiota, as well as for modulation of these changes using probiotic bacterium *L. rhamnosus*.

Key words: AO rats, commensal bacteria, colitis, DA rats, immunomodulation, inflammation, *Lactobacillus rhamnosus*, peritoneal cavity macrophages,

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunobiology

LISTA SKRAĆENICA

ANOVA – analiza varijanse, *engl.* Analysis of Variance

AO – Albino Oksford

APĆ – Antigen prezentujuća ćelija

BSA – goveđi albumin iz seruma *engl.* bovine serum albumin

CD – klaster diferencijacije, *engl.* Cluster of Differentiation

CFU – jedinica koja formira koloniju, *engl.* Colony Forming Units

ConA – konkanavalin A, *engl.* Concanavalin A

CTAB – Cetiltrimetilamonijum bromid

DA – Dark Aguti

DAMP – molekularni obrasci oštećenja, *engl.* Danger Associated Molecular Patterns

DGGE - gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu, *engl.* Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis

DSS – Dekstran natrijum sulfat, *engl.* Dextran Sodium Sulfate

DĆ – Dendritska ćelija

Esp – površinski protein enterokoka *engl.* Enterococcal surface protein

FCS – fetalni serum teleta, *engl.* Fetal Calf Serum

GF – bez mikrobiote, *engl.* Germ Free

GM-CSF - faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga, *engl.* Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor

HBSS – Henkov uravnoteženi rastvor soli, *engl.* Hanks Balanced Salt Solution

HE – Hematoksilin Eozin

HRP – peroksidaza rena, *engl.* Horse Raddish Peroxidase

IBD – zapaljenska bolest creva, *engl.* Inflammatory Bowel Disease

IFN - interferon

IL - interleukin

ILC – limfoidna ćelija urođene imunosti, *engl.* Innate Lymphoid Cell

iNOS – inducibilna NO sintaza

IRF – regulatorni faktor interferona, *engl.* Interferon Regulatory Factor

ISPF – α -izonitrozopropiofenon

LIF – faktor inhibicije leukocita, *engl.* Leukocyte Inhibitory Factor

LPM – veliki makrofagi peritonealne šupljine, *engl.* Large Peritoneal Macrophages

LPS – Lipopolisaharid

LTA – lipoteihoična kiselina, *engl.* Lipoteichoic acid

MDR – reakcija nestajanja makrofaga, *engl.* Macrophage Disappearance Reaction

MFI – prosečan intenzitet fluorescence *engl.* Mean Fluorescence Intensity

MHCII - molekul glavnog kompleksa tkivne podudarnosti druge klase, *engl.* Major Histocompatibility Complex class II

MPO - mijeloperoksidaza

NF- κ B – nuklearni faktor kapa B

NFAT5 – nuklearni factor aktiviranih T ćelija

NLR – receptor sličan NOD-u, *engl.* NOD-Like Receptor

NO – azot monoksid, *engl.* Nitric Oxide

OG – optička gustina

OPD – o-fenilen diamin *engl.* O-Phenilene Diamine

PAMP – molekularni obrasci patogena, *engl.* Pathogen Associated Molecular Patterns

PBS – fiziološki rastvor puferisan fosfatima, *engl.* Phosphate-Buffered Saline

PFA – paraformaldehid

PMA – forbol-miristat-acetat, *engl.* Phorbol Myristate Acetate

PMSF – fenilmetil sulfonil fluorid, *engl.* Phenyl Methyl Sulfonil Fluoride

PP – Pajerove pločice

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SCFA – masna kiselina kratkog lanca, *engl.* Short Chain Fatty Acid

SOCS3 – supresor signalizacije citokina 3, *engl.* Suppressor Of Cytokine Signaling 3

SPF – bez specifičnih patogena, *engl.* Specific Pathogen Free

SPM – mali makrofagi peritonealne šupljine, *engl.* Small Peritoneal Macrophages

STAT3 – prenosilac signala i aktivator transkripcije 3, *engl.* Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TGF – transformišući faktor rasta, *engl.* Transforming Growth Factor

TGM2 – transglutaminaza 2

TLR – Receptor sličan Tolu, *engl.* Toll-Like Receptor

TNBS - 2,4,6-trinitro benzensulfonska kiselina *engl.* 2,4,6-TriNitroBenzeneSulphonic acid

TNF – faktor nekroze tumora, *engl.* Tumor Necrosis Factor

TNP – tri-nitro fenil, *engl.* Tri-Nitro Phenyl

VEGF – faktor rasta vaskularnog endotela, *engl.* Vascular Endothelial Growth Factor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Peritonealna šupljina	1
1.1.1 Makrofagi i njihova raznovrsna uloga.....	2
1.1.2. Makrofagi u inflamatornom odgovoru	4
1.2 Creva kao imunski organ.....	4
1.2.1. Zapaljenje kolona i životinjski modeli	6
1.2.2. Model kolitisa indukovano rastvorom TNBS.....	7
1.2.3. Citokini u razvoju inflamacije creva	7
1.3 Komensalna mikrobiota – značaj za zdravlje i metode ispitivanja	8
1.3.1. Uticaj komensalne flore creva na razvoj imunskog sistema	9
1.4 Probiotici – značaj, efekti, i mehanizmi	9
1.4.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (<i>L. rhamnosus</i>).....	9
1.5. Sojne razlike u inflamatornom odgovoru pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja – uloga makrofaga.....	10
2. Ciljevi rada	11
3. Materijal i metode.....	12
3.1. Laboratorijske životinje	12
3.2. Hemikalije, antitela i imunokonjugati.....	12
3.3. Izolovanje bakterija fecesa	13
3.4. Indukcija peritonitisa	13
3.5. Intraperitonealni (<i>i.p.</i>) tretman probiotskom bakterijom <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (<i>L. rhamnosus</i>)	13
3.6. Indukcija kolitisa.....	14
3.7. Oralni tretman probiotskom bakterijom <i>L. rhamnosus</i>	14
3.8. Bakterijska translokacija	14
3.9. Izolacija ćelija i tkiva	14
3.10. Određivanje ispoljavanja antigena na ćelijama peritonealnog lavata i mezenteričnih limfnih čvorova.....	15
3.11. Određivanje produkcije azot-monoksida (NO).....	15
3.12. Određivanje aktivnosti arginaze-1	15
3.13. Određivanje produkcije vodonik peroksida (H ₂ O ₂).....	16
3.14. Određivanje peroksidazne aktivnosti (MPO)	16
3.15. Određivanje koncentracije citokina	16
3.16. Određivanje nivoa IgG i IgA specifičnih za bakterijske antigene u serumu	16
3.17. Histološka analiza kolona	16
3.18. Analiza varijabilnosti bakterija fecesa.....	17

3.19. Statistička obrada podataka	17
4. REZULTATI	18
4.1. Indukcija peritonitisa <i>i.p.</i> primenom formalinom-umrtvljenih bakterija fecesa u AO i DA pacovima	18
4.1.1. Uticaj <i>i.p.</i> primene bakterija fecesa na zdravlje pacova.....	18
4.1.2. Uticaj <i>i.p.</i> primene bakterija fecesa na prinos ćelija peritonealne šupljine	18
4.1.3. Uticaj <i>i.p.</i> primene bakterija fecesa na fenotip ćelija peritonealne šupljine.....	19
4.1.4. Uticaj <i>i.p.</i> primene bakterija fecesa na aktivnost makrofaga peritonealne šupljine.....	20
4.1.5. Uticaj <i>i.p.</i> primene bakterija fecesa na produkciju citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine	21
4.2. Modulacija fenotipa i aktivnosti ćelija peritonealne šupljine <i>i.p.</i> primenom probiotske bakterije <i>L. rhamnosus</i>	23
4.2.1. Telesna masa i izgled životinja nakon <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i>	23
4.2.2. Prinos ćelija peritonealne šupljine nakon <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i>	23
4.2.3. Fenotip makrofaga peritonealne šupljine nakon <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i>	23
4.2.4. Uticaj <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i> na produkciju NO i hidrolizu L-arginina od strane makrofaga peritonealne šupljine nakon <i>in vitro</i> stimulacije bakterijama fecesa	26
4.2.5. Uticaj <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i> na produkciju H ₂ O ₂ makrofaga peritonealne šupljine nakon <i>in vitro</i> stimulacije bakterijama fecesa	27
4.2.6. Uticaj <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i> na produkciju citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine	28
4.3. Razvoj kolitisa indukovano rastvorom TNBS u AO i DA pacovima	29
4.3.1. Klinički znaci	29
4.3.2. Funkcionalna analiza tkiva kolona.....	33
4.3.3. Mezenterični limfni čvorovi	35
4.3.4. Ćelije peritonealne šupljine.....	37
4.3.5. Nivo antitela u serumu specifičnih za komensalni izolat <i>E. coli</i>	42
4.4. Modulacija razvoja kolitisa DA pacova oralnom primenom probiotske bakterije <i>L. rhamnosus</i> u ranom postnatalnom periodu	43
4.4.1. Klinički znaci	43
4.4.2. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom <i>L. rhamnosus</i> na koncentraciju citokina u homogenatima tkiva kolona nakon indukovano kolitisa	46
4.4.3. Mezenterični limfni čvorovi	47
4.4.4. Ćelije peritonealne šupljine.....	48
4.4.5. Analize diverziteta mikrobiote fecesa i antitela u serumu specifičnih za bakterije fecesa	51
5. DISKUSIJA.....	54
5.1. Sojne razlike u indukciji peritonitisa umrtvljenim bakterijama fecesa	54
5.2. Sojne razlike u imunomodulaciji makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon <i>i.p.</i> primene <i>L. rhamnosus</i>	57

5.3. Sojne razlike između AO i DA pacova u razvoju kolitisa indukovano rastvorom TNBS	59
5.4. Rana postnatalna oralna primena probiotske bakterije <i>L. rhamnosus</i> selektivno modulira razvoj TNBS kolitisa u DA pacovima	65
6. Zaključci.....	69
7. Literatura.....	71
8. Biografija.....	100
9. Izjave	101

1. UVOD

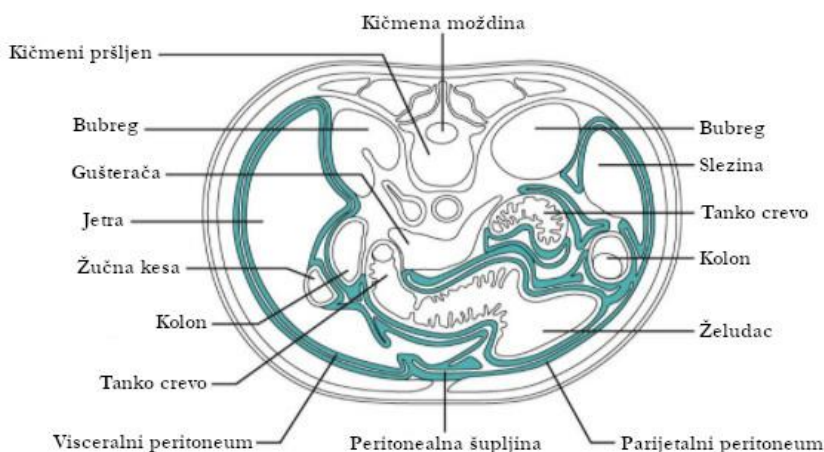
1.1 Peritonealna šupljina

Peritonealna šupljina je telesni odeljak unutar abdomena u kome je pozicionirana većina visceralnih organa. Ona predstavlja bitan imunološki odeljak jer je ispunjena tečnošću u kojoj su prisutni leukociti, među kojima su dominantni makrofagi i specifični B1 limfociti, zatim granulociti, mastociti, monociti, NK ćelije, kao i T limfociti (1). Zastupljenost ovih ćelija znatno varira ne samo prilikom patoloških pojava, već i u okviru različitih sojeva laboratorijskih životinja iste vrste (2).

Najveći značaj ovog telesnog odeljka za istraživače je dugo bio u relativnoj jednostavnosti izolovanja imunskih ćelija, pretežno makrofaga, iz laboratorijskih glodara u uslovima homeostaze ili inflamacije (3). Iz kliničke prakse peritonealne ćelije su za potrebe istraživanja gotovo isključivo izolovane iz pacijenata podvrgnutih peritonealnoj dijalizi (4).

Sam peritoneum predstavlja seroznu opnu koja obavija peritonealnu šupljinu, a može se podeliti na parijetalni (oblaže telesni zid) i visceralni peritoneum (oblaže visceralne organe) (Slika 1 Uprošćeni shematski prikaz peritonealne šupljine i pozicije intra- i retroperitonealnih organa. Preuzeto izmenjeno sa Slika 1). Glavna uloga peritonealne šupljine je oblaganje površina visceralnih organa uz malu količinu peritonealne tečnosti kako bi se smanjio efekat trenja, olakšao transport fluida, i olakšao imunološki nadzor međuorganskog prostora. Mezotelne ćelije koje čine peritonealni omotač imaju imunomodulatorne funkcije, sekretuju hemokine i citokine kao što su C-C ligand 2 (CCL)-2, makrofagni inflamatorni protein (MIP)-2, faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor, TNF), interleukin (IL)-6, IL-10 i ekspimiraju različite receptore urođenog imunskog odgovora kao što su CD14, receptor sličan Tolu (*engl.* Toll-Like Receptor, TLR)-1-5 (5).

Infekcije nastale unutar visceralnih organa se mogu proširiti na ostale organe (6), što peritonealne ćelije aktivno suzbijaju. Makrofagi peritonealne šupljine su sposobni da migriraju u udaljena tkiva u kratkom roku, što uz jednostavnost izolovanja i manipulacije, kao i relativno velikog broja, ove ćelije čini izuzetno potentnim imunoterapeutskim sredstvom (7) Zreli, rezidentni makrofagi peritonealne šupljine miševa (F4/80^{Hi}GATA6⁺) imaju sposobnost direktne migracije u jetru nakon sterilne povrede (8), gde se diferenciraju u alternativno aktiviran fenotip koji podstiče oporavak tkiva, kao i u creva nakon povrede seroze i indukcije kolitisa (9). Iz ovoga je moguće pretpostaviti ulogu makrofaga peritonealne šupljine ne samo u imunološkom nadzoru prostora između visceralnih organa i sprečavanju širenja infekcija tim putem, nego i kao izvora ćelija koje reparativnim mehanizmima brzo reaguju na oštećenja izazvana unutar organa.



Slika 1 Uprošćeni shematski prikaz peritonealne šupljine i pozicije intra- i retroperitonealnih organa. Preuzeto izmenjeno sa <https://cnx.org/>

1.1.1 Makrofagi i njihova raznovrsna uloga

Makrofagi su ćelije imunskog sistema mijeloidnog porekla, prisutni u svim tkivima organizma. Tokom embrionalnog razvića kolonizuju tkiva iz dva izvora – žumančane kese, iz koje poreklo vode samoobnavljajući rezidentni makrofagi većine tkiva, i fetalne jetre, gde se odvija hematopoeza, koja se po rođenju premešta u kostnu srž, odakle potiču monociti koji obnavljaju populacije tkivnih makrofaga ili učestvuju u inflamaciji (10). Istraživanjima je utvrđeno da su makrofagi veoma plastične ćelije koji se prilagođavaju lokalnoj sredini. Male razlike u vanćelijskom matriksu mogu imati značajan uticaj na njihovu polarizaciju *in vivo* ili *in vitro* (11), i usmeravanje ka anti-inflamatornom (12) ili proinflamatornom profilu (13). Makrofagi imaju ulogu u zaceljivanju povreda, direktnim učesćem u produkciji kolagenih vlakana i posledičnoj fibrozi, što je pokazano u humanim makrofagima monocitnog porekla (14), a nedavno utvrđeno i na više životinjskih modela (15). Efektorska funkcija ovih ćelija ogleda se u fagocitozi stranih tela i patogenih mikroorganizama, koju ostvaruju pomoću površinskih receptora specifičnih za filogenetski konzervirane molekulske obrasce patogena (*engl.* Pathogen-associated molecular patterns, PAMP) kao što su TLR ili receptori slični NOD-u (*engl.* NOD-Like Receptors, NLR) (16). Pored imunološkog nadzora i fagocitoze stranih tela i mikroorganizama, makrofagi takođe reaguju na unutrašnje signale opasnosti koji se oslobađaju nakon nekroze tkivnih ćelija, i koje nazivamo molekulskim obrascima oštećenja (*engl.* Danger-associated molecular patterns, DAMP), što predstavlja rekapitulaciju njihovog molekularnog odgovora na PAMP (17). Makrofagi se, pored dendritskih ćelija (DC) i B limfocita, ubrajaju u profesionalne antigen prezentujuće ćelije (APC).

Tabela 1 Pregled tkivno-specifičnih makrofaga i njihovih funkcija u homeostazi i tokom inflamacije.

Tkivo	Subset	Uloge i funkcije
Fetalna jetra	Stromalni makrofagi	Eritropoeza
Kostna srž	Monociti	Obnavljanje tkivnih makrofaga, inflamacija
	Stromalni makrofagi	Formiranje hematopoetskih ostrvaca, hematopoeza, i enukleacija eritrocita
	Osteoklasti	Remodeliranje kostiju
Slezina	Makrofagi crvene pulpe	Uklanjanje istrošenih eritrocita i polimorfonukleara, recikliranje gvožđa, i katabolizam hem grupe
	Marginalni metalofili	Uklanjanje polisaharida, antigena, i mikroba
	Makrofagi spoljašnje marginalne zone	Fagocitoza
	Makrofagi bele pulpe	Uklanjanje apoptotskih T i B limfocita, transfer antigena i aktivacija limfocita
Limfni čvorovi	Subkapsularni makrofagi	Uklanjanje polisaharida, antigena, i mikroba, prenos antigena na DC
	Medularni makrofagi	Aktivacija T i B ćelija
Creva	Makrofagi lamine proprije	Interakcije sa mikrobiomom, epitelom, urođene limfoidne ćelije, i limfocitima, modulacija inflamacije
	Makrofagi submukoze	Interakcije sa lokalnim mišićnim i nervnim ćelijama, regulacija peristaltike creva
Peritonealna šupljina	Rezidentni makrofagi (veliki i	Interakcije sa B1 limfocitima,

	mali)	migriranje u abdominalne organe nakon povreda ili drenirajuće limfne čvorove u inflamaciji
Jetra	Kupferove ćelije	Fagocitoza, endocitoza, interakcije sa hepatocitima, sinteza proteina akutne faze, metabolizam gvožđa, lipida, i mikronutrijenata
Pluća	Alveolarni makrofagi	Uklanjanje čestica, imunosupresija nakon aktivacije
	Bronhijalni makrofagi	Ingestija i prezentacija antigena
Srce	Rezidentni makrofagi srca	Regulacija kardiomiocita
	Rezidentni makrofagi miokardijuma ili makrofagi poreklom od monocita	Odgovor na ishemijski infarkt miokardijuma, remodeliranje i oporavak tkiva
Arterije	Rezidentni makrofagi	Adhezija za endotel, interakcija sa lipidima i mišićnim ćelijama, formiranje penastih ćelija
Mozak	Mikroglija	Interakcija sa živim i apoptotičnim neuronima i astrocitima, oblikovanje sinapsi
	Perivaskularni makrofagi	Uklanjanje lektina
	Makrofagi horioidnog pleksusa	Sekrecija moždano-moždinske tečnosti
	Meningealni makrofagi	Uklanjanje i dreniranje limfe

Poznata je gruba podela makrofaga prema načinu aktivacije i efektorskim mehanizmima na M1 (klasično aktivirane, odnosno aktivirane simultanim dodatkom liganada za TLR4 i IFN- γ , koje posreduju u razvoju Th1 odgovora) i M2 (alternativno aktivirane citokinima IL-4 ili IL-13, i koje posreduju u razvoju Th2 odgovora i rezoluciji inflamacije). Ova dva tipa makrofaga se razlikuju fenotipski i funkcionalno (Tabela 2) (18). Noviji rezultati ukazuju na to da je stanje aktivacije makrofaga preciznije predstaviti u vidu spektra fenotipskih i funkcionalnih karakteristika, a pokazano je i da se dobro utvrđeni markeri alternativne aktivacije eksprimiraju i na makrofagama stimulisanim TLR4 ligandom, samo je njihova ekspresija odložena (19).

Tabela 2 Fenotipske i funkcionalne karakteristike različito polarizovanih makrofaga. Preuzeto izmenjeno iz Rószter T 2015 (20) i Duluc D et al. 2007 (21)

Tipovi i podtipovi makrofaga	Stimulatori	Fenotipski markeri	Solubilni produkti
M1	IFN- γ LPS GM-CSF	CD80, CD86, MHCII, TLR2, TLR4, iNOS, IL1R	TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 CCL2-5, CCL6-11
M2a	IL-4 IL-13 Fungalne/parazitske infekcije	CD163, MHCII, CD200R, CD206, Arg-1, Ym1/2	IL-10, TGF- β , IL-1ra CCL17, CCL22, CCL24
M2b	IL-1R Imunski kompleksi	CD86, MHCII	TNF, IL-1, IL-6, IL-10 CCL1
M2c	TGF- β IL-10 Glukokortikoidi	CD163, TLR1, TLR8	IL-10, TGF- β CCL2
M2d	IL-6	VEGF	TNF, IL-10, IL-12,

	LIF Adenozin		TGF- β CCL5, CXCL10, CXCL16
--	-----------------	--	---

Arg-1, arginaza-1; GM-CSF, faktor stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor); IL-1ra, antagonist IL-1 receptora; LIF, faktor inhibicije leukocita (*engl.* Leukocyte Inhibitory Factor); TGM2, transglutaminaza 2; TGF, transformišući faktor rasta (*engl.* Transforming Growth Factor); TNF, faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor); TLR, (*engl.* Toll-Like Receptor); iNOS, (*engl.* Inducible Nitric Oxide Synthase); SOCS3, (*engl.* Suppressor Of Cytokine Signaling 3); VEGF, (*engl.* Vascular Endothelial Growth Factor); MHC II, molekul glavnog kompleksa tkivne podudarnosti druge klase, (*engl.* Major histocompatibility complex)

1.1.2. Makrofagi u inflamatornom odgovoru

Makrofagi su raspoređeni u svim tkivima organizma, što im omogućava da budu među prvim ćelijama odbrane na mestu povrede ili infekcije. Jedan od prvih koraka u aktivaciji urođenog imunskog odgovora jeste aktivacija makrofaga, čime makrofagi postaju kompetentni da izvršavaju kompleksne akcije (22). Aktivacija makrofaga rezultuje njihovom sposobnošću regrutovanja inflamatornih ćelija na mesto povrede ili infekcije što čine sekrecijom citokina, i pojačanom sposobnošću fagocitoze stranih tela i mikroorganizama, kao i sinteze toksičnih metabolita koji imaju mikrobicidnu ulogu. Blokiranje rane infiltracije monocita, koji se diferenciraju u M1 makrofage, obično rezultuje nižim stepenom oštećenja tkiva, dok blokiranje akumulacije makrofaga u fazi rezolucije, koje su pretežno M2 makrofagi, rezultuje odlaganjem oporavka tkiva i produžavanjem inflamacije i oštećenja (23–25).

Među peritonealnim makrofagama je korisna i podela na dva podtipa – velike (*engl.* Large Peritoneal Macrophage, LPM) i male makrofage peritonealne šupljine (*engl.* Small Peritoneal Macrophage, SPM), koje se razlikuju po poreklu, fenotipskim markerima, i funkcionalnosti (26). LPM su veći, rezidentni makrofagi poreklom iz embrionskih prekursora, sa visokom ekspresijom površinskog CD11b, koje u homeostazi čine oko 90% ukupnih peritonealnih makrofaga, dok su SPM manje, sa nižom ekspresijom CD11b, i diferenciraju se iz pristiglih monocita. Tokom inflamacije, LPM napuštaju peritonealnu šupljinu kroz limfne sudove u omentumu i na dijafragmi, dok se broj SPM uvećava u akutnoj inflamaciji, da bi nakon toga došlo do repopulacije LPM koje posreduju u rezoluciji inflamacije (26,27). Funkcija LPM jeste u održanju homeostaze i fagocitoze ćelija u apoptozi, a u inflamaciji se polarizuju ka M2 profilu (28), dok su SPM polarizovane kao M1, sa izraženim proinflamatornim kapacitetom (povišena ekspresija iNOS) i produkcija NO i IL-12 u odgovoru na stimulaciju sa LPS), kao i pojačanom fagocitozom bakterija (26,27). Makrofagi peritonealne šupljine imaju specifičnu ulogu u inflamaciji okolnih visceralnih organa, gde se direktno infiltriraju u tkivo u slučaju povrede ili inflamacije i učestvuju u rezoluciji inflamacije (8,9). Budući da su to GATA6⁺ makrofagi, možemo zaključiti da LPM nisu u svojoj funkciji rezolucije inflamacije ograničeni na lokalno tkivo, nego da mogu učestvovati u uspostavljanju homeostaze i obližnjih intraperitonealnih organa.

1.2 Creva kao imunski organ

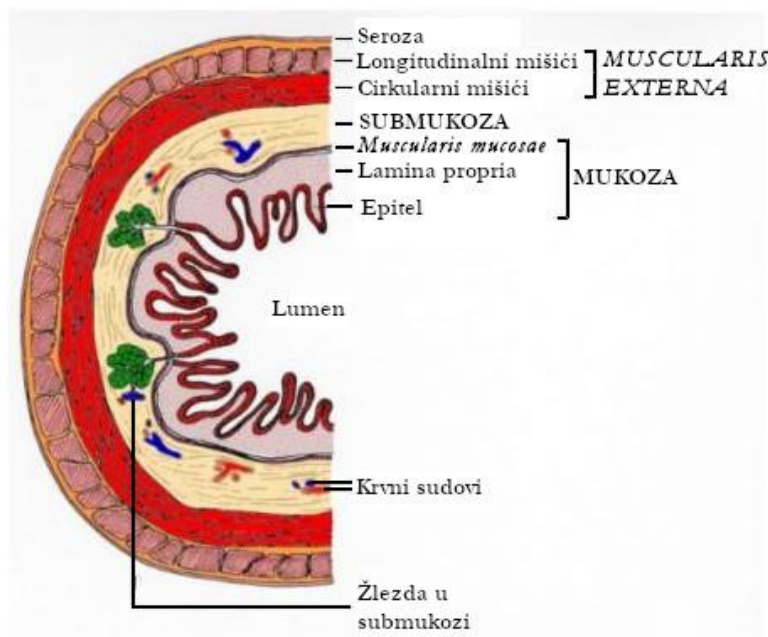
Primarna funkcija gastrointestinalnog trakta jeste obrada i apsorpcija hranljivih materija. Celom dužinom, od jednjaka do rektuma, može se videti da se tkivo gastrointestinalnog trakta sastoji iz tri sloja – mukoznog, koji čine lamina proprija, i epitelna površina, submukoznog sloja, koji od mukoznog deli tanak mišićni sloj muscularis mucosae, i spoljašnjeg mišićnog sloja (muscularis externa), koji čine longitudinalni i cirkularni mišići, krucijalni za peristaltičke pokrete creva (Slika 2). Oko mišićnog sloja se nalazi serozni omotač (peritoneum), osim na segmentima kolona koji su vezani direktno za posteriorni telesni zid, gde funkciju omotača obavlja adventitia, sloj vezivnog tkiva.

Mukozni sloj je imunološki najaktivniji jer se u njemu nalazi najveći broj imunskih ćelija u odnosu na bilo koji drugi organ (29). Tu se nalaze makrofagi koji nastaju konstantnim uplivom monocita (30), dendritske ćelije (DĆ) koje svojim produžecima lociranim među epitelnim ćelijama ispituju antigenski sastav lumena creva (31), plazma ćelije diferencirane od B limfocita Pejerovih pločica koje sekretuju imunoglobuline koji se transportuju u lumen creva (32), i T limfociti koji održavaju homeostazu tkiva ili učestvuju u odbrambenim inflamatornim reakcijama (33). Pored imunskih ćelija, celularnu komponentu mukoznog sloja čine: epitelne ćelije zvane enterociti, sa mikrovilima na apikalnoj površini čija funkcija je selektivna apsorpcija hranljivih materija i sprečavanje prodora komensalnih mikroorganizama u tkivo; Panetove ćelije, koje vrše sekreciju antimikrobnih peptida koji sprečavaju prodor patogenih

mikroorganizama; i peharaste ćelije, sa krupnim vakuolama koje sintetišu i sekretuju mucin, osnovni sastojak mukoznog sloja/dvosloja u tankom crevu i kolonu, koji fiksira mikroorganizme i otežava im prodor do epitelne površine. Luminalnu stranu limfoidnih tkiva (npr. PP) oblažu epitelne ćelije specijalizovane za usvajanje i prenos antigena do DĆ, tzv microfold (M)-ćelije oblažu luminalnu površinu, i učestvuju u ispitivanju luminalnog sadržaja antigena. U epitelu su rasuti i intraepitelni limfociti, koji imaju funkciju u imunološkom nadzoru sadržaja lumena u neposrednoj blizini epitela, enteroendokrine ćelije najbrojnije endokrine ćelije koje luče hormone u krvotok u odgovoru na luminalne stimulse, kao i stem ćelije, koje deljenjem obnavljaju ostale ćelije epitelnog sloja.

Usled svoje ogromne površine u odnosu na ostale organske sisteme i specifičnih uslova pogodnih za razvoj mikroorganizama, mukozna površina creva je najopterećenija mikroorganizmima, i funkcija barijere mukoznog epitela je ključna za održanje homeostaze.

Posebnu ulogu u održavanju crevne homeostaze imaju makrofagi. U homeostazi, makrofagi creva miša diferencirani iz $Ly6C^{High}$ monocita konstitutivno ekspimiraju anti-inflamatorni citokin IL-10, i nisu reaktivni na stimulaciju TLR (34). Tokom inflamacije, monocitni prekursori se mogu diferencirati u proinflamatorne ćelije, koje ekspimiraju veće količine proinflamatornog TNF i reaguju na stimulaciju TLR4 sa LPS (34). Rezidentni makrofagi kolona adultnih miševa se uspostavljaju od treće nedelje života, iz $CCR2^{High}Ly6C^{High}$ monocita, kada počinju da ekspimiraju MHC molekule II klase na membrani, i progresivno potiskuju $CD11b^{Low}F4/80^{High}$ embrionalne makrofage i ubrzo postaju dominantne (30).



Slika 2 Uprošćeni shematski prikaz tkivnih slojeva creva. Izmenjeno preuzeto sa <https://www.cancerquest.org/>.

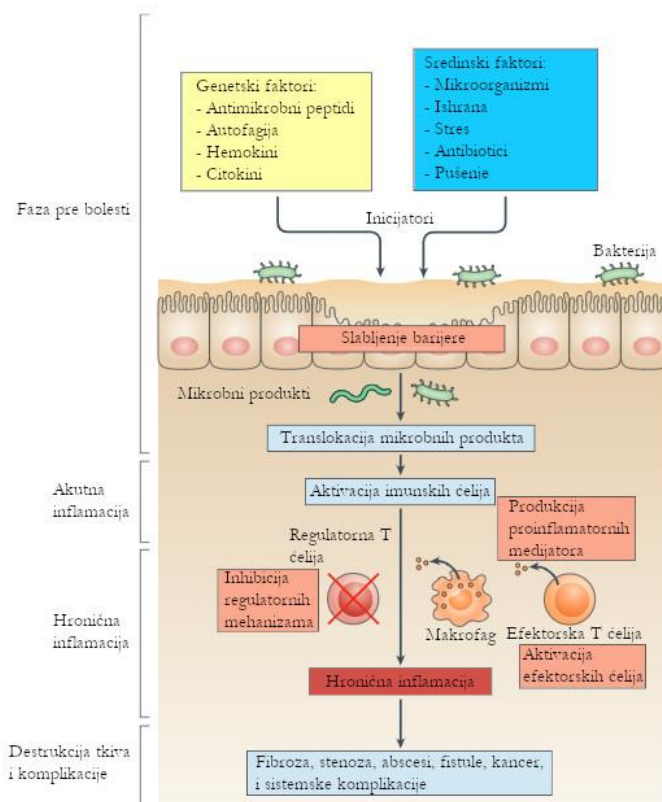
Funkcija barijere mukoznog sloja se može narušiti različitim faktorima. Neke hranljive materije direktno utiču na kvalitet epitela, npr. nedostatak vitamina D (35) ili vitamina A (36) mogu uticati na povećanu propustljivost epitelne barijere creva i podložnost patološkim promenama. Posebno relevantni za humanu populaciju jesu životne navike, poput ishrane, duvanskog dima, i alkohola. Istraživanja su pokazala da etanol izaziva povećanu propustljivost epitelne membrane čitavog gastrointestinalnog trakta (37), a utiče i na komensalnu floru povećanjem prisustva Gram negativnih bakterija, što dovodi do endotoksemije i inflamacije jetre (38). Dim cigarete narušava barijeru tankog creva, ali nema efekta na barijeru kolona (39).

1.2.1. Zapaljenje kolona i životinjski modeli

Zapaljenske bolesti creva predstavljaju hronična relapsna inflamatorna stanja koja obuhvataju delove gastrointestinalnog trakta. Kod ljudi su najpoznatija dva tipa zapaljenskih bolesti creva – Kronova bolest i ulcerativni kolitis.

Ove bolesti predstavljaju veoma aktivno polje istraživanja, i od svog otkrića (ulcerativni kolitis je prvi put opisan pre oko 170 (40), a Kronova bolest pre oko 90 godina (41)), pokazale su se komplikovanim za detaljno razumevanje, usled multifaktorijalne prirode bolesti, a samim tim su i opcije lečenja ograničene. Poslednjih decenija učestalost dijagnoza zapaljenskih bolesti creva kod ljudi u razvijenim zemljama, kao i u zemljama u razvoju, je u vidnom porastu (42). Iako se dugo smatralo da je propustljivost mukozne barijere creva sporedni efekat inflamacije, postoje sve jači dokazi u prilog hipotezi da je propustljivost zapravo neophodan preduslov razvoja Kronove bolesti ili ulcerativnog kolitisa (Slika 3) (43). Trenutno su terapijske opcije ograničene na supresiju zapaljenskog odgovora (44), što je lečenje sekundarne pojave (simptomatska terapija), umesto eliminacije uzroka bolesti.

Razlike između dva tipa zapaljenskih bolesti creva ogledaju se u tome što je Kronova bolest relapsna, karakteriše je transmuralna inflamacija (nije ograničena na mukozu), i može zahvatiti bilo koji deo gastrointestinalnog trakta, dok ulcerativni kolitis zahvata samo kolon, retko se manifestuje kao transmuralna inflamacija, a eliminacija zahvaćenog dela tkiva sprečava remisiju i širenje bolesti.



Slika 3 Uprošćen shematski prikaz neophodnih koraka za razvoj inflamacije creva koja je karakteristična za humane zapaljenske bolesti creva. Preuzeto izmenjeno iz Neurath 2014 (45)

Korisni modeli za izučavanje ovih bolesti jesu modeli indukovane zapaljenske bolesti creva na laboratorijskim životinjama. Kolitis se laboratorijskim životinjama može indukovati direktnom primenom agresivnog agensa, kao što su etanol (46) ili sirćetna kiselina (47), međutim ovi modeli se nisu pokazali efikasnim za izučavanje hronične inflamacije. Za tu svrhu su razvijeni složeniji modeli, među kojima su najpoznatiji i u najširoj upotrebi model kolitisa indukovani dekstran natrijum sulfatom (*engl.* Dextran sodium sulfate, DSS) (48) i 2,4,6-trinitrobenzensulfonskom kiselinom (*engl.* Trinitrobenzene Sulfonic acid, TNBS) (49). Ova dva modela, različita po putevima i dinamici primene, izazivaju reproducibilna oštećenja kolona koja traju duže od nedelju dana, nalik simptomima humanih

zapaljenskih bolesti creva. Slično je i sa modelom indukcije kolitisa peptidoglikanskim polisaharidom, koji je relapsni model hronične inflamacije creva, sličan simptomima Kronove bolesti (50). Preciznija mehanistička ispitivanja na celularnom nivou pružaju modeli kolitisa indukovanog adoptivnim transferom ćelija, poput modela adoptivnog transfera CD45RB^{High}CD4⁺ T limfocita (51).

1.2.2. Model kolitisa indukovanog rastvorom TNBS

Indukcija kolitisa pomoću rastvora TNBS u etanolu predstavlja relevantan model u istraživanju zapaljenskih bolesti creva pošto aktivira imunski odgovor i nakon početnog oštećenja etanolom prelazi u hroničnu inflamaciju (49). TNBS je hapten koji modifikuje proteine tkiva kolona i komensalnih bakterija, izazivajući imunski odgovor koji povećava propustljivost endotela (52,53). Intrarektalna primena TNBS rastvorenog u etanolu izaziva transmuralnu inflamaciju posredovanu Th1 imunskim odgovorom (54). Sam TNBS je toksičan za epitelne ćelije kolona u kulturi, oštećenja epitelnog tkiva su vidljiva već 2h nakon intrarektalne primene, sto povećava propustljivost mukozne barijere, a do 48h se razvijaju maksimalna oštećenja, predominantno u silaznom kolonu (55). Etanol koji se koristi kao sredstvo probijanja mukozne barijere izaziva oštećenja tkiva koja su prisutna barem 5 dana nakon indukcije, i neophodno je nekoliko nedelja da se tkivo u potpunosti oporavi (56). Prednost ovog modela je i jednostavnost izvođenja, budući da ne zahteva preveliku pripremu ili stručnost pored rukovanja laboratorijskim životinjama, kao ni skupe reagentse ili opremu za izvođenje.

1.2.3. Citokini u razvoju inflamacije creva

Ključna uloga citokina u razvoju zapaljenskih bolesti creva se najjasnije ogleda u činjenici da je najrašireniji vid terapije Kronove bolesti i ulcerativnog kolitisa upravo neutrališuće antitelo protiv TNF (40). TNF produkuje razne imunske ćelije, ali primarni izvor su aktivirani monociti i makrofagi. Pored njih, u manjim koncentracijama ga produkuje limfociti, neutrofili, NK ćelije, fibroblasti, mastociti, i osteoklasti (57). Svoj efekat vrše preko dve forme receptora, TNFR1, eksprimiranog u svim humanim tkivima, i TNFR2, eksprimiranog na imunskim, endotelnim, i nervnim ćelijama (58,59). Poslednji korak signalnog puta TNF unutar ciljnih ćelija jeste aktivacija nuklearnog faktora kapa-B (NF- κ B), koji pokreće transkripciju mnogih proinflamatornih gena za iNOS, IL-12, IFN- γ , i signalizaciju preživljavanja ćelije, ali može indukovati i ćelijsku smrt (apoptozu ili nekrozu) preko TNFR1 (60). TNF je glavni medijator inflamatornog odgovora, kako akutnog, tako i hroničnog. Ima centralnu ulogu u autoimunskim oboljenjima poput reumatoidnog artritisa, zapaljenskih bolesti creva, multiple skleroze, i sistemskog eritemskog lupusa (61).

Pored TNF, bitnu ulogu u razvoju simptoma zapaljenskih bolesti creva ima IL-6, čije dejstvo povećava koncentraciju mnogih klasičnih markera inflamacije koji se rutinski proveravaju u laboratorijskoj praksi. Sintetiše se lokalno, u inicijalnoj fazi inflamacije, ali brzo dospeva u sistemsku cirkulaciju gde izaziva povećano oslobađanje proteina akutne faze iz jetre (62) kao i ubrzano sazrevanje megakariocita i posledično povećanje broja trombocita oslobođenih u krvotok (63). Preliminarna istraživanja su pokazala da neutralizacija IL-6 monoklonskim antitelom može dovesti do olakšavanja simptoma u jednom delu pacijenata sa Kronovom bolešću (64). U animalnim modelima spontanog kolitisa, CD4⁺ T limfociti poreklom iz lamine proprije su identifikovani kao izvor većih količina IL-6 (65). Prilikom razvoja simptoma Kronove bolesti, utvrđena je otpornost mukoznih T limfocita na indukciju apoptoze, koja je posredovana signalizacijom kompleksa IL-6 i solubilnog receptora za IL-6, koji se može vezati za ćelije koje nemaju receptor za IL-6 (66). Ovim putem IL-6 promovise održavanje hroničnog inflamatornog stanja u pacijentima sa Kronovom bolešću. IL-6 je identifikovan i kao neophodan faktor polarizacije Th17 ćelija, u sadejstvu sa transformišućim faktorom rasta (*engl.* Transforming Growth Factor, TGF)- β (67). Među mijeloidnim ćelijama poreklom iz lamine proprije pacijenata sa Kronovom bolešću otkrivena je populacija CD14⁺CD163^{Low} ćelija koje produkuje velike količine IL-6, IL-1 β , i TNF nakon stimulacije LPS, i imaju izraženu sposobnost *in vitro* polarizacije naivnih T limfocita u Th17 fenotip (68). Ove ćelije postoje i u zdravom tkivu, ali je njihova sposobnost indukcije Th17 odgovora snižena u odnosu na ćelije koje su izolovane iz pacijenata sa inflamacijom kolona. Konačno, IL-6 značajno stimuliše ILC3 ćelije kolona, koje imaju povećan kapacitet produkcije IL-17A i IL-22, čime doprinose razvoju simptoma kolitisa na animalnim modelima i u humanim zapaljenskim bolestima creva (69).

Interferoni (IFN) su po prvobitnom otkriću i okarakterisani kao faktori koji ometaju replikaciju virusa (70). Ova grupa citokina se deli na dve podgrupe, tip I IFN, i tip II IFN. U tipu I su najpoznatiji predstavnici IFN- α i IFN- β , čija produkcija je klasično indukovana viralnom infekcijom (71). IFN- γ je jedini predstavnik tipa II IFN, i predominantno se proizvodi iz aktiviranih NK ćelija i Th1-polarizovanih T limfocita, mada i APC, NKT ćelije, i B limfociti imaju sposobnost produkcije ovog citokina. IFN- γ je neophodan za polarizaciju makrofaga ka proinflamatornom M1 fenotipu, koji ima efektorske funkcije u antimikrobnom i antitumorskom odgovoru (18). Značaj produkcije IFN- γ u APC je autoaktivacija, kao i lokalna aktivacija obližnjih imunskih ćelija (72). Učestalost IFN- γ u inflamaciji creva je pokazano na pacijentima koji boluju od zapaljenskih bolesti creva, koji su imali veće koncentracije IFN- γ u serumu u odnosu na zdrave donore (73), kao i na mišjem IFN- $\gamma^{-/-}$ modelu DSS-indukovanog kolitisa (74). Jedan od mehanizama kojim IFN- γ utiče na razvoj inflamacije u zapaljenskim bolestima creva jeste disrupcija vaskularnih barijera kolona (75). Sa druge strane, postoji dosta podataka u prilog protektivnoj funkciji IFN- γ . Naime, IFN- γ promovise produkciju/regeneraciju kripti u zdravom/inflamiranom kolonu (76), kao i održanje Treg/Th17 balansa u kolonu i limfoidnim tkivima (77), a neophodan je i za indukciju ekspresije MHC molekula II klase na epitelnim ćelijama creva (78). Sve to ukazuje na složene interakcije koje ovaj proinflamatorni citokin ima sa tkivnim okruženjem creva i njegovu ulogu u održavanju homeostaze.

Pored Th1 odgovora, drugi tip proinflamatornog odgovora je Th17 odgovor, posredovan dejstvom citokina familije IL-17, čiji su najpoznatiji predstavnici IL-17A, IL-17F, i IL-22. Istraživanja su pokazala da IL-17A i IL-17F imaju ulogu u promociji razvoja inflamacije u crevima (79), međutim začuđujuća je činjenica da tretman neutrališućim anti-IL-17A antitelom ne utiče na olakšanje simptoma, uz veću učestalost neželjenih efekata nego kod placebo tretmana (80). IL-17A antagonizuje reparaciju oštećenih kripti tokom inflamacije kolona, čime može uticati na produžavanje simptoma zapaljenskih bolesti creva (76). Diskusija oko uloge IL-17 u inflamaciji creva je produbljena nalazima na modelu kolitisa indukovano adaptivnim transferom CD45RB^{Hi} ćelija, gde je IL-17A konzistentno dovodio do smirivanja inflamacije (81).

IL-10 je anti-inflamatorni Th2 citokin koga proizvode regulatorni T limfociti, monociti, kao i alternativno aktivirani makrofagi. Efekat IL-10 se posebno izražava suprimiranjem funkcija makrofaga i aktiviranih T limfocita. Ovaj citokin ima važnu imunoregulatornu ulogu u mukozni creva (82), a njegova važnost u razvoju inflamacije kolona se ogleda u spontanom razvoju kolitisa u miševima koji su deficitarni za sam IL-10 ili receptor za IL-10 (83,84). U pogledu mehanizma kojim poremećena signalizacija IL-10 utiče na indukciju kolitisa u eksperimentalnim životinjama, utvrđeno je da aberantna produkcija citokina IL-22 izaziva inflamatorne uslove koji dovode do razvoja kolitisa (85). Nažalost, tretman dodatnim IL-10 ne doprinosi rezoluciji inflamacije u pacijentima sa zapaljenskim bolestima creva, čak se javljaju neželjene posledice usled tendencije IL-10 da izaziva anemiju direktnim uticajem na translaciju feritina (86).

1.3 Komensalna mikrobiota – značaj za zdravlje i metode ispitivanja

Značaj mikrobiote creva za opšte stanje zdravlja je oblast koja sve više dobija na značaju. Znanje o ovom složenom sistemu i interakciji humanih i brojčano nadmoćnih bakterijskih i gljivičnih ćelija se širi sa brojnim istraživanjima koja se objavljuju i metodama koje se razvijaju. U crevima čoveka se nalazi kompleksan ekosistem mikroorganizama (barem 10^{12} ćelija), što čini broj mogućih interakcija sa domaćinom nesagledivim. Do sada su razvijene mnoge metode molekularne biologije i mikrobiologije za testiranje efekata kompleksnih bakterijskih populacija: gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu (*engl.* Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis, DGGE), koja omogućava identifikaciju i jako retkih (~1%) predstavnika u populaciji (87); transplantacija mikrobiote fecesa, što predstavlja implantaciju flore creva jednog organizma u drugi (transfaunacija), što se u kliničkoj praksi pokazalo uspešnim za lečenje pacijenata sa ulcerativnim kolitisom (69) i pseudomembranoznim enterokolitisom (89); životinjski modeli bez mikrobiote (*engl.* Germ Free, GF) ili bez određenih mikroorganizama mikrobiote (*engl.* Specific Pathogen Free, SPF), koji omogućavaju ispitivanje uticaja specifičnih članova bakterijske flore creva na homeostazu, razvoj, i fiziološke procese *in vivo* (90).

Navedenim metodama se došlo do boljeg razumevanja mnogih aspekata pozitivnog uticaja komensalne mikrobiote na različite aspekte zdravlja i razvoja organizma. Raznovrsne bakterije crevne mikrobiote imaju nezamenjivu ulogu u direktnoj sintezi neophodnih hranljivih materija (vitamini, folat, biotin) ili stvaranju povoljnog okruženja za katabolizam proteina i lipida iz ishrane (91). Gojaznost u mnogim eksperimentima korelira sa poremećenim odnosom pripadnika komensalnog bakterijskog filuma Firmicutes i Bacterioides u korist prethodnih, što rezultuje povećanom koncentracijom metabolita u crevima koji poveavaju unos kalorija (92). Prisustvo komensalnih bakterija je neophodno za razvoj peharastih ćelija i efikasne sinteze mukusa, budući da su u GF pacovima ove ćelije značajno manje zastupljene (93), mada tačan mehanizam ove interakcije nije poznat. Uz svu do sada identifikovanu složenost samih populacija komensalnih bakterija i njihovih interakcija, jasno je da su sva istraživanja dosada samo zagrebala površinu, i da ovo polje istraživanja ima bogatu budućnost i ogroman značaj za razumevanje i unapređenje zdravlja ljudi.

1.3.1. Uticaj komensalne flore creva na razvoj imunskog sistema

Neposredno pre rođenja, intaktni gastrointestinalni trakt kolonizuju brojni mikroorganizmi raznih filuma. Interakcije komensalne mikrobiote sa lokalnim su bitan učesnik u oblikovanju imunskog sistema u razvoju. Rezydentni makrofagi lamine proprije adultnih creva su specifične po tome što se konstanto obnavljaju monocitima iz cirkulacije, a taj proces je vođen upravo kolonizacijom flore creva (30). Eksperimentalni modeli miševa gajenih u SPF uslovima imali su nerazvijen imunski sistem, čiji ćelijski sastav više podseća na imunski sistem novorođenčadi nego odraslih jedinki, a čije sazrevanje je kompletirano u divlji soj miševa pet šopa ili nakon kohabitacije sa njima (94). Slobodnoživeći miševi se takođe dosta razlikuju u imunološkim parametrima od miševa gajenih u laboratorijskim uslovima. Miševi divljeg soja imaju daleko veće koncentracije antitela klase IgG i IgE u serumu, kao i drugačiji sastav ćelija slezine, sa populacijama mijeloidnih ćelija koje su potpuno odsutne u laboratorijskih miševa (95). U istraživanju polnih razlika u imunskom odgovoru, pokazalo se da postoji uzajmna zavisnost gena i mikrobiote u razvoju imunskog sistema – urođene polne razlike u imunskom odgovoru oblikuju sastav mikrobiote, a sastav mikrobiote oblikuje razvoj mnogih elemenata imunskog odgovora (96).

1.4 Probiotici – značaj, efekti, i mehanizmi

Probiotici su po definiciji Svetske Zdravstvene Organizacije živi mikroorganizmi koji u adekvatnim količinama utiču pozitivno na zdravlje recipijenta (97). Otkriće značaja specifičnih mikroorganizama za zdravlje i dugovečnost se pripisuje Ilji Mečnikovu i Anriju Tisijeu na samom početku dvadesetog veka (98), mada je značajan napredak na polju istraživanja probiotskih sojeva i njihovih efekata na brojne patološke promene postignut tek u poslednje četiri decenije. Tretmani probiotskim preparatima pokazuju efikasnost na animalnim modelima, a na pacijentima koji pate od ulcerativnog kolitisa pomažu u izazivanju i održavanju remisije, dok nisu pokazali efikasnost u lečenju simptoma CD (44). Neke vrste humane flore creva zdravih individua sprečavaju uspostavljanje izvesnih patogenih vrsta, čime doprinose održavanju mukozne barijere protiv patogenih bakterija (99).

1.4.1. *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*)

Bakterije roda *Lactobacillus* su veoma zastupljene u više mikrobiotskih zajednica (urogenitalni sistem, flora creva). Mlečna bakterija *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) predstavlja verovatno najpodrobnije izučeni probiotski soj bakterija, posebno soj LGG. Ovaj soj se pokazao da ima izuzetno izraženu sposobnost adherence za ćelije epitela kolona (100), kao i sposobnost preživljavanja i metaboličke aktivnosti u kiseloj pH sredini želudačnog miljea. Mnogo uspešnije kolonizuje neonatalnu floru creva, i dovodi do povećanja prisustva vrsta roda *Lactobacillus* (101). Uspešnosti kolonizacije osim izražene adhezivnosti za mukozni epitel sigurno doprinosi i mikrobicidna aktivnost peptida koje LGG proizvodi (102), kao i njihova otpornost na odbrambene sisteme creva (103). Rana istraživanja su pokazala da imaju efekat u pojačavanju mukozne barijere creva u miševima (104), verovatno usled njihovog antiapoptotskog efekta na epitelne ćelije (105). Međutim, zanimljiva karakteristika *L. rhamnosus* je izražena imunološka aktivnost: doprinosi sazrevanju imunskog sistema neonatalnih creva i štiti od kolitisa u miševima (106), solubilnim faktorima utiče na inhibiciju LPS-stimulisane sekrecije IL-12 i TNF makrofaga, dok podstiče ekspresiju TLR na više tipova ćelija (107,108), a modulacijom DC indukuje hiporesponsivnost aktiviranih T limfocita, čime ublažava inflamaciju u mukozi (109).

1.5. Sojne razlike u inflamatornom odgovoru pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja – uloga makrofaga

Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) pacovi ne podležu jednako indukciji inflamatornih bolesti kao što su eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) (110) i akutnom inflamatornom stanju kao što je konkanavalinom A (ConA) indukovani edem šapice (111). Jedan od faktora koji doprinosi razlici u osjetljivosti na indukciju EAE je različit sastav komensalne flore ova dva soja pacova, i nakon uklanjanja razlika u sastavu mikrobiote, njihova podložnost indukciji se izjednačava (112–114). Starenje je također faktor u različitoj podložnosti EAE ova dva soja pacova (115). Makrofagi peritonealne šupljine ova dva soja pacova također pokazuju različit odgovor na stimulaciju tioglikolatom, kao i različite profile citokina i fenotipske karakteristike tokom starenja (116). Također, makrofagi peritonealne šupljine ova dva soja pacova se razlikuju u profilima odgovora na raznovrsne stimulatore (117), uključujući i komensalne bakterije, što veoma moguće korelira sa njihovom različitom podložnošću na indukciju autoimunskih i inflamatornih bolesti (118). Uzevši u obzir uključenost makrofaga u sve faze inflamatornog odgovora, od inicijacije do rezolucije, kao i do sada pokazane sojne razlike u fenotipu i funkciji makrofaga ova dva soja, može se pretpostaviti da ove razlike u funkcionalnosti izazvane genetskim i razvojnim razlikama pod uticajem mikrobiote, imaju ulogu u različitosti opšteg odgovora na inflamatorne agense ova dva soja pacova.

2. CILJEVI RADA

Predmet istraživanja predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivanje promena u fenotipu i aktivnosti peritonealnih makrofaga dva soja pacova tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano delovanjem bakterija mikrobiote creva direktno, *i.p.* primenom, ili indirektno, nakon narušavanja integriteta epitela creva, utvrđivanje značaja genetski determinisane predispozicije ka određenom obrascu aktivacije makrofaga za ishod uočenih promena, kao i ispitivanje mogućnosti modulacije ovih promena primenom probiotske bakterije *Lactobacillus rhamnosus*.

Radi realizacije istraživanja, postavljeni su sledeći istraživački ciljevi:

- Ispitivanje fenotipskih i funkcionalnih karakteristika peritonealnih makrofaga pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja tokom razvoja peritonitisa indukovano primenom *Enterococcus* spp. i *Escherichia coli* .
- Ispitivanje fenotipskih i funkcionalnih karakteristika peritonealnih makrofaga pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja tokom razvoja eksperimentalnog kolitisa.
- Ispitivanje uticaja primene probiotske bakterije *L. rhamnosus* na fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga pacova tokom razvoja peritonitisa i eksperimentalnog kolitisa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Laboratorijske životinje

Istraživanja su rađena na pacovima DA i AO soja, starosti 3-5 meseci. Životinje su inicijalno nabavljene iz vivarijuma Vojno Medicinske Akademije, a zatim gajene u vivarijumu Centra za imunološka istraživanja i sparivane zbog potreba dobijanja životinja koje će biti tretirane u ranom postnatalnom uzrastu. Pacovi su gajeni u plastičnim kavezima sa dostupnom vodom i hranom (pod strogom proverom, zavisno od potreba eksperimenta), u 12-očasovnom ciklusu tame i svetla, pri temperaturi od $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti od 40%-70%. Zavisno od potreba eksperimenta, jedinke su bile ili u odvojenim kavezima, ili po tri istog uzrasta i pola u jednom kavezu. Svi eksperimenti čiji rezultati su prikazani u ovoj tezi su izvođeni u skladu sa etičkim principima u radu sa eksperimentalnim životinjama i Zakonom o dobrobiti životinja (Rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama broj 2323-07-01577/2016-05/14, izdato 25.02.2016. godine).

3.2. Hemikalije, antitela i imunokonjugati

Albumin goveđeg seruma (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA), konkanavalin A (*engl.* Concanavalin A, ConA), TNBS, lipopolisaharid (LPS), fenil-metil-sulfonil-fluorid (*engl.* Phenyl Methyl Sulfonil Fluoride, PMSF), alfa-izo-nitrozo-propio-fenon (α ISPF), fenol crveno, forbol-miristat-acetat (*engl.* Phorbol Myristate Acetate, PMA), sulfanil amid, naftil-etilen-diamin, medijum Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sa fenol crvenim indikatorom, i cetrimonijum bromid (CTAB) su nabavljni od proizvođača Sigma (St. Louis, Mo., SAD). Fetalni goveđi serum (*engl.* Foetal Calf Serum, FCS) je nabavljen od proizvođača Gibco, Grand Island, NY, SAD. Boja Comassie Blue G250 je od Merck kompanije, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ, SAD. Antitela koja su korišćena u eksperimentima su nabrojana u Tabela 3.

Tabela 3. Monoklonska i poliklonska antitela korišćena za fenotipizaciju ćelija i detekciju imunoglobulina u serumu u izvedenim eksperimentima

Životinja porekla	Antigen, konjugat	Proizvođač (kat.broj)
miš	CD163, neobeleženo	BioRad (MCA342R)
	CD163, PE	BD Pharmingen (554901)
	CD4, PE	BD Pharmingen (551397)
	CD43, PE	BioLegend (202812)
	CD45RA, PE-Cy5	BD Pharmingen (557015)
	CD68, biotin	BioRad (MCA341B)
	CD68, FITC	BioRad (MCA341F)
	CD8a, FITC	BD Pharmingen (554856)
	CD86, biotin	BD Pharmingen (555017)
	HIS48, biotin	eBioscience (13-0570-82)
	IgG1, biotin	Biolegend (407403)
	IgG2a biotin	Biolegend (407503)
	IgG2b, biotin	BD Pharmingen (553883)
	Ki67, AlexaFluor 488	BD Pharmingen (561165)
	MHCII, FITC	BD Pharmingen (554929)
MHCII, PE	eBioscience (12-0920-82)	
zec	TLR4, neobeleženo	Abcam (ab13556)
koza	IgA, biotin	Abcam (ab97183)
	Mouse IgG, FITC	BD Pharmingen (554001)
	Mouse IgG, PCPCy5.5	BioLegend
	Rabbit IgG, FITC	BD Pharmingen (554020)
ostalo	Streptavidin, PE	BD Pharmingen (554061)
	Streptavidin, HRP	BDPharmingen (554066)

3.3. Izolovanje bakterija fecesa

Komensalne bakterije su izolovane iz svežih fecesa sakupljenih od pacova AO i DA soja prema prethodno utvrđenom protokolu (119). Uzorci fecesa su homogenizovani i zasejani na različite podloge agara (MacConcey agar, Endo agar, Institut "Torlak", Beograd, Srbija), i kultivisani 24h na 37°C. Kolonije su izolovane u stacionarnoj fazi rasta i identifikovane bojenjem po Gramu i morfološkim karakteristikama, kao i biohemijskim testovima i brzim sistemom identifikacije (ID-32A, API Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Agar medijum iz eskulina žuči (Institut "Torlak") je upotrebljen za potvrdu roda *Enterococcus*. Dalje determinacija roda *Enterococcus* do nivoa vrste nije rađena, s obzirom da nakon MALDI-TOF analize pretraga kroz bazu VITEK® MS V2.0 Knowledge Base (Biomerieux) nije dala rezultat.

E. coli i *Enterococcus* spp. su identifikovane kao predominantne anaerobne Gram (-), odnosno Gram (+) bakterije u oba soja pacova (AO i DA). Bakterije su gajene 24h u aerobnim uslovima, sakupljene u stacionarnoj fazi rasta, isprane sterilnim PBS-om (1000 x g, 20 minuta), i resuspendovane u sterilnom PBS-u. Bakterije su ubijene formalinom (finalne koncentracije 0.5% v/v) a suspenzije su držane na 35°C duže od 48h. Čelije su isprane tri puta PBS-om kako bi se uklonio formaldehid, i resuspendovane su u sterilnom PBS/0.25% fenolu, i uskladištene na 4°C do upotrebe. Efikasnost ubijanja bakterija je potvrđeno testom sterilnosti. Koncentracija ćelija je utvrđena čitanjem optičke gustine na 580nm i ekstrapolacijom pomoću standardne krive uz pomoć BaSO₄.

3.4. Indukcija peritonitisa

Intraperitonealno je ubrizgavano 300µl suspenzije koja sadrži 1.5x10⁸ CFU/ml u PBS-u formalinom-umrtvljenih autologih bakterija fecesa sojeva *E. coli* i *Enterococcus* spp. Pacovi kontrolne grupe su primili istu zapreminu sterilnog PBS-a. Ponašanje i izgled životinja su praćeni tokom sledeća dva dana i ocenjivani prema tabeli Opšteg Zdravlja (Tabela 4) (120). Nakon dva dana životinje su žrtvovane i sterilnom lavazom je izolovan peritonealni lavat za ispitivanje aktivnosti ćelija i njihovog fenotipa.

Tabela 4 Kriterijumi bodovanja opšteg zdravstvenog stanja životinja prema Gill-u (120)

Skor	Opis stanja životinje
5	Zainteresovana za okruženje, budna i bistrih očiju, sa glatkim i sjajnim krznom
4	Blago neuredno krzno sa gubitkom sjaja, životinja i dalje budna i aktivna
3	Veoma neuredno krzno, vidljivo odsustvo nege na delovima krzna, manje interesovanja za okruženje, pokazuju znake hiperventilacije prilikom pregleda
2	Letargična i mirna, skoro da nema interesovanja za okruženje, odsustvo nege krzna
1	Ne odgovara na stimulaciju, mirna i sklupčana, preferira da spava, hladna na dodir, šape hladne, krzno u vrlo lošem stanju, četkastog izgleda

3.5. Intraperitonealni (*i.p.*) tretman probiotskom bakterijom *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*)

Probiotska bakterija *L. rhamnosus* je nabavljena od Instituta za Virusologiju, Vakcine, i Serume "Torlak", gde se koristi u proizvodnji probiotskog preparata "Liobif". Ovaj soj je izolovan iz humane gastrointestinalne flore, i okarakterisan je sekvencioniranjem bakterijke 16S rRNK (NCIMB Ltd, Aberdeen, UK; dodeljen naziv soja NCSQ 18723), čime je utvrđeno da ima 99.41% sličnosti sa sekvencama vrste *L. rhamnosus*.

Direktno delovanje probiotske bakterije na ćelije peritonealnog lavata je ispitivano na pacovima AO i DA soja *i.p.* ubrizgavanjem 300µl suspenzije *L. rhamnosus* koncentracije 1.5x10⁸ CFU/ml u PBS. Pacovi kontrolne grupe su primili istu zapreminu sterilnog PBS-a. Ponašanje i izgled životinja su praćeni tokom sledeća dva dana i ocenjivani prema tabeli Opšteg Zdravlja (Tabela 4) (120). Životinje su žrtvovane nakon dva i sedam dana, i sterilnom peritonealnom lavazom su izolovane ćelije za fenotipska i funkcionalna ispitivanja odgovarajućim *in vitro* stimulacijama.

3.6. Indukcija kolitisa

Životinje su anestezirane *i.p.* injekcijom koktela ketamin/ksilazin (60 mg/7.5 mg/kg telesne mase), i tek po dosezanju duboke anestezije (proveravane refleksom zadnje šape), izvršena je indukcija kolitisa. Kanila prečnika $\Phi = 1$ mm, namazana vazelinom, je vrlo nežno ubačena intrarektalno (kako bi se izbegla mehanička oštećenja tkiva), i nakon što je oko 8 cm kanile ubačeno, ubrizgano je 250 μ l odgovarajućeg rastvora (laganim pritiskom, u trajanju od oko 10 sekundi) u zavisnosti od eksperimentalne grupe. Životinje su podeljene u 4 eksperimentalne grupe:

- kontrolna grupa kojoj je ubrizgan fiziološki rastvor (Fiz.Rastvor),
- grupa životinja kojoj je ubrizgan 50% rastvor etanola (EtOH),
- grupa tretirana nižom dozom TNBS (10 mg TNBS/kg telesne težine – TNBS10),
- grupa tretirana višom dozom TNBS (40 mg TNBS/kg telesne težine – TNBS40).

Kanila je vrlo nežno izvučena, i životinja je okretana u položaj posteriornim krajem na gore, kako bi se sprečilo pasivno odlivanje rastvora. Životinje su držane 5 minuta u tom položaju, nakon čega su stavljene u kaveze i pažljivo praćene do potpunog buđenja iz anestezije. Narednih 7 dana praćeno je njihovo generalno zdravstveno stanje, konzumacija hrane i vode, kao i konzistencija fecesa i prisustvo krvi. Jedan dan pred eutanaziju, životinjama je uklonjena hrana.

3.7. Oralni tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus*

Pacovima DA soja su od trećeg dana života podeljeni u dve grupe – L/V (grupa životinja koja je od 3. do 30-og dana života pojena rastvorom probiotika) i V/V (kontrolna grupa, koja je od 3. do 30. dana života na isti način pojena istom količinom vode). Probiotik *L. rhamnosus* je rastvoren u običnoj vodi i primenjivan u količini od 3×10^6 CFU/g telesne mase dnevno. Tokom prvih 30 dana života pacovi su pojeni pipetom, dok su nakon odvajanja od majki (30. dana) i smeštanja u kaveze prema polu, pacovi obe eksperimentalne grupe nastavili samostalno da uzimaju vodu iz bočica za pojenje. Nakon odvajanja od majki, 30. dana života, a zatim i 76. dana života, sakupljani su sveži fecesi tako što su pacovi pojedinačno stavljeni u čiste kaveze obrisane 70% etanolom. Fecesi su zamrznuti na -80°C do momenta slanja na Institut za Molekularnu Genetiku i Genetski Inženjering na analizu raznovrsnosti bakterija.

Jednom delu pacova iz L/V i V/V grupe je 77. dana života indukovana kolitis ubrizgavanjem više doze TNBS-a (40mg/kg). Ostali pacovi su korišćeni kao zdrave kontrole za ispitivanja fenotipa i funkcionalnosti peritonealnih makrofaga, kao i translokaciju komensalnih bakterija kolona.

3.8. Bakterijska translokacija

Da bi se ispitala translokacija bakterija iz creva ka sekundarnim limfoidnim organima tokom razvoja kolitisa, životinjama je izolovana slezina i mezenterični limfni čvorovi. Nakon maceracije sekundarnih limfoidnih tkiva kroz najlonsku mrežicu (50 μ m), pripremljene su suspenzije u sterilnom fiziološkom rastvoru. Serijska razblaženja su zasejana na MacConcey agar (Institut "Torlak", Beograd, Srbija). Podloge su inkubirane preko noći na 37°C , 24h, odnosno 48h. Rezultat je izražen na kvalitativnoj skali označenoj simbolima "+", što znači da su se iz svih uzoraka iz grupe razvile kolonije bakterije kolona, "+/-", što znači da je bilo uzoraka iz grupe iz kojih se nisu razvile kolonije bakterija kolona, i "-", što znači da se ni iz jednog uzorka iz grupe nije razvila nijedna kolonija.

3.9. Izolacija ćelija i tkiva

Abdomen pacova je prebrisan 70% etanolom, krzno je odvojeno od trbušnog zida zasecanjem, i napravljen je medijalni rez (duž *linea alba*) oko 1,5 cm dužine. U abdomen je ubrizgano 10ml hladnog i sterilnog PBS-a, životinja je blago protresena, kako bi se pufer ravnomerno rasporedio po peritonealnoj šupljini, i špicem je sav lavat aspiriran. Ćelije peritonealnog lavata su isprane 2 puta u 2% FCS/PBS, i resuspendovane u 1ml istog rastvora. Broj ćelija ove suspenzije je izbrojan na hemocitometru pod mikroskopom (40x) u Tirkovom rastvoru (1:10), kako bi se podesila koncentracija ćelija za dalja ispitivanja. Broj ćelija je izražen po 1ml konačne suspenzije.

Mezenterični limfni čvorovi su izolovani sa mezenterijuma, od cekuma pa uz ileokoličnu venu, pažljivo odvojeni od masnog tkiva, izbrojani i izmereni na analitičkoj vagi. Nakon toga su macerirani kroz ćelijsko sito (Falcon 352340, 40 μ m). Ćelije su resuspendovane u 2ml 2% FCS/RPMI i izbrojane u rastvoru boje Tripan Blue (1:10) na svetlosnom mikroskopu (40x).

Nakon otvaranja grudnog koša krv je uzeta kardijalnom punkcijom, prebačena u serološke epruvete, i ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi 2h, a zatim još 2h na 4°C, uz povremeno pažljivo odvajanje koaguluma od zida epruvete staklenim štapićem. Nakon potpunog taloženja ćelija, epruvete sa serumom su dva puta centrifugirane na 500 g, a zatim je serum dekantovan u ependorfe koji su zamrznuti na -20°C

Kolon je odsečen od okolnih mezenterijuma, cekuma, i rektuma, ispran u HBSS (*engl.* Hanks Balanced Salt Solution) bez kalcijuma i magnezijuma, sa dodatkom HEPES pufera (pH 7.2), otvoren uzdužnim rezom i očišćen od fecesa. Po 50 mg tkiva kolona je ostavljeno u 1 ml 50 mM K-P pufera za određivanje koncentracije citokina i aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO), dok je ostatak tkiva uvijen u spiralu ili u vidu kratkih poprečnih preseka ostavljen u 4% PFA za histološku analizu tkiva.

3.10. Određivanje ispoljavanja antigena na ćelijama peritonealnog lavata i mezenteričnih limfnih čvorova

Detekcija membranskih ili unutarćelijskih antigena je vršena na 5x10⁵ ćelija uzorka (u 50 μ l peritonealnog lavata ili suspenzije ćelija mezenteričnih limfnih čvorova). Bojenja su rađena u epruvetama od 4,5 ml (Falcon), a ispiranja vršena centrifugiranjem dva puta na 350g, 6 minuta, na 4°C. Obeležavanje membranskih antigena je vršeno direktnim nalivanjem primarnog antitela, sa inkubacijom od 20 minuta na 4°C. Obeležavanje citoplazmatskih antigena (CD68, Ki67) je vršeno na ćelijama fiksiranim u 0.25%PFA/PBS i permeabilizovanim sa 0.2%Tween-20/PBS. Sva učitavanja i analize su rađene na BD FACSVerser (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) citometru, sa softverom FACSuite.

3.11. Određivanje produkcije azot-monoksida (NO)

Produkcija NO je određena po standardnoj proceduri iz Green et al. (121). Po 100 μ l suspenzije ćelija peritonealnog lavata (10⁶/ml 2%FCS/PBS) je adherirano (37°C, 2h), nakon čega su neadherirane ćelije isprane temperiranim (37°C) PBS-om i dodato im je 100 μ l stimulatora (LPS 1 μ g/ml 5% FCS/RPMI) ili 100 μ l suspenzije umrtvljenih bakterija (*E. coli* i *Enterococcus* spp, 3x10⁸ CFU/ml 5% FCS/RPMI) po bazenu. Nakon 48 sati inkubacije ćelija na 37°C, 5% CO₂, iz kulture je uzeto 50 μ l supernatanta, gde je reakcijom sa Grisovim reagensom i čitanjem žute boje na 545 nm talasne dužine utvrđena koncentracija nitrita prema vrednostima standardne krive (1-100 μ M NaNO₂). Za očitavanje bojene reakcije u testu određivanja produkcije NO, kao i u svim ostalim kolorimetrijskim reakcijama u ovoj disertaciji, korišćen je aparat Multiscan Ascent plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). Adherirane ćelije peritonealnog lavata su lizirane (0.1% Triton-X/PBS), a lizati zamrznuti u prisustvu inhibitora proteaza PMSF za analizu aktivnosti arginaze .

3.12. Određivanje aktivnosti arginaze-1

Aktivnost arginaze u lizatima makrofaga je određena metodom merenja koncentracije uree nakon hidrolize L-arginina (122). Ćelije u ploči zamrznutoj na -20°C su nakon nedelju dana odmrzavane na sobnoj temperaturi, nakon čega im je dodato po 50 μ l po bazenu rastvora MnCl₄ u TrisHCl (pH 7.5). Ploča je inkubirana na 55°C, 10 minuta. Suspenzije liziranih ćelija su prebačene u ependorfe (po 25 μ l), dodat im je rastvor L-arginina (0.5 M pH 9.7, 25 μ l), nakon čega su ostavljene na 37°C preko noći. Sledećeg dana je dodat rastvor kiselina (96% H₂SO₄, 85% H₃PO₄, i voda, u odnosu 1:3:7) i α -ISPF u apsolutnom etanolu (25 μ l/bazenu). Uzorci su grejani u vodenom kupatilu, na temperaturi blizu ključanja i nakon 40 minuta razvoja ljubičaste boje, očitane su vrednosti optičkih gustina na 545 nm. Aktivnost arginaze se određuje prema izmerenim vrednostima uree u uzorku, preračunatim prema vrednostima standardne krive (25-1600 μ M uree).

3.13. Određivanje produkcije vodonik peroksida (H₂O₂)

Suspenzije ćelija peritonealne šupljine (100 µl 2.5x10⁶ ćelija/ml RPMI/5%FCS) su inkubirane na 37°C, u prisustvu 5% CO₂ tokom 2h, nakon čega su isprane 2 puta toplim PBS-om (37°C). Nakon toga je naliveno po 100 µl 25 nM PMA u rastvoru fenol crvenog (koji sadrži 0.1% glukoze, 0.02% fenol crvene boje, i 0.02% peroksidaze rena u PBS-u) po bazenu. *In vitro* stimulacije su rađene i sa dodatnim autologim *E. coli* ili *Enterococcus* spp (3x10⁸ CFU/ml 25 nM PMA). Nakon sat vremena stimulacije (37°C/5% CO₂), reakcija je prekinuta sa 10 µl 0,5M rastvora NaOH. Intenzitet razvijene ljubičaste boje je meren na 620 i 690 nm, a koncentracija H₂O₂ je izračunata prema standardu H₂O₂ (1-100 µM).

3.14. Određivanje peroksidazne aktivnosti (MPO)

Aktivnost MPO u ćelijama peritonealnog lavata je detektovana nakon adherence ćelija (2.5x10⁶/ml) od 2h (37°C), promenom boje orto-fenilen diamina (OPD) nakon dodavanja H₂O₂. Tkivo kolona je homogenizovano u kalijum-fosfatnom puferu (pH 6) sa 0.05 M CTAB u odnosu 50 mg tkiva na 1 ml pufera. Nakon homogenizacije, homogenat je centrifugiran (4°C, 10000g, 10 minuta), i iz supernatanta je određena aktivnost MPO dodatkom rastvora OPD (1 mg/ml citratnog pufera) sa 0.0144% H₂O₂. Rezultati su prikazani kao očitana optička gustina (OG) x 1000.

3.15. Određivanje koncentracije citokina

Ćelije limfnih čvorova i peritonealnog lavata su nalivene u ploču sa 96 bazena, po istom principu kao u ostalim testovima. Nakon 24h inkubacije, supernatanti su preuzeti i zamrznuti na -80°C. Određivanje koncentracije citokina u tkivu kolona je rađeno u homogenatima tkiva, odmah nakon njihove pripreme, ili nakon odleđivanja prethodno zaleđenog homogenata. Za određivanje koncentracije citokina iz supernatanta ili homogenata korišćeni su komercijalni ELISA kitovi za IL-17A, TNF (Biolegend, San Diego, CA, USA), IL-6, IL-10, i TGF-β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) i IFN-γ (Elabscience, Houston, TX, USA).

3.16. Određivanje nivoa IgG i IgA specifičnih za bakterijske antigene u serumu

Nivo antitela IgG1, IgG2a, IgG2b, i IgA klase specifičnih za komensalne bakterije je određivan po modifikovanoj verziji prethodno opisanog protokola (123). U ploču od 96 bazena (Polysorp NUNC Immuno-plate) naliveno je po 50 µl suspenzije bakterija u PBS-u (*E. coli*, 10⁸ ćelija/ml). Ploče su centrifugirane na 1500 g 15 minuta, nakon čega su ostavljene preko noći na +4°C. Sledećeg jutra, potencijalno nespecifično vezivanje imunoglobulina je blokirano dodavanjem 200 µl 1% BSA/PBS tokom 2h, posle čega su ploče isprane sa 0.05% Tween-20/PBS. Nakon toga su u bazene naliveni serumi razblaženi u PBS-u (1:400 za određivanje IgG1, IgG2a, IgG2b, 1:50 za određivanje IgA), i inkubirani 2h na sobnoj temperaturi. Za detekciju su korišćena anti-IgA (Abcam), anti-IgG1 (BioLegend), anti-IgG2a (BioRad), anti-IgG2b (BD Pharmingen) antitela konjugovana biotinom, kao i ekstravidinom konjugovana peroksidaza rena (Sigma). Kolorimetrijska reakcija se razvila dodavanjem 50 µl 0.00132% H₂O₂/OPD i prekinuta je nakon 15 minuta istom zapreminom 2N H₂SO₄. Čitanje optičke gustine je vršeno na 492 nm, sa korekcijom na 620 nm. Rezultati su prikazani kao očitane optičke gustine (OG) x 1000. Preliminarnim eksperimentima u serumu pacova AO i DA soje pre i nakon indukcije kolitisa nisu detektovana antitela specifična za *Enterococcus* spp..

3.17. Histološka analiza kolona

Uzorci kolona, isečeni na komadiće dimenzija 3x3 mm, su držani u mraku u 20x većoj zapremini 4% PFA tokom 3 dana, nakon čega su isprani u čistom PBS-u i prebačeni u serijska razblaženja alkohola (70% 24h, 85% 24h, 96% 1h, 100% 2h, ksilol 1h). Nakon prosvetljenja ksilolom, tkiva su ostavljena u parafinu na +58°C preko noći i sledećeg dana ukalupljena u svežem parafinu. Ukalupljeni i ohlađeni preparati su sečeni na mikrotomu (Leica RM2155). Preseci debljine 5 µm su bojeni hematoksilin/eozin (HE) metodom, i uslikani na mikroskopu Olympus (BH-2) na uvećanju 40x.

Distalni ileum i kolon, izolovani iz pacova starih 30 dana, koji su tretirani *L. rhamnosus* (L/V) ili vodom (V/V), su obojeni standardnom HE metodom. Dužina resica ileuma i dubina kripti kolona, predstavljene mikrometrima, su izmerene na mikroskopu (BX53 Research Microscope, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

3.18. Analiza varijabilnosti bakterija fecesa

Ekstrakcija ukupne bakterijske DNK je rađena primenom ZR fekalnog DNK MiniPrep™ (Zymo Research, Irvine, CA, USA), prema priloženom uputstvu. Elektroforeza na denaturišućem gradijentu gelu (DGGE) i manipulacija gelom nakon elektroforeze su obavljene prema već opisanom protokolu (124). Uzorci fecesa su ispitani PCR-DGGE analizom sa izolovanom genomskom DNK kao paternom (125). Univerzalni 16S rRNA gene-targeting prajmeri U968-GC-f (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3') i L1401-r (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (amplifikuju regione bakterijske 16S rRNA od V6 do V8) (90); Bifidobacterium 16S rDNA gene-targeting prajmeri Bif662-GC-r (5' CGC CCG CG CGC GCC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC ACC GTT ACA CCG GGA A 3') i Bif164-f (5' GGG TGG TAA TGC CGG ATG 3') (91); Lactobacillus-specifični prajmeri Lab-0159f (5' GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG 3') i Uni-0515GCr (5' CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT CGT ATT ACC GCG GCT GCT 3') (125) su upotrebljeni radi detaljne provere mikrobijalnog diverziteta u uzorcima fecesa. PCR reakcija je izvršena u termalnom sajklaru Gene AmpRPCR sistemu 2700 (AppliedBiosystems, Foster City, CA). Amplifikacije su urađene pomoću KAPATaqDNA polimeraze (KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa). Bakterijska DNK je onda postavljena na denaturišući gradijentski gel (124) pripremljen uz korišćenje staklenih ploča za aparaturu za elektroforezu DGEE-2001 (C.V.S. Scientific, San Diego, CA). Gradijent od 30-60% je korišćen za separaciju DGGE amplikona koji su dobijeni pomoću seta prajmera specifičnih za Lactobacillus, a gradijent od 45-55% za separaciju DGGE amplikona koji su dobijeni pomoću prajmera specifičnih za Bifidobacterium (127). PCR produkti dobijeni pomoću univerzalnog seta prajmera su separisani na gradijentu od 40-80% (87). DNK fragmenti su vizuelizovani pomoću AgNO₃ bojenja, koje je razvijeno u baznim uslovima, kao što je već opisano (128).

3.19. Statistička obrada podataka

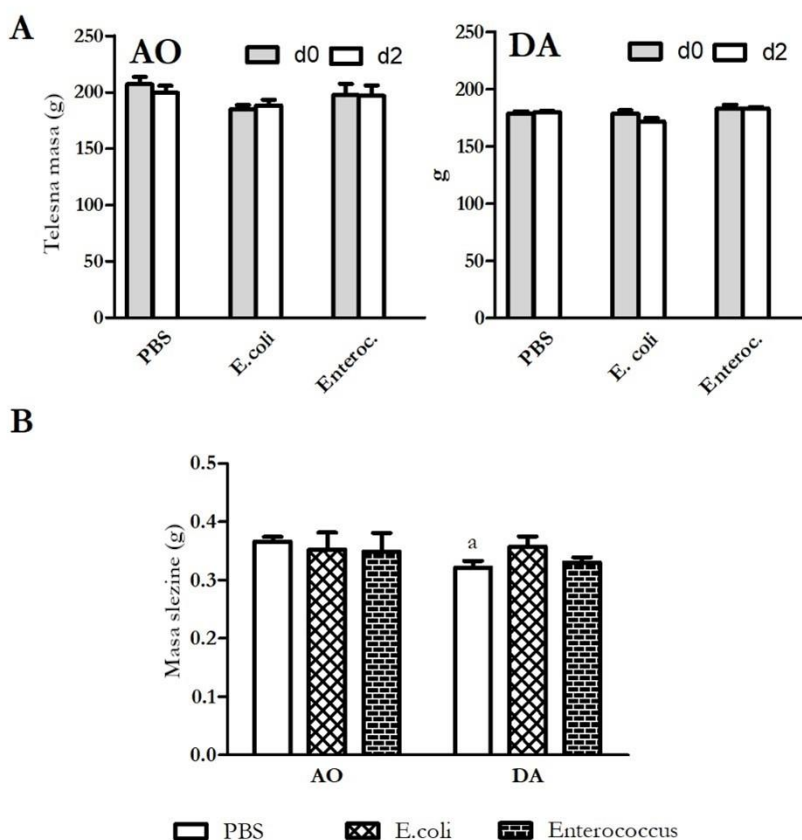
Rezultati su izraženi kao realna srednja vrednost \pm standardna greška. Korišćeni su t-test za poređenje dve grupe, jednofaktorska (za poređenje više grupa po jednoj zavisnoj promenljivoj) i dvofaktorska (za poređenje grupa po dve promenljive) analiza varijanse (ANOVA), uz primenu Bonferonijevog post hoc testa za poređenje. Statistička obrada podataka je vršena statističkim programom GraphPad Prism 5 (GraphPadSoftware, Inc., CA, USA). Statistički značajnim efektom je smatrana svaka analiza koja daje vrednost $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Indukcija peritonitisa *i.p.* primenom formalinom-umrtvljenih bakterija fecesa u AO i DA pacovima

4.1.1. Uticaj *i.p.* primene bakterija fecesa na zdravlje pacova

Tokom eksperimenta nije bilo uginuća životinja, kao ni patoloških promena (prema Tabeli Opšteg Zdravlja (84).) Pacovi su izgledali zdravo, bili budni, imali glatko krzno i odgovarali na stimuluse iz sredine (Skor 5). Ovim je dodatno potvrđeno da bakterije mikrobiote creva tretirane formalinom nisu bile vijabilne, odnosno sposobne da nakon *i.p.* primene dovedu do bakterijske infekcije koja bi mogla da dovede do razvoja sepe.



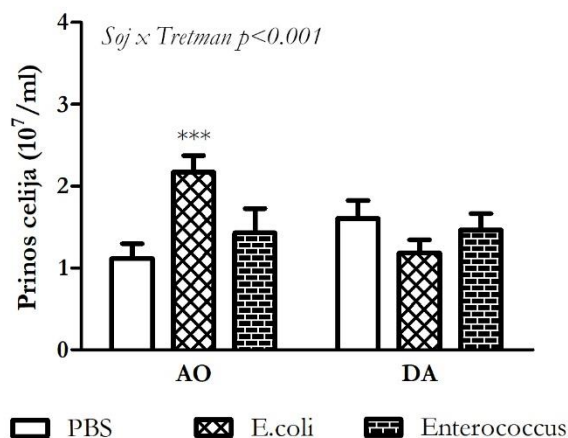
Grafik 1 Telesna masa (A) i masa slezine (B) AO i DA pacova na dan indukcije (d0) i drugog dana nakon indukcije peritonitisa *i.p.* primenom bakterija fecesa (d2). Kontrolne životinje su tretirane primenom PBS. ^a $p < 0.05$, u odnosu na AO soj.

Nije bilo značajnije promene telesne mase (Grafik 1A) ili mase slezina (Grafik 1B) tokom razvoja bakterijskog peritonitisa u AO i DA pacovima. Mase slezina kontrolnih DA pacova tretiranih PBS-om bile su malo manje u odnosu na slezine kontrolnih AO pacova.

4.1.2. Uticaj *i.p.* primene bakterija fecesa na prinos ćelija peritonealne šupljine

I.p. primena *E. coli* je dovela do porasta u prinosu ukupnih ćelija peritonealne šupljine, dok *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije uticala na prinos ovih ćelija u odnosu na kontrolne AO pacove (Grafik 2). U DA pacovima *i.p.* primena bakterija fecesa nije dovela do promena u broju ukupnih peritonealnih ćelija u odnosu na kontrolne pacove (Grafik 2). Dvofaktorska analiza varijanse ovih podataka je pokazala postojanje značajne interakcije između faktora, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje

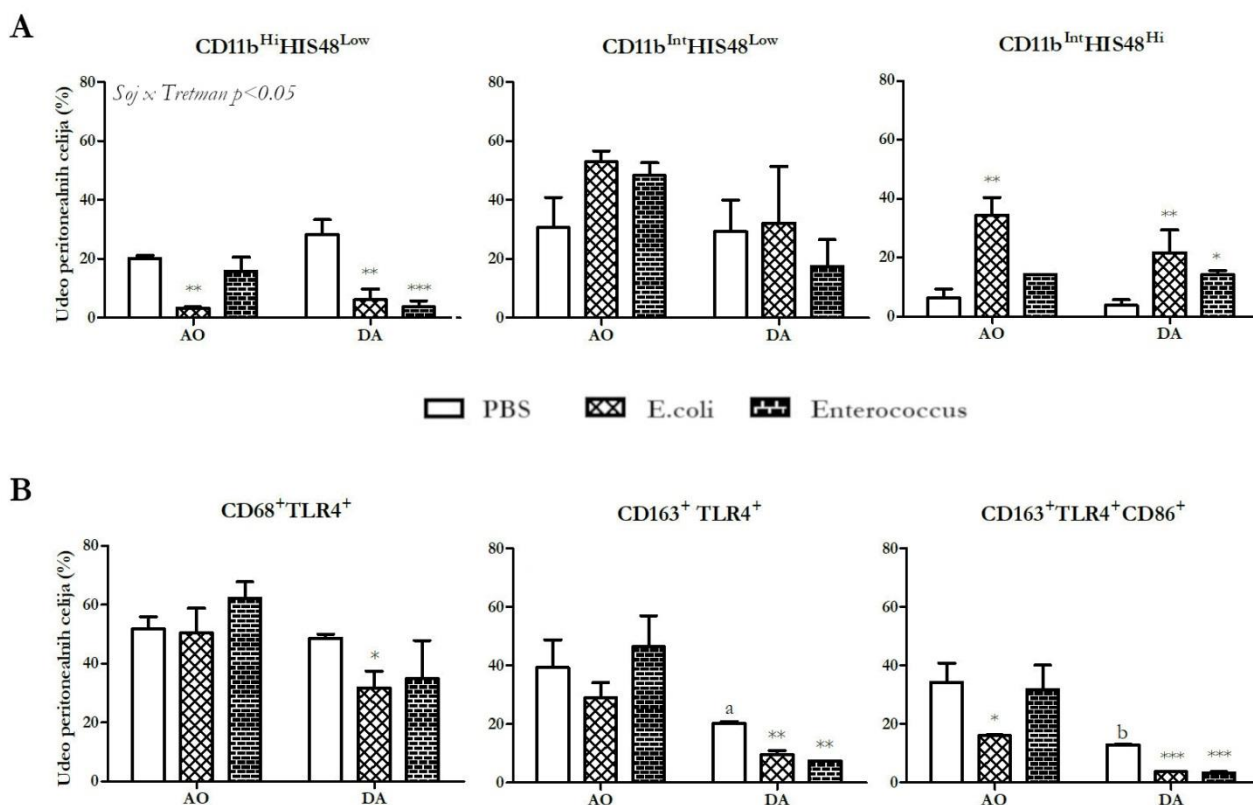
proizilaze iz razlika između sojeva pacova učestvuju u razlikama u odgovoru na promene prinosa ukupnih ćelija peritonealne šupljine na *in vivo* tretman bakterijama.



Grafik 2 Prinos ćelija peritonealne šupljine pacova AO i DA soja nakon indukcije peritonitisa *i.p.* primenom bakterija fecesa. * p<0.001 u odnosu na kontrolnu grupu (PBS).**

4.1.3. Uticaj *i.p.* primene bakterija fecesa na fenotip ćelija peritonealne šupljine

Udeo rezidentnih CD11b^{Hi}HIS48^{Low} i CD11b^{Int}HIS48^{Low} makrofaga peritonealne šupljine (Grafik 3A), kao i CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita (Grafik 3A), u populaciji ćelija peritonealne šupljine je sličan u kontrolnim AO i DA pacovima. *I.p.* primena *E. coli* je dovela do smanjenja udela rezidentnih peritonealnih CD11b^{Hi}HIS48^{Low} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, i povećanja zastupljenosti peritonealnih CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita, u odnosu na ćelije peritonealne šupljine kontrolnih pacova oba soja (Grafik 3A). *I.p.* primena *Enterococcus* spp., je dovela do povećanja udela CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita samo u peritonealnoj šupljini DA pacova, dok u AO pacovima nije imalo uticaja (Grafik 3A). Dvofaktorska analiza varijanse ovih podataka je pokazala značajnu interakciju, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na promene fenotipa CD11b^{Hi}HIS48^{Low} makrofaga peritonealne šupljine u odgovoru na *in vivo* tretman bakterijama fecesa.

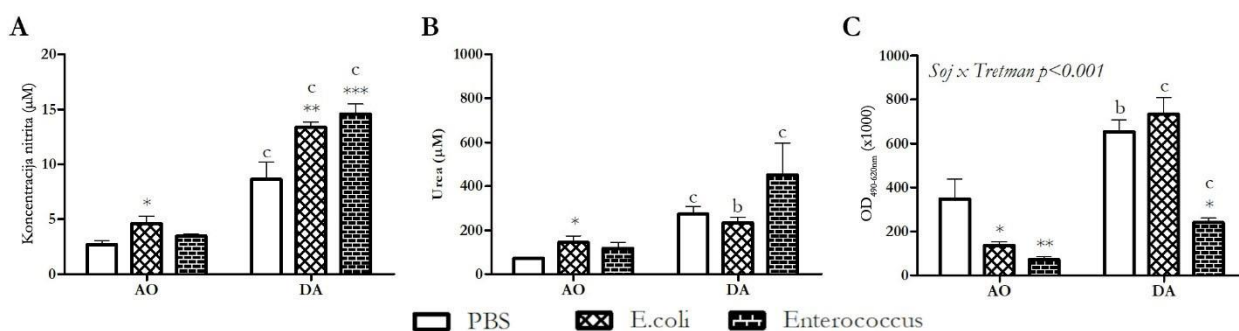


Grafik 3 Fenotip makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon indukcije peritonitisa *i.p.* primenom bakterija fecesa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, u odnosu na kontrolnu grupu (PBS); ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, u odnosu na AO soj.**

Kontrolni AO i DA pacovi su imali sličan udeo makrofaga $CD68^{+}TLR4^{+}$ fenotipa među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, dok je udeo $CD163^{+}TLR4^{+}$ i $CD163^{+}CD86^{+}TLR4^{+}$ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine bio viši u AO pacovima u odnosu DA pacove (Grafik 3B). *I.p.* primena *E. coli* ili *Enterococcus* spp. nije uticala na udeo $CD68^{+}TLR4^{+}$ makrofaga u peritonealnoj šupljini AO pacova, dok je *i.p.* primena *E. coli* dovela do smanjenja udela $CD68^{+}TLR4^{+}$ makrofaga u peritonealnoj šupljini DA pacova. Takođe, *i.p.* primena *E. coli* ili *Enterococcus* spp. nije imala uticaj na udeo $CD163^{+}TLR4^{+}$ makrofaga u peritonealnoj šupljini AO pacova, iako je *i.p.* primena *E. coli* dovela do smanjenja udela $CD163^{+}TLR4^{+}CD86^{+}$ makrofaga. *I.p.* primena *E. coli* ili *Enterococcus* spp. je umanjila udeo $CD163^{+}TLR4^{+}$, kao i $CD163^{+}TLR4^{+}CD86^{+}$ makrofaga u peritonealnoj šupljini DA pacova (Grafik 3B).

4.1.4. Uticaj *i.p.* primene bakterija fecesa na aktivnost makrofaga peritonealne šupljine

U kontrolnim pacovima tretiranim PBS-om detektovana koncentracija nitrita je bila niža u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine AO pacova u odnosu na makrofage peritonealne šupljine DA pacova. U AO pacovima, *i.p.* primena *E. coli* je izazvala značajno povećanje koncentracije nitrita u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine, a *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije imala značajnog efekta (Grafik 4A). U DA pacovima, *i.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp. izazvala je značajan porast koncentracije nitrita u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine u odnosu na makrofage peritonealne šupljine kontrolnih DA pacova (Grafik 4A). Koncentracija uree je takođe bila viša nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine DA pacova kontrolne grupe nego u lizatima makrofaga AO pacova, s tim što je *i.p.* primena *E. coli* dovelo do povećanja detektovane koncentracije uree samo nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine AO pacova, a *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije uticala na koncentraciju uree ni u jednom soju pacova (Grafik 4B).

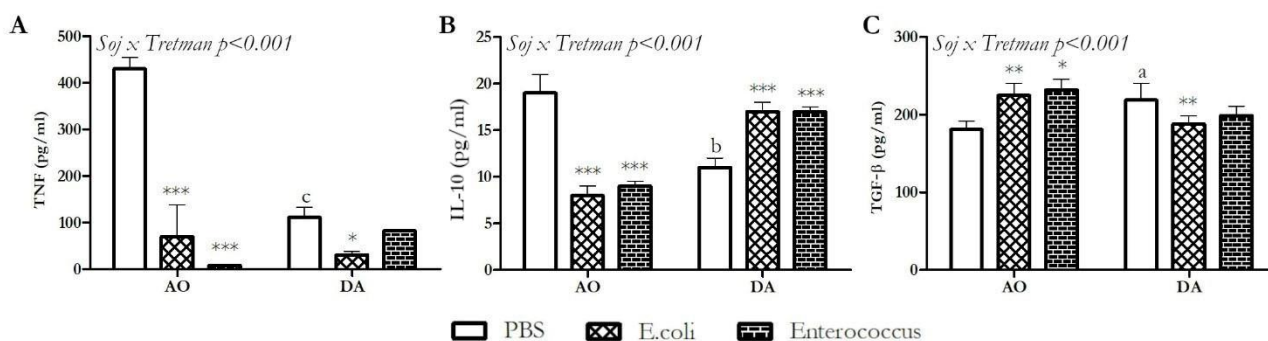


Grafik 4 Koncentracija nitrita (A), hidroliza L-arginina u ureu (B) i peroksidazna aktivnost (C) makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon indukcije peritonitisa *i.p.* primenom bakterijama fecesa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrolnu grupu (PBS); ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, u odnosu na AO soj.

Makrofagi peritonealne šupljine kontrolnih DA pacova tretiranih PBS-om su imali višu peroksidaznu aktivnost u odnosu na makrofage peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova (Grafik 4C). *I.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp. je dovela do smanjenja peroksidazne aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine AO pacova, dok je samo *i.p.* primena *Enterococcus* spp. dovela do smanjenja peroksidazne aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine DA pacova, a *i.p.* primena *E. coli* nije dovela do značajnih promena peroksidazne aktivnosti (Grafik 4C). Dvofaktorska analiza varijanse ovih podataka je pokazala značajnu interakciju, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na razlike u promeni peroksidazne aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine u odgovoru na *in vivo* tretmane bakterijama.

4.1.5. Uticaj *i.p.* primene bakterija fecesa na produkciju citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine

U supernatantu 24-časovne kulture makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova je detektovana viša koncentracija TNF i IL-10, i niža koncentracija TGF- β u odnosu na supernatante makrofaga kontrolnih DA pacova (Grafik 5). Koncentracija TNF i IL-10 u supernatantu makrofaga peritonealne šupljine AO pacova je bila niža, a koncentracija TGF- β viša, u odnosu na makrofage AO pacova kontrolne grupe nakon tretmana bakterijama (Grafik 5). U DA pacovima je *i.p.* primena *E. coli* dovela do smanjenja koncentracije TNF i TGF- β u supernatantu makrofaga peritonealne šupljine, dok *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije imala uticaja na koncentraciju ova dva citokina. *I.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp dovela je do povećanja koncentracije IL-10 u supernatantu makrofaga peritonealne šupljine DA pacova u odnosu na makrofage kontrolnih pacova tretiranih PBS-om (Grafik 5B). Dvofaktorska analiza varijanse ovih podataka je pokazala značajnu interakciju za sve ispitivane citokine, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na razlike u koncentraciji citokina u supernatantu makrofaga peritonealne šupljine izolovanih nakon *in vivo* tretmana PBS-om ili bakterijama.



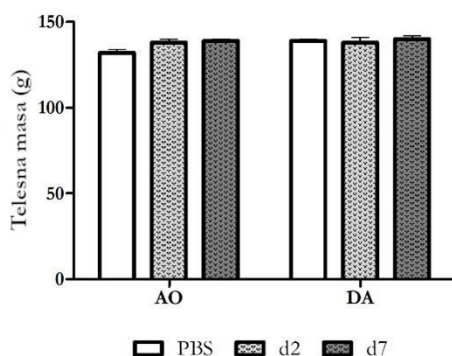
Grafik 5 Koncentracija TNF (A), IL-10 (B), i TGF- β (C) u supernatantu makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova izolovanih nakon indukcije peritonitisa *i.p.* primenom bakterijama fecesa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrolnu grupu (PBS); ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$, ^c $p < 0.001$, u odnosu na AO soj.

bakterija fecesa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrolnu grupu (PBS); ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, u odnosu na AO soj.

4.2. Modulacija fenotipa i aktivnosti ćelija peritonealne šupljine *i.p.* primenom probiotske bakterije *L. rhamnosus*

4.2.1. Telesna masa i izgled životinja nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*

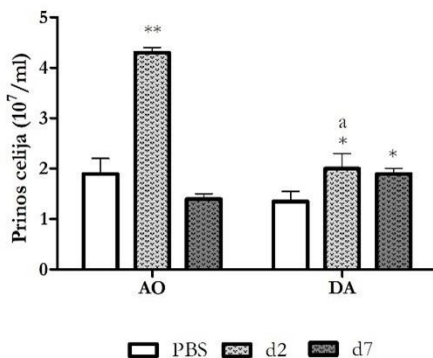
I.p. primena rastvora probiotske bakterije (*L. rhamnosus*, 5×10^7 CFU) nije uticala na telesnu masu pacova tokom čitavog eksperimenta (Grafik 6). Ponašanje i izgled pacova tokom sedam dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* nije bilo različito u odnosu na kontrolne pacove – imale su sjajno krzno, bile su budne, radoznale, i odgovarale su na stimulse iz okruženja (Skor 5, Tabela 4).



Grafik 6 Promena telesne mase AO i DA pacova drugog ili sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*.

4.2.2. Prinos ćelija peritonealne šupljine nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*

I.p. primena *L. rhamnosus* je nakon dva dana dovela do povećanja prinosa ukupnih peritonealnih ćelija u pacovima oba soja u odnosu na kontrolne pacove, dok je u DA pacovima primećeno povećanje broja ukupnih ćelija i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 7). Međutim, povećanje prinosa drugog dana je bilo izraženije u AO pacovima u odnosu na DA pacove.

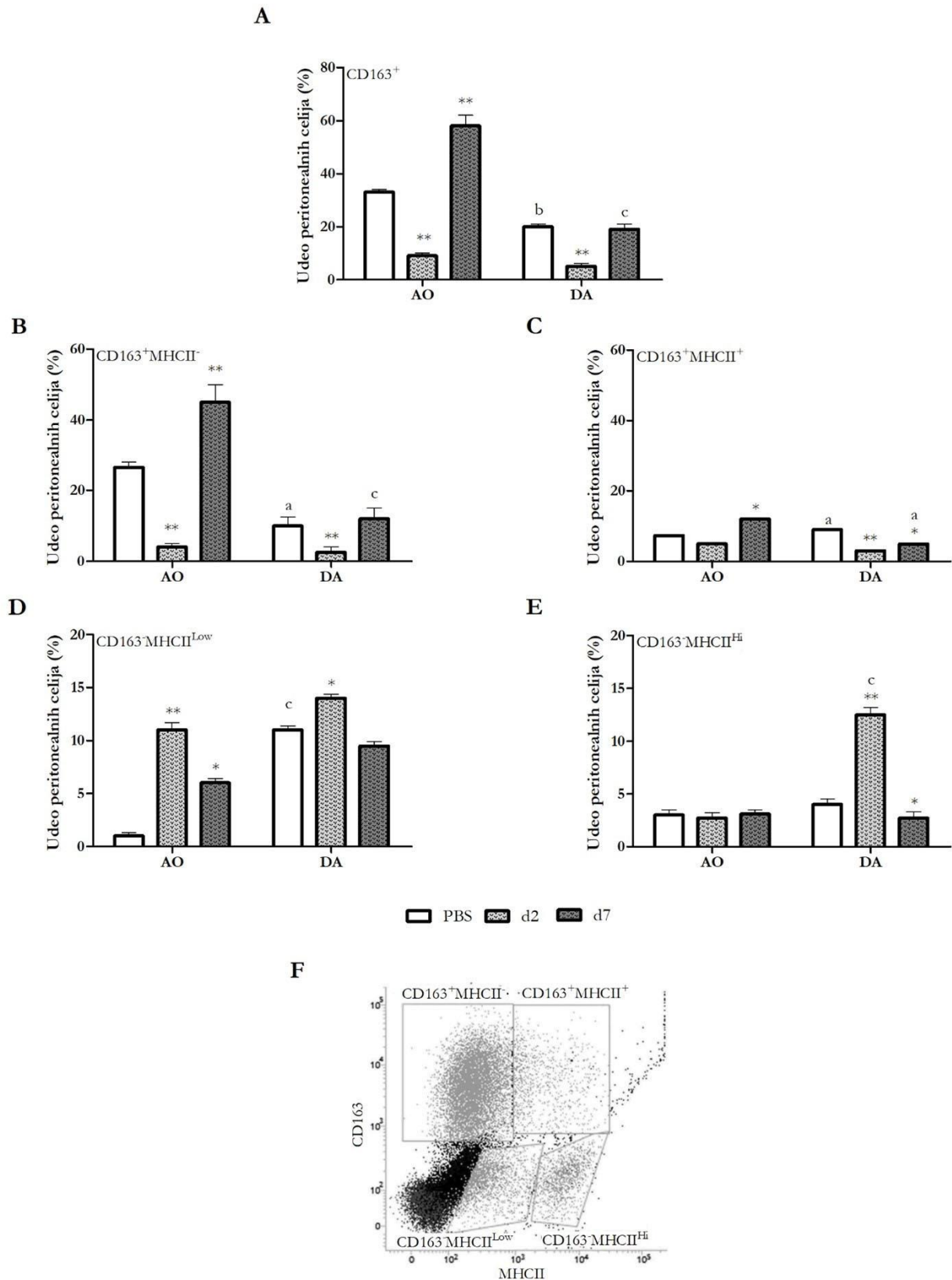


Grafik 7 Prinos ćelija peritonealne šupljine AO i DA pacova drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na kontrole (PBS); ^a $p < 0.05$, u odnosu na AO soj.

4.2.3. Fenotip makrofaga peritonealne šupljine nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*

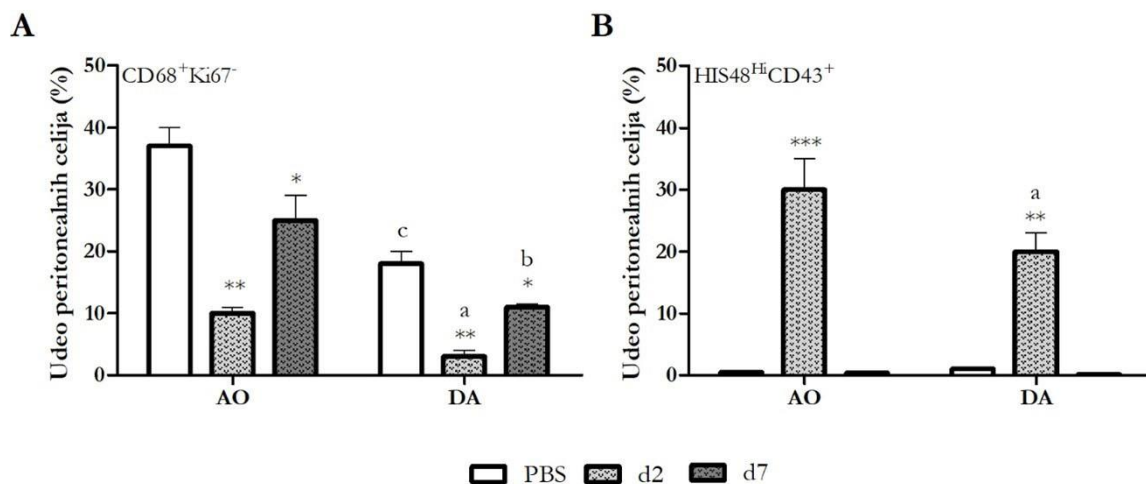
Udeo $CD163^+$ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je znatno veći u kontrolnim AO pacovima u odnosu na kontrolne DA pacove, a isti odnos među sojevima je očuvan i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 8A). Drugog dana nakon *i.p.* primene udeo $CD163^+$ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je bio sličan u pacovima oba soja i znatno manji u odnosu na kontrolne pacove. Drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* udeo $CD163^+MHCII^-$ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine AO pacova je značajno manji, a sedmog dana značajno veći, u odnosu na ćelije peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova. U DA pacovima, jedina razlika u odnosu na udeo $CD163^+MHCII^-$ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine kontrolnih DA pacova je primećena drugog dana, kada je udeo ovih ćelija bio značajno manji (Grafik 8B).

Dvostruko pozitivni CD163⁺MHCII⁺ makrofagi su prisutni u malo većem procentu u peritonealnoj šupljini kontrolnih DA pacova u odnosu na ćelije peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova. Primena *L. rhamnosus* u DA pacovima dovodi do smanjenja udela CD163⁺MHCII⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene, dok u AO pacovima dovodi do povećanja sedmog dana u odnosu na kontrolne AO pacove (Grafik 8C). Udeo CD163⁻MHCII^{Low} ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je značajno viši u kontrolnim DA pacovima u odnosu na AO pacove, dok *i.p.* primena *L. rhamnosus* dovodi do povećanja procenta ovih ćelija, i to nakon dva dana u pacova oba soja, a nakon sedam dana samo u AO pacovima (Grafik 8D). Udeo CD163⁻MHCII^{Hi} ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine AO pacova je ostao nepromenjen nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok je u DA pacovima *i.p.* primena *L. rhamnosus* nakon dva dana dovela do povećanja, a nakon sedam dana do blagog smanjenja udela CD163⁻MHCII^{Hi} peritonealnih ćelija među ukupnim peritonealnim ćelijama u odnosu na kontrolne DA pacove (Grafik 8E).



Grafik 8 Fenotip makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*. Ukupan udeo peritonealnih CD163⁺ makrofaga (A), i subpopulacije makrofaga CD163⁺MHCII⁻ (B), CD163⁺MHCII⁺ (C), CD163⁻MHCII^{Low} (D) i CD163⁻MHCII^{Hi} (E). Analizirane populacije su takođe prikazane na dot plotu (F). * p<0.05, ** p<0.01, u odnosu na kontrolu (PBS); ^a p<0.05, ^b p<0.01, ^c p<0.001, u odnosu na AO soj.

Udeo CD68⁺Ki67⁺ ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je bio značajno veći u grupi kontrolnih AO pacova u odnosu na ćelije peritonealne šupljine DA pacova. Drugog dana nakon primene *L. rhamnosus* uočen je drastičan pad udela CD68⁺Ki67⁺ ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u pacova oba soja, a udeo ovih ćelija je ostao snižen i sedmog dana nakon primene (Grafik 9A). Udeo CD68⁺Ki67⁺ ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je bio manji u DA pacovima, u svim eksperimentalnim grupama. U oba soja pacova je samo drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* uočen značajan porast udela HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u odnosu na kontrolne pacove, u kojima ovih ćelija skoro da nije bilo, a sedmog dana se udeo ovih ćelija nije razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 9B).

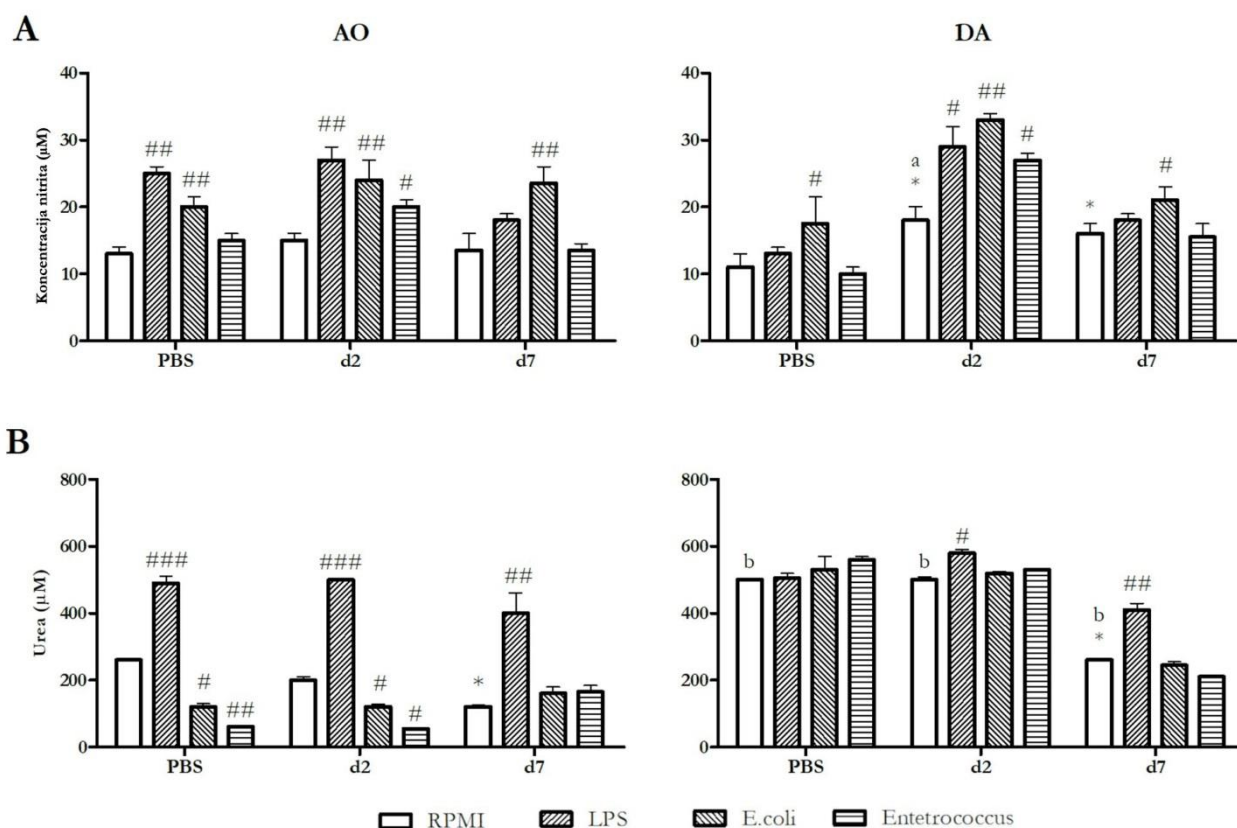


Grafik 9 Fenotip ćelija peritonealne šupljine AO i DA pacova drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*. Udeo CD68⁺Ki67⁺ makrofaga (A) i HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita (B). * p<0.05, ** p<0.01, * p<0.001, u odnosu na kontrolu (PBS); a p<0.05, b p<0.01, c p<0.001, u odnosu na AO soj.**

4.2.4. Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na produkciju NO i hidrolizu L-arginina od strane makrofaga peritonealne šupljine nakon *in vitro* stimulacije bakterijama fecesa

U nastavku istraživanja ispitivano je da li promene u fenotipu ćelija peritonealne šupljine izolovanih drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* dovode do promena u aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine, kao i da li ove promene mogu da modulišu odgovor makrofaga na *in vitro* stimulaciju pomoću autologih bakterija fecesa *E. coli* i *Enterococcus* spp.. Stimulacija pomoću LPS *in vitro* je korišćena kao dodatna kontrola stimulacije *E. coli*.

In vitro u supernatantima nestimulisanih makrofaga peritonealne šupljine AO pacova nisu detektovane veće količine nitrita nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok je u DA pacovima *i.p.* primena *L. rhamnosus* dovela do povećanja koncentracije nitrita u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine izolovanih i drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* u odnosu na makrofage kontrolnih pacova (Grafik 10A). U makrofagima AO pacova stimulacija pomoću LPS i *E. coli* je dovela do značajnog povećanja koncentracije nitrita u supernatantima ćelija kontrolnih pacova i supernatantima ćelija izolovanih dva dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok je u makrofagama peritonealne šupljine izolovanim sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* samo stimulacija pomoću *E. coli* dovela do povećanja koncentracije nitrita (Grafik 10A, levo). Stimulacija pomoću *Enterococcus* spp. je dovela do povećanja koncentracije nitrita samo u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine izolovanih drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 10A, levo). U makrofagima DA pacova, stimulacija pomoću LPS i *Enterococcus* spp. je dovela do povećanja koncentracije nitrita samo u supernatantima ćelija izolovanih drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok je stimulacija pomoću *E. coli* dovela do povećanja koncentracije nitrita i u supernatantima makrofaga kontrolnih pacova, kao i supernatantima makrofaga izolovanih drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 10A, desno).

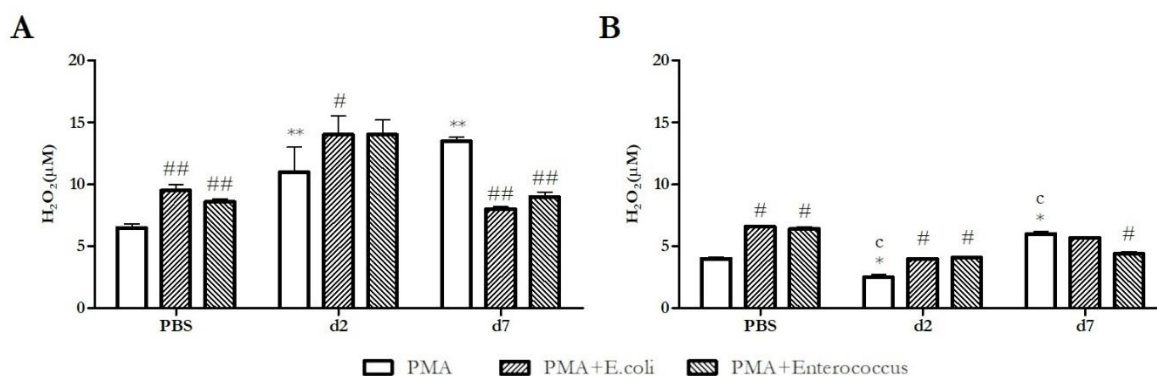


Grafik 10 Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na koncentraciju nitrita (A) i hidrolizu L-arginina u ureu (B) od strane makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova soja nakon *in vitro* stimulacije bakterijama fecesa. Čelije su izolovane drugog (d2) i sedmog (d7) dana nakon primene *L. rhamnosus*. * $p < 0.05$, u odnosu na kontrole (PBS); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, u odnosu na nestimulisane ćelije (RPMI); ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, u odnosu na AO soj.

Koncentracija uree nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine pacova oba soja je bila niža sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* u odnosu na makrofage kontrolnih pacova, dok je i u kontrolnoj grupi i oba dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* koncentracija uree bila značajno viša nakon hidrolize u lizatima DA pacova (Grafik 10B). Stimulacija pomoću LPS je dovela do značajnog povećanja koncentracije uree nakon hidrolize u lizatima makrofaga peritonealne šupljine AO pacova svih eksperimentalnih grupa, dok je *in vitro* stimulacija pomoću *E. coli* i *Enterococcus* spp. dovela do smanjenja koncentracije uree nakon hidrolize u lizatima makrofaga kontrolnih pacova i makrofaga izolovanih drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 10B, levo). *In vitro* stimulacija pomoću LPS je dovela do blagog povećanja koncentracije uree nakon hidrolize lizatima makrofaga peritonealne šupljine DA pacova izolovanih drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok stimulacije pomoću bakterija fecesa nisu dovele do promena koncentracije uree, ni u jednoj od eksperimentalnih grupa DA pacova (Grafik 10B, desno).

4.2.5. Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na produkciju H_2O_2 makrofaga peritonealne šupljine nakon *in vitro* stimulacije bakterijama fecesa

Makrofagi peritonealne šupljine AO pacova izolovani drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* su produkovali veće količine H_2O_2 u odnosu na makrofage izolovane iz kontrolnih pacova tretiranih PBS-om (Grafik 11). Makrofagi peritonealne šupljine DA pacova izolovani drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* su oslobađale su manje količine H_2O_2 , a makrofagi izolovani sedmog dana veće količine H_2O_2 , u odnosu na makrofage kontrolnih pacova (Grafik 11B). Nije primećena sojna razlika između makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih pacova u pogledu oslobađanja H_2O_2 , dok su makrofagi AO pacova izolovane drugog i sedmog dana nakon primene *L. rhamnosus* oslobađali veće količine H_2O_2 u odnosu na makrofage DA pacova.

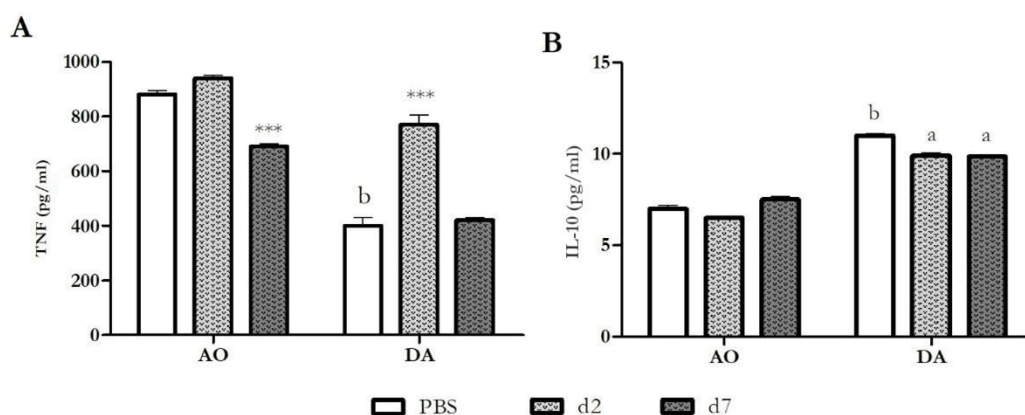


Grafik 11 Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na sposobnost oslobađanja H₂O₂ od strane makrofaga peritonealne šupljine AO (A) i DA pacova (B) nakon *in vitro* stimulacije sa PMA ili PMA u prisustvu bakterija fecesa. Čelije su izolovane drugog (d2) i sedmog (d7) dana nakon primene *L. rhamnosus*. * p<0.05, ** p<0.01, u odnosu na kontrole (PBS); # p<0.05, ## p<0.01, u odnosu na PMA; ^c p<0.001, u odnosu na AO soj.

In vitro stimulacije pomoću *E. coli* i *Enterococcus* spp značajno povećavaju oslobađanje H₂O₂ od strane makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih pacova oba soja (Grafik 11). U makrofagima koji su izolovani drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, samo je stimulacija pomoću *E. coli* dovela do porasta produkcije H₂O₂ u makrofagima AO pacova (Grafik 11A), dok su u makrofagima DA pacova stimulacije pomoću obe bakterije fecesa dovele do povećanog oslobađanja H₂O₂ (Grafik 11B). Sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, stimulacija pomoću *Enterococcus* spp. suprimirala je sekreciju H₂O₂ od strane makrofaga peritonealne šupljine oba soja pacova, dok je stimulacija pomoću *E. coli* suprimirala samo oslobađanje H₂O₂ od strane makrofaga AO pacova.

4.2.6. Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na produkciju citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine

Makrofagi peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova su produkovali značajno veće količine TNF, a značajno manje IL-10 u odnosu na makrofage kontrolnih DA pacova. (Grafik 12A i B) Primena *L. rhamnosus* je dovela do povećanja produkcije TNF od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova izolovanih drugog dana nakon primene i smanjenja produkcije TNF makrofaga AO pacova izolovanih sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* (Grafik 12A).



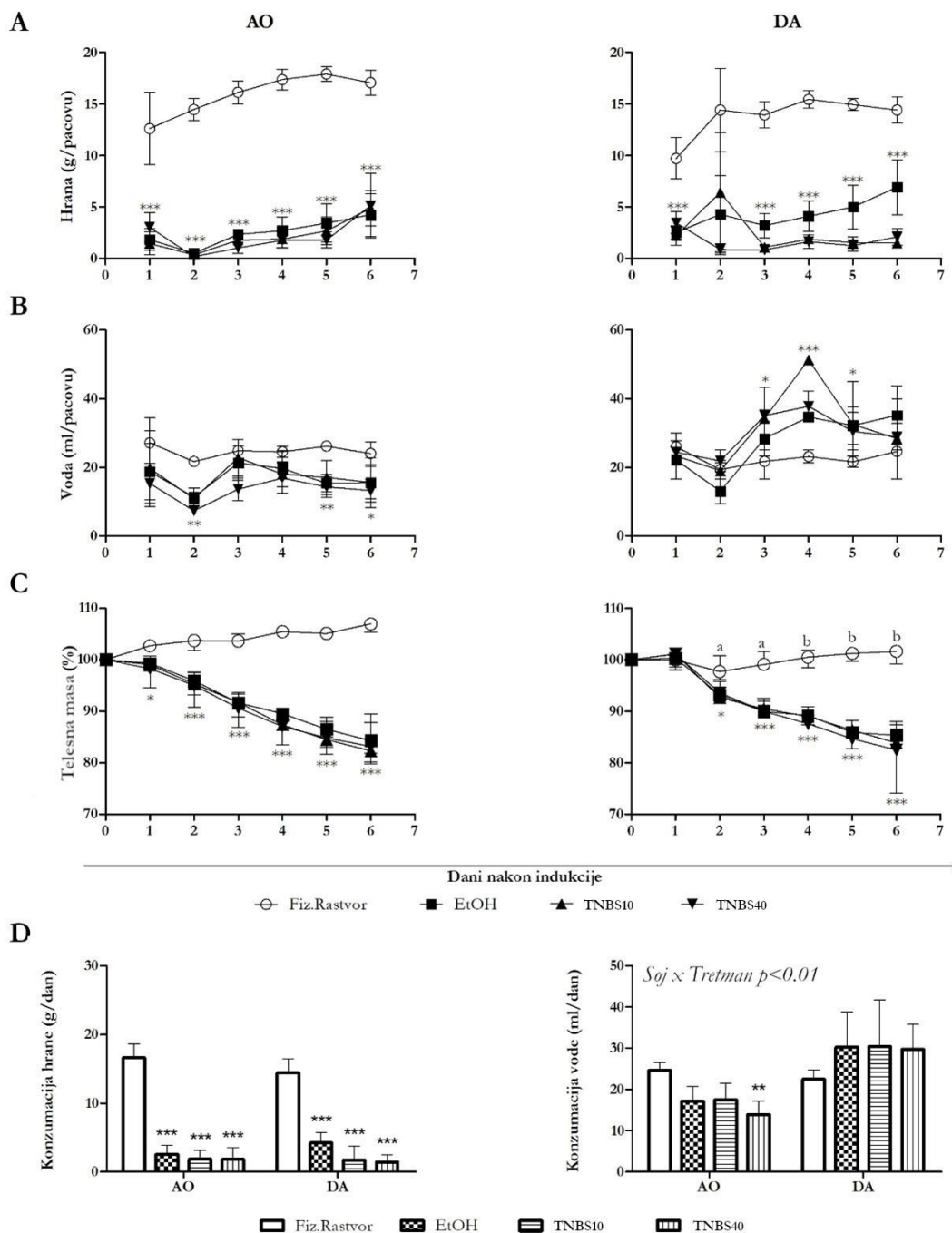
Grafik 12 Uticaj *i.p.* primene *L. rhamnosus* na produkciju TNF (A) i IL-10 (B) od strane makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova. Čelije su izolovane drugog (d2) i sedmog (d7) dana nakon primene *L. rhamnosus*. *** p<0.001, u odnosu na kontrole; ^a p<0.05, ^b p<0.01, u odnosu na AO soj.

4.3. Razvoj kolitisa indukovano rastvorom TNBS u AO i DA pacovima

4.3.1. Klinički znaci

4.3.1.1. Konzumacija hrane i vode i telesna masa nakon indukcije kolitisa

Konzumacija hrane i vode je praćena tokom 6 dana nakon indukcije kolitisa intrarektalnom primenom 50% rastvora etanola, ili rastvora TNBS (u 50%-tnom etanolu) u dozama od 10 mg/kg ili 40 mg/kg. Kontrolnim pacovima je intrarektalno ubrizgan fiziološki rastvor.



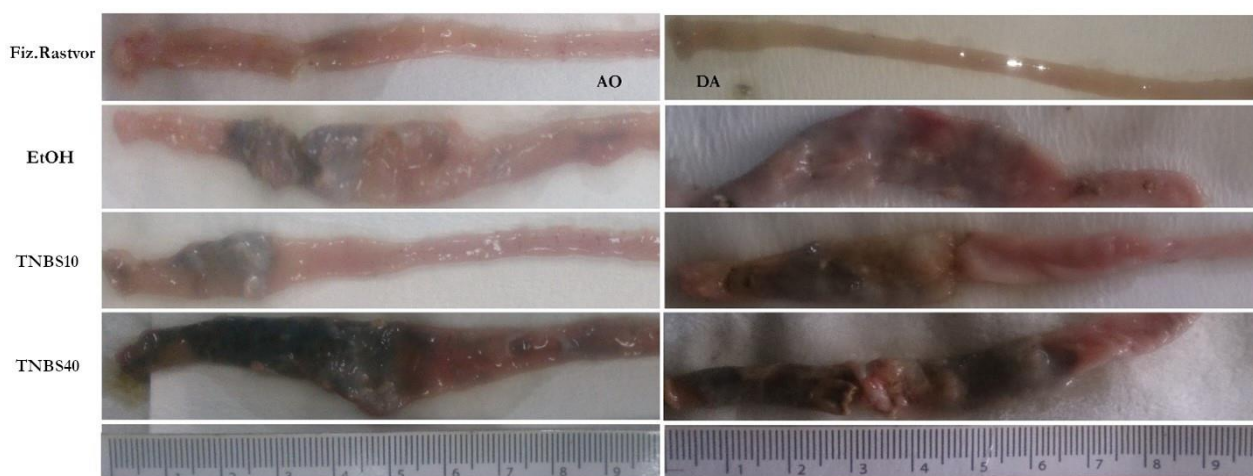
Grafik 13 Prikaz pojedinačnih vrednosti dnevne konzumacije hrane (A) i vode (B), promene telesne mase (C) i prosečnih vrednosti konzumacije hrane i vode (D) nakon indukcije kolitisa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrolu (Fiz. rastvor); ^a $p < 0.01$, ^b $p < 0.05$, u odnosu na AO soj.

Pacovi oba soja koji su tretirani rastvorom etanola ili TNBS su bili letargični i nakostrešeni tokom celog eksperimenta (Skor Opšteg Zdravlja 3-4, Tabela 4), za razliku od kontrolnih pacova tretiranih fiziološkim rastvorom, koji su bile radoznali i raspoloženi (Skor 5, Tabela 4).

Kontrolni pacovi oba soja tretirani fiziološkim rastvorom su konzumirali sličnu količinu hrane i vode tokom 6 dana (Grafik 13A), što je rezultiralo i komparabilnim prosečnim vrednostima konzumacije hrane i vode kontrolnih AO i DA pacova (Grafik 13D). Tretman rastvorom etanola ili TNBS u dozama od 10 ili 40 mg/kg dovodi do značajnog smanjenja dnevnog i prosečnog unosa hrane u odnosu na kontrole pacove oba soja (Grafik 13A i D). Dok je u AO pacovima nakon indukcije kolitisa konzumiranje vode smanjeno u odnosu na kontrolne pacove tokom celog perioda praćenja, u DA pacovima se od trećeg dana nakon indukcije javlja trend povećanja dnevne konzumacije vode u odnosu na kontrolnu grupu pacova istog soja (Grafik 13B). Dvofaktorska analiza varijanse ovih podataka je ukazala na značajnu interakciju, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na razlike u prosečnoj konzumaciji vode nakon indukcije kolitisa. Trend smanjenja prosečnog uzimanja vode u AO pacovima je bio statistički značajan u grupi tretiranoj TNBS u dozi od 40 mg/kg, dok su DA pacovi prosečno uzimali sličnu količinu vode bez obzira da li je kolitis indukovano rastvorom etanola ili TNBS u različitim dozama (Grafik 13D). U kontrolnim AO pacovima telesna masa je blago rasla tokom perioda praćenja, dok se u DA pacovima nije menjala, te je od drugog dana praćenja, telesna masa AO pacova bila viša u odnosu na telesnu masu DA pacova (Grafik 13C). Međutim, nakon prvog dana od indukcije kolitisa, u pacovima oba soja je primećen sličan, konstantan gubitak telesne mase, nezavisno od prisustva ili doze TNBS u rastvoru kojim je izvršena indukcija (Grafik 13C).

4.3.1.2. Makroskopska oštećenja kolona nakon indukcije kolitisa

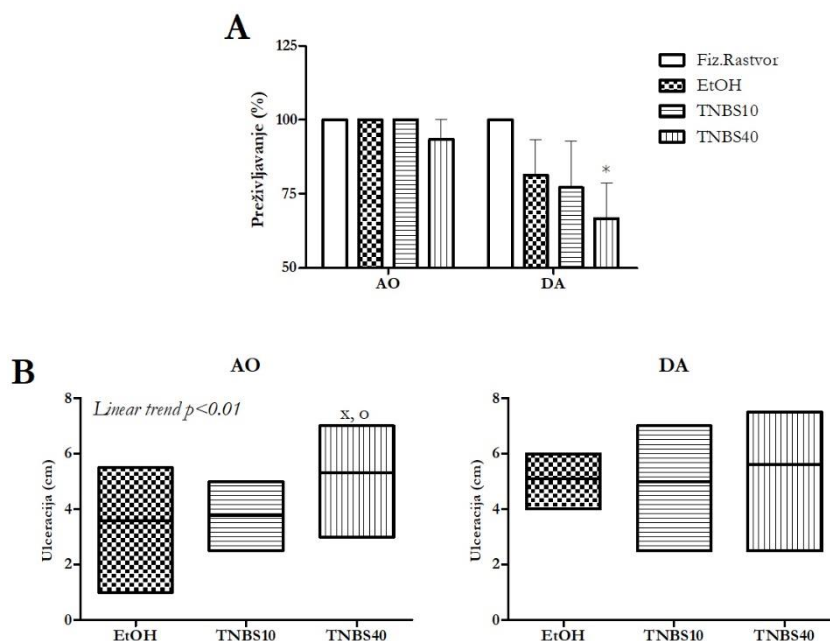
Nezavisno toga da li je kolitis indukovano tretmanom TNBS ili rastvorom etanola, u pacovima oba soja je na dan indukcije i tokom prvih dva dana nakon indukcije, sporadično primećivano rektalno krvarenje kao i dijareja i prisustvo krvi u stolici. Nakon trećeg dana je primećeno potpuno odsustvo defekacije u pacovima oba soja, a pri disekciji je otkrivena ogromna impakcija fecesa u zapaljenom kolonu. Sedmog dana nakon indukcije kolitisa primećene su razlike u izgledu kolona i peritonealne šupljine između kontrolnih i pacova sa kolitisom. U pacovima oba soja je primećeno prisustvo veće količine masnog tkiva oko inflamiranog kolona, a masnim tkivom je neretko bila obuhvaćena i slezina. Bile su vidljive i brojne adhezije po peritoneumu, i izražena hipertrofija kolona. U pacova koji su bili u oporavku mase i apetita, primećen je manji stepen hipertrofije, kao i odsustvo adhezija na površini peritoneuma. Mukozna površina kolona je bila zahvaćena ulceracijom, dok je zid creva bio nekoliko puta deblji u odnosu na kolon kontrolnih pacova (Slika 4).



Slika 4 Makroskopski izgled kolona AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora.

4.3.1.3. Preživljavanje i stepen ulceracije kolona nakon indukcije kolitisa

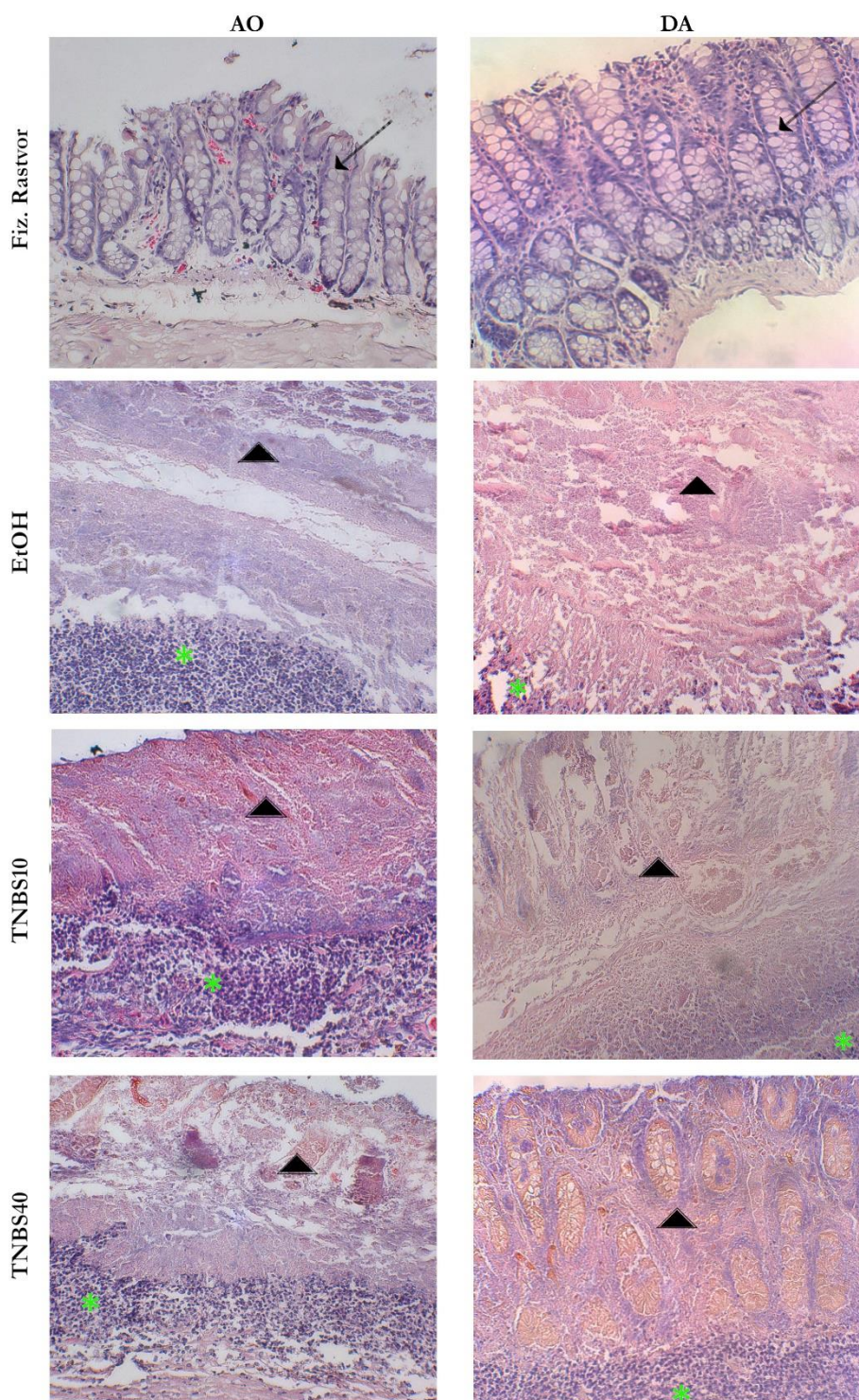
Među AO pacovima je zabeležen samo jedan smrtni ishod, i to sedmog dana u grupi tretiranoj TNBS u dozi od 40 mg/kg, dok je u DA pacovima zapaženo više uginuća u svakoj tretiranoj grupi, a prosečno preživljavanje je najniže u grupi tretiranoj TNBS u dozi od 40 mg/kg (Grafik 14A). Pacovi DA soja su imali sličnu dužinu kolona zahvaćenu ulceracijom nezavisno od prisustva ili količine TNBS u rastvoru kojim je izvršena indukcija, dok je u AO pacovima stepen ulceracije nakon tretmana TNBS u dozi od 40 mg/kg bio značajno veći u odnosu na pacove tretirane rastvorom etanola ili TNBS u dozi od 10 mg/kg (Grafik 14B). Jednofaktorska analiza varijanse ovih podataka je pokazala značajan linearan trend ($p=0.0016$) između doze TNBS i stepena ulceracija, ali samo u AO pacovima. Pacovi kontrolne grupe nisu imali vidna oštećenja kolona.



Grafik 14 Procenat preživelih pacova (A) i dužina kolona zahvaćena ulceracijom(B) prikazana kao medijana sa opsegom, sedmog dana nakon indukcije kolitisa. * $p < 0.05$, u odnosu na kontrolu (Fiz. rastvor); x $p < 0.05$, u odnosu na EtOH; o $p < 0.05$, u odnosu na TNBS10.

4.3.1.4. Histološka analiza kolona nakon indukcije kolitisa

Na histološkim preseccima tkiva kolona AO i DA pacova kojima je intrarektalno ubrizgan fiziološki rastvor se vide očuvane kripte sa peharastim ćelijama (strelica, Slika 5) i tankim submukoznim slojem, bez vidne infiltracije neutrofila.



Slika 5 Reprezentativne mikrografije preparata kolona AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa obojenih hematoksilinom i eozinom, slikanih na uvećanju od 40x. Strelica pokazuje očuvane kripte sa peharastim ćelijama i tankim submukoznim slojem, zelena zvezdica infiltraciju inflamatornih ćelija, crni trougao fibroznu akumulaciju unutar oštećene mukoze.

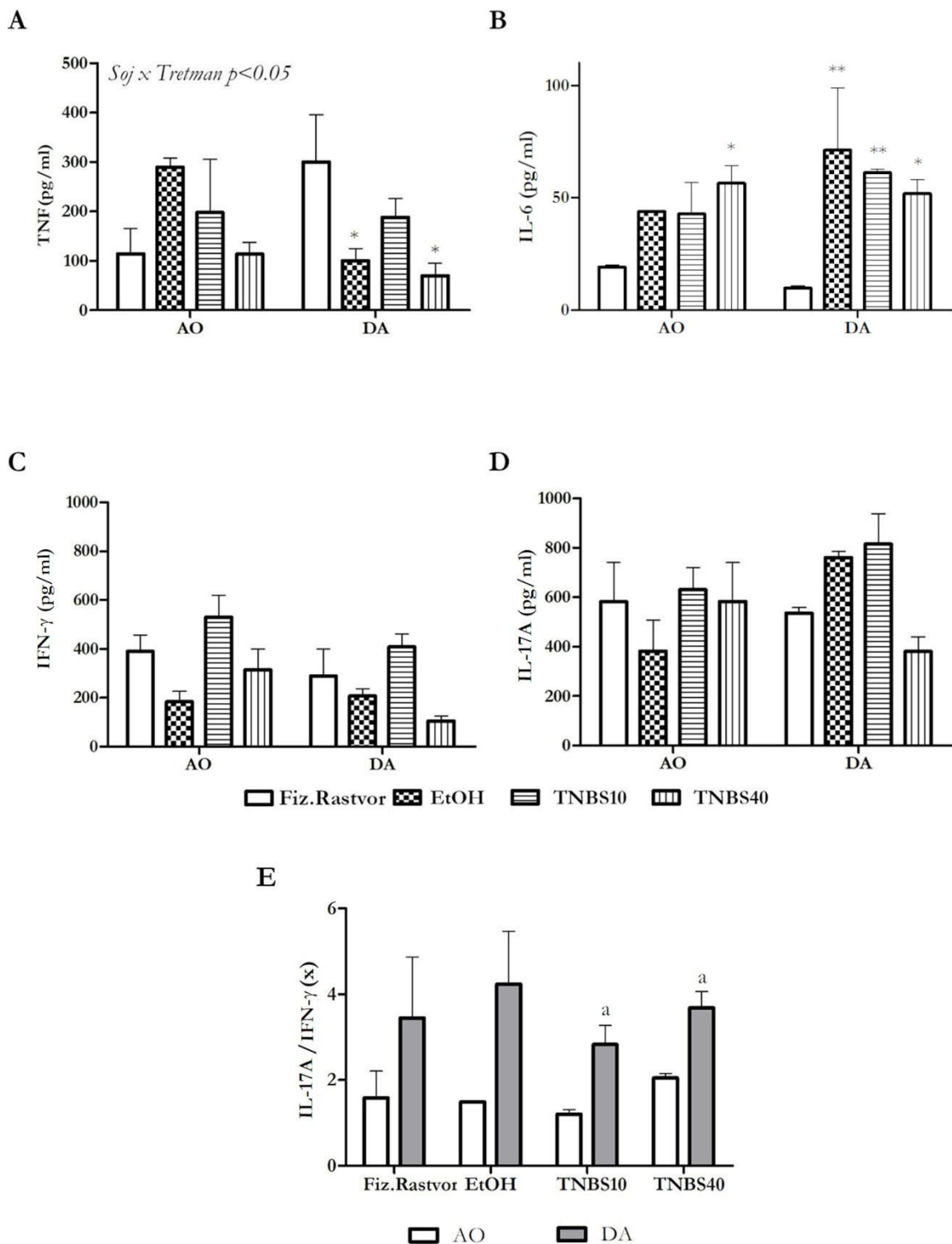
Na mikrografijama tkiva kolona pacova oba soja kojima je bio ubrizgan rastvor etanola, ili TNBS u dozama od 10 mg/kg ili 40 mg/kg, jasno su bila vidljiva tkivna oštećenja u kolonu: oštećenje epitela i mukoznog sloja u kome su nagomilane fibrozne naslage i strukture ožiljnog tkiva (trougao), kao i gust sloj inflamatornih neutrofila (zelena zvezdica, Slika 5) u submukozi. Mišićni sloj mukoze (muscularis mucosae) je bio prekinut ili potpuno dezintegriran ispod slojeva fibroznih naslaga i infiltriranih

inflamatornih ćelija. Kružni sloj mišića na periferiji tkiva je bio zadebljan u odnosu na zdravo tkivo kontrolne grupe, a peritonealna opna na spoljašnjosti kolona je bila višestruko deblja i slojevitija u segmentima sa uništenom mukozom u odnosu na segmente bez oštećenja mukoze, ukazujući na aktivan peritonitis.

4.3.2. Funkcionalna analiza tkiva kolona

4.3.2.1. Koncentracije citokina u tkivu kolona nakon indukcije kolitisa

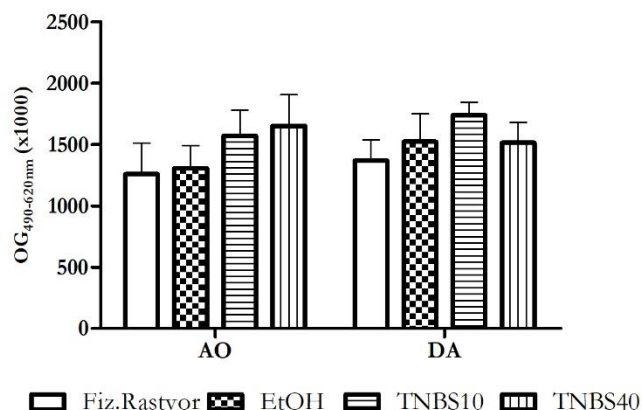
U homogenatima tkiva kolona AO pacova nakon indukcije kolitisa detektovan je vidan porast koncentracije IL-6 koji je bio statistički značajan samo nakon tretmana TNBS u dozi od 40 mg/kg, dok se koncentracija TNF nije značajno menjala (Grafik 15A i B). U homogenatima kolona DA pacova je nivo TNF bio niži nakon indukcije kolitisa (osim nakon tretmana TNBS u dozi od 10 mg/kg), dok je nivo IL-6 bio povišen (Grafik 15A i B). Intrarektalni tretmani nisu uticali na koncentracije Th1 citokina IFN- γ ili Th17 citokina IL-17A u oba soja pacova (Grafik 15C i D). Dvofaktorska analiza podataka dobijenih za koncentraciju TNF u homogenatima kolona je ukazala na prisustvo slabe interakcije, što ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na razlike u promeni koncentracije TNF u kolonu nakon indukcije kolitisa (Grafik 15A). Odnos koncentracija IL-17A i IFN- γ u kolonu pacova je bio uporediv između dva soja u kontrolnim pacovima i nakon indukcije kolitisa etanolom, ali u grupama sa TNBS-indukcijom ovaj odnos je veći u DA pacovima u odnosu na AO pacove (Grafik 15E).



Grafik 15 Koncentracija TNF (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), i IL-17A (D) i odnos koncentracija IL-17A/IFN- γ (E) u homogenatima tkiva kolona AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor); ^a $p < 0.05$, u odnosu na AO soj.

4.3.2.2. Aktivnost MPO u tkivu kolona nakon indukcije kolitisa

Aktivnost MPO u homogenatima tkiva kolona AO i DA pacova je određena reakcijom oksidacije orto-fenilen-diamina (OPD) sa 0.0144% H_2O_2 . Nije bilo značajnih razlika između MPO aktivnosti tkiva kolona pacova AO i DA soja kontrolne grupe, kao ni nakon intrarektalnih tretmana (Grafik 16).

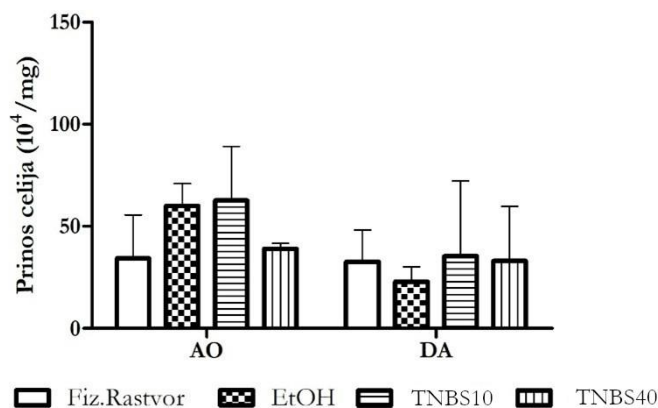


Grafik 16 Aktivnost MPO u homogenatima tkiva kolona AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora.

4.3.3. Mezenterični limfni čvorovi

4.3.3.1. Prinos ukupnih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova nakon indukcije kolitisa

Prinos ukupnih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova je bio uporediv između kontrolnih AO i DA pacova, a indukcija kolitisa nije izazvala promenu prinosa ukupnih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova u odnosu na kontrolne pacove, nezavisno od vrste rastvora kojim je izvršena indukcija, bez obzira da li je u pitanju rastvor etanola ili TNBS u različitim dozama (10 ili 40 mg/kg) (Grafik 17).

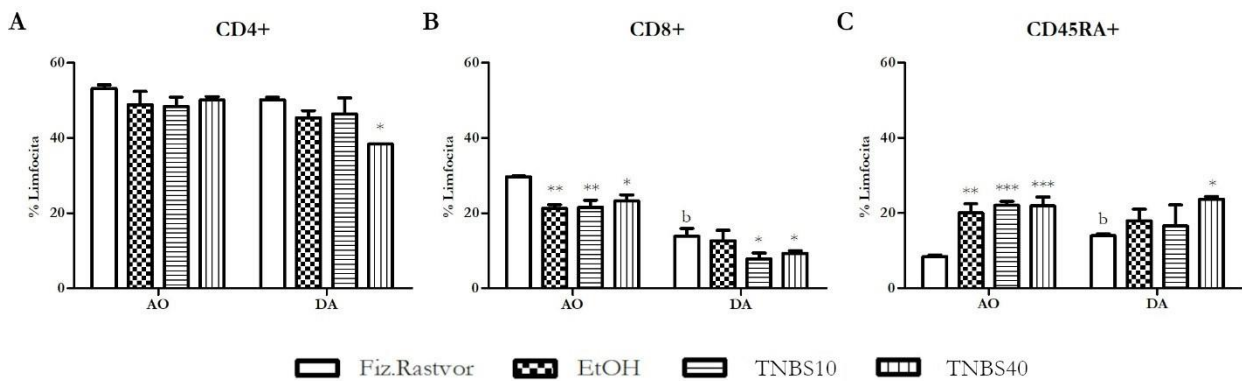


Grafik 17 Prinos ukupnih ćelija po masi mezenteričnih limfnih čvorova izolovanih iz AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora.

4.3.3.2. Fenotip ćelija mezenteričnih limfnih čvorova nakon indukcije kolitisa

U mezenteričnim limfnim čvorovima kontrolnih AO i DA pacova tretiranih fiziološkim rastvorom udeo CD4⁺ T limfocita među ukupnim limfocitima je bio sličan, dok je udeo CD8⁺ limfocita bio niži, a udeo CD45RA⁺ limfocita viši u DA pacovima. Pacovi DA soja su nakon tretmana rastvorom TNBS koncentracije 40 mg/kg imali smanjen udeo CD4⁺ T limfocita među ukupnim limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova, dok se udeo CD4⁺ T limfocita AO pacova nije menjao (Grafik 18A). Kontrolni AO pacovi su imali dvostruko više CD8⁺ T limfocita među ukupnim limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova u odnosu na DA pacove, i dok je indukcija kolitisa slično dovela do smanjenja udela ovih ćelija u AO pacovima nezavisno od vrste rastvora kojim je izvršena indukcija (rastvor etanola ili TNBS-a u različitim dozama), u DA pacovima je smanjenje udela CD8⁺ T limfocita zapaženo samo nakon primene TNBS, nezavisno od doze (Grafik 18B). Kontrolni DA pacovi su imali veći udeo CD45RA⁺ B limfocita među ukupnim limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova u odnosu na kontrolne AO pacove (Grafik 18C). Indukcija kolitisa je u AO pacovima dovela do porasta udela CD45RA⁺ B limfocita, nezavisno od od rastvora kojim je izvršena indukcija, dok je u DA pacovima

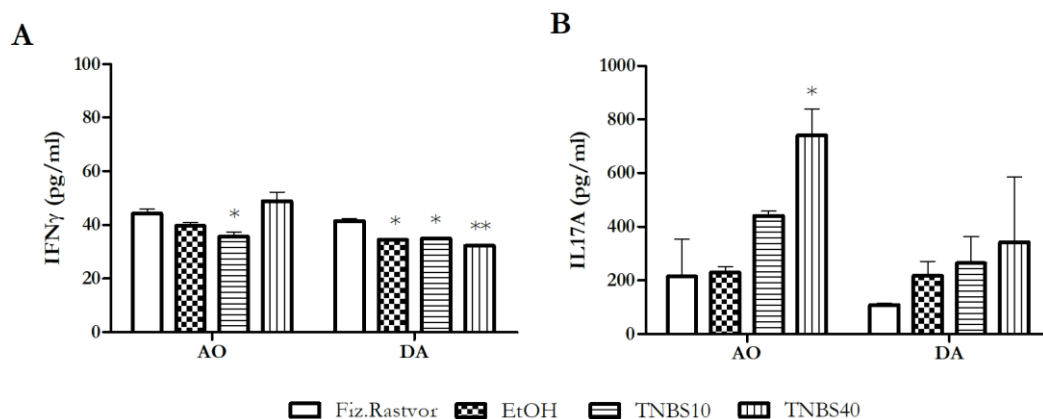
jedino primena TNBS u dozi 40 mg/kg dovela do značajnog povećanja udela CD45RA⁺ B limfocita mezenteričnih limfnih čvorova (Grafik 18C).



Grafik 18 Fenotipske karakteristike limfocita mezenteričnih limfnih čvorova prikazane zastupljenošću CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), i CD45RA⁺ (C) limfocita izolovanih sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor); ^b p<0.01, u odnosu na AO soj.

4.3.3.3. Produkcija citokina od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova stimulisanim pomoću ConA nakon indukcije kolitisa

Limfociti mezenteričnih limfnih čvorova kontrolnih pacova oba soja ispoljavali su nisku produkciju IFN- γ i IL-17A nakon stimulacije pomoću ConA tokom 24h, i nije bilo razlike među sojevima (Grafik 19A i B). Indukcija kolitisa je dovela do smanjenja produkcije IFN- γ od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova DA pacova, nezavisno od rastvora kojim je izvršena indukcija, mada je to smanjenje bilo minorno (Grafik 19A). U AO pacovima nije bilo značajnije promene produkcije IFN- γ , osim u grupi tretiranoj TNBS u dozi od 10 mg/kg, gde je produkcija IFN- γ smanjena u odnosu na produkciju od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova kontrolnih pacova (Grafik 19A). S druge strane, produkcija IL-17A od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova se povećala u AO pacovima nakon indukcije kolitisa TNBS, što je bilo statistički značajno u dozi od 40 mg/kg TNBS, dok je u DA pacovima primećen blagi porast produkcije IL-17A od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova bez obzira na rastvor kojim je izvršena indukcija, ali bez statističke značajnosti (Grafik 19).

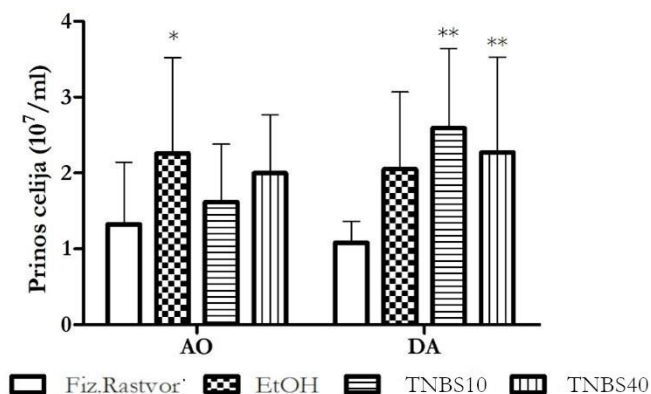


Grafik 19 Produkcija citokina IFN- γ (A) i IL-17A (B) od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova AO i DA pacova nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora, stimulisanih pomoću ConA *in vitro*. * p<0.05, ** p<0.01, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor).

4.3.4. Čelije peritonealne šupljine

4.3.4.1. Prinos ukupnih ćelija peritonealne šupljine nakon indukcije kolitisa

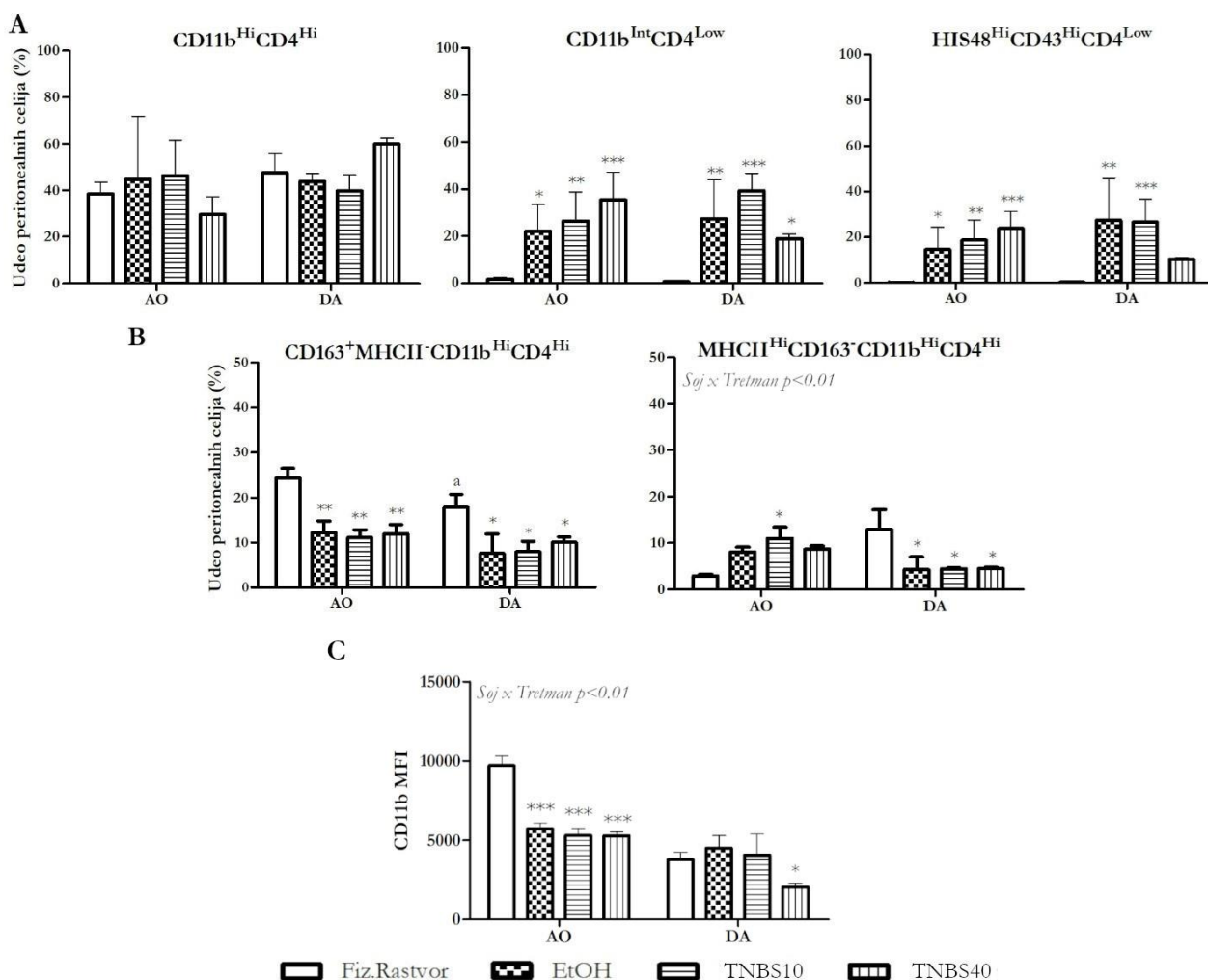
U pogledu prinosa ukupnih ćelija peritonealne šupljine, nisu detektovane statistički značajne razlike između sojeva, samo između različitih tretmana indukcije kolitisa (Grafik 20). U AO pacovima prinos ukupnih ćelija peritonealne šupljine je bio viši nakon indukcije kolitisa, ali je samo u AO pacovima tretiranim rastvorom etanola broj ukupnih ćelija bio statistički značajno viši u odnosu na kontrolne pacove. U DA pacovima intrarektalna primena TNBS je, nezavisno od doza, dovela do statistički značajnog povećanja prinosa ukupnih ćelija peritonealne šupljine.



Grafik 20 Prinos ćelija peritonealne šupljine AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor).

4.3.4.2 Fenotip ukupnih ćelija peritonealne šupljine nakon indukcije kolitisa

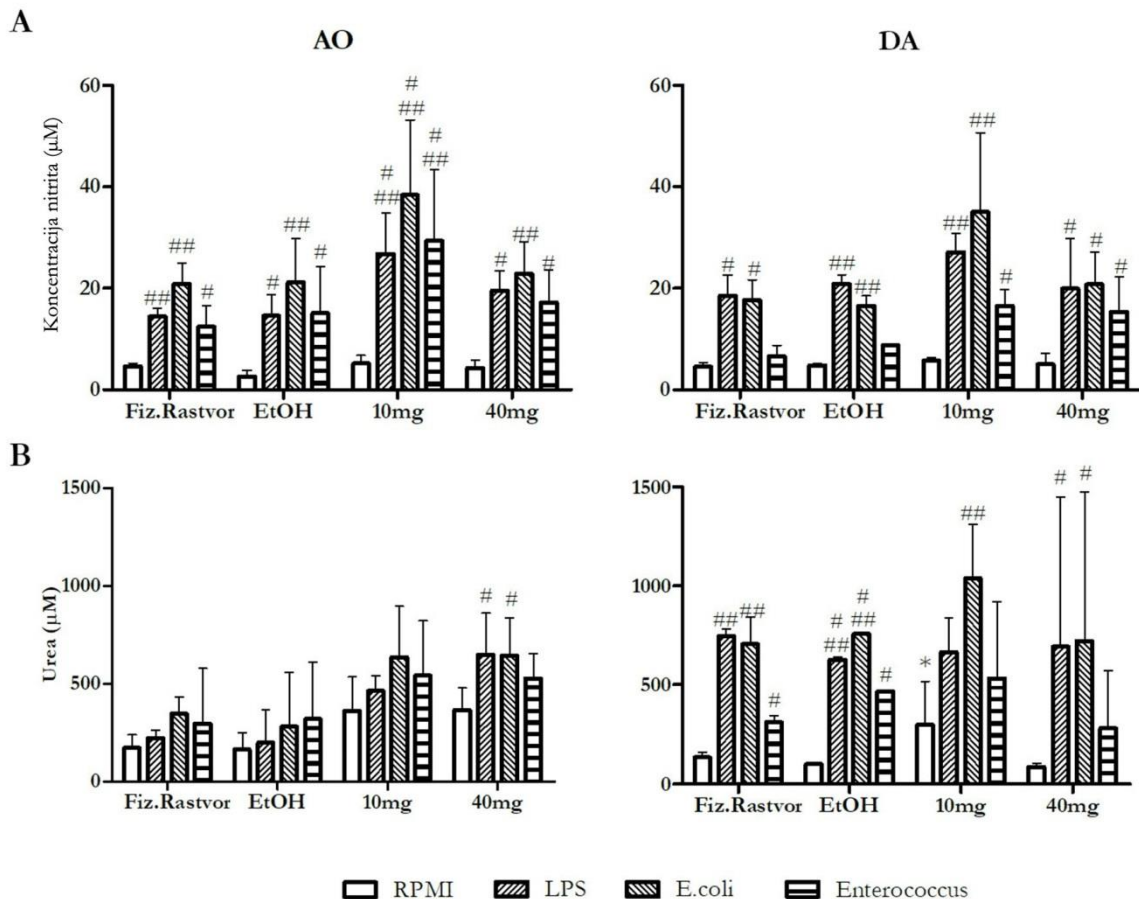
Između kontrolnih AO i DA pacova nisu postojale razlike u udelu rezidentnih CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, dok HIS48^{Hi}CD43^{Hi}CD4^{Low} monocita i inflamatornih CD11b^{Int}CD4^{Low} makrofaga u peritonealnoj šupljini skoro da nije bilo (Grafik 21A). Sedmog dana nakon indukcije kolitisa nije bilo većih promena u udelu rezidentnih makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, ali je u oba soja pacova bio prisutan značajan udeo monocita i inflamatornih makrofaga, sa izuzetkom DA pacova tretiranih TNBS u dozi od 40 mg/kg, u kojima je porast zastupljenosti ovih ćelija bio manje izražen (Grafik 21A). U peritonealnoj šupljini je bilo više zrelih CD163⁺MHCII⁺ makrofaga u kontrolnim AO pacovima u odnosu na kontrolne DA pacove, a sedmog dana nakon indukcije kolitisa, udeo ovih makrofaga je bio značajno smanjen u pacova oba soja (Grafik 21B). S druge strane, kontrolni DA pacovi su imali više CD163⁺MHCII⁺ peritonealnih makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u odnosu na kontrolne AO pacove, a uticaj indukcije kolitisa na ovu populaciju je bio obrnut, što dvofaktorska analiza varijanse potvrđuje – u AO pacovima je bio detektovan porast udela MHCII⁺CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, dok je u DA pacovima bilo izraženo značajno smanjenje udela makrofaga ovog fenotipa (Grafik 21B). Indukcija kolitisa je dovela do smanjenja ekspresije membranskog CD11b na CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofagima AO pacova, dok je u DA pacovima pad ekspresije CD11b isključivo bio prisutan nakon indukcije kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg, a u pacova ostalih grupa je nivo ekspresije CD11b bio sličan kao u kontrolnim DA pacovima (Grafik 21C).



Grafik 21 Fenotipske karakteristike ćelija peritonealne šupljine AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. Udeo rezidentnih CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofaga, inflamatornih CD11b^{Int}CD4^{Low} makrofaga, i HIS48^{Hi}CD43^{Hi}CD4^{Low} monocita (A), i CD163⁺MHCII⁻ i CD163⁻MHCII^{Hi} makrofaga (B) među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine. Gustina ekspresije (*engl.* Mean Fluorescence Intensity, MFI) CD11b na CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofagama (C). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor); ^a p<0.05, u odnosu na AO soj.

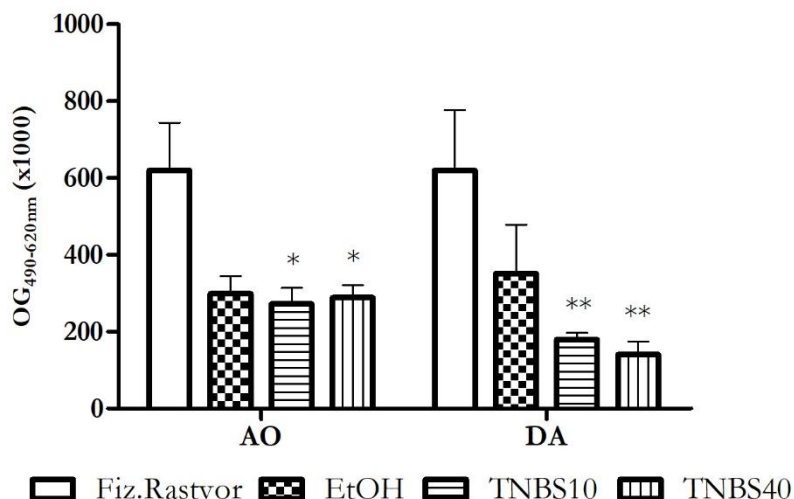
4.3.4.3. Uticaj indukcije kolitisa na produkcija NO, hidroliza arginina, i peroksidazna aktivnost makrofaga peritonealne šupljine nakon *in vitro* stimulacije bakterijama fecesa

Nakon 48h *in vitro* kulture, u supernatantima nestimuliranih makrofaga peritonealne šupljine su detektovane slične, zanemarljivo male količine nitrita (<5μM), nezavisno od soja pacova ili eksperimentalne grupe. Stimulacija pomoću LPS ili *E. coli in vitro* dovela je do statistički značajnog povećanja koncentracije nitrita u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine u oba soja pacova. Stimulacija pomoću *Enterococcus* spp. dovela je do povećanja koncentracije nitrita samo u supernatantima makrofaga AO pacova izolovanih iz peritonealne šupljine pacova tretiranih fiziološkim rastvorom ili rastvorom etanola. Najveće koncentracije nitrita detektovane su u supernatantima makrofaga pacova oba soja u kojima je kolitis indukovao TNBS u dozi od 10 mg/kg, nezavisno od *in vitro* stimulatora (Grafik 22A).



Grafik 22 Koncentracija nitrita (A) i hidroliza L-arginina u ureu (B) od strane makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon *in vitro* stimulacije, sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * $p < 0.05$, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, u odnosu na nestimulisane ćelije (RPMI).

Nije bilo sojnih razlika u detektovanoj koncentraciji uree nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih pacova, kao ni u lizatima makrofaga pacova tretiranih rastvorom etanola. U DA pacovima tretiranim TNBS u dozi od 10 mg/kg detektovana je povećana koncentracija uree nakon hidrolize L-arginina u lizatima nestimulisanih makrofaga u odnosu na makrofage kontrolnih pacova, dok je u AO pacovima detektovana koncentracija uree slična kao nakon hidrolize L-arginina u lizatima kontrolnih pacova. Stimulacija pomoću LPS ili *E. coli* dovela je do povećanja koncentracije uree nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine svih eksperimentalnih grupa DA pacova, osim onih kod kojih je kolitis indukovao TNBS u dozi od 10 mg/kg, dok je u AO pacovima povećanje koncentracije uree detektovano nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga izolovanih iz pacova u kojima je kolitis indukovao TNBS u dozi 40 mg/kg. *In vitro* stimulacija pomoću *Enterococcus* spp. nije dovela do promene koncentracije uree detektovane nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine AO pacova, dok je u makrofaga DA pacova dovela do porasta koncentracije uree samo nakon hidrolize L-arginina u lizatima kontrolnih pacova i pacova tretiranih rastvorom etanola, i to u manjoj meri u odnosu na porast indukovao *in vitro* stimulacijom pomoću LPS ili *E. coli* (Grafik 22B).

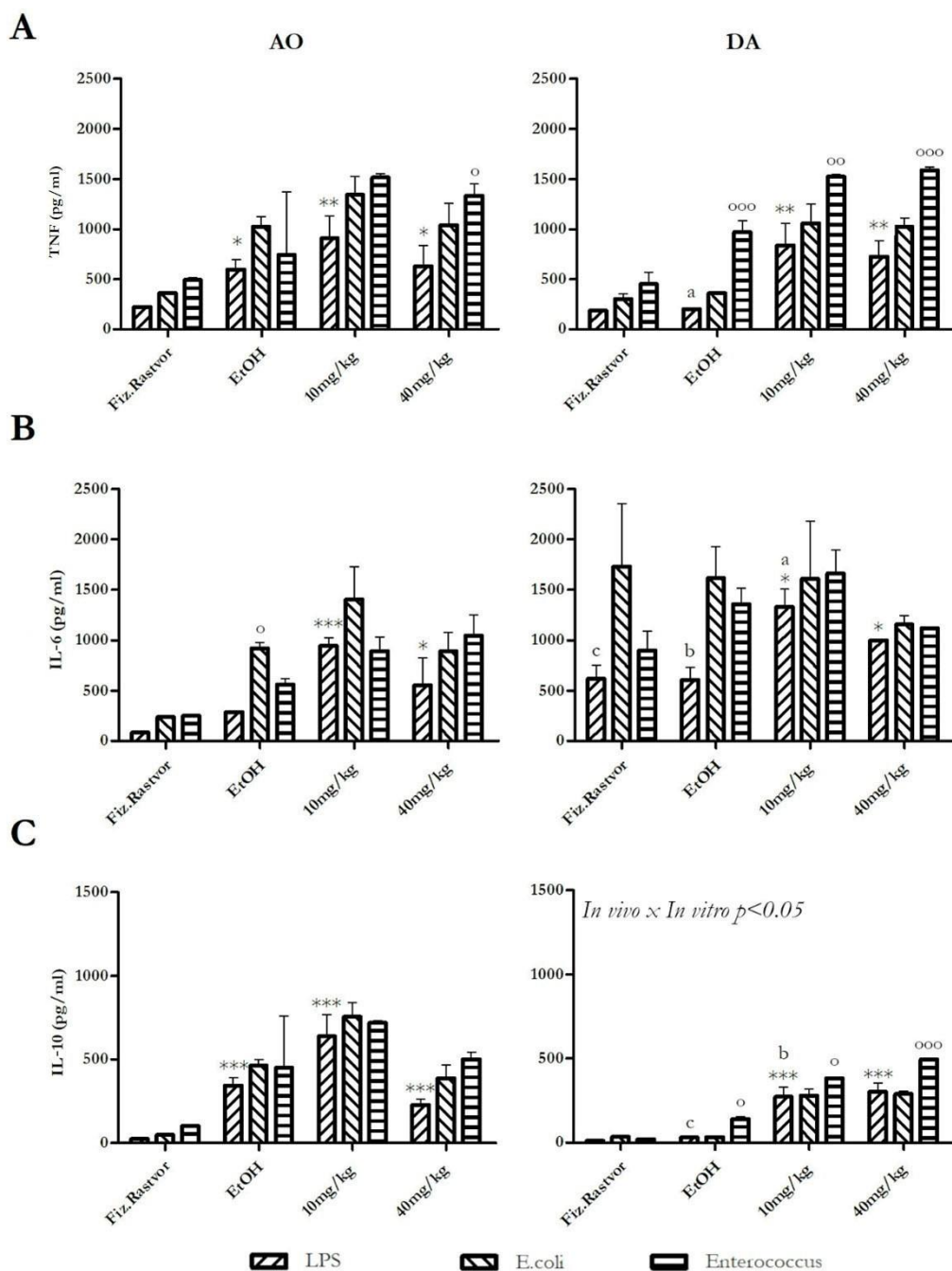


Grafik 23 Peroksidazna aktivnost makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor).

Nije bilo sojnih razlika u detektovanoj sposobnosti oksidacije OPD od strane makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih AO i DA pacova (Grafik 23). Indukcija kolitisa dvostruko je snizila oksidaciju OPD od strane makrofaga peritonealne šupljine AO pacova, bez obzira na doza TNBS kojim je izvršena indukcija, dok je u DA pacovima značajnije smanjenje oksidacije OPD od strane makrofaga detektovano u pacova kojima je kolitis indukovao TNBS u obe doze (Grafik 23).

4.3.4.4. *Produkcija citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine nakon indukcije kolitisa*

Indukcija kolitisa je dovela do povećanja produkcije TNF, IL-6 i IL-10 od strane peritonealnih makrofaga AO pacova stimuliranih pomoću LPS, dok je u DA pacovima indukcija TNBS u dozama 10 ili 40 mg/kg dovela do porasta produkcije svih ispitivanih citokina, a indukcija rastvorom etanola nije uticala na promenu produkcije citokina od strane peritonealnih makrofaga (Grafik 24A-C). U makrofagima AO pacova *in vitro* stimulacija bakterijama fecesa uglavnom ne dovodi do značajnog povećanja produkcije citokina, osim što tretman *E. coli* u većoj meri nego LPS povećava produkciju IL-6 makrofaga pacova tretiranih rastvorom etanola, a stimulacija pomoću *Enterococcus* spp značajno povećava sekreciju TNF od strane makrofaga pacova kojima je kolitis indukovao TNBS u dozi od 40 mg/kg u odnosu na stimulaciju ovih makrofaga pomoću LPS.

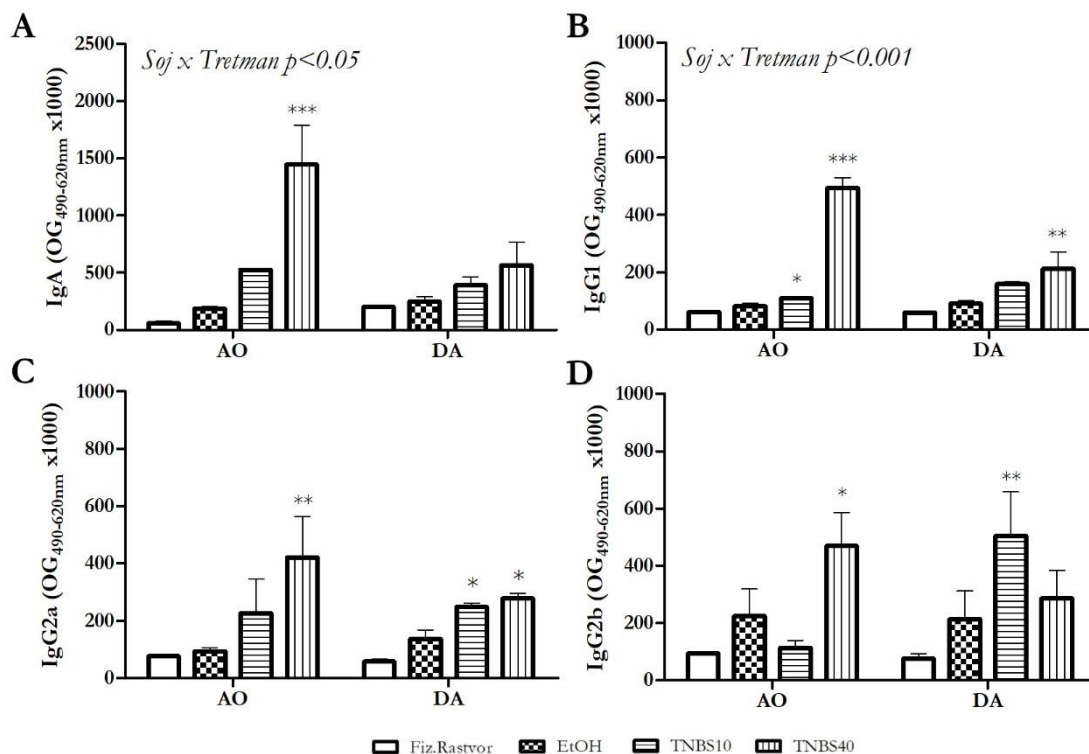


Grafik 24 Produkcija TNF (A), IL-6 (B), i IL-10 (C) od strane makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon *in vitro* stimulacije, sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrolnu grupu (Fiz.Rastvor); ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, u odnosu na AO soj; ^o $p < 0.05$, ^{oo} $p < 0.01$, ^{ooo} $p < 0.001$, u odnosu na stimulaciju pomoću LPS.

U DA pacovima, bez obzira na intrarektalni tretman, kapacitet stimulacije produkcije IL-6 od strane makrofaga peritonealne šupljine nakon stimulacije bakterijama fecesa je sličan onome nakon stimulacije pomoću LPS, dok je kapacitet produkcije TNF i IL-10 nakon stimulacije pomoću *Enterococcus* spp značajno veći nego nakon stimulacije pomoću LPS u makrofagima DA pacova kojima je indukovano kolitis. Dvofaktorska analiza varijanse u testu produkcije IL-10 je detektovala slabu interakciju samo u pacovima DA soja, što ukazuje da način indukcije kolitisa zaista menja način na koji makrofagi peritonealne šupljine odgovaraju na *in vitro* stimulaciju.

4.3.5. Nivo antitela u serumu specifičnih za komensalni izolat *E. coli*

Nivo antitela specifičnih za *E. coli* IgA klase je bio viši u serumu kontrolnih DA pacova u odnosu na kontrolne AO pacove (Grafik 25A), dok su nivoi ostalih klasa antitela specifičnih za *E. coli* bili komparabilni između kontrolnih grupa ovih životinja. Indukcija kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg je dovela do statistički značajnog porasta nivoa antitela specifičnih za *E. coli* svih klasa u serumu AO pacova, dok je indukcija TNBS u dozi od 40 mg/kg u DA pacovima dovela do porasta nivoa antitela specifičnih za *E. coli* klase IgG1 i IgG2a (Grafik 25B i C). S druge strane, indukcija kolitisa rastvorom TNBS u dozi od 10 mg/kg nije uticala na nivo antitela specifičnih za *E. coli* u serumu AO pacova, ali je u DA pacovima dovelo do porasta nivoa antitela specifičnih za *E. coli* klase IgG2a i IgG2b (Grafik 25C i D).



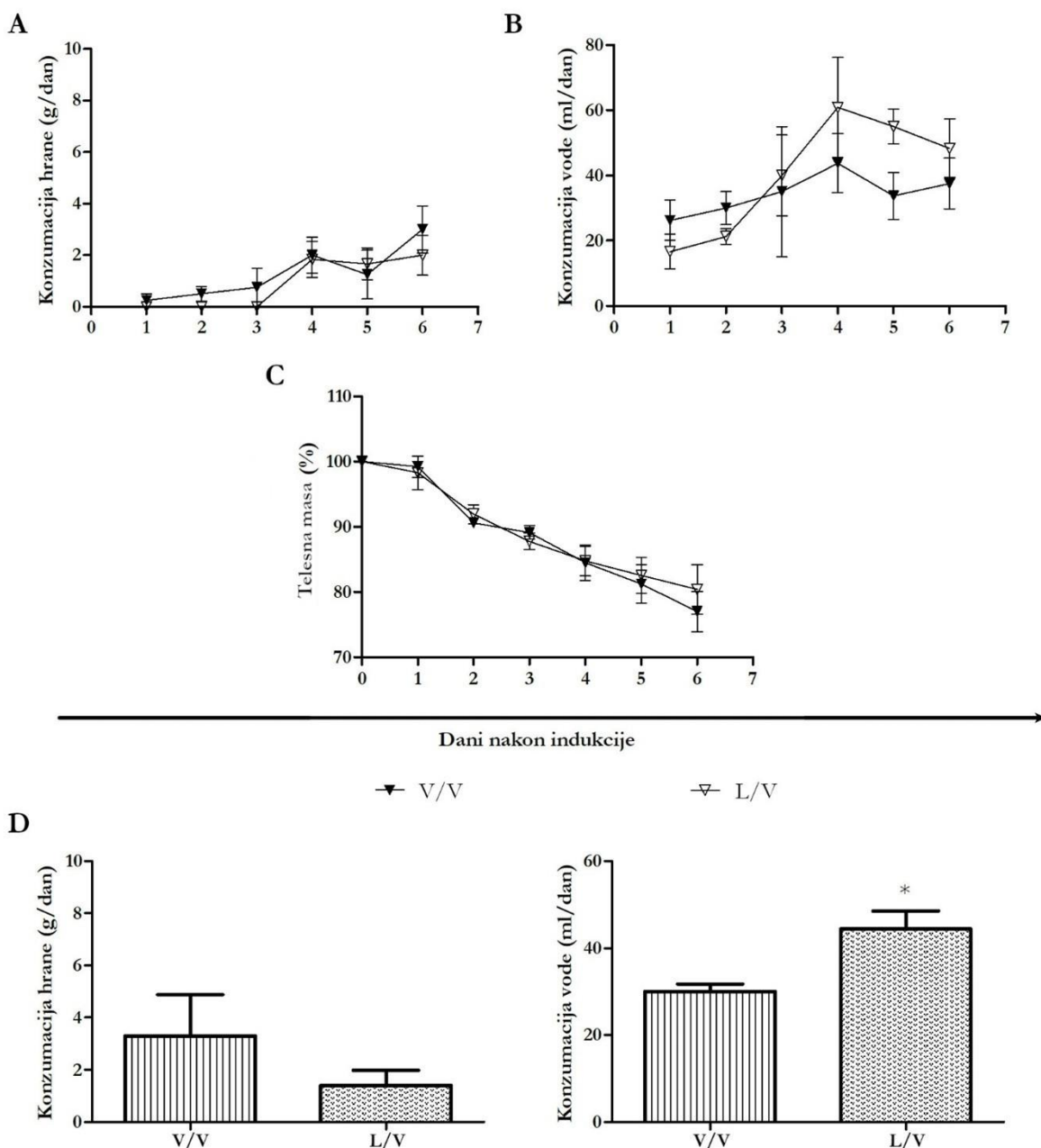
Grafik 25 Nivo antitela u serumu AO i DA pacova specifičnih za *E. coli* sedmog dana nakon indukcije kolitisa ili intrarektalne primene fiziološkog rastvora. Antitela specifična za *E. coli* klase IgA (A), IgG1 (B), IgG2a (C), i IgG2b (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, u odnosu na kontrole (Fiz. rastvor); ^c $p < 0.001$, u odnosu na AO soj.

4.4. Modulacija razvoja kolitisa DA pacova oralnom primenom probiotske bakterije *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu

4.4.1. Klinički znaci

4.4.1.1. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na konzumaciju hrane i vode, i gubitak telesne mase tokom razvoja kolitisa

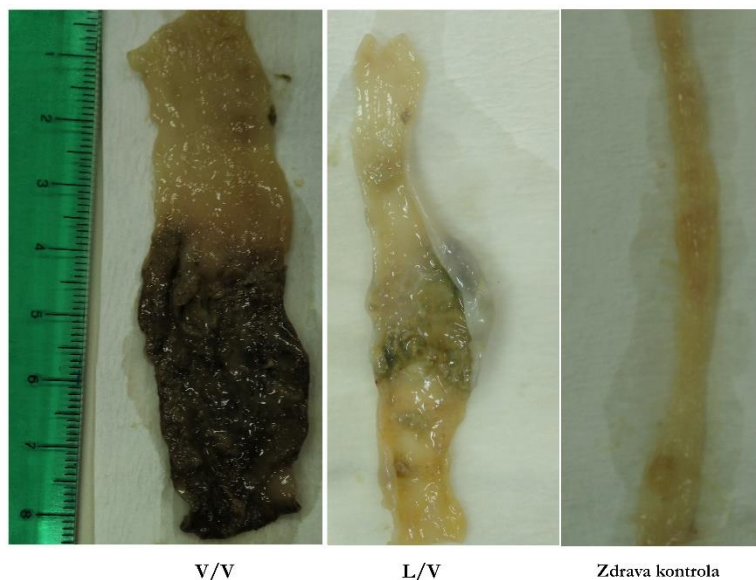
Nakon indukcije kolitisa, konzumacija hrane vode DA pacova je praćena tokom 6 dana. Pacovi su uzimali sličnu količinu hrane, i po danu i prosečno, nezavisno od prethodnog tretmana probiotikom (Grafik 26A). Dnevna konzumacija vode je slična u pacova obe grupe (Grafik 26B), međutim, pacovi koji su tretirani probiotikom tokom ranog postnatalnog perioda u proseku konzumiraju više vode u odnosu na netretirane pacove (Grafik 26D). Između pacova koji su tretirani probiotikom i netretiranih, ne postoji razlika u trendu gubitka telesne mase (Grafik 26C).



Grafik 26 Dnevna konzumacija hrane (A) i vode (B), promena telesne mase (C), i prosečne vrednosti konzumacije hrane i vode (D) DA pacova nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna

grupa bez tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus*, L/V – grupa tretirana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, u odnosu na V/V.

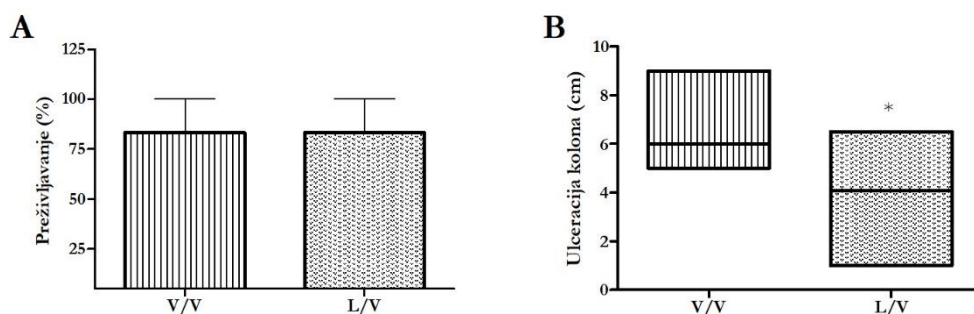
4.4.1.2. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na makroskopska oštećenja kolona nakon indukcije kolitisa Pacovi kontrolne grupe koji nisu tretirani probiotikom razvijaju značajno zadebljanje zida kolona, širenje lumena, kao i ekstenzivnu ulceraciju sedmog dana nakon indukcije kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg (Slika 6). U pacova tretiranih probiotikom u ranom postnatalnom periodu detektovana su znatno manja oštećenja. Naime, zadebljanje i ulceracije kolona su i dalje prisutni, ali u manjoj meri nego u pacovima netretirane grupe.



Slika 6 Makroskopski izgled kolona DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus*, L/V – grupa tretirana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu.

4.4.1.3 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na stopu preživljavanja životinja i ulceraciju kolona nakon indukcije kolitisa

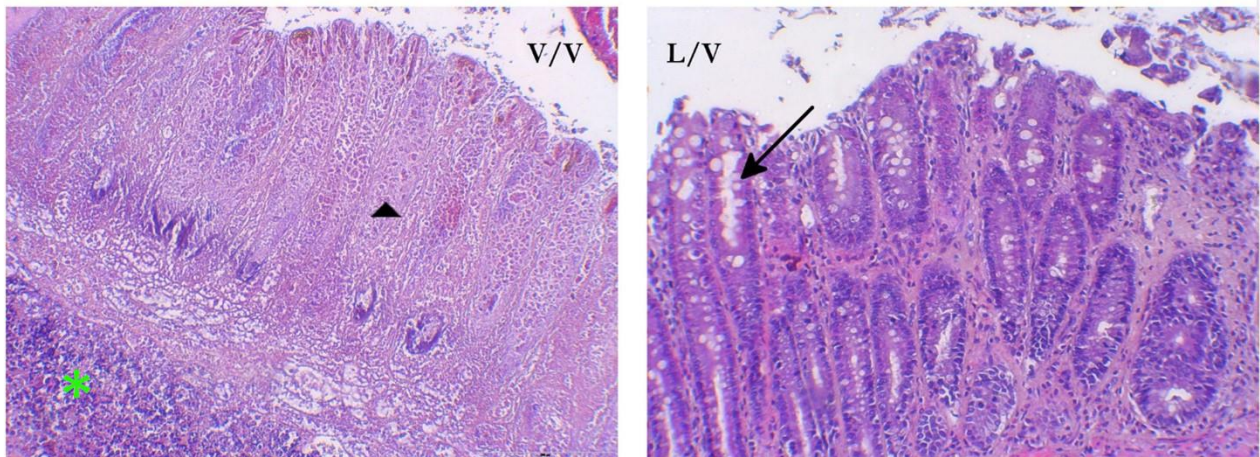
Preživljavanje tokom sedam dana nakon indukcije kolitisa među pacovima nije promenjeno ranim postnatalnim tretmanom probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* (Grafik 27A). Sedmog dana nakon indukcije kolitisa primećeno je da u preživelih pacova koji su rano tretirani probiotikom (L/V) postoji nešto manja zahvaćenost površine kolona ulceracijom (Grafik 27B).



Grafik 27 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na procenat preživljavanja DA pacova (A) i dužinu kolona zahvaćenu ulceracijom (B) sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, u odnosu na V/V.

4.4.1.4. Uticaj ranog tretmana probioskom bakterijom *L. rhamnosus* na promene histologije tkiva kolona nakon indukcije kolitisa

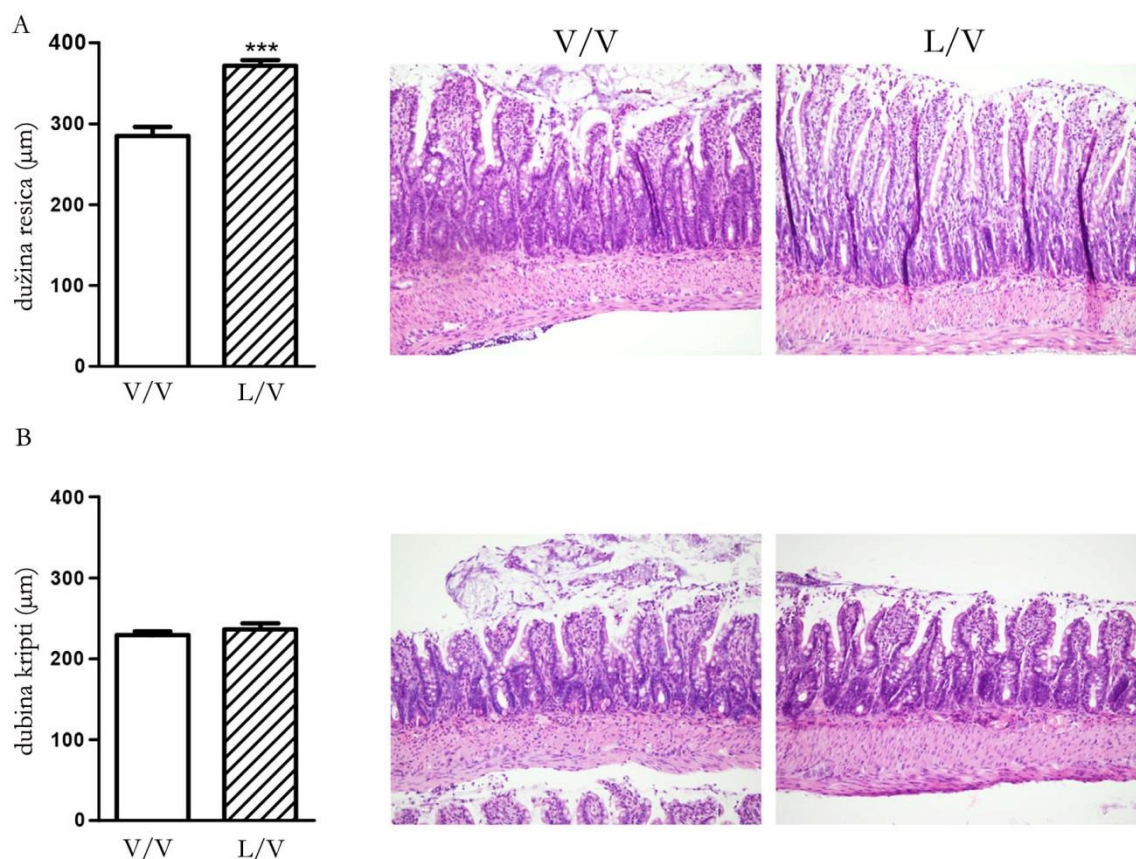
Indukcija kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg je izazvala distorziju kripti, razaranje epitelnog sloja mukoze, i masovnu infiltraciju inflamatornih ćelija u mukoznom i submukoznom sloju u pacova koji nisu tretirani probiotikom (V/V). Međutim, u pacova tretiranih probiotikom u ranom postnatalnom periodu je vidno smanjenje patoloških promena izazvanih primenom TNBS u dozi od 40 mg/kg – integritet kripti je više očuvan, a akumulacija inflamatornih ćelija je manje izražena. (Slika 7).



Slika 7 Reprezentativne mikrografije preparata kolona DA pacova tretiranih probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu (L/V) ili netretiranih (V/V), sedmog dana nakon indukcije kolitisa. Preparati su obojeni hematoksilinom i eozinom, i slikani na uvećanju od 40x. Strelica pokazuje oporavljene kripte sa peharastim ćelijama, zelena zvezdica infiltraciju inflamatornih ćelija, crni trougao fibroznu akumulaciju unutar oštećene mukoze.

4.4.1.5. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na promene dubina kripti i dužine resica kolona i ileuma

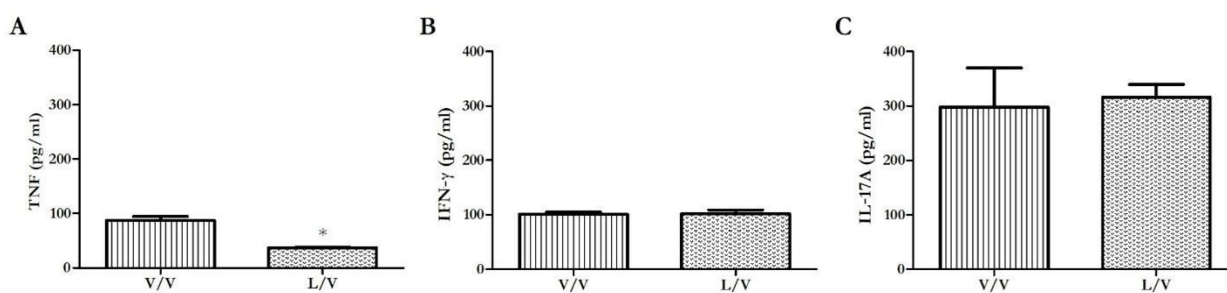
Pacovi DA soja tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu su imali značajno duže resice u terminalnom ileumu (Slika 8A), dok nije bilo nikakve značajne razlike u dubini kripti u kolonu (Slika 8B).



Slika 8 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na dužinu resica u distalnom ileumu (A) i dužinu kripti u kolonu (B) DA pacova. Reprezentativne mikrofografije preparata bojenih hematoksilinom i eozinom prikazane su sa desne strane (Uveličanje 20x). *** $p < 0.001$, u odnosu na V/V.

4.4.2. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na koncentraciju citokina u homogenatima tkiva kolona nakon indukovanoog kolitisa

Pacovi tretirani probiotikom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu su imali značajno nižu koncentraciju TNF u kolonu sedam dana nakon indukcije kolitisa u odnosu na one koji nisu tretirani probiotikom (Grafik 28A). Nije bilo značajnih razlika u koncentraciji IFN- γ ili IL-17A u homogenatima tkiva kolona nakon indukcije kolitisa između pacova tretiranih probiotikom i pacova koji nisu tretirani, a u obe grupe pacova je detektovana veća koncentracija IL-17A u odnosu na IFN- γ (Grafik 28B i C).

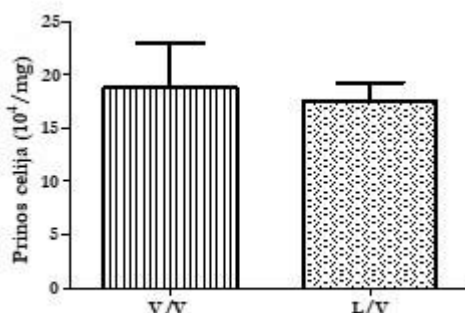


Grafik 28 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na koncentraciju TNF (A), IFN- γ (B), i IL-17A (C) u homogenatima tkiva kolona DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, u odnosu na V/V.

4.4.3. Mezenterični limfni čvorovi

4.4.3.1. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na prinos ćelija mezenteričnih limfnih čvorova nakon indukcije kolitisa

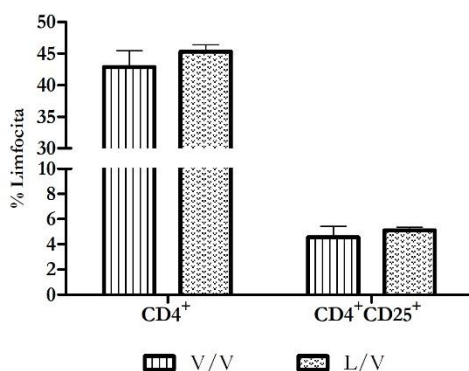
Prinos ukupnih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova sedmog dana nakon indukcije kolitisa je uporediv između pacova koji su bili tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu i pacova koji nisu bili tretirani (Grafik 29).



Grafik 29 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na prinos ukupnih ćelija po masi mezenteričnih limfnih čvorova DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu.

4.4.3.2. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na promene fenotipa limfocita mezenteričnih limfnih čvorova nakon indukcije kolitisa

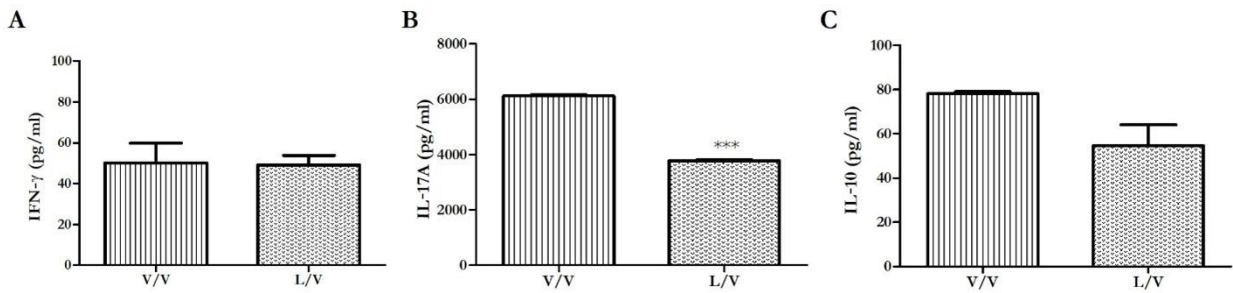
Među ukupnim limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova u pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa između 40 i 45% čine CD4⁺ limfociti, a dvostruko pozitivni CD4⁺CD25⁺ limfociti čine oko 4% ukupnih limfocita (Grafik 30). Rani postnatalni tretman probiotikom nije doveo do promene u udelu CD4⁺ ili CD4⁺CD25⁺ limfocita među ukupnim limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova.



Grafik 30 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na udeo CD4⁺ i CD4⁺CD25⁺ limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu.

4.4.3.3. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na produkciju citokina od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova stimulisanih pomoću ConA nakon indukcije kolitisa

Limfociti mezenteričnih limfnih čvorova stimulisani pomoću ConA sedmog dana nakon indukcije kolitisa proizvode slične količine IFN- γ i IL-10, nezavisno od prethodnog tretmana probiotikom (Grafik 31A i C). Rani tretman probiotikom je doveo do značajnog smanjenja produkcije IL-17A od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova stimulisanih pomoću ConA nakon indukcije kolitisa, u odnosu na grupu koja nije tretirana probiotikom (Grafik 31).

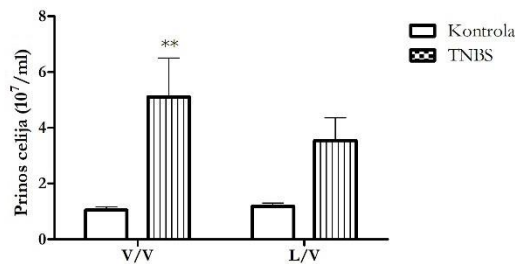


Grafik 31 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na sposobnost produkcije citokina IFN- γ (A), IL-17A (B), i IL-10 (C) od strane limfocita mezenteričnih limfnih čvorova DA pacova *in vitro* stimulisanih pomoću ConA sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. *** $p < 0.001$, u odnosu na V/V.

4.4.4. Čelije peritonealne šupljine

4.4.4.1. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na prinos ukupnih ćelija peritonealne šupljine nakon indukcije kolitisa

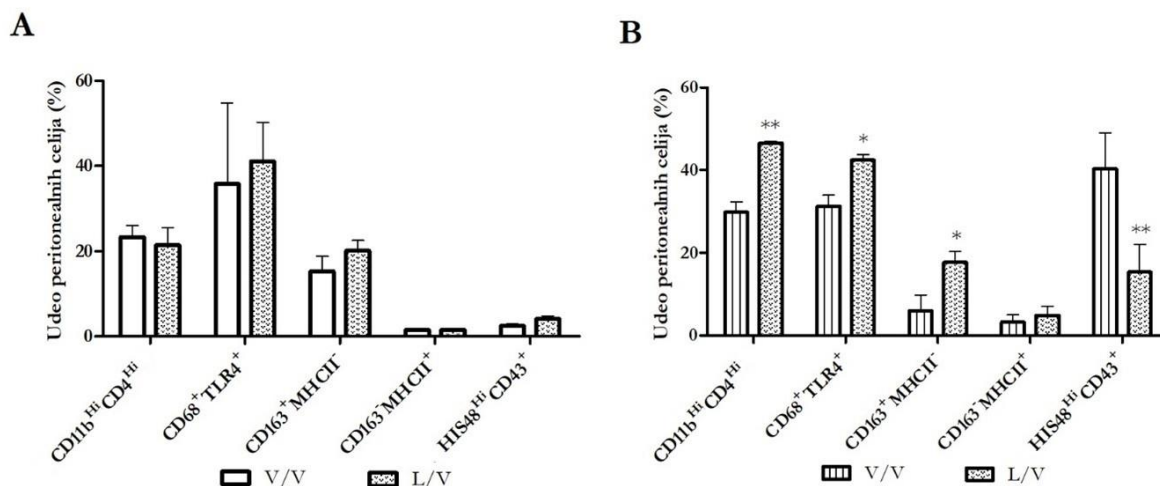
Iako nije doveo do promena u broju ukupnih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine zdravih pacova, tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu značajno je smanjio povećanje broja ukupnih ćelija peritonealne šupljine koje se javlja sedmog dana nakon indukcije kolitisa. (Grafik 32).



Grafik 32 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na prinos ukupnih ćelija peritonealne šupljine DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. ** $p < 0.01$, u odnosu na V/V.

4.4.4.2. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na fenotip ukupnih ćelija peritonealne šupljine nakon indukcije kolitisa

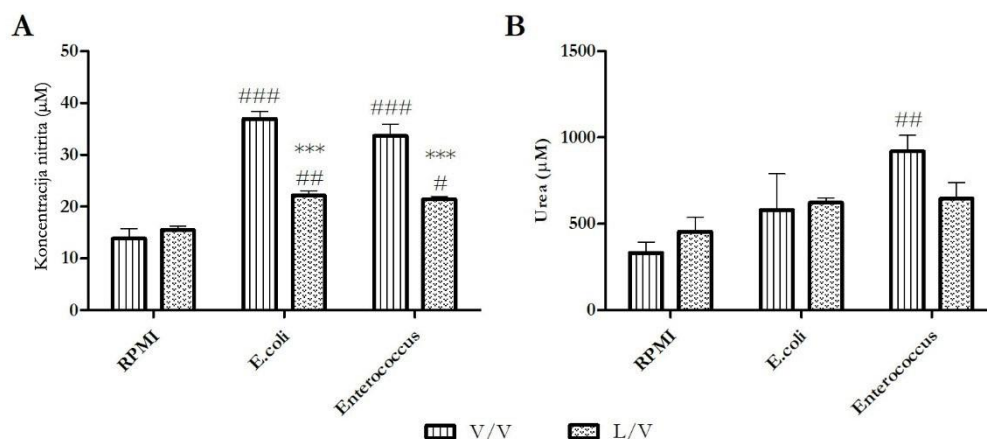
Tretman probiotikom nije doveo do promena fenotipa ćelija peritonealne šupljine zdravih DA pacova (Grafik 33A). Sedmog dana nakon indukcije kolitisa, u DA pacovima koji su tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu detektovan je veći udeo rezidentnih CD11b^{Hi}CD4^{Hi} i CD68⁺TLR4⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u odnosu na pacove koji nisu tretirani (Grafik 33B). Nakon indukcije kolitisa, udeo CD163⁺MHCII⁻ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je veći u pacova tretiranih probiotskom bakterijom *L. rhamnosus*, dok je udeo CD163⁺MHCII⁺ makrofaga/dendritskih ćelija sličan kao u pacova koji nisu tretirani (Grafik 33B). Udeo peritonealnih HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine je značajno manji sedmog dana nakon indukcije kolitisa u pacova tretiranih probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u odnosu na pacove koji nisu tretirani (Grafik 33B):



Grafik 33 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na fenotipske karakteristike ćelija peritonealne šupljine DA pacova, u zdravim pacovima (A) i sedmog dana nakon indukcije kolitisa (B). V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na V/V.

4.4.4.3. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na produkciju NO, hidrolizu L-arginina, i produkciju H_2O_2 od strane makrofaga peritonealne šupljine stimulanih *in vitro* pomoću bakterija fecesa nakon indukcije kolitisa

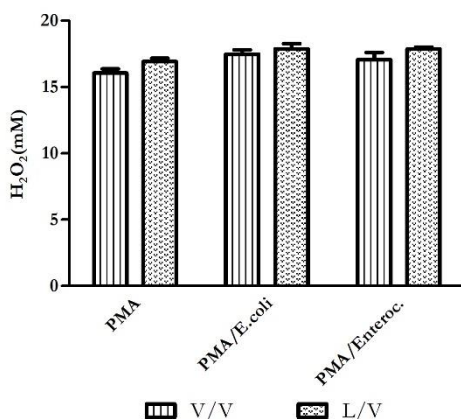
Tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nije doveo do promene koncentracije nitrita u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine ili koncentracije uree nakon hidrolize L-arginina u lizatima makrofaga peritonealne šupljine DA pacova izolovanih sedmog dana nakon indukcije kolitisa (Grafik 34). Makrofagi pacova koji nisu tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* su na *in vitro* stimulaciju pomoću *E. coli* ili *Enterococcus* spp. odgovorili povećanjem koncentracije nitrita, dok je porast koncentracije nitrita indukovanih bakterijama fecesa bio značajno manji u makrofaga tretiranih pacova (Grafik 34A). U pogledu hidrolize arginina, stimulacija makrofaga peritonealne šupljine netretiranih pacova pomoću *E. coli* nije dovela do značajnog povećanja koncentracije uree, dok je stimulacija pomoću *Enterococcus* spp. dovela do značajnog povećanja detektovane koncentracije uree (Grafik 34B): Makrofagi pacova tretiranih probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nisu reagovali na *in vitro* stimulaciju promenom koncentracije uree dobijene hidrolizom L-arginina (Grafik 34B).



Grafik 34 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na koncentraciju nitrita (A) i hidrolizu L-arginina u ureu (B) od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova stimulanih *in vitro* pomoću bakterija fecesa sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom

postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, u odnosu na V/V; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, u odnosu na nestimulisane ćelije (RPMI).

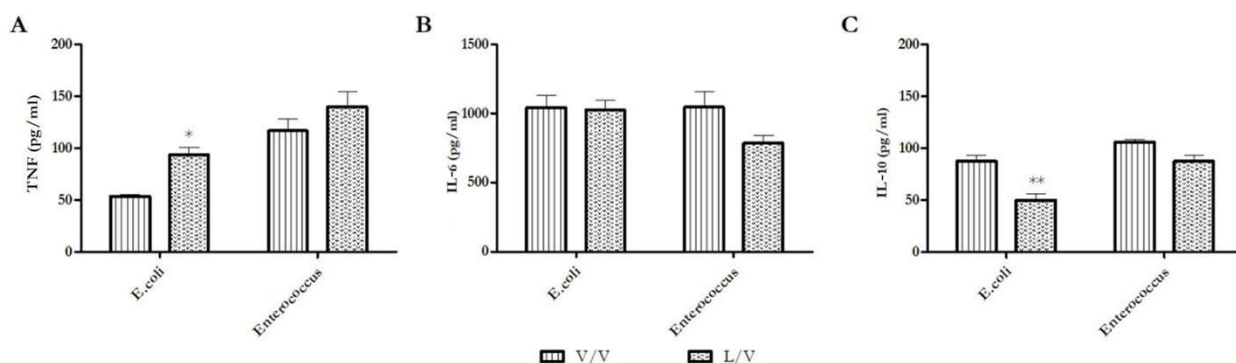
Rani tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nije doveo do promena koncentracije H_2O_2 produkovane od strane makrofaga peritonealne šupljine stimulisanih pomoću PMA. Dodatna *in vitro* stimulacija pomoću *E. coli* i *Enterococcus* spp. nije dovela do promene detektovane koncentracije H_2O_2 (Grafik 35).



Grafik 35 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na koncentraciju H_2O_2 produkovanog od strane peritonealnih makrofaga DA pacova stimulisanih pomoću PMA *in vitro*, sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu.

4.4.4.4. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na produkciju citokina od strane makrofaga peritonealne šupljine stimulisanih pomoću bakterija fecesa nakon indukcije kolitisa

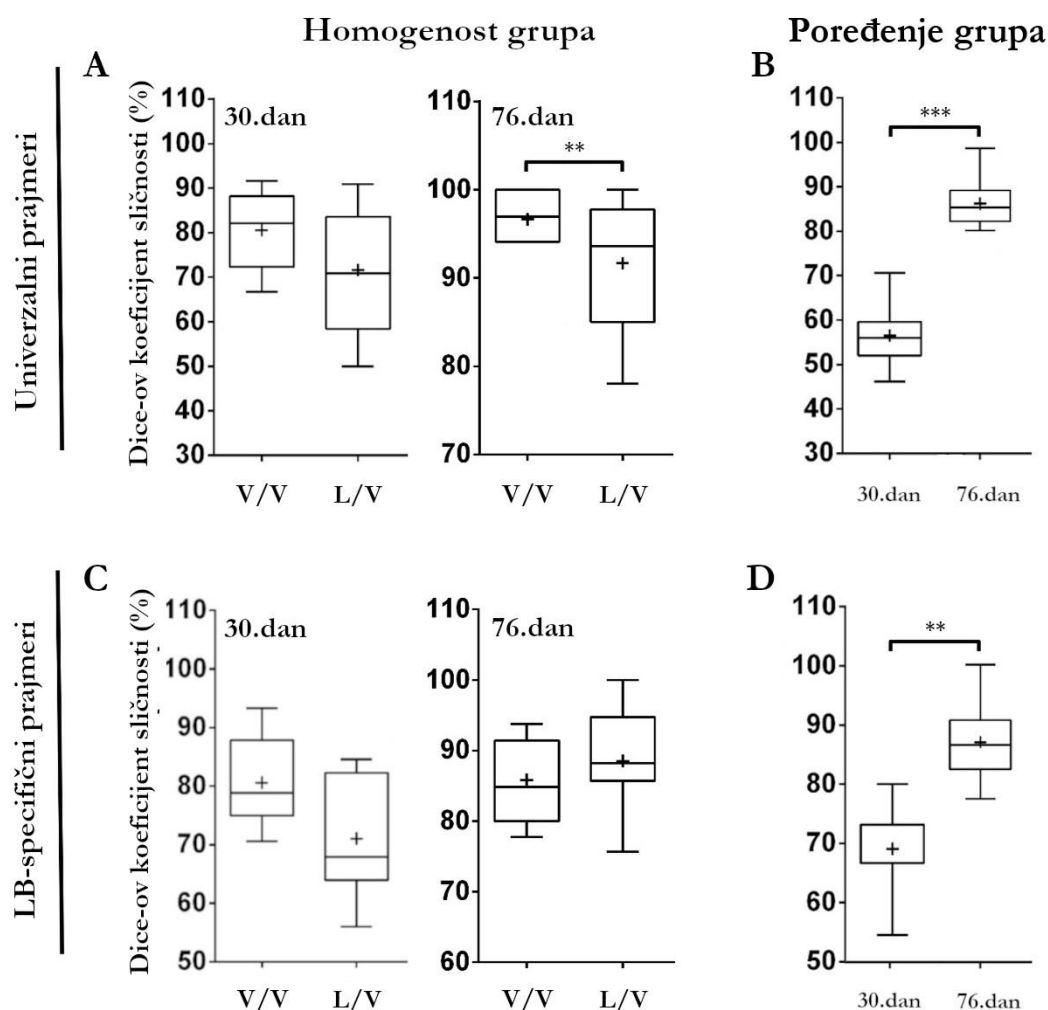
Sedmog dana nakon indukcije kolitisa, makrofagi peritonealne šupljine DA pacova koji su tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu nakon *in vitro* stimulacije pomoću *E. coli* imali su veću koncentraciju TNF u supernatantima, a manju koncentraciju IL-10 u odnosu na supernatante makrofaga pacova koji nisu tretirani (Grafik 36A i C). Rani tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* ne dovodi do promene koncentracije IL-6 u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine nakon stimulacije pomoću *E. coli*, kao ni koncentracija TNF, IL-6 i IL-10 nakon stimulacije pomoću *Enterococcus* spp. (Grafik 36A-C).



Grafik 36 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na koncentraciju TNF (A), IL-6 (B), i IL-10 (C) u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine DA pacova izolovanih sedmog dana nakon indukcije kolitisa i stimulisanih pomoću bakterija fecesa tokom 24h *in vitro*. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u odnosu na V/V.

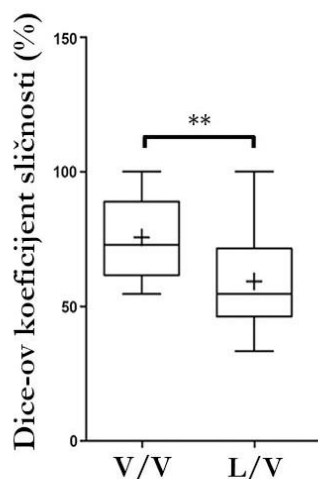
4.4.5. Analize diverziteta mikrobiote fecesa i antitela u serumu specifičnih za bakterije fecesa

4.4.5.1. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na diverzitet bakterija fecesa zdravih DA pacova
Odrađena je DGGE analiza rDNA amplikona pomoću DNK izolovane iz uzoraka fecesa zdravih DA pacova starih mesec dana, i U968-GC-f i L1401-r Bif662-GC-r i Bif164-f i Lab-0159f i Uni-0515GCr set prajmera. Rani tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nije doveo do značajne promene homogenosti u DGGE profilu dobijenom univerzalnim ili prajmerima specifičnim za LB u 30-om danu života (Grafik 37A i C, levo). 76. dana života, grupa DA pacova tretiranih probiotikom imala je značajno veću raznovrsnost, mereno smanjenjem koeficijenta sličnosti unutar grupe u DGGE profilu dobijenom univerzalnim prajmerima, ali nije bilo razlike u homogenosti bakterijskog sastava između tretirane i netretirane grupe pacova u DGGE profilu dobijenom prajmerima specifičnim za LB (Grafik 37A i C, desno). Sličnost sastava mikrobiote između tretirane i netretirane grupe je niža u 30. danu u odnosu na 76. dan života, nezavisno od prajmera koji je korišćen (Grafik 37B i D).



Grafik 37 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na raznovrsnost bakterijskih populacija iz uzoraka fecesa DA pacova sakupljenih 30. i 76. dana života, izraženu Dice-ovim koeficijentom. Homogenost grupa procenjena upoređivanjem pojedinačnih DGGE profila dobijenih pomoću univerzalnih prajmera (A) i prajmera specifičnih za *Lactobacillus* (LB) (C) unutar grupa. Poređenje grupa urađeno poređenjem DGGE profila dobijenih pomoću univerzalnih prajmera (B) ili prajmera specifičnih za LB (D) uzoraka L/V grupe sa profilom V/V grupe (L/V:V/V). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Pacovi DA soja koji su rano tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* su 30.dana života imali veću raznovrsnost bakterija vrsta *Bifidobacterium* u fecesu, u odnosu na pacove koji nisu tretirani probiotikom (Grafik 38). U uzorcima fecesa prikupljenim 76.dana života DGGE profili pokazuju apsolutnu homogenost u svim uzorcima, nezavisno od tretmana probiotikom ili jedinke (podaci nisu prikazani).



Grafik 38 Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na raznovrsnost bakterijskih populacija iz uzoraka fecesa DA pacova sakupljenih 30. dana života, izraženu Dice-ovim koeficijentom. Homogenost grupa procenjena upoređivanjem pojedinačnih DGGE profila dobijenih pomoću prajmera specifičnih za *Bifidobacterium*. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu. ** p<0.01.

4.4.5.2. Uticaj ranog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na translokaciju bakterija van kolona nakon indukcije kolitisa

Iz macerata tkiva slezine i mezenteričnih limfnih čvorova zdravih DA pacova nije bilo moguće razviti kulturu bakterija, dok su komensalne bakterije *E. coli* i *Enterococcus* spp. bile detektovane u kulturama tkiva izolovanih iz pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa. Iako je nakon indukcije kolitisa utvrđeno manje prisustvo komensalnih bakterija u tkivu životinja tretiranih probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu (L/V), rani tretman nije u potpunosti sprečio translokaciju komensalnih bakterija iz kolona (Tabela 5).

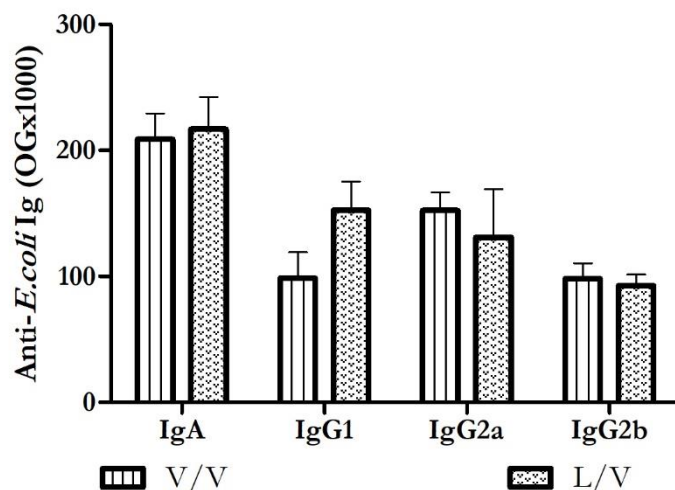
Tabela 5. Efekat ranog postnatalnog oralnog tretmana probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na translokaciju predstavnika bakterija crevne flore kolona DA pacova pre indukcije kolitisa i sedmog dana nakon indukovano kolitisa (+ svi analizirani uzorci imaju vijabilne bakterije, +/- deo uzoraka ima vijabilne bakterije; - nijedan uzorak nema vijabilne bakterije); V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu.

Probiotski tretman	Indukcija kolitisa	Tkivo	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
V/V	-	Mezenterični limfni čvorovi	-	-
		Slezina	-	-
V/V	+	Mezenterični limfni čvorovi	+	+
		Slezina	+	-
L/V	+	Mezenterični limfni	+/-	+/-

		čvorovi		
		Slezina	+/-	+/-

4.4.5.3. Uticaj ranog tretmana probiotikom *L. rhamnosus* na nivo antitela u serumu specifičnih za komensalni izolat *E. coli* nakon indukcije kolitisa

Rani tretman DA pacova probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nije pokazao značajan uticaj na nivo antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA, IgG1, IgG2a, ili IgG2b sedmog dana nakon indukcije kolitisa (Grafik 39).



Grafik 39 Uticaj ranog tretmana DA pacova probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* na nivo antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA, IgG1, IgG2a, i IgG2b u serumu, sedmog dana nakon indukcije kolitisa. V/V – kontrolna grupa bez tretmana probiotikom, L/V – grupa tretirana probiotikom u ranom postnatalnom periodu.

5. DISKUSIJA

5.1. Sojne razlike u indukciji peritonitisa umrtvljenim bakterijama fecesa

Kako bi se ispitale promene u fenotipu i aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine dva soja pacova tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano direktnim delovanjem bakterija crevne mikrobiote, pacovi AO i DA soja su podvrgnuti *i.p.* tretmanu formalinom-umrtvljenim autologim bakterijama fecesa *E. coli* ili *Enterococcus* spp., a ćelije peritonealne šupljine su izolovane i ispitane dva dana nakon toga. Tokom dva dana nakon *i.p.* primene bakterija, životinje su izgledale zdravo, bile budne, imale glatko krzno i odgovarale na stimuluse iz sredine, čime je dodatno potvrđeno da bakterije fecesa tretirane formalinom nisu bile vijabilne, odnosno sposobne da nakon *i.p.* primene dovedu do bakterijske infekcije koja bi uslovlila razvoj sepse. U prilog tome govori i odsustvo promena telesne mase i mase slezina tokom razvoja bakterijskog peritonitisa.

U AO pacovima, broj ukupnih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine je bio povišen samo nakon *i.p.* primene *E. coli*, dok u DA pacovima nije bilo nikakvih promena u broju ukupnih ćelija peritonealne šupljine nakon *i.p.* tretmana bakterijama fecesa, nezavisno od soja bakterija. Prvi odgovor na inflamatorne stimuluse unutar seroznih šupljina jeste "reakcija nestajanja makrofaga" (*engl.* Macrophage Disappearance Reaction, MDR) (129). Reakcija rezidentnih makrofaga na inflamatorni stimulus u peritonealnoj šupljini je povećanje ekspresije adhezivnih molekula i molekula uključenih u kaskadu reakcije koagulacije, te na ovaj način makrofagi ostaju u ugrušcima fibrina u omentumu ili odlaze u limfotok čime postaju praktično nedostupne za izolaciju lavažom (130,131). Inluks neutrofila kroz venule sa visokim endotelom omentuma počinje u prvih sat vremena od *i.p.* primene bakterija, a neutrofilni fagocituju bakterije i brzo podležu apoptozi, tako da ih do dvadeset četiri časa nakon indukcije inflamacije praktično više nema u peritonealnoj šupljini (132,133). U prvih nekoliko sati nakon indukcije, paralelno sa neutrofilima počinje i inluks monocita, koji traje barem nekoliko dana. Rezidentni makrofagi peritonealne šupljine su izvor hemoatraktanta specifičnog za monocite, CCL2, koga oslobađaju u akutnoj inflamaciji nakon fagocitoze bakterija (134,135).

Monociti i makrofagi na površini plazma membrane ekspimiraju β_2 -integrin CD11b, kao i antigen za koga se spekulise da je ekvivalent mišijem Ly6C antigenu monocita, makrofaga, i neutrofila, koji vezuje antitelo HIS48 (170). Odnos nivoa ekspresije CD11b i HIS48 molekula na površini plazma membrane ćelije, kao i njena veličina, ukazuju na to da li je ćelija monocit (veći stepen ekspresije HIS48 antigena, srednji stepen ekspresije CD11b) ili makrofag (manji stepen ekspresije HIS48, veći stepen ekspresije CD11b) (26,136–138). Smanjenje udela rezidentne CD11b^{Hi}HIS48^{Low} populacije makrofaga peritonealne šupljine, zajedno sa povećanjem udela CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita ukazuje na klasični korak inflamatornog odgovora u tkivu - inluks inflamatornih monocita koji postaju brojčano dominantni u odnosu na rezidentne zrele makrofage u DA pacovima. U AO pacovima, samo *i.p.* primena *E. coli*, a u DA pacovima *i.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp., povećavaju procenat CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita u peritonealnoj šupljini nakon dva dana od primene.

U DA pacovima, *i.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp. dovodi do smanjenja udela rezidentnih CD11b^{Hi}HIS48^{Low} makrofaga u peritonealnoj šupljini, i povećanja udela CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita, dok se ove promene u sastavu ćelija peritonealne šupljine u AO pacovima dešavaju samo nakon *i.p.* primene *E. coli* što ukazuje na to da do razvoja peritonealne inflamacije u DA pacovima dolazi i nakon *i.p.* primene Gram-pozitivne bakterije *Enterococcus* spp.

Molekul CD163 je receptor za kompleks hemoglobin-haptoglobin, poznat kao marker zrelih makrofaga (139). CD163 molekul je ekspimiran na svim tkivnim makrofagama i šablon njegove ekspresije u pacovima se dobrim delom poklapa sa ekspresijom u ljudima (139). S obzirom na to da *in vitro* stimulacija pomoću IL-4 povećava nivo ekspresije ovog površinskog receptora, CD163 se često smatra markerom polarizacije makrofaga ka M2 fenotipu (139). S druge strane, ligacija ovog receptora monoklonskim antitelom indukuje jak proinflamatorni odgovor u vidu sekrecije citokina (IL-1, TNF, i IL-6), kao i medijatora inflamacije (NO), i to sličnim intenzitetom kao stimulacija LPS, što ukazuje na

ulogu ovog receptora u proinflamatornom odgovoru karakterističnom za makrofage polarizovane ka M1 fenotipu (139).

Veća zastupljenost zrelih CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u kontrolnim AO pacovima u odnosu na DA pacove ukazuje na izraženiju polarizaciju ka proinflamatornom fenotipu u peritonealnoj šupljini DA pacova tokom homeostaze. Podatak da samo *i.p.* primena *E. coli* u AO pacovima dovodi do smanjenja zastupljenosti CD163⁺TLR4⁺CD86⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, dok u DA pacovima i *E. coli* i *Enterococcus* spp. dovode do smanjenja zastupljenosti CD163⁺CD86⁺ i CD163⁺TLR4⁺CD86⁺ makrofaga, dodatno ukazuje na intenzivniju aktivaciju ćelija peritonealne šupljine pacova DA soja bakterijskim antigenima. CD86 (B7-2 molekul) je transmembranski receptor imunoglobulinske familije, eksprimiran na površini APC-a (140). Iako je uloga kostimulatornog CD86 molekula prevashodno vezana za aktivaciju T ćelijskog odgovora vezivanjem za CD28 na površini naivnih T limfocita (141,142), ekspresija CD86 se podstiče i ushodno reguliše stimulacijom pomoću LPS ili IFN- γ (143), pa i ekspresija CD86 ukazuje na stepen aktivacije monocita i makrofaga nakon indukcije inflamacije.

Makrofagi peritonealne šupljine DA pacova su sposobni da produkuju veće koncentracije NO u homeostazi u odnosu na AO soj. Značajnije povećanje koncentracije NO je takođe detektovano u makrofagima DA pacova drugog dana nakon *i.p.* primene *E. coli* ili *Enterococcus* spp. Ovi rezultati ukazuju na snažniji *in vivo* odgovor u DA pacovima, u kojima su makrofagi peritonealne šupljine intenzivnije polarizovani u pravcu M1 fenotipa.

Signali za aktivaciju makrofaga mogu biti poreklom iz komensalne mikrobiote – TLR4-zavisna translokacija bakterija iz creva se odvija na nižem nivou tokom homeostaze (144), dok inflamatorno okruženje značajno povećava prelazak komensalnih bakterija kroz epitelni sloj creva (145). S obzirom da je ekspresija iNOS u makrofagima povećana najmanje sedam dana nakon bakterijske stimulacije ili stimulacije pomoću IFN- γ (146) može se pretpostaviti da je intenzivnija produkcija NO od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova u odnosu na makrofage peritonealne šupljine AO pacova verovatno rezultat ili povećane propustljivosti crevnog epitela DA pacova i češćeg kontakta ćelija peritoneuma sa bakterijama komensalne flore creva, ili intenzivnije aktivacije peritonealnih ćelija pacova ovog soja pri susretu sa bakterijama creva.

S druge strane, funkcionalna polarizacija rezidentnih makrofaga i monocita ka inflamatornom M1 fenotipu predstavlja jednu od bitnih karakteristika autoimunskih bolesti kao što su reumatoidni artritis (147) i multipla skleroza (148). Iako NO posreduje u imunskom odgovoru direktnom inhibicijom patogenih mikroorganizama ili indukcijom oksidativnih oštećenja svojim metabolitima (npr. peroksinitrit) (149), NO može da doprinese i oštećenju tkiva u hroničnoj inflamaciji. Povećana produkcija NO iz arginina nakon indukcije iNOS, markera M1 polarizacije makrofaga, dovodi do veće stope nekroze ćelija i erozije koštanog tkiva u reumatoidnom artritisu (150), kao i disrupcije krvno-moždane barijere, oštećenja oligodendrocita, i demijelinizacije aksona u multiploj sklerozi (151). Alternativni put metabolizma arginina preko enzima arginaze, koja se smatra markerom M2 polarizacije makrofaga, promovise sintezu kolagena i reparaciju tkiva (152). Intravensko ubrizgavanje monocita aktiviranih *ex vivo* M2 citokinima (IL-10 i IL-13) u modelu EAE dovodi do razvoja blažih kliničkih znakova nakon indukcije EAE, kao i imunomodulatorne aktivnosti u lezijama (148). S druge strane, relativno nizak nivo oslobađanja NO i uree u makrofagima kontrolnih pacova, slabija aktivacija nakon *i.p.* primene *E. coli*, i izostanak promena u produkciji NO i uree od strane makrofaga peritonealne šupljine AO pacova nakon *i.p.* primene *Enterococcus* spp. mogu ukazati na efikasniju aktivaciju inflamatornih ćelija koja omogućava adekvatno uklanjanje unetih bakterija (153,154), ali i na odlaganje početka inflamacije do dva dana nakon infekcije (155,156). Očuvan odnos inflamatornih i protektivnih medijatora je predložen kao faktor koji doprinosi dužem zdravom životu u odnosu na DA pacove (116,157).

Peroksidazna aktivnost makrofaga peritonealne šupljine AO pacova je bila manja nakon *i.p.* primene *E. coli* i *Enterococcus* spp, dok je u DA pacovima samo *i.p.* primena *Enterococcus* spp. smanjila peroksidaznu aktivnost makrofaga. U AO pacovima *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije uticala na udeo

CD11b^{Hi}HIS48^{Int} makrofaga i CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, ili produkciju NO i koncentraciju uree u makrofagima peritonealne šupljine, što može da ukazuje da umrtnjena bakterija *Enterococcus* spp. ne aktivira ćelije peritonealne šupljine AO pacova. Detektovana veća peroksidazna aktivnost makrofaga peritonealne šupljine DA pacova može da bude posledica nešto sporijeg uklanjanja apoptotičnih neutrofila nakon fagocitoze bakterija. Naime, ukupna peroksidazna aktivnost koja se određuje oskidacijom OPD može da bude rezultat i peroksidazne aktivnosti granula apoptotičnih neutrofila unutar fagozoma makrofaga (158).

U AO pacovima, *i.p.* primena *E. coli*, smanjuje udeo CD11b^{Hi}HIS48^{Low} i CD163⁺ rezidentnih makrofaga peritonealne šupljine, a povećava udeo CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita u peritonealnoj šupljini, dok u DA pacovima *i.p.* primena *E. coli* i *Enterococcus* spp. dovode do sličnog efekta. Imajući u vidu promene u sastavu ćelija peritonealne šupljine, bila bi očekivana dominantna sekrecija proinflammatoryh citokina, dok je u eksperimentima prikazanim u ovoj disertaciji primećeno da su makrofagi peritonealne šupljine izolovani iz AO pacova nakon *i.p.* primene *E. coli* i *Enterococcus* spp. produkovali znatno manje TNF i IL-10, ali više TGF- β u odnosu na makrofage peritonealne šupljine kontrolnih pacova, dok je u DA pacovima *i.p.* primena *E. coli* smanjila sekreciju i TNF i TGF- β u odnosu na makrofage kontrolnih pacova, a *i.p.* primena *Enterococcus* spp. nije dovela do promena u sekreciji ovih citokina. Međutim, *i.p.* primena i *E. coli* i *Enterococcus* spp. dovela je do porasta produkcije IL-10 u makrofagima DA pacova. Kako je nivo sekrecije citokina određivan u adherentnim ćelijama peritonealne šupljine, odnosno dominantno makrofagima koji imaju najizraženiji afinitet za plastiku (159), rezultati sugerišu da su makrofagi prisutni drugog dana u peritonealnoj šupljini funkcionalno izmenjeni u pravcu smanjenja sekrecije TNF (AO i DA) i povećanja sekrecije TGF- β (AO), odnosno IL-10 (DA). Kako efikasno uklanjanje apoptotičnih neutrofila od strane makrofaga dovodi i do povećane produkcije IL-10 i TGF- β (160), moguće je da je ovaj mehanizam doveo do smanjenja produkcije TNF. Značajno veća sposobnost produkcije IL-10, koja je prethodno pokazana u imunskim ćelijama koje se infiltriraju u centralni nervni sistem, ćelijama cervikalnih limfnih čvorova, i u ćelijama peritonealne šupljine DA pacova u odnosu na AO pacove (116,161,162), je faktor koji doprinosi podložnosti DA pacova infekciji sa *Trichinella spiralis* i oporavku od EAE, a IL-10 je predložen kao karakterističan citokin koga ćelije pacova ovog soja produkuju u odgovoru na inflamaciju (163). S druge strane, ćelije AO pacova u značajno većoj meri produkuju TGF- β , kako bazalno, tako i nakon imunizacije (161). Makrofagi monocitnog porekla nakon fagocitoze apoptotskih ćelija produkuju i TGF- β (164), a povećana produkcija TGF- β tokom akutnog peritonitisa indukovano *i.p.* primenom *E. coli* ublažava inflamaciju i dovodi do efikasnije rezolucije inflamacije (165). TGF- β je ključan stimulator akumulacije kolagena u okolnim fibroblastima koji doprinose rezoluciji inflamacije (166), a kako se ekspresija TGF- β postepeno povećava u danima nakon inicijacije regrutovanja inflammatoryh ćelija (167), viša sekrecija ovog citokina nakon *i.p.* primene bakterija AO pacovima može da ukazuje da je inflamacija okončana ranije u njima, i da je veći stepen fagocitoze apoptotskih ćelija detektovan neposredno pred izolaciju ćelija. U prvih nekoliko sati nakon indukcije, paralelno sa neutrofilima počinje i influks monocita, koji traje barem nekoliko dana. Pošto CD163 molekul može da posreduje u fagocitozi bakterija (168), prisustvo većeg broja zrelih rezidentnih CD163⁺ u AO pacovima predstavlja obilniji izvor CCL2 u slučaju inflamacije koje privlače veći broj monocita (169), a time, moguće, i izvor sekrecije TGF- β .

Povećanje produkcije IL-10 i TGF- β takođe doprinosi smanjenju ekspresije TLR4 i CD86 (170), što može da doprinese smanjenju sekrecije proinflammatoryh citokina. Međutim, nivoi IL-10 i TGF- β u kulturi ćelija pacova oba soja su bili značajno ispod nanogramskih koncentracija neophodnih za supresivno delovanje u fiziološkim uslovima (171–173), stoga, nakon *i.p.* primene bakterija fecesa, ne možemo pouzdano zaključiti koliki je stepen doprinosa povećane sekrecije IL-10 ili TGF- β , smanjenju sekrecije TNF.

Pokazano je da stimulacija makrofaga TNF povećava ekspresiju mRNA za iNOS (174), a NO, produkt iNOS, učestvuje u efikasnom uklanjanju fagocitovanih bakterija. Međutim, pokazano je i da je stepen korelacije između fagocitoze bakterija i povećanja produkcije NO definisan genetskim karakteristikama domaćina (175) a naši nalazi pokazuju da je porast sekrecije supresivnog TGF- β nakon fagocitoze u AO pacovima u boljoj korelaciji sa relativno malim porastom produkcije NO nakon *i.p.* primene *E. coli*,

odnosno odsustva povećanja produkcije NO nakon *i.p.* primene *Enterococcus* spp., dok porast koncentracije supresivnog IL-10 u supernatantima makrofaga peritonealne šupljine DA pacova ne korelira sa povećanjem produkcije NO od strane makrofaga peritonealne šupljine.

5.2. Sojne razlike u imunomodulaciji makrofaga peritonealne šupljine AO i DA pacova nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*

Kako bi se ispitala direktna modulatorna svojstva probiotske bakterije *L. rhamnosus*, ćelije peritonealne šupljine su izolovane iz AO i DA pacova drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*. Praćene su promene fenotipa ćelija peritonealne šupljine i njihov odgovor na stimulaciju predstavnicima mikrobiote *in vitro*.

Rezultati su pokazali da su i inflamatorna reakcija ćelija peritonealne šupljine indukovana živom bakterijom *L. rhamnosus*, i sposobnost *L. rhamnosus* da utiče na odgovor ovih ćelija na stimulaciju predstavnicima mikrobiote *in vitro* sojno zavisne. Nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* došlo je do povećanja prinosa ukupnih ćelija peritonealne šupljine izolovanih drugog dana nakon primene u pacovima oba soja, sa karakterističnim smanjenjem udela rezidentnih CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine. Influx inflamatornih HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita i porast udela inflamatornih CD163⁺MHCII^{Low} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine u pacovima oba soja drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* potvrđuje da ova probiotska bakterija indukuje razvoj inflamacije u peritonealnoj šupljini (176). Kako je Ki67 indikator proliferativnog potencijala makrofaga, posebno G1 faze proliferacije (177), smanjen udeo CD68⁺Ki67⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine izolovanih drugog dana u odnosu na ćelije kontrolnih pacova oba soja ukazuje na to da je i mali udeo proliferišućih rezidentnih makrofaga, kojih drugog dana nakon *i.p.* primene ima u peritonealnoj šupljini značajno manje u odnosu na peritonealnu šupljinu kontrolne grupe, dovoljan da doprinese obnavljanju ćelijskog miljea peritonealne šupljine i povećanju broja rezidentnih makrofaga u danima nakon MDR (178). Veći kapacitet proliferacije makrofaga peritonealne šupljine u AO pacovima u odnosu na makrofage DA pacova, kako nakon *i.p.* primene PBS tako i nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, ukazuje na značajniji doprinos proliferacije rezidentnih makrofaga obnavljanju ćelijskog miljea peritonealne šupljine nakon inflamacije u ovom soju pacova. Nasuprot tome, u DA pacovima je drugog dana nakon *i.p.* primene detektovano značajno povećanje zastupljenosti inflamatornih CD163⁺MHCII^{Hi} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, što potvrđuje da je balans proliferativne ekspanzije rezidentnih makrofaga u odnosu na influx monocita tokom infekcije različit između različitih sojeva laboratorijskih pacova (179). Takođe može se pretpostaviti i da značajnija sposobnost proliferacije rezidentnih makrofaga peritonealne šupljine doprinosi većoj zastupljenosti rezidentnih CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine AO pacova u odnosu na ćelije peritonealne šupljine DA pacove, kako u homeostazi, tako i tokom inflamacije.

S druge strane, veći udeo rezidentnih CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine AO pacova, nasuprot većoj proporciji nerezidentnih makrofaga u homeostazi i tokom inflamacije u DA pacovima, a posebno onih koji eksprimiraju MHCII molekul, ukazuje na sojno-specifično delovanje faktora mikrosredine peritonealne šupljine. Naime, ekspresija CD163 molekula ukazuje na makrofage sa imunomodulatornim i remodelirajućim M2 profilom (180), a ekspresija CD163 molekula se stimuliše delovanjem Th2 i anti-inflamatornih citokina IL-4/IL-13 i IL-10 (181), dok influx HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita i prisustvo nerezidentnih CD163⁺MHCII^{Low} ćelija ukazuje na hemokinske signale (CCL2) u peritonealnoj šupljini koji regrutuju monocite i posreduju u njihovoj diferencijaciji do inflamatornih MHCII⁺ makrofaga. U skladu sa podacima koji pokazuju da se tokom inflamacije smanjuje zastupljenost rezidentnih CD163⁺ makrofaga u pulu MHCII⁺ ćelija peritonealne šupljine (182), rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji ukazuju na to da je udeo CD163⁺ makrofaga peritonealne šupljine u okviru onih koje eksprimiraju MHCII molekule smanjen drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, dok se sedmog dana uspostavlja udeo ovih ćelija sličan onome u kontrolnim pacovima u oba soja.

Produkcija citotoksičnih molekula i citokina makrofaga peritonealne šupljine se razlikovala između sojeva pacova i bila je sojno-specifično modulirana *i.p.* primenom *L. rhamnosus*. Iako je visoka produkcija TNF od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova prethodno asocirana sa njihovom podložnošću indukovanim autoimunskim bolestima (183), u eksperimentima predstavljenim

u ovoj disertaciji makrofagi peritonealne šupljine kontrolnih AO pacova su proizveli više nivoa TNF u odnosu na makrofage peritonealne šupljine DA pacova. Jedno objašnjenje za ovu diskrepancu može da bude da je produkcija proinflamatornog TNF rezultat kompenzacije relativno visoke produkcije profibrotskog i antiinflamatornog TGF- β karakteristične za AO pacove (161). TNF u prisustvu TGF- β može da indukuje diferencijaciju perifernih Foxp3⁺ T regulatornih limfocita, čiji supresivni fenotip usporava formiranje autoimunskih klonova Th1 i Th17 limfocita (184). Makrofagi peritonealne šupljine AO pacova takođe proizvode veće koncentracije H₂O₂ u odnosu na makrofage peritonealne šupljine DA pacova, što kreira oksidativno okruženje u blizini imunološke sinapse, koje je manje povoljno za razvoj autoreaktivnih T ćelija (185), što je još jedan od mehanizama koji može da doprinese relativnoj otpornosti AO pacova prema indukciji autoimunskih bolesti.

Značajno veća sposobnost produkcije IL-10 koja je prethodno pokazana u imunskim ćelijama koje infiltriraju tkivo centralnog nervnog sistema, ćelijama cervikalnih limfnih čvorova, i u ćelijama peritonealne šupljine DA pacova u odnosu na imunske ćelije AO pacova (116,161,162), je faktor koji doprinosi podložnosti DA pacova infekciji sa *Trichinella spiralis*, ali i oporavku od EAE. IL-10 sprečava regrutovanje monocita iz krvi u peritonealnu šupljinu, ali nema efekta na regrutovanje MHCII^{Hi} DC/makrofaga tokom inflamacije (186), što može da objasni diskretan porast u zastupljenosti CD163⁻ MHCII^{Low} monocita i dramatičan rast u zastupljenosti CD163⁺ MHCII^{Hi} inflamatornih makrofaga/DC među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* u DA pacovima. S druge strane, DC osim velike aktivnosti superoksid dismutaze, enzima koji neutrališe superoksidne radikale iz aktiviranih monocita i makrofaga, takođe značajno ekspimiraju i enzim peroksiredoksin koji je uključen u efikasno otklanjanje H₂O₂ (187). Iako su laktobacili među najpotentnijim induktorima ROS i *in vitro* i *in vivo* (188), promene u sastavu ćelija peritonealne šupljine DA pacova drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, odnosno značajan influks ćelija koje su morfološki i fenotipski (MHCII^{Hi}) slične DC, verovatno doprinosi ukupnom smanjenju produkcije H₂O₂ od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova.

Iako je broj ukupnih ćelija peritonealne šupljine, kao i udeo CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* bio sličan kao u peritonealnoj šupljini kontrolnih pacova, ćelije su bile funkcionalno različite u odnosu na one iz kontrolnih pacova. U funkcionalnom smislu su bile slične makrofagima peritonealne šupljine izolovanim drugog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, s obzirom da su zadržale povećanu produkciju NO (DA) i H₂O₂ (AO), ali su makrofagi AO pacova proizveli manje TNF, a makrofagi DA pacova više H₂O₂ u odnosu na makrofage izolovane drugog dana. Makrofagi peritonealne šupljine pacova oba soja izolovani sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus* imali su nižu aktivnost arginaze detektovanu preko koncentracije uree u odnosu na makrofage peritonealne šupljine kontrolnih pacova. Hidroliza L-arginina u ureu i L-ornitin ograničava dostupnost arginina za produkciju antiproliferativnog i citotoksičnog NO, molekula koji sintetiše iNOS tokom inflamacije (189). Povećanje aktivnosti arginaze ćelija domaćina je jedan od mehanizama kojima bakterije i paraziti omogućavaju sopstveno preživljavanje, zaobilazeći ubijanje posredovano dejstvom NO molekula (190). Smanjenje aktivnosti arginaze favorizuje produkciju NO molekula od strane makrofaga peritonealne šupljine DA pacova, što uz povećanje sekrecije H₂O₂ od strane makrofaga peritonealne šupljine AO pacova, ukazuje na favorizovan antibakterijski potencijal ćelija pacova oba soja izolovanih sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*.

Iako sastav peritonealnih ćelija sedam dana nakon *i.p.* primene probiotske bakterije ukazuje na terminaciju inflamatornog odgovora i obnavljanje homeostaze peritonealne šupljine u pacovima oba soja mereno zastupljenošću CD163⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, koji su u peritonealnoj šupljini pacova AO soja bili zastupljeni u većem procentu nego u peritonealnoj šupljini kontrolnih pacova, i zastupljenošću CD163⁺ MHCII^{Low} inflamatornih i CD163⁺ MHCII^{Hi} makrofaga/DC koje su u DA pacovima bile procentualno slične onima u peritonealnoj šupljini kontrolnih pacova, poreklo ovih ćelija, odnosno njihova sposobnost adhezije za omentum, migracije ka limfotoku, ili influksa iz cirkulacije, kao i proliferacije nakon MDR, i stimulacije medijatorima mikrosredine peritonealne šupljine, ih čini bitno različitim u odnosu na ćelije pre inflamacije. U tom smislu se

rezultati koji pokazuju da se efekti konzumacije probiotika mogu replikovati jednim *i.p.* tretmanom (191) moraju interpretirati pažljivo, jer tok događaja nakon *i.p.* primene uključuje promene i u sastavu peritonealnih ćelija i u njihovoj aktivnosti, koje se menjaju vremenom. Pored brojnih podataka koji pokazuju da varijabilnost u efektima suplementacije probioticima može da bude posledica individualnih razlika u kolonizaciji creva nakon tretmana probiotskim bakterijama (192), rezultati izloženi u ovoj disertaciji ukazuju na to da bi varijabilnost u efektima probiotika mogla da bude posledica i genetski determinisanih razlika u aktivnosti ćelija urođene imunosti domaćina (193,194).

U poslednjoj fazi eksperimenta, adherentni makrofagi peritonealne šupljine (195) izolovani iz kontrolnih pacova ili drugog i sedmog dana nakon *i.p.* primene *L. rhamnosus*, stimulisani su *in vitro* umrtvljenim autologim bakterijama fecesa. Ključne komponente ćelijskog zida Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija, LPS i LTA (*engl.* Lipoteichoic Acid), mogu da indukuju oksidativni stres i produkciju NO (196,197), a LPS, ali ne i LTA, stimuliše i aktivnost arginaze (198,199). *In vitro* stimulacija pomoću *E. coli* povećava produkciju NO ali suprimira (u makrofagima AO pacova), ili ne utiče (u makrofagima DA pacova), na hidrolizu arginina u ureu, iako stimulacija pomoću komercijalno dostupnog LPS (*E. coli* O111:B4) uglavnom dovodi do povećanja koncentracija NO i uree. Ovo ukazuje na to da dodatne komponente bakterijskog zida *E. coli* koje su prisutne pored LPS mogu biti uključene u modulaciju aktivnosti makrofaga (200). Takođe, pokazano je i da efekat LPS koji nije vezan za ćeliju može da bude drugačiji od efekta LPS koji je vezan za ćelijski zid bakterije (201). Dok u AO pacovima *i.p.* primena *L. rhamnosus* dovodi do prevencije porasta NO i H₂O₂ indukovanog *in vitro* stimulacijom pomoću *E. coli* i *Enterococcus* spp., u DA pacovima *i.p.* primena *L. rhamnosus* dodatno povećava bakterijama stimulisanu produkciju NO drugog dana, a sedmog dana potencira i povećanje aktivnosti arginaze indukovano stimulacijom pomoću LPS. Prethodno je pokazano da inkubacija epitelnih ćelija sa *L. rhamnosus* smanjuje ekspresiju gena za medijatore koji su uključeni u inflamaciju indukovanu bakterijom *E. coli* (202). Takođe je pokazano da mehanizam modulatornog delovanja probiotika uključuje modulaciju ne samo prijemčivosti ćelija imunskog sistema za određeni patogen, već i puteva transdukcije signala nakon kontakta sa patogenom (203).

U modelima inflamacije i indukcije tumora je pokazano je da su laktobacili potentni imunomodulatori, kako *in vivo* tako i *in vitro* (204). S obzirom na to da razlike u sastavu mikrobiote creva laboratorijskih životinja utiču na razlike u progresiji tumora (205), jasan je značaj genetski determinisanih karakteristika ćelija domaćina za konačan ishod stimulacije probioticima.

Naši rezultati ukazuju na to da *i.p.* primena *L. rhamnosus* ima veći potencijal u AO pacovima da spreči funkcionalne promene koje su indukovane *in vitro* stimulacijom makrofaga peritonealne šupljine umrtvljenim bakterijama fecesa. Budući da su genetski determinisane karakteristike imunskih ćelija odlučujuće za obrasce aktivacije tokom inflamacije indukovane *in vitro* stimulacijom *E. coli* (175), može se pretpostaviti i da je krajnji ishod imunomodulacije bakterijom *L. rhamnosus* rezultat interakcije barem dva događaja koja su definisana sojem životinje. S jedne strane bi bila genetski determinisana aktivnost ćelija domaćina, a s druge strane kaskada događaja koju pokreće susret ćelija peritonealne šupljine sa *L. rhamnosus*.

5.3. Sojne razlike između AO i DA pacova u razvoju kolitisa indukovanog rastvorom TNBS

TNBS je nitroarilna oksidujuća kiselina, koja se već više decenija koristi u modelu indukcije kolitisa eksperimentalnim životinjama. Rastvor TNBS se intrarektalno primenjuje u razblaženom etanolu koji dovodi do povećanja propustljivosti mukozne barijere creva, dok sam TNBS dovodi do haptimizacije proteina poreklom iz tkiva i mikrobiote (49). Jedan od glavnih mehanizama razvoja kolitisa nakon intrarektalne primene TNBS jeste sinteza antitela klase IgG i IgM specifičnih za TNP (*engl.* Trinitrophenyl)-modifikovani protein (206). Korišćenje različitih koncentracija etanola dovodi i do razlika u intenzitetu inflamacije kolona indukovane intrarektalnom primenom TNBS (56), dok je i primena samog 50% rastvora etanola dovoljno da indukuje inflamaciju (46), kao što je pokazano i u eksperimentima u ovoj disertaciji. Za razvoj kolitisa je neophodno prisustvo glavnog induktora Th1 odgovora, IL-12, dok je efektorski Th1 citokin, IFN- γ , manje bitan za razvoj kliničkih znaka (207). Oralni put unošenja TNBS indukuje toleranciju, što u potpunosti onemogućava indukciju kolitisa

intrarektalnom primenom TNBS, što je dokaz uključenosti imunske komponente u razvoj kolitisa u ovom modelu (206).

Iako postoje neke nesuglasice u literaturi oko optimalne doze TNBS koja je neophodna za reproducibilnu indukciju kolitisa (49,208), u ovim eksperimentima su i doza od 10 i doza od 40 mg/kg bile dovoljne da indukuju reproducibilnu akutnu inflamaciju, a i sam 50% rastvor etanola je postigao sličan efekat, što je primećeno i u drugim laboratorijama (46). U preliminarnim eksperimentima je korišćena i doza od 20 mg/kg TNBS, ali se pokazalo da korišćenje ove doze ne daje pouzdane i reproducibilne rezultate, odnosno da su stepen oštećenja kolona i klinička slika u nekim eksperimentima slični onima indukovanim dozom od 10 mg/kg, a u nekim slični onima indukovanim dozom od 40 mg/kg. U skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (56), različite doze TNBS kojima je izvršena indukcija kolitisa nisu dovele do različite stope gubitka telesne mase. Iako različite doze TNBS obično izazivaju različit nivo oštećenja kolona (56), u eksperimentima čiji su rezultati izloženi u ovoj disertaciji dozno zavisne razlike su primećene samo u AO pacovima, u kojima je površina kolona zahvaćena ulceracijom bila značajno veća nakon indukcije kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg u odnosu na indukciju pacove kojima je kolitis indukovao rastvorom etanola ili TNBS 10 mg/kg. U DA pacovima deo kolona zahvaćen ulceracijama je bio slične dužine u svim pacovima kojima je indukovao kolitis, nezavisno od rastvora kojim je izvršena indukcija. Veća osetljivost pacova DA soja na indukciju kolitisa se ogledala u manjoj stopi preživljavanja, gde je u svim eksperimentalnim grupama dolazilo do ugibanja životinja tokom sedam dana nakon indukcije kolitisa. Najniži procenat preživelih pacova je bio u grupi u kojoj je kolitis indukovao TNBS u dozi od 40 mg/kg. Među AO pacovima je samo u grupi gde je indukcija kolitisa izvršena TNBS u dozi od 40 mg/kg procenat preživelih pacova nakon 7 dana od indukcije bio ispod 100%, ali ipak je uočen dosta veći procenat preživelih AO pacova u poređenju sa DA pacovima iste eksperimentalne grupe.

Povećan unos vode tokom razvoja kolitisa, najverovatnije u cilju prevencije dehidratacije, primećen je samo među DA pacovima. Slično povećanje unosa vode u odnosu na kontrolne pacove je primećeno u pacovskom modelu TNBS kolitisa (208). Iako nakon intrarektalne primene TNBS ne dolazi do cistitisa, razvoj kolitisa dovodi do hipersenzitivnosti mokraćne bešike na distenziju kolona, što dovodi do njene hiperaktivnosti i učestalijeg mokrenja (209). S druge strane, u mukozi pacijenata sa Kronovom bolešću je otkriven povećan nivo angiotenzina I i II, što je bilo u korelaciji sa stepenom inflamacije kolona (210), a angiotenzin II je jedan od glavnih induktora žeđi (211). Objašnjenja da li su sojne razlike u količini uzimanja vode tokom razvoja bolesti posledica razlike u inervaciji bešike, odnosno praga osetljivosti prema konvergentnim senzornim signalima, ili posledica razlika u sadržaju neuropeptidnih hormona tokom inflamacije, prevazilaze opseg istraživanja ovog rada.

Na histološkim presecima kolona svih tretiranih grupa pacova oba soja primećeni su klasični znaci transmuralne inflamacije – razorena mukoza (uključujući sloj *muscularis mucosae*), zadebljanje kolona usled intenzivne fibroze, kao i prisutan pojas inflamatornih granulocita u svim fazama aktivacije i raspada (212). U jednom broju uzoraka je ispod sloja longitudinalnih mišića primećeno značajno zadebljanje peritonealne opne oko kolona, koje se podudaralo sa razorenim mukozom. Ovo je najverovatnije mehanizam kompenzacije za narušenu strukturnu barijeru kolona kojim se umanjuje prodor proinflamatornih faktora i produkata komensalnih bakterija iz kolona u peritonealnu šuplinu.

Naši rezultati pokazuju da nije bilo značajnih razlika u koncentraciji proinflamatornih citokina TNF, IL-6, IFN- γ , i IL-17A u kolonu pacova različitih sojeva nakon razvoja kolitisa, što odgovara sličnom stepenu oštećenja kolona AO i DA pacova na makro- i mikroskopskom nivou. S druge strane, indukcija kolitisa rastvorom etanola, kao i TNBS u dozama od 10 i 40 mg/kg u DA pacovima dovodi do povećanja koncentracije IL-6 u tkivu kolona, dok je u AO pacovima značajan porast primećen samo u onim tretiranim TNBS u dozi od 40 mg/kg. Povećana produkcija IL-6 u crevnoj mukozi je marker hronične inflamacije creva i u pacijentima i u životinjskim modelima, gde IL-6 indukuje otpornost na apoptozu CD4⁺ T ćelija čime produžava trajanje inflamacije (66). S druge strane, IL-6 doprinosi diferencijaciji Th17 ćelija (67), a deficijencija IL-6 dovodi do razvoja kolitisa usled povećane ekspresije CCL2/CCR2 i posledičnog privlačenja proinflamatornih monocita i neutrofila (213). Iznenađujuće je odsustvo značajnijeg porasta IL-17 u tkivu kolona oba soja pacova. Međutim, odnos koncentracija IL-

17A i IFN- γ je bio drastičnije veći u DA pacovima u odnosu na AO pacove, što ukazuje na to da je balans Th1/Th17 pomeren više ka Th17 odgovoru u DA pacovima. Budući da IFN- γ uglavnom ima zaštitnu ulogu koja je protivteža inflamaciji izazvanoj dejstvom IL-17A (77), preferencijalna ekspresija Th17 fenotipa u kolonu DA pacova u odnosu na AO pacove može da bude u osnovi njihove veće podložnosti posledicama inflamacije. S druge strane, postoje dokazi da IFN- γ ne igra značajniju ulogu u razvoju kolitisa nakon indukcije TNBS u miševima (207), stoga odsustvo značajnih razlika među tretiranim grupama nije iznenađujuće.

Pacovi AO soja u kojima je kolitis indukovao TNBS u dozi od 40 mg/kg imali su više nivoe antitela u serumu specifičnih za *E. coli* klase IgA, IgG1, IgG2a, i IgG2b u odnosu na pacove kontrolne grupe. U DA pacovima je tokom razvoja kolitisa nivo antitela u serumu specifičnih za *E. coli* klase IgA ostao nepromenjen bez obzira na dozu TNBS kojim je izvršena indukcija kolitisa, dok je su nivoi antitela u serumu specifičnih za *E. coli* klase IgG1 i IgG2a bili viši u pacovima tretiranim TNBS u dozi od 40 mg/kg, a nivoi antitela u serumu specifičnih za *E. coli* klase IgG2a i IgG2b antitela viši u pacovima tretiranim TNBS u dozi od 10 mg/kg, u odnosu na kontrolne pacove. Pacijenti sa aktivnom Kronovom bolešću imaju u fecesu veću količinu solubilnih antitela klase IgG i IgA specifičnih za komensalne bakterije, a nivo ovih antitela korelira sa stepenom aktivnosti bolesti (214). Pokazano je i da je u serumu pacijenata sa Kronovom bolešću veća koncentracija antitela specifičnih za *E. coli* klase IgG u odnosu na serume zdravih donora (215). U serumima AO pacova tretiranim TNBS u dozi od 40 mg/kg su prisutni neznajčajno viši nivoi antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA i IgG1, a dvofaktorskom analizom otkrivena značajna interakcija soja pacova i tretmana tj. doze TNBS kojom je izvršena indukcija kolitisa ukazuje na to da razlike u imunološkom statusu koje proizilaze iz razlika između sojeva pacova utiču na razlike u nivoima antitela specifičnih za *E. coli* IgA i IgG1 klase u serumu sedmog dana nakon indukcije. Viši nivo antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA u serumu AO pacova u odnosu na serume DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa je u skladu sa prethodnim eksperimentima imunizacije sa *E. coli* (119), što znači da indukcija kolitisa TNBS dovodi do aktivacije specifičnog/humoralnog imunskog odgovora, što rezultuje povećanjem nivoa specifičnih antitela.

Značaj antitela za razvoj i ozbiljnost kolitisa nije u potpunosti jasan. Antitela klase IgA su specifična za mukozni imunski sistem, gde se antitela ove klase sekretuju u lumen creva i učestvuju u kontroli prodora komensalnih i patogenih mikroorganizama (216). Diferencijaciju plazma ćelija koje proizvode IgA pokreće stimulacija pomoću TGF- β , koji je visoko ekspresiran u mukoznim tkivima creva gde je glavni regulator lokalnih imunskih odgovora (217), sa kofaktorima poput retinoične kiseline (218).

Komensalna mikrobiota može da utiče na koncentracije ukupnih antitela klase IgA u serumu, kao i brojnost plazma ćelija u kostnoj srži, koje proizvode IgA, a viša koncentracija antitela IgA klase u serumu, indukovanih komensalnom mikrobiotom igra ulogu u zaštiti od sepse u miševima (219). Naime, antitela specifična za *E. coli* klase IgA opsonizuju i aglutiniraju bakterije u lumenu creva, dok mehanizam efektorskih funkcija antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA u serumu nije u potpunosti jasan. Porast produkcije antitela specifičnih za *E. coli* klase IgA tokom razvoja kolitisa može da bude mehanizam koji doprinosi boljem preživljavanju inflamacije u AO pacovima u odnosu na DA pacove u modelu kolitisa predstavljenom u ovoj disertaciji. Promena klase antitela u IgG1 je posredovana stimulacijom pomoću IL-4, i neophodan je transkripcioni faktor STAT6, što ukazuje na pripadnost ove klase antitela klasičnom Th2 odgovoru (220). U miševima i pacovima, jak odgovor produkcije antitela klase IgG1 se indukuje parazitskim antigenima, dok IL-12 smanjuje nivo antitela klase IgG1 u serumu posredstvom IFN- γ , koji je klasičan citokin Th1 odgovora (221,222). Prisustvo nešto većeg nivoa antitela specifičnih za *E. coli* klase IgG1 u serumu AO pacova u odnosu na DA pacove sedmog dana nakon indukcije kolitisa, iako bez statističke značajnosti, može u izvesnoj meri da doprinese boljem preživljavanju životinja, budući da su antitela klase IgG1 potentan opsonin za bakterije, i da olakšavaju njihovu fagocitozu od strane makrofaga, smanjujući broj živih bakterija *Salmonella Typhimurium* u jetri i slezini nakon *i.p.* infekcije (223). Komparabilni nivoi antitela specifičnih za *E. coli* potklase IgG2a i IgG2b u serumu AO i DA pacova sedmog dana nakon indukcije kolitisa ukazuju na to da je aktivnost plazma ćelija koje sekretuju specifična antitela klase IgG2 uporediva između sojeva pacova tokom razvoja kolitisa. Budući da su antitela klase IgA i IgG specifična za komensalne bakterije poreklom iz

odvojenih populacija nezrelih plazma ćelija (plazmablasta) iz lamine proprije, (224), moguće je da genetski determinisane razlike AO i DA pacova uslovljavaju sličnu reaktivnost plazmablasta koji ekspimiraju IgG, a različitu reaktivnost plazmablasta koji ekspimiraju IgA specifičan za *E. coli*, što rezultuje različitim nivoima specifičnih antitela u serumu kojima bi mogla da se objasni sojna razlika u preživljavanju nakon razvoja kolitisa.

Peritonitis predstavlja relativno retku posledicu tokom razvoja Kronove bolesti usled transmuralne inflamacije (225,226). Međutim, komplikovaniji slučajevi inflamatornih bolesti creva u pacijenata mogu da dovedu do razvoja peritonitisa, sa posledičnim smrtnim ishodom (227). Peritonitis prevashodno započinje kao reakcija na "curenje" sadržaja crevnog lumena kroz perforacije nastale usled mehaničkih povreda zida creva, opstruktivne ili neopstruktivne dilatacije creva, i karakteriše ga zadebljanje peritoneuma, povećanje zapremine peritonealne tečnosti, i influks inflamatornih ćelija, najviše neutrofila i monocita. S obzirom da se u eksperimentalnom modelu kolitisa koristi rastvor etanola koji dovodi do dramatičnog povećanja propustljivosti epitela, kao i da je u pacovima oba soja nakon primene rastvora TNBS u etanolu primećeno masivno oštećenje epitela i nekroza creva, uz podatke iz poslednjeg segmenta istraživanja ove disertacije (ispitivanje modulatornih svojstava rane postnatalne primene bakterije *L. rhamnosus* na razvoj kolitisa) koji pokazuju diseminaciju bakterija creva do mezenteričnih limfnih čvorova i slezine tokom razvoja kolitisa u DA pacovima, jasno je da prilikom razvoja kolitisa u pacovima dolazi do prodora bakterija creva u peritonealnu šupljinu, a time i kontakta sa rezidentnim imunskim ćelijama i posledičnog razvoja peritonitisa.

Međutim, dok je prinos ukupnih ćelija peritonealne šupljine bio povećan u DA pacovima sedmog dana nakon indukcije kolitisa TNBS u dozi od 10 ili 40 mg/kg, u AO pacovima je prinos ovih ćelija bio povećan isključivo nakon indukcije rastvorom etanola. Rezultati ukazuju na to da je u AO pacovima rastvor etanola, indukujući povećanje propustljivosti epitela creva i značajan prodor inflamatornih medijatora, doprineo influksu ćelija koji nije dodatno pogoršan sa TNBS, dok je u DA pacovima TNBS bio neophodan faktor za povećan influks ćelija u odgovoru na prodor bakterija i inflamatornih medijatora u peritonealnu šupljinu.

Iako nije bilo značajnih razlika u udelu rezidentnih CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine između kontrolnih pacova i pacova u kojima je indukovano kolitis, gustina ekspresije CD11b je u populaciji CD11b⁺ makrofaga bila niža u svim tretiranim AO pacovima i u DA pacovima u kojima je kolitis indukovano TNBS u dozi od 40 mg/kg. Kako je ekspresija CD11b molekula viša na rezidentnim velikim makrofagama peritonealne šupljine (LPM) (CD11b^{Hi}) u odnosu na CD11b^{Int} malim makrofagama peritonealne šupljine (SPM) i monocite (26), prisustvo ćelija sa nižom ekspresijom CD11b ukazuje na gubitak LPM iz peritonealne šupljine, što je standardna reakcija tokom razvoja peritonealne inflamacije (129). U modelu abdominalne sepse je pokazano da prethodno dominantne rezidentne LPM nestaju iz peritonealne šupljine u veoma kratkom roku, i da tokom naredne dve nedelje monociti iz cirkulacije postaju dominantne ćelije (228). Takođe je pokazana ključna uloga LPM i specifičnih tranzicionih pre-monocita za preživljavanje abdominalne sepse (228). U peritonealnoj šupljini kontrolnih AO i DA pacova je detektovan nizak udeo CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita, koji u miševima obnavljaju retku SPM populaciju u homeostazi (26), dok je sedmog dana nakon indukcije kolitisa u peritonealnoj šupljini AO pacova prisustvo CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita povećano nezavisno od načina indukcije, a u DA pacovima soja samo nakon indukcije rastvorom etanola ili TNBS u dozi od 10 mg/kg. Imajući u vidu značaj LPM i tranzicionih monocita za preživljavanje sepse, smanjenje zastupljenosti CD163⁺ makrofaga i CD11b^{Int}HIS48^{Hi} monocita u peritonealnoj šupljini DA pacova u kojima je kolitis indukovano TNBS u dozi od 10 mg/kg može da doprinese izostanku zaštite od efekata septične inflamacije u peritonealnoj šupljini i većoj stopi smrtnosti pacova ove grupe (228).

Dok je u uslovima bez inflamacije udeo CD163⁺MHCII⁺ makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine bio veći u AO pacovima u odnosu na DA pacove, sedmog dana nakon indukcije kolitisa je primećeno smanjenje zastupljenosti ovih makrofaga u peritonealnoj šupljini pacova oba soja. Budući da je CD163 receptor za kompleks hemoglobin-haptoglobin, i marker zrelih makrofaga (139) veća zastupljenost CD163⁺ makrofaga u zdravim AO pacovima može da znači veću otpornost na

unutrašnje krvarenje i favorizovanje anti-inflamatorne aktivnosti makrofaga polarizovanih ka M2 fenotipu i reparaciju tkiva visceralnih organa (9), kao i veći potencijal odgovora na bakterijske infekcije u peritonealnoj šupljini ovog soja pacova (229).

Indukcija kolitisa je imala suprotan efekat na udeo CD163⁺MHCII^{hi} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine AO i DA pacova, s obzirom da se procenat ovih makrofaga u AO pacovima povećavao a u DA pacovima smanjivao tokom razvoja kolitisa. MHC molekuli II klase su površinski markeri svih profesionalnih APC, a njihova ekspresija se može indukovati dejstvom IFN- γ na endotelnim ćelijama i fibroblastima (230). Primarna uloga MHC molekula II klase je prezentacija egzogenih antigena T limfocitima, što je jedan od inicijalnih koraka i inflamatornog odgovora, ali i imunske tolerancije (231,232). Ključni faktor ekspresije MHC molekula II klase na makrofagima je regulatorni protein nuklearni faktor aktiviranih T ćelija 5 (NFAT5), koji isključivo na makrofagama indukuje ekspresiju MHC molekula II klase na površini membrane (233). NFAT5 stimuliše transkripciju gena koji kodiraju proinflamatorne citokine u M1 i M2 polarizovanim makrofagama (234). S druge strane, MHCII⁺ makrofagi peritonealne šupljine miševa predstavljaju populaciju makrofaga čija je diferencijacija zavisna od transkripcionog faktora IRF4 (*engl.* Interferon Regulatory Factor) i prisustva mikrobiote creva, a ovi makrofagi se konstantno obnavljaju iz pula monocita iz krvi (235), slično makrofagama creva (30). Kako MHCII^{hi} makrofagi vrše imunski nadzor peritonealne šupljine nad antigenima mikroorganizama i imaju pojačan kapacitet fagocitoze bakterija (27), smanjeno prisustvo MHCII^{hi} makrofaga u peritonealnoj šupljini DA pacova može da bude u vezi sa njihovom povećanom stopom mortaliteta tokom razvoja kolitisa. Imunski nadzor slabijeg intenziteta u DA pacovima je mogao da doprinese lakšem širenju i produžetku trajanja infekcije bakterijama lumena creva.

Makrofagi AO pacova kojima je kolitis indukovao TNBS u dozi od 40 mg/kg imaju višu nestimulisanu aktivnost arginaze, što uz nepromenjenu produkciju NO možda ukazuje na preferenciju polarizacije makrofaga ovog soja pacova ka M2 antiinflamatornom fenotipu koji vrši funkcije koje doprinose oporavku tkiva i zaštiti od prekomernih oštećenja izazvanih inflamacijom (9).

Peroksidazna aktivnost makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih AO i DA pacova je bila visoka i uporediva između sojeva pacova, ali je nakon indukcije kolitisa opala sličnim intenzitetom u makrofagama svih eksperimentalnih grupa AO pacova, dok je u DA pacovima bila smanjena samo nakon indukcije kolitisa TNBS u dozama od 10 ili 40 mg/kg . S obzirom da rezidentne ćelije peritonealne šupljine poseduju snažniju peroksidaznu aktivnost od nerezidentnih monocita koje ulaze u peritonealnu šupljinu tokom inflamacije (236), kolitisom indukovano smanjenje peroksidazne aktivnosti ukazuje na nestanak rezidentnih ćelija. Prva faza akutne inflamacije pluća se takođe odlikuje prisustvom makrofaga sa smanjenom peroksidaznom aktivnošću (236,237). Smanjenje peroksidazne aktivnosti peritonealnih ćelija nakon indukcije kolitisa može da bude znak njihove narušene sposobnosti da enzimski razlažu H₂O₂ nastao u inflamaciji u peritoneumu tokom razvoja kolitisa, ali i njihove funkcionalne istrošenosti (238).

Dok u AO pacovima indukcija kolitisa rastvorom etanola ili TNBS dovodi do porasta produkcije TNF, IL-6, i IL-10 od strane makrofaga peritonealne šupljine stimulisanih pomou LPS, porast produkcije ovih citokina je u makrofagama DA pacova stimulisanim LPS-om detektovan samo nakon indukcije kolitisa TNBS u dozama od 10 ili 40 mg/kg .

Stimulacija makrofaga peritonealne šupljine kontrolnih AO i DA pacova pomoću LPS ili umrtvljenih bakterija fecesa dovodi do produkcije sličnih koncentracija TNF. Nezavisno od intrarektalnog tretmana (etanol ili TNBS), makrofagi AO pacova su nakon indukcije kolitisa reagovali na stimulaciju pomoću LPS ili *E. coli*, dok je u makrofagama DA pacova odgovor na stimulaciju pomoću *Enterococcus* spp. bio značajno veći nego odgovor na stimulaciju pomoću LPS ili *E. coli*. Izolat bakterija soja *Enterococcus* spp. iz fecesa u makrofagama DA pacova indukuje intenzivniju produkciju TNF nego izolat *E. coli*, moguće putem TLR2-zavisne aktivacije transkripcionih faktora iz familije nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B) (239). Za razliku od Gram negativnih bakterija, Gram pozitivne bakterije u strukturi ćelijskog zida poseduju LTA koja je predominantni ligand TLR2 i TLR6 receptora (240,241). Drugi put aktivacije je

preko enterokoknog površinskog proteina, koji je prisutan na više sojeva *Enterococcus* spp. i koji takođe aktivira NF- κ B (242).

Stimulacija *in vitro* pomoću umravljenih bakterija *E. coli* indukuje jaču produkciju IL-6, iako ne uvek statistički značajno, u odnosu na stimulaciju pomoću *Enterococcus* spp, bez obzira na soj pacova. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno utvrđenim dominantnim efektom TLR4-aktivacije u odnosu na TLR2-aktivaciju u ekspresiji IL-6 (243). Delimično objašnjenje ovog odnosa sekretornog potencijala dve bakterije za IL-6 možda leži u činjenici da TLR2 agonisti kao što je i LTA na površini bakterije *Enterococcus* spp. indukuju aktivnost iNOS nedovoljnim intenzitetom, dok je prethodno pokazano da sekretovani NO utiče na povećanu ekspresiju IL-6 (244).

Makrofagi DA pacova proizvode veće količine IL-6 u poređenju sa makrofagima AO pacova u odgovoru na stimulaciju LPS-om ili umravljenim bakterijama fecesa, osim u grupi pacova tretiranih TNBS u dozi od 40 mg/kg u kojima je produkcija IL-6 između makrofaga pacova oba soja slična. Pored toga, produkcija TNF je uporediva među makrofagima AO i DA soja u svim eksperimentalnim grupama. Postoje indicije da povećana produkcija IL-6 u odnosu na TNF dovodi do inflamatornog odgovora jačeg intenziteta na bakterijsku infekciju (245). Takođe, IL-6 je ključni faktor u polarizaciji Th17 odgovora, koji je uključen u patogenezu i teže oblike zapaljenskih bolesti creva i modela kolitisa (67–69). Budući da makrofagi peritonealne šupljine imaju potencijal da pređu u kolon nakon oštećenja (9), oni mogu da doprinesu pomeranju odnosa IL-17A/IFN- γ ka IL-17A među T ćelijama u lamini propriji. Odgovor makrofaga peritonealne šupljine može da bude i odraz sistemske tendencije makrofaga DA pacova ka intenzivnijoj sintezi IL-6 u odnosu na makrofage AO pacova, što utiče na ekspanziju Th17 T ćelija koje u kolitisu doprinose razvoju težih kliničkih znakova u infekcijama indukovanim bakterijama creva (246).

Produkcija IL-10 u makrofagima peritonealne šupljine je bila zanemarljivo niska u kontrolnim pacovima oba soja, nezavisno od *in vitro* stimulacije LPS-om i umravljenim bakterijama fecesa. Iako je indukcija kolitisa dovela do porasta produkcije IL-10 u makrofagima AO pacova, nije bilo razlike u kapacitetu LPS i umravljenih bakterija fecesa da stimulišu produkciju IL-10. Viši nivo produkcije anti-inflamatornog IL-10 makrofaga AO pacova u odnosu na makrofage DA pacova nakon stimulacije LPS-om ili *E. coli* može da doprinese većoj stopi preživljavanja AO pacova tokom razvoja kolitisa, budući da tretman pomoću IL-10 utiče na smanjenje stope mortaliteta miševa sa teškim oblikom peritonitisa (247). U AO pacovima indukcija kolitisa je dovela do povećanja udela MHCII⁺ ćelija među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine, koje su fenotipski slične rezidentnoj populaciji makrofaga nastalih od monocita u lamini propriji creva. Ove ćelije ekspimiraju MHC molekule II klase na plazma membrani, sekretuju IL-10, i učestvuju u održanju integriteta epitelne barijere (30).

Neočekivan nalaz je bio nepromenjen prinos ukupnih ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova nakon indukcije kolitisa u pacovima oba soja. Inflamacija u drenirajućim limfnim čvorovima indukuje nagomilavanje intersticijalne tečnosti sa imunskim ćelijama, što se odražava većom zapreminom i masom limfnih čvorova. Činjenica da se to nije videlo u eksperimentima predstavljenim u ovoj disertaciji može da znači da se povećanje celularnosti u mezenteričnim limfnim čvorovima javlja tek u hroničnoj fazi bolesti. Iako celularnost i masa mezenteričnih limfnih čvorova nisu promenjene nakon indukcije kolitisa, primećene su sojno-specifične razlike u ćelijskom sastavu unutar mezenteričnih limfnih čvorova. Naime, indukcija kolitisa, i to TNBS u dozi od 40 mg/kg, je samo u mezenteričnim limfnim čvorovima DA pacova dovela do smanjenja zastupljenosti CD4⁺ T limfocita, dok su smanjenje zastupljenosti CD8⁺ T limfocita i povećanje zastupljenosti CD45RA⁺ limfocita bili izraženiji u mezenteričnim limfnim čvorovima AO pacova. S druge strane, indukcija kolitisa je dovela do smanjenja produkcije IFN- γ samo u limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova DA pacova stimulisanim pomoću ConA, i povećanje produkcije IL-17A samo u limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova AO pacova. Poznato je da su mezenterični limfni čvorovi izvor CD4⁺ T limfocita Th17 fenotipa lokalizovanih u lamini propriji creva, kao i da te ćelije značajno doprinose razvoju inflamacije creva (248,249). Kako se tokom kolitisa povećava ekspresija hemokina CCL20 u kolonu, što utiče na privlačenje CCR6⁺ limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova (250), veći stepen odlaska CD4⁺ T limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova DA pacova u kolon u odnosu na AO pacove verovatno

objašnjava niži nivo IL-17A u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova pacova ovog soja. S druge strane, ovaj nalaz sugerise i da je ukupni nivo IL-17 i IFN- γ u kolonu DA pacova, barem nakon indukcije kolitisa TNBS u dozi od 40 mg/kg, posledica i lokalne produkcije u kolonu, i influksa CD4⁺ T limfocita.

Iz rezultata ovog dela istraživanja, jasni zaključci su da nakon indukcije kolitisa AO pacovi imaju višu stopu preživljavanja u poređenju sa DA pacovima, imaju više koncentracije antitela klase IgA i IgG1 u serumu specifičnih za *E. coli*, dok u peritonealnoj šupljini imaju veći broj CD163⁺MHCII⁻ i CD163⁻MHCII⁺ makrofaga. S druge strane, makrofagi DA pacova značajno više proizvode IL-6 u odgovoru na stimulaciju LPS-om ili umrtvljenim bakterijama fecesa, što može voditi ka njihovoj narušenoj funkciji u terminaciji procesa inflamacije usled preživljavanja aktiviranih T limfocita podstaknutog aktivnošću transkripcionog faktora STAT3 (*engl.* Signal Transducer and Activator of Transcription 3).

5.4. Rana postnatalna oralna primena probiotske bakterije *L. rhamnosus* selektivno modulira razvoj TNBS kolitisa u DA pacovima

Rezultati eksperimenta indukcije kolitisa su jasno pokazali da se teži klinički znaci razvijaju u DA pacovima, stoga smo odabrali ovaj soj pacova za finalni eksperiment ispitivanja modulacije kolitisa oralnom primenom probiotskih bakterija. Kako bi se ispitaio uticaj probiotske bakterije *L. rhamnosus* na promene u fenotipu i aktivnosti peritonealnih makrofaga tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano indirektnim delovanjem bakterija mikrobiote creva, DA pacovi su tokom prvih mesec dana života oralno tretirani ovom probiotskom bakterijom, a kolitis je indukovano u odrasloj dobi TNBS u dozi od 40 mg/kg. Ćelije peritonealne šupljine su izolovane sedmog dana nakon indukcije kolitisa. Praćeni su i parametri razvoja kolitisa, funkcionalne karakteristike tkiva kolona i mezenteričnih limfnih čvorova, raznovrsnost bakterija mikrobiote creva, kao i nivoi antitela specifičnih za anti-*E. coli* u serumu.

Rezultati pokazuju da rani postnatalni tretman *L. rhamnosus* ublažava kliničke vidljive tokom sedam dana nakon indukcije kolitisa. U poređenju sa netretiranim jedinkama, u onima tretiranim probiotskom bakterijom bili su manja površina mukoze kolona zahvaćena ulceracijom, manji stepen razaranja kripti kolona, i manji stepen infiltracije ćelija u kolonu. S druge strane, koncentracija antitela u serumu svih klasa specifičnih za *E. coli* je bila slična, nezavisno od tretmana probiotskom bakterijom, ukazujući na to da oralni tretman probiotskom bakterijom nije uticao na intenzitet humoralnog odgovora na komensalnu *E. coli* koja prođe mukoznu barijeru tokom razvoja kolitisa.

Gubitak integriteta epitela tokom razvoja kolitisa uzrokuje prelazak bakterija iz lumena creva, produžava inflamaciju i održava imunski odgovor (251). Tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* nije sprečio diseminaciju komensalnih bakterija creva indukovanoj inflamacijom. Slično tome, tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* GG (LGG) je u individuuama sa zapaljenskim bolestima creva poboljšao integritet strukturne barijere gastrointestinalnog trakta (104,252), ali nije sprečio translokaciju bakterija u modelu eksperimentalne ciroze (253). Takođe, preventivni tretman probiotskom bakterijom *Bifidobacterium infantis* nije modifikovao propustljivost membrane u modelu nekrotizirajućeg enterokolitisa u neonatalnim pacovima, ali je doveo do značajnog smanjenja stope mortaliteta, broja lezija u kolonu, i nivoa endotoksina u plazmi (254). Ovi nalazi sugerisu da, iako je translokacija bakterija iz lumena creva faktor koji doprinosi indukciji i/ili razvoju kolitisa, mehanizam blagotvornog delovanja probiotika na razvoj ili kliničke bolesti ne mora nužno da uključuje uticaj na translokaciju bakterija.

Postnatalni tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* je doveo do smanjenja nivoa TNF, u kolonu pacova nakon indukcije kolitisa, verovatno smanjenjem influksa neutrofila i makrofaga tokom razvoja kolitisa. Iako druge ćelije, kao što su crevne epitelne ćelije ili CD4⁺ T limfociti, mogu da proizvode citokine, akumulacija neutrofila i aktivnost MPO koreliraju sa oštećenjima mukoze u kolitisu (255,256). CD68⁺ makrofagi infiltriraju crevnu mukozu tokom razvoja zapaljenskih bolesti creva i difuzno se šire kroz zadebljalu mukozu i submukozu (257), a njihova deplecija korelira sa supresijom razvoja hroničnog kolitisa (258). Makrofagi ekspimiraju NF- κ B (259) i sekretuju proinflamatorne citokine TNF, IL-6, IL-8, IL-24, IL-1 β , ali i anti-inflamatorne citokine IL-10 i TGF- β (260–262). Značaj proinflamatornih citokina za razvoj i održanje zapaljenskih bolesti creva je pokazano podacima da

tretman rekombinantnim inhibitorom IL-18 dovodi do ublažavanja simptoma kolitisa indukovano rastvorom TNBS u miševima smanjenjem nivoa TNF i IL-6 u kolonu (263). Iako tretman *L. rhamnosus* smanjuje nivo TNF u kolonu, čija je neutralizacija efikasan tretman zapaljenskih bolesti creva (40), ipak nije uticao na koncentracije IFN- γ i IL-17A u kolonu. Pokazano je i da *L. rhamnosus* ispoljava proinflamatorna svojstva, s obzirom na to da je njegova oralna primena dovela do povećanja sposobnosti fagocitoze makrofaga (264) a imunizacija koja uključuje *L. rhamnosus* kao adjuvans povećava produkciju IFN- γ i smanjuje oslobađanje IL-4 iz ćelija limfnih čvorova (265). Imajući u vidu moguće imunopotencirajuće efekte primene probiotske bakterije *L. rhamnosus*, nalaz da njegova primena u ranom postnatalnom periodu nije dovela do pogoršanja razvoja kolitisa indukovano u adultnom dobu ukazuje da oralna primena *L. rhamnosus* tokom prvih 30 dana života dovodi do razvoja balansirano inflamatornog odgovora u adultnom dobu.

Naši rezultati pokazuju da je ključno primeniti probiotsku bakteriju *L. rhamnosus* tokom ranog postnatalnog perioda kako bi se omogućila njegova modulatorna aktivnost u razvoju kolitisa u odraslima. Poslednji mesec gestacije i prvih par meseci života su ključni za razvoj imunskog sistema (266,267). Pošto relativno niska raznovrsnost mikrobiote postaje progresivno bogatija u periodu odvikavanja od sisanja, najverovatnije konstantnim izlaganjem mikroorganizmima spoljašnje sredine (268), pozitivna uloga probiotika na imunski sistem u razvoju je najizraženija tokom prelaznog perioda sa sisanja na čvrstu hranu (269). U eksperimentima predstavljenim u ovoj disertaciji, rani postnatalni oralni tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* je ubrzao povećanje raznovrsnosti mikrobiote, naročito vrste roda *Bifidobacterium*, i poboljšao razvoj creva tokom ranog života.

Kolonizacija LGG u crevima podstiče razvoj metaboličkih uslova koji favorizuju razvoj bakterija roda *Bifidobacterium* (270). Deca majki koje su u sopstvenoj ishrani koristile LGG imaju kompleksiji sastav i veću raznovrsnost bakterija roda *Bifidobacterium*, dok u majkama ne dolazi do povećanja njihove raznovrsnosti što ukazuje na potpuno razvijenu populaciju komensalnih bifidobakterija odraslih (270). Uzevši u obzir da umanjeno prisustvo bifidobakterija može da se koristi kao biomarker crevne disbioze koja pokreće razvoj ulcerativnog kolitisa u ljudima, i da oralna primena *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 ublažava kolitis indukovano rastvorom TNBS u miševima (271), moguće je pretpostaviti da rani postnatalni tretman sa *L. rhamnosus* povećanjem diverziteta bakterija roda *Bifidobacteria* mladih pacova ima dugotrajni blagotvorni efekat na razvoj gastrointestinalnog trakta, i posledično na razvoj kolitisa u odraslima. Rana kolonizacija laktobacilima dovodi do povećanja dužine crevnih resica (106), što povećava i njihovu sposobnost apsorpcije nutrijenata (272) i time doprinosi opštem zdravlju i većoj otpornosti ka indukciji inflamacije u odraslom dobu. Rana kolonizacija LGG povećava bogatstvo i raznovrsnost mikrobiote kolona i promovise proliferaciju epitela, diferencijaciju i produkciju mukoznih antitela klase IgA u odraslima (106). Suplementacija probioticima u ranom postnatalnom dobu osigurava da regulatorni T ćelijski odgovor creva (273) i balansirani odgovor na stimulaciju LPS-om u mononuklearima periferne krvi (274) budu održani. Povećana raznovrsnost bakterija roda *Bifidobacterium* neposredno nakon okončanja ranog postnatalnog tretmana probiotikom može da doprinese ranom razvoju mukoznog imunskog odgovora i ograničavanju rasta mikroorganizama u crevima, s obzirom na to da je pokazano direktno dejstvo bifidobakterija na smanjenje vijabilnosti Gram-negativnih bakterija (99), kao i smanjenje aktivacije CD40 i ekspresije IL-17 i IL-23 u odgovoru na LPS (275).

Pokazano je da čak i prolazna promena u sastavu mikrobiote u ranom životnom dobu miševa, uključujući smanjeno prisustvo bakterija *Lactobacillus* spp, utiče na ispoljavanje gena koji kodiraju proinflamatorne citokine u ileumu i ima dugotrajne metaboličke efekte (276). Manipulacija sastavom rezidentne mikrobiote u AO pacovima tokom prve četiri nedelje života može da naruši i otpornost ovih pacova na indukciju EAE (113), što govori u prilog značaju sastava, raznovrsnosti, i aktivnosti mikrobiote creva tokom ranog razvoja za imunološke promene koje se prate u odraslom dobu.

Prinos ukupnih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova, i udeo CD4⁺ i CD4⁺CD25⁺ T limfocita među ukupnim limfocitima kao i produkcija IFN- γ i IL-10 od strane ćelija mezenteričnih limfnih čvorova pacova kojima je indukovano kolitis nisu bili promenjeni prethodnim tretmanom *L. rhamnosus*. S druge strane, sposobnost produkcije proinflamatornog citokina IL-17A, kao jednog od faktora patogeneze

zapaljenja creva, bila je značajno smanjena u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova tretiranih u odnosu na netretirane pacove.

Prethodno je pokazano da oralni tretman probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* JB-1 dovodi do povećanja zastupljenosti regulatornih CD4⁺CD25⁺ T limfocita među ukupnim ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova i smanjenja produkcije TNF i IFN- γ od strane ovih ćelija, bez promene u produkciji IL-10 (277). Međutim, mehanizmi koji učestvuju u ekspresiji regulatornih T limfocita indukovanoj probiotskim bakterijama uključuju povećanje ekspresije hem oksigenaze u DC limfnih čvorova, dok ovaj enzim ne učestvuje u smanjenju produkcije citokina indukovanom probiotskim bakterijama, što ukazuje na to da je delovanje probiotske bakterije na zastupljenost regulatornih T limfocita i njihovu produkciju citokina nezavisno regulisano (277). S obzirom na to da sposobnost probiotskih bakterija da indukuju Foxp3⁺ T-regulatorni fenotip zavisi od soja probiotske bakterije (278), činjenica da tretman *L. rhamnosus* u našim eksperimentima dovodi do smanjenja sekrecije IL-17A u limfocitima mezenteričnih limfnih čvorova stimulisanim pomoću ConA bez promena u njihovom fenotipskom profilu ukazuje na specifične dugotrajne funkcionalne promene limfocita mezenteričnih limfnih čvorova izazvane oralnom primenom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom uzrastu.

Rezidentne ćelije peritonealne šupljine konstantno prepoznaju produkte mikrobiote creva, i u homeostazi i tokom inflamacije (279). Nakon indukcije kolitisa broj ukupnih ćelija dobijen peritonealnom lavažom je značajno povećan, međutim, to povećanje je manje izraženo u pacovima koji su tretirani oralno probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu. Pored manjeg porasta ukupnog broja ćelija peritonealne šupljine, efekat ranog tretmana *L. rhamnosus* je bio i manji procenat HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita koji infiltriraju peritonealnu šupljinu tokom sedam dana nakon indukcije kolitisa. Kako je udeo monocita manji, u peritonealnoj šupljini ovih pacova je veći udeo ukupnih makrofaga CD68⁺TLR4⁺, kao i CD11b^{Hi}CD4^{Hi} (ekvivalentne LPM ćelijama miša) i CD163⁺MHCII⁻ makrofaga. Udeo CD163⁺MHCII⁺ (ekvivalentne SPM ćelijama miša) je ostao nepromenjen. Kako rani tretman probiotikom nije doveo do promena u sastavu i brojnosti ćelija u homeostazi, jasno je da je inflamacija kolona suprimirana ranim tretmanom probiotikom dovela i do manje izražene inflamatorne reakcije u peritonealnoj šupljini u odnosu na onu primećenu tokom razvoja kolitisa u netretiranim pacovima.

Analiza funkcija makrofaga peritonealne šupljine u odgovoru na stimulaciju pomoću *E. coli* je pokazala da je u pacovima koji su tretirani probiotskom bakterijom *L. rhamnosus* u ranom postnatalnom periodu povećanje produkcije NO bilo značajno manje u odnosu na makrofage pacova koje nisu tretirane, što sugerise njihovu slabiju baktericidnu aktivnost. S druge strane, ovi makrofagi su proizveli značajno više količine TNF a manje količine IL-10, što ukazuje na inflamatornu polarizaciju ćelija pacova tretiranih probiotskom bakterijom. Ovi nalazi su bili iznenađujući, imajući u vidu da je prethodno opisano da i molekuli koji se ponašaju kao donori NO, i zastupljenost anti-inflamatornih makrofaga polarisanih ka M2 fenotipu u peritonealnoj šupljini, doprinose ublažavanju težine kliničke slike kolitisa u miševima (280,281). Takođe, veća zastupljenost makrofaga u odnosu na monocite u pacovima tretiranim probiotskom bakterijom upućuje na pretpostavku da bi promena u ukupnoj zastupljenosti ćelija peritonealne šupljine u pogledu sekrecije citokina trebalo da bude pomerena ka manje inflamatornom fenotipu (27,28). Međutim, u rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji određivan je nivo produkcije NO i citokina adherentnih ćelija peritonealne šupljine, odnosno dominantno makrofaga koje imaju najizraženiji afinitet za plastiku (159), što sugerise da rana postnatalna oralna primena probiotske bakterije *L. rhamnosus* u pacovima specifično favorizuje inflamatorni kapacitet makrofaga peritonealne šupljine u odraslom dobu. Oralna primena različitih probiotskih bakterija vrste *Lactobacillus* dovodi do aktivacije makrofaga peritonealne šupljine povećanjem nivoa IFN- γ u serumu (282), međutim, može se pretpostaviti da promena u aktivnosti makrofaga peritonealne šupljine pacova nakon indukcije kolitisa u adultnom dobu nisu posledica prolaznih promena u koncentraciji citokina do kojih dovodi primena probiotske bakterije *L. rhamnosus* tokom prvih mesec dana života, već verovatno rezultat dugotrajnih sistemskih promena u imunoregulaciji.

Nespecifična imunska memorija je fenomen nazvan engleskim terminom “trained immunity”, a najbliže se može opisati kao pojava da ćelije urođenog imunskog odgovora koje učestvuju u reakcijama

nespecifične odbrane organizma od infekcije i u razvoju inflamacije zapravo imaju sposobnost da, zahvaljujući metaboličkim i epigenetskim promenama, razviju jednu vrstu “memorije” koja im omogućava da na ponovljeni ili drugi, nespecifični stimulus, reaguju značajno jačim odgovorom (283,284). Iako su najbolje opisani mehanizmi razvoja nespecifične imunološke memorije indukovane BCG (Bacille Calmette-Guérin) vakcinom i β glukanom gljive *Candida albicans* (285,286), pokazano je i da probiotske bakterije imaju sposobnost da indukuju kompleksne epigenetske promene koje regulišu aktivnost transkripcionih faktora ključnih za urođeni imunski odgovor (287). U ispitivanjima *in vitro* je pokazano da kombinacija dve probiotske bakterije (*Bifidobacterium breve* DSMZ 20 213 i *L. rhamnosus* LGG) dovodi do promena u sekreciji citokina u odgovoru na stimulaciju LPS-om tako što redukuje acetilaciju histona i smanjuje aktivnost NF- κ B uz povećan stepen metilacije DNK (275). Iako se eksperimenti prikazani u ovoj disertaciji nisu bavili detaljnom analizom intracelularnih mehanizama u posredovanju delovanja probiotske bakterije *L. rhamnosus*, možemo da pretpostavimo da je rano izlaganje pacova ovoj probiotskoj bakteriji, tokom kritičnog perioda u razvoju imunskog sistema, pored povećanja raznovrsnosti uobičajenih bakterijskih i vrsta roda *Bifidobacterium* i promene tkivne arhitekture creva, dovela i do nekog vida dugotrajnog reprogramiranja funkcija ćelija urođene imunosti tako da su u odraslom dobu tokom razvoja kolitisa ove ćelije na stimulaciju pomoću *E. coli* reagovala drastičnijim promenama u sekreciji citokina. Fiziološki značaj ovih promena bi bio u adekvatnoj odbrani ćelija domaćina od potencijalnih patogena.

6. ZAKLJUČCI

Polazeći od postavljenih ciljeva doktorske disertacije i rezultata dobijenih tokom eksperimentalnog rada, mogu se predložiti sledeći zaključci:

- U homeostazi, AO pacovi imaju više zrelih rezidentnih CD163⁺ makrofaga u peritonealnoj šupljini u odnosu na DA pacove, što uz nalaz, da nakon *i.p.* primene umrtvljenih autolognih bakterija fecesa *E. coli* ili *Enterococcus* spp. u DA pacovima dolazi do izraženijeg smanjenja udela zrelih makrofaga i povećane produkcije NO, ukazuje na veći stepen aktivacije ćelija peritonealne šupljine zdravih DA pacova i izraženiju proinflamatornu polarizaciju tokom razvoja peritonitisa u odnosu na ćelije AO pacova.

- Makrofagi peritonealne šupljine DA pacova proizvode veće količine IL-6, a manje količine IL-10 u odnosu na makrofage peritonealne šupljine AO pacova tokom peritonitisa izazvanog indirektnim delovanjem bakterija mikrobiote creva narušavanjem integriteta epitela kolona tokom razvoja kolitisa, a posebno nakon dodatne stimulacije predstavnicima mikrobiote creva *in vitro*. Uprkos sličnom stepenu oštećenja kolona, smrtni ishod tokom razvoja kolitisa je retkost u AO pacovima, što je u korelaciji sa većom zastupljenošću rezidentnih CD163⁺MHCII⁺ makrofaga peritonealne šupljine i njihovom intenzivnijom produkcijom IL-10 u odgovoru na dodatnu stimulaciju umrtvljenim bakterijama fecesa *in vitro*, i verovatno je i u vezi sa porastom koncentracije antitela klase IgA specifičnih za *E. coli* u serumu AO pacova.

- *I.p.* primena probiotske bakterije *L. rhamnosus* dovodi do razvoja inflamacije u peritonealnoj šupljini, koja je okarakterisana smanjenjem zastupljenosti rezidentnih CD163⁺ makrofaga, influsom inflamatornih HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita i porastom zastupljenosti inflamatornih CD163⁺MHCII^{Low} makrofaga među ukupnim ćelijama peritonealne šupljine pacova oba soja. *I.p.* primena ove probiotske bakterije u AO pacovima prevenira porast produkcije NO i H₂O₂ od strane makrofaga stimulisanih *in vitro* pomoću *E. coli* i *Enterococcus* spp., a u DA pacovima dodatno povećava produkciju NO i uree od strane makrofaga stimulisanih pomoću autologih umrtvljenih bakterija fecesa *in vitro*. Nalazi ukazuju na to da *L. rhamnosus* ima veći potencijal da u AO pacovima spreči funkcionalne promene do kojih dovodi stimulacija ćelija peritonealne šupljine komensalom mikroflorom.

- Rana postnatalna oralna primena probiotske bakterije *L. rhamnosus* u DA pacovima uzrokuje da nakon razvoja kolitisa u adultnom dobu bude povećana zastupljenost rezidentnih CD163⁺MHCII⁺ i CD11b^{Hi}CD4^{Hi} makrofaga peritonealne šupljine i smanjen influs HIS48^{Hi}CD43⁺ monocita, suprimirano povećanje produkcije NO i IL-10 od strane makrofaga stimulisanih umrtvljenim bakterijama fecesa *in vitro*, a potencira i produkciju TNF od strane ovih ćelija. Osim što ovakva primena dovodi do smanjenja dužine kolona zahvaćene ulceracijom nakon indukcije kolitisa u adultnom dobu, što je verovatno rezultat i niže produkcije inflamatornih citokina u tkivu kolona, pored povećanja raznovrsnosti bakterija uobičajenih bakterijskih i *Bifidobacterium* vrsta u fecesu i poboljšanja histološkog nalaza creva, izloženost probiotskoj bakteriji *L. rhamnosus* tokom kritičnog perioda u razvoju imunskog sistema verovatno dovodi i do neke vrste dugotrajnog reprogramiranja funkcija ćelija urođenog imunskog odgovora i njihovog odgovora na stimulaciju komensalnim bakterijama u odrasloj dobi.

- Nalazi ove disertacije ukazuju na značaj genetski determinisane predispozicije ka određenom obrascu aktivacije makrofaga za promene u njihovom fenotipu i aktivnosti tokom razvoja inflamatornog odgovora koji je indukovano delovanjem bakterija crevne mikrobiote ili probiotske bakterije *L. rhamnosus*. Ovi nalazi ukazuju i na značaj personalizovane terapije probioticima, odnosno na to da je u proceni efikasnosti tretmana probiotskim bakterijama, pored karakteristika koje su uslovljene polom ili starošću, ključno sagledati i one individualne karakteristike u imunološkoj reaktivnosti koje su genetski determinisane pošto su one mogući uzrok varijabilnih rezultata istraživanja efekata probiotika na zdravlje ljudi i laboratorijskih životinja.

- Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji dodatno potvrđuju značaj mikrobiote creva za razvoj imunskog sistema tokom ranog postnatalnog perioda i formiranje profila imunološke aktivacije u adultnom periodu.

7. LITERATURA

1. van Baal JOAM, van de Vijver KK, Nieuwland R, van Noorden CJF, van Driel WJ, Sturk A, et al. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue and Cell* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Mar 9];49(1):95–105. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0040816616301483?via%3Dihub>
2. Festingi MFW, Leggi R, Eydmanni T, Brammalv A. Mouse strain differences in resident peritoneal cells: a flow cytometric analysis. *Laboratory Animals* [Internet]. 1990 [cited 2022 Mar 9];24:53–62. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/002367790780890374?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub 0pubmed
3. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2008 [cited 2022 Mar 9];(83):14.1.1-14.1.14. Available from: </pmc/articles/PMC2834554/>
4. Bailie GR, Eisele G. Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis: A Review of its Mechanics, Advantages, Complications, and Areas of Controversy. *The Annals of Pharmacotherapy* [Internet]. 1992 Jun 28 [cited 2022 Mar 9];26(11):1409–20. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/106002809202601115?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
5. Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Dueñas R. The peritoneum: Beyond the tissue - A review. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2022 Mar 9];9(JUN):738. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00738/full>
6. Emani R, Alam C, Pekkala S, Zafar S, Emani MR, Hänninen A. Peritoneal Cavity is a Route for Gut-Derived Microbial Signals to Promote Autoimmunity in Non-Obese Diabetic Mice. *Scandinavian Journal of Immunology* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2022 Mar 11];81(2):102–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/sji.12253>
7. Fraga-Silva TF de C, Venturini J, de Arruda MSP. Trafficking of phagocytic peritoneal cells in hypoinsulinemic-hyperglycemic mice with systemic candidiasis. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. 2013 Mar 25 [cited 2022 Feb 6];13(1):147. Available from: </labs/pmc/articles/PMC3616899/>
8. Wang J, Kubes P. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* [Internet]. 2016 Apr 21 [cited 2022 Mar 9];165(3):668–78. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867416302653/fulltext>
9. Honda M, Kadohisa M, Yoshii D, Komohara Y, Hibi T. Directly recruited GATA6 + peritoneal cavity macrophages contribute to the repair of intestinal serosal injury. *Nature Communications* 2021 12:1 [Internet]. 2021 Dec 15 [cited 2022 Mar 9];12(1):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27614-9>
10. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science* [Internet].

- 2012 Apr 6;336(6077):86–90. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1219179>
11. Vasse GF, Kühn PT, Zhou Q, Bhusari SA, Reker-Smit C, Melgert BN, et al. Collagen morphology influences macrophage shape and marker expression in vitro. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Dec 17];1:13–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2468498817300112>
 12. Rowley AT, Meli VS, Wu-Woods NJ, Chen EY, Liu WF, Wang SW. Effects of Surface-Bound Collagen-Mimetic Peptides on Macrophage Uptake and Immunomodulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [Internet]. 2020 Jul 3 [cited 2021 Dec 17];8:747. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00747/full>
 13. Zhang Y, Li X, Luo Z, Ma L, Zhu S, Wang Z, et al. ECM1 is an essential factor for the determination of M1 macrophage polarization in IBD in response to LPS stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Feb 11 [cited 2022 Mar 11];117(6):3083–92. Available from: [/pmc/articles/PMC7022174/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3241174/)
 14. Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, et al. Production of Type VI Collagen by Human Macrophages: A New Dimension in Macrophage Functional Heterogeneity. *J Immunol* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2021 Dec 18];180(8):5707–19. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/180/8/5707>
 15. Simões FC, Cahill TJ, Kenyon A, Gavriouchkina D, Vieira JM, Sun X, et al. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair. *Nature Communications* [Internet]. 2020 Jan 30 [cited 2021 Dec 17];11(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14263-2>
 16. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Mar 11];30(1):16–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08830185.2010.529976>
 17. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2022 Feb 16];214(2):161–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18161744/>
 18. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005 5:12 [Internet]. 2005 Dec [cited 2021 Oct 14];5(12):953–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri1733>
 19. Menzies FM, Henriquez FL, Alexander J, Roberts CW. Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation. *Clinical and Experimental Immunology* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Feb 3];160(3):369. Available from: [/pmc/articles/PMC2883107/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2083107/)
 20. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 18];2015. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/816460/>

21. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* [Internet]. 2007 Dec 15 [cited 2022 Mar 10];110(13):4319–30. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/110/13/4319/103222/Tumor-associated-leukemia-inhibitory-factor-and-IL>
22. Adams DO. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunology Today* [Internet]. 1989 Feb 1 [cited 2022 Mar 8];10(2):33–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0167569989902983?via%3Dihub>
23. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2005 Jan 3 [cited 2022 Mar 10];115(1):56–65. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/22675>
24. Lu L, Faubel S, He Z, Andres Hernando A, Jani A, Kedl R, et al. Depletion of Macrophages and Dendritic Cells in Ischemic Acute Kidney Injury. *American Journal of Nephrology* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Mar 10];35(2):181–90. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/335582>
25. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct Macrophage Phenotypes Contribute to Kidney Injury and Repair. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2022 Mar 10];22(2):317–26. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/content/22/2/317>
26. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2010 Feb 9 [cited 2021 Oct 13];107(6):2568–73. Available from: <https://www.pnas.org/content/107/6/2568>
27. Cassado A dos A, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, de Buzzo CL, Faustino L, Nascimento R, et al. Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli. *PLOS ONE* [Internet]. 2011 [cited 2022 Mar 9];6(7):e22141. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022141>
28. Cain DW, O’Koren EG, Kan MJ, Womble M, Sempowski GD, Hopper K, et al. Identification of a tissue-specific, C/EBP β -dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2022 Mar 9];191(9):4665–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3808250/>
29. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2014 Oct 11;14(10):667–85. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3738>
30. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology* 2014 15:10 [Internet]. 2014 Aug 24 [cited 2022 Mar 9];15(10):929–37. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.2967>

31. Rescigno M. Intestinal Dendritic Cells. *Advances in Immunology* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Mar 10];107(C):109–38. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123813008000046?via%3Dihub>
32. Wang X, Hao GL, Wang BY, Gao CC, Wang YX, Li LS, et al. Function and dysfunction of plasma cells in intestine. *Cell & Bioscience* [Internet]. 2019 Mar 13 [cited 2022 Mar 10];9(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6417281/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32417281/)
33. Ma H, Tao W, Zhu S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cellular & Molecular Immunology* 2019 16:3 [Internet]. 2019 Feb 20 [cited 2022 Mar 10];16(3):216–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-019-0208-2>
34. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology* 2013 6:3 [Internet]. 2012 Sep 19 [cited 2022 Mar 9];6(3):498–510. Available from: <https://www.nature.com/articles/mi201289>
35. Assa A, Vong L, Pinnell LJ, Avitzur N, Johnson-Henry KC, Sherman PM. Vitamin D Deficiency Promotes Epithelial Barrier Dysfunction and Intestinal Inflammation. *The Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2022 Mar 6];210(8):1296–305. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/210/8/1296/2911874>
36. Quadro L, Gamble M v., Vogel S, Lima AAM, Piantedosi R, Moore SR, et al. Retinol and Retinol-Binding Protein: Gut Integrity and Circulating Immunoglobulins. *The Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2022 Mar 6];182(Supplement_1):S97–102. Available from: https://academic.oup.com/jid/article/182/Supplement_1/S97/2191652
37. Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition Reviews* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2022 Mar 6];71(7):483–99. Available from: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/71/7/483/1807403>
38. Malaguarnera G, Giordano M, Nunnari G, Bertino G, Malaguarnera M. Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives. *World Journal of Gastroenterology: WJG* [Internet]. 2014 Nov 28 [cited 2022 Mar 6];20(44):16639. Available from: [/pmc/articles/PMC4248208/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/248208/)
39. Zuo L, Li Y, Wang H, Wu R, Zhu W, Zhang W, et al. Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice. *Journal of Crohn's and Colitis* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2022 Mar 10];8(12):1710–22. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/8/12/1710/2756244>
40. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative Colitis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1102942> [Internet]. 2011 Nov 2 [cited 2022 Mar 10];365(18):1713–25. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1102942>
41. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [Internet]. 1984 Jan 6 [cited 2022

- Mar 10];251(1):73–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/390889>
42. M’Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clinical Medicine Insights Gastroenterology* [Internet]. 2013 [cited 2021 Oct 18];6:33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4020403/>
 43. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert review of Gastroenterology & Hepatology* [Internet]. 2017 Sep 2 [cited 2022 Mar 6];11(9):821–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17474124.2017.1343143>
 44. Parian AM, Mullin GE, Langhorst J, Brown AC. Inflammatory Bowel Disease [Internet]. Fourth Edi. *Integrative Medicine: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2018. 501-516.e8 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-35868-2.00050-5>
 45. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2014 Apr 22 [cited 2022 Feb 21];14(5):329–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3661>
 46. Andrade MC, Vaz NM, Faria AMC. Ethanol-induced colitis prevents oral tolerance induction in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [Internet]. 2003 Aug 19 [cited 2022 Mar 10];36(9):1227–32. Available from: <http://www.scielo.br/j/bjmr/a/YjvMfFp5M4QQKTn8QMswNrC/?lang=en>
 47. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental Production of Diffuse Colitis in Rats. *Digestion* [Internet]. 1978 [cited 2022 Mar 10];17(2):135–50. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/198104>
 48. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* [Internet]. 1990 Mar 1 [cited 2021 Oct 19];98(3):694–702. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(90\)90290-H/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(90)90290-H/pdf)
 49. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon. *Gastroenterology* [Internet]. 1989;96(2):795–803. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(89\)80079-4/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(89)80079-4/fulltext)
 50. Reingold L, Rahal K, Schmiedlin-Ren P, Rittershaus AC, Bender D, Owens SR, et al. Development of a Peptidoglycan–Polysaccharide Murine Model of Crohn’s Disease: Effect of Genetic Background. *Inflammatory Bowel Diseases* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2022 Mar 10];19(6):1238–44. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/19/6/1238/4603141>
 51. Leach MW, Bean AGD, Mauze S, Coffman RL, Powrie F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 1996 May [cited 2022 Mar 10];148(5):1503. Available from: </pmc/articles/PMC1861555/?report=abstract>

52. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Oct 13];1(2):154–70. Available from: <http://www.cmghjournal.org/article/S2352345X15000405/fulltext>
53. Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. International Journal of Colorectal Disease [Internet]. 2000 [cited 2021 Oct 13];15(3):144–60. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s003840000227>
54. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. Journal of Experimental Medicine [Internet]. 1995 Nov 1 [cited 2021 Oct 13];182(5):1281–90. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/182/5/1281/1107351/1281.pdf>
55. Yamada T, Marshal S, Specian RD, Grisham MB. A Comparative Analysis of Two Models of Colitis in Rats. Gastroenterology [Internet]. 1992;102(1):1524–34. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(92\)91710-L/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(92)91710-L/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
56. Qin HY, Xiao HT, Wu JCY, Berman BM, Sung JJY, Bian ZX. Key factors in developing the trinitrobenzene sulfonic acid-induced post-inflammatory irritable bowel syndrome model in rats. World Journal of Gastroenterology [Internet]. 2012;18(20):2481–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360446/>
57. Grivennikov SI, Tumanov A v., Liepinsh DJ, Kruglov AA, Marakusha BI, Shakhov AN, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: Protective and deleterious effects. Immunity [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2022 Mar 7];22(1):93–104. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761304003796/fulltext>
58. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. Nature Reviews Drug Discovery [Internet]. 2010 May 21 [cited 2022 Mar 7];9(6):482–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd3030>
59. Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and Regulation of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 2. Current Medicinal Chemistry [Internet]. 2012 Nov 6 [cited 2022 Mar 7];11(16):2205–12. Available from: <https://www.eurekaselect.com/article/8037>
60. Pimentel-Muiños FX, Seed B. Regulated Commitment of TNF Receptor Signaling: A Molecular Switch for Death or Activation. Immunity [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2022 Mar 7];11(6):783–93. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761300801521/fulltext>
61. Chu WM. Tumor necrosis factor. Cancer Lett [Internet]. 2013 Jan 28 [cited 2022 Mar 7];328(2):222. Available from: [/pmc/articles/PMC3732748/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732748/)
62. Heinrich PC, Castell J v., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. Biochemical Journal [Internet]. 1990 [cited 2022 Mar 8];265(3):621. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1133681/>

63. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, et al. Interleukin-6 Is a Potent Thrombopoietic Factor In Vivo in Mice. *Blood* [Internet]. 1989 Sep 1 [cited 2022 Mar 8];74(4):1241–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120825701>
64. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, et al. A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2004;126(4):989–96. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(04\)00032-0/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(04)00032-0/pdf)
65. Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Matsuda C, et al. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor γ chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2022 Mar 7];128(4):922–34. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(05\)00033-8/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(05)00033-8/fulltext)
66. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* [Internet]. 2000 May [cited 2022 Mar 7];6(5):583–8. Available from: https://www.nature.com/articles/nm0500_583
67. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2022 Mar 8];27:485–517. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>
68. Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, et al. Increased Th17-Inducing Activity of CD14+ CD163low Myeloid Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2022 Mar 7];145(6):1380-1391.e1. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508513012699/fulltext>
69. Powell N, Lo JW, Biancheri P, Vossenkämper A, Pantazi E, Walker AW, et al. Interleukin 6 Increases Production of Cytokines by Colonic Innate Lymphoid Cells in Mice and Patients With Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*. 2015 Aug 1;149(2):456-467.e15.
70. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1957 Sep 12 [cited 2022 Mar 8];147(927):258–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13465720/>
71. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in Oncological Practice: Review of Interferon Biology, Clinical Applications, and Toxicities. *The Oncologist* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2022 Mar 8];6(1):34–55. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/6/1/34/6387688>
72. Gessani S, Belardelli F. IFN- γ Expression in Macrophages and Its Possible Biological Significance. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [Internet]. 1998 May 1 [cited 2022 Mar 8];9(2):117–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359610198000070?via%3Dihub>
73. Rafa H, Amri M, Saoula H, Belkhef M, Medjeber O, Boutaleb A, et al. Involvement of Interferon- γ in Bowel Disease Pathogenesis by Nitric Oxide Pathway: A Study in Algerian

- Patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research* [Internet]. 2010 Sep 13 [cited 2022 Mar 8];30(9):691–7. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jir.2010.0012>
74. Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and Experimental Immunology* [Internet]. 2006 Nov [cited 2022 Mar 8];146(2):330. Available from: [/pmc/articles/PMC1942055/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1942055/)
 75. Langer V, Vivi E, Regensburger D, Winkler TH, Waldner MJ, Rath T, et al. IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Mar 8];129(11):4691. Available from: [/pmc/articles/PMC6819119/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36819119/)
 76. Walrath T, Malizia RA, Zhu X, Sharp SP, D'Souza SS, Lopez-Soler R, et al. IFN- γ and IL-17A regulate intestinal crypt production of CXCL10 in the healthy and inflamed colon. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Mar 8];318(3):G479–89. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.00208.2019>
 77. Zheng SG, Xu Z, Wang J. A protective role of IFN- γ in T cell-mediated colitis by regulation of Treg/Th17 via induction of indoleamine-2,3-deoxygenase. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 8];202(1 Supplement). Available from: https://www.jimmunol.org/content/202/1_Supplement/57.3
 78. Thelemann C, Eren RO, Coutaz M, Brasseit J, Bouzourene H, Rosa M, et al. Interferon- γ Induces Expression of MHC Class II on Intestinal Epithelial Cells and Protects Mice from Colitis. *PLOS ONE* [Internet]. 2014 Jan 28 [cited 2022 Mar 8];9(1):e86844. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086844>
 79. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, et al. ROR γ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2022 Mar 8];136(1):257–67. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508508018519/fulltext>
 80. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PDR, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2022 Mar 8];61(12):1693–700. Available from: <https://gut.bmj.com/content/61/12/1693>
 81. O'Connor W, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology* [Internet]. 2009 May 17 [cited 2022 Mar 8];10(6):603–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.1736>
 82. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, et al. Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans. *Adv Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Mar 7];122:177. Available from: [/pmc/articles/PMC4741283/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24741283/)

83. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* [Internet]. 1993 Oct 22 [cited 2022 Mar 7];75(2):263–74. Available from: <http://www.cell.com/article/009286749380068P/fulltext>
84. Spencer SD, di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, et al. The Orphan Receptor CRF2-4 Is an Essential Subunit of the Interleukin 10 Receptor. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 1998 Feb 16 [cited 2022 Mar 7];187(4):571. Available from: </pmc/articles/PMC2212143/>
85. Gunasekera DC, Ma J, Vacharathit V, Shah P, Ramakrishnan A, Uprety P, et al. The development of colitis in Il10^{-/-} mice is dependent on IL-22. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Mar 7];13(3):493. Available from: </pmc/articles/PMC7566780/>
86. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for Induction of Anemia During Inflammation. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2022 Mar 7];169(4):2204–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/169/4/2204>
87. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 1993 [cited 2021 Oct 13];59(3):695–700. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202176/>
88. Bennet JD, Brinkman M. Treatment of Ulcerative Colitis by Implantation of Normal Colonic Flora. *The Lancet* [Internet]. 1989 Jan 21 [cited 2022 Mar 9];333(8630):164. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673689911835/fulltext>
89. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* [Internet]. 1958 [cited 2022 Mar 9];44(5):854–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13592638/>
90. Betts AO. The Provision and Use of Pathogen-free Laboratory Animals. *Proc R Soc Med* [Internet]. 1962 Apr [cited 2022 Mar 9];55(4):253. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1896709/>
91. Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Mar 10];91(4):771. Available from: </pmc/articles/PMC3144392/>
92. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. *Curr Obes Rep* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Apr 20];4(2):250. Available from: </pmc/articles/PMC4443745/>
93. Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* [Internet]. 1995;36(2):209–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1382406/>
94. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Recapitulating adult human immune traits in laboratory mice by normalizing environment. *Nature* [Internet]. 2016 Apr 28 [cited 2022 Mar 9];532(7600):512. Available from: </pmc/articles/PMC4871315/>

95. Abolins S, King EC, Lazarou L, Weldon L, Hughes L, Drescher P, et al. The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nature Communications* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 9];8. Available from: [/pmc/articles/PMC5418598/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35418598/)
96. Franssen F, van Beek AA, Borghuis T, Meijer B, Hugenholtz F, van der Gaast-de Jongh C, et al. The impact of gut microbiota on gender-specific differences in immunity. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2020 Mar 13];8(JUN). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00754/full>
97. FAO, WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food, including powder milk with live lactic acid bacteria [Internet]. 2006. Available from: <https://catalogue.nla.gov.au/Record/3788914>
98. Anukam KC, Reid G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation [Internet]. 2007. Available from: https://www.basicknowledge101.com/pdf/Probiotics_100_years.pdf
99. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* [Internet]. 2000 [cited 2022 Mar 7];47(5):646. Available from: [/pmc/articles/PMC1728100/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11728100/)
100. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2022 Mar 10];73(2):393s–8s. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/393s/4737568>
101. Sepp E, Mikelsaar M, Salminen S. Effect of Administration of *Lactobacillus casei* Strain GG on the Gastrointestinal Microbiota of Newborns. *Microbial Ecology in Health & Disease* [Internet]. 2009 [cited 2022 Mar 10];6(6):309–14. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08910609309141340>
102. Lu R, Fasano S, Madayiputhiya N, Morin NP, Nataro J, Fasano A. Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus GG* conditional media that exert both anti-gram-negative and Gram-positive bactericidal activity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Internet]. 2009 Jul [cited 2022 Mar 10];49(1):23–30. Available from: https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2009/07000/Isolation,_Identification,_and_Characterization_of.6.aspx
103. Lebeer S, Claes IJJ, Verhoeven TLA, Vanderleyden J, de Keersmaecker SCJ. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus GG* form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology* [Internet]. 2011 May [cited 2022 Mar 10];4(3):368. Available from: [/pmc/articles/PMC3818995/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21818995/)
104. Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacillus casei* Strain GG Reverses Increased Intestinal Permeability Induced by Cow Milk in Suckling Rats. *Gastroenterology* [Internet]. 1993;105(6):1643–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12818995/>

- [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(93\)91059-Q/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(93)91059-Q/pdf?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
105. Yan F, Polk DB. Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 27 [cited 2022 Mar 10];277(52):50959. Available from: [/pmc/articles/PMC4006994/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144444/)
 106. Yan F, Liu L, Cao H, Moore DJ, Washington MK, Wang B, et al. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood. *Mucosal Immunology* [Internet]. 2016 Apr 20 [cited 2022 Mar 10];10(1):117–27. Available from: <https://www.nature.com/articles/mi201643>
 107. Peña JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2022 Mar 10];5(4):277–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00275.x>
 108. Fong FLY, Kirjavainen P v., El-Nezami H. Immunomodulation of Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors. *Scientific Reports* [Internet]. 2016 Mar 10 [cited 2022 Mar 10];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4785377/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26144444/)
 109. Braat H, van den Brande J, van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M, van Deventer S. Lactobacillus rhamnosus induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *The American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2022 Mar 10];80(6):1618–25. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/80/6/1618/4690494>
 110. Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, et al. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *Journal of Neuroscience Research* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2022 Mar 11];84(2):379–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.20883>
 111. Kuštrimović N, Mitić K, Dimitrijević M, Vujić V, Kovačević Jovanović V, Miletić T, et al. Strain differences in concanavalin a-induced paw edema in the rat: Involvement of histamine H1 and H2 receptors. *Acta Veterinaria* [Internet]. 2011;61(2–3):119–32. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=RS2011001365>
 112. Stanisavljević S, Lukić J, Soković S, Mihajlović S, Stojković MM, Miljković D, et al. Correlation of Gut Microbiota Composition with Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rats. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 13];7(DEC). Available from: [/labs/pmc/articles/PMC5156687/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30144444/)
 113. Stanisavljević S, Dinić M, Jevtić B, Đedović N, Momčilović M, Đokić J, et al. Gut Microbiota Confers Resistance of Albino Oxford Rats to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 May 2 [cited 2021 Oct 13];9(MAY). Available from: [/labs/pmc/articles/PMC5942155/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32144444/)

114. Stanisavljević S, Lukić J, Momčilović M, Miljković M, Jevtić B, Kojić M, et al. Gut-associated lymphoid tissue, gut microbes and susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Beneficial Microbes* [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 13];7(3):363–73. Available from: https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2015.0159?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub 0pubmed
115. Stojić-Vukanić Z, Nacka-Aleksić M, Pilipović I, Vujnović I, Blagojević V, Kosec D, et al. Aging diminishes the resistance of AO rats to EAE: Putative role of enhanced generation of GM-CSF Expressing CD4+ T cells in aged rats. *Immunity and Ageing* [Internet]. 2015;12(1). Available from: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-015-0044-x>
116. Stanojević S, Ćuruvija I, Blagojević V, Petrović R, Vujić V, Dimitrijević M. Strain-dependent response to stimulation in middle-aged rat macrophages: A quest after a useful indicator of healthy aging. *Experimental Gerontology* [Internet]. 2016;85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531556516304363?via%3Dihub>
117. Stanojević S, Kuštrimović N, Mitić K, Vujić V, Aleksić I, Dimitrijević M. Peritoneal mast cell degranulation differently affected thioglycollate-induced macrophage phenotype and activity in Dark Agouti and Albino Oxford rats. *Life Sciences* [Internet]. 2013 Oct 11;93(16):564–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320513004876?via%3Dihub>
118. Kovačević Jovanović V, Mitić K, Stanojević S, Miletić T, Vujic V, Dimitrijević M. Production of H2O2 and NO by rat peritoneal macrophages in response to gut commensal bacteria. *Acta Veterinaria* [Internet]. 2009;59(2–3):111–22. Available from: <http://intor.torlakinstitut.com/handle/123456789/290>
119. Kovačević-Jovanović V, Miletić T, Stanojević S, Mitić K, Dimitrijević M. Immune response to gut *Escherichia coli* and susceptibility to adjuvant arthritis in the rats. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* [Internet]. 2015 Mar 30 [cited 2021 Oct 13];62(1):1–19. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/62/1/article-p1.xml>
120. Gill HS, Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, Cross ML. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Medical Microbiology and Immunology* [Internet]. 2001 [cited 2021 Oct 13];190(3):97–104. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004300100095>
121. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* [Internet]. 1982;126(1):131–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/000326978290118X?via%3Dihub>
122. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* [Internet]. 1994;174(1–2):231–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175994900272>

123. Kovačević-Jovanović V, Miletić T, Stanojević S, Mitić K, Dimitrijević M. Strain differences in the humoral immune response to commensal bacterial antigens in rats. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* [Internet]. 2013;60(3):271–88. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/60/3/article-p271.xml>
124. Lukic J, Strahinic I, Milenkovic M, Golic N, Kojic M, Topisirovic L, et al. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: Implications for colitis induction. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2013 [cited 2021 Oct 13];79(18):5735–44. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01807-13>
125. Heilig HGJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2002 [cited 2021 Oct 13];68(1):114–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126540/>
126. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 1998 [cited 2021 Oct 13];64(10):3854–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106569/>
127. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans ADL, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2001 [cited 2021 Oct 13];67(2):504–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92614/>
128. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* [Internet]. 1994 Nov;17(5):914–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7840973/>
129. Barth MW, Hendrzak JA, Melnicoff MJ, Morahan PS. Review of the macrophage disappearance reaction. *Journal of Leukocyte Biology* [Internet]. 1995 Mar 1 [cited 2022 Mar 16];57(3):361–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jlb.57.3.361>
130. Cassado AA, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2015;6(MAY):1–9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00225/full>
131. Zhang N, Czepielewski RS, Jarjour NN, Erlich EC, Esaulova E, Saunders BT, et al. Expression of factor V by resident macrophages boosts host defense in the peritoneal cavity. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Mar 17];216(6):1291–300. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20182024>
132. Buscher K, Wang H, Zhang X, Striewski P, Wirth B, Saggi G, et al. Protection from septic peritonitis by rapid neutrophil recruitment through omental high endothelial venules. *Nature*

- Communications [Internet]. 2016 [cited 2021 Oct 14];7(10828). Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms10828>
133. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1996 [cited 2021 Oct 14];156(10):3986–92. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/156/10/3986.long>
 134. Henderson RB, Hobbs JAR, Mathies M, Hogg N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2022 Mar 23];102(1):328–35. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/102/1/328/16833/Rapid-recruitment-of-inflammatory-monocytes-is>
 135. Nandi A, Bishayi B. Murine macrophage response from peritoneal cavity requires signals mediated by chemokine receptor CCR-2 during *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Mar 23];64(1):213–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26616292/>
 136. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: Validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation. *PLoS ONE* [Internet]. 2016;11(1):1–15. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142520>
 137. Kiefer J, Zeller J, Bogner B, Hörbrand IA, Lang F, Deiss E, et al. An Unbiased Flow Cytometry-Based Approach to Assess Subset-Specific Circulating Monocyte Activation and Cytokine Profile in Whole Blood. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 Apr 26 [cited 2022 Mar 29];12. Available from: </pmc/articles/PMC8108699/>
 138. Turner-Stokes T, Diaz AG, Pinheiro D, Predecki M, McAdoo SP, Roufosse C, et al. Live imaging of monocyte subsets in immune complex-mediated glomerulonephritis reveals distinct phenotypes and effector functions. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Mar 29];31(11):2523–42. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/content/31/11/2523>
 139. Polfliet MMJ, Fabriek BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* [Internet]. 2006;211(6–8):419–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0171298506000726?via%3Dihub>
 140. Carreno BM, Collins M. The B7 Family of Ligands and Its Receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2022 Mar 29];20:29–53. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806>
 141. Lim W, Ma W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Diaz-Mitoma F, et al. Distinct Role of p38 and c-Jun N-Terminal Kinases in IL-10-Dependent and IL-10-Independent Regulation of the Costimulatory Molecule B7.2 in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytic Cells. *The*

- Journal of Immunology [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2022 Mar 29];168(4):1759–69. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/168/4/1759>
142. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2001 [cited 2022 Mar 29];1(3):220–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri35105024>
 143. Lim W, Gee K, Mishra S, Kumar A. Regulation of B7.1 Costimulatory Molecule Is Mediated by the IFN Regulatory Factor-7 through the Activation of JNK in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytic Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2022 Mar 29];175(9):5690–700. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/175/9/5690>
 144. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 Mediates Phagocytosis and Translocation of Bacteria Across the Intestinal Barrier. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2021 Oct 14];176(5):3070–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/176/5/3070>
 145. Clark E, Hoare C, Tanianis-Hughes J, Carlson GL, Warhurst G. Interferon γ Induces Translocation of Commensal *Escherichia coli* Across Gut Epithelial Cells via a Lipid Raft--Mediated Process. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2021 Oct 14];128(5):1258–67. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(05\)00158-7/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(05)00158-7/fulltext?referrer=https%3A%2F%2Fpubmed.ncbi.nlm.nih.gov%2F)
 146. Heneka MT, Dumitrescu L, Löschmann PA, Wüllner U, Klockgether T. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2000 Apr 1;18(4):167–79.
 147. Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M. The macrophages in rheumatic diseases. *J Inflamm Res*. 2016;9:1–11.
 148. Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, et al. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration: *Multiple Sclerosis* [Internet]. 2011 Sep 2 [cited 2021 Oct 14];17(1):2–15. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458510379243>
 149. Chakravorty D, Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2003 Jun 1;5(7):621–7.
 150. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Érsek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* [Internet]. 2010 Jun 28 [cited 2021 Oct 14];12(3):1–6. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3045>
 151. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2002 Aug 1;1(4):232–41.

152. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravortty D. Modulation of the Arginase Pathway in the Context of Microbial Pathogenesis: A Metabolic Enzyme Moonlighting as an Immune Modulator. *PLOS Pathogens* [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Oct 14];6(6):e1000899. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000899>
153. Leendertse M, Willems RJL, Giebelen IAJ, Roelofs JJTH, van Rooijen N, Bonten MJM, et al. Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immunity*. 2009;15(1):3–12.
154. Leendertse M, Willems RJL, Giebelen IAJ, van den Pangaart PS, Wiersinga WJ, de Vos AF, et al. TLR2-Dependent MyD88 Signaling Contributes to Early Host Defense in Murine *Enterococcus faecium* Peritonitis . *The Journal of Immunology*. 2008;180(7):4865–74.
155. Jorch SK, Surewaard BGJ, Hossain M, Peiseler M, Deppermann C, Deng J, et al. Peritoneal GATA6+ macrophages function as a portal for *Staphylococcus aureus* dissemination. *The Journal of Clinical Investigation*. 2019 Nov 1;129(11):4643–56.
156. Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Estay M, Keith JM. Survival of *Enterococcus faecalis* in Mouse Peritoneal Macrophages [Internet]. Vol. 67, *Infection and Immunity*. 1999. Available from: <https://journals.asm.org/journal/iai>
157. Dimitrijević M, Stanojević S, Vujić V, Aleksić I, Pilipović I, Leposavić G. Aging oppositely affects TNF- α and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology* [Internet]. 2014 Jul 10 [cited 2021 Oct 14];15(5):475–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-014-9513-4>
158. Shellito J, Sniezek M, Warnock M. Acquisition of peroxidase activity by rat alveolar macrophages during pulmonary inflammation. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 1987 [cited 2022 Mar 21];129(3):567. Available from: </pmc/articles/PMC1899817/?report=abstract>
159. Fleit SA, Fleit HB, Zolla-Pazner S. Culture and recovery of macrophages and cell lines from tissue culture-treated and -untreated plastic dishes. *Journal of Immunological Methods*. 1984 Mar 30;68(1–2):119–29.
160. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 1998 Feb 15 [cited 2022 Apr 17];101(4):890. Available from: </pmc/articles/PMC508637/?report=abstract>
161. Blaževski J, Petković F, Momčilović M, Jevtic B, Miljković D, Mostarica Stojković M. High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology*. 2013 Sep 1;218(9):1192–9.
162. Vasilev S, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic LJ. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between dark agouti and albino oxford rats. *Veterinary Parasitology*. 2009 Feb 23;159(3–4):229–31.

163. Stanojević S, Kuštrimović N, Mitić K, Vujić V, Dimitrijević M. Role of Mast Cells and C-Sensory Fibers in Concanavalin A-Induced Paw Edema in Two Rat Strains. *Inflammation*. 2015;38(4):1434–49.
164. Huynh MLN, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2022 Apr 17];109(1):41. Available from: /pmc/articles/PMC150814/
165. Wang X, Nie J, Jia Z, Feng M, Zheng Z, Chen W, et al. Impaired TGF- β signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. Coli in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2022 Apr 18];25(2):399–412. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article/25/2/399/1816571>
166. Nacu N, Luzina IG, Highsmith K, Lockatell V, Pochetuhen K, Cooper ZA, et al. Macrophages Produce TGF- β -Induced (β -ig-h3) following Ingestion of Apoptotic Cells and Regulate MMP14 Levels and Collagen Turnover in Fibroblasts. *J Immunol* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2022 Apr 18];180(7):5036. Available from: /pmc/articles/PMC2847349/
167. Diamond JR, Kees-Folts D, Ding G, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, monocyte chemoattractant peptide-1, and TGF-beta 1 in experimental hydronephrosis. *The American Journal of Physiology* [Internet]. 1994 [cited 2022 Apr 18];266(6 35-6). Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajprenal.1994.266.6.F926>
168. Kneidl J, Löffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, et al. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus via binding of specific fibronectin peptides. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2022 Mar 23];14(6):914–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2012.01766.x>
169. Chen CY, Fuh LJ, Huang CC, Hsu CJ, Su CM, Liu SC, et al. Enhancement of CCL2 expression and monocyte migration by CCN1 in osteoblasts through inhibiting miR-518a-5p: implication of rheumatoid arthritis therapy. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Mar 24 [cited 2022 Mar 23];7(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-00513-0>
170. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang Y, Lee VWS, et al. IL-10/TGF- β -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Apr 17];21(6):933. Available from: /pmc/articles/PMC2900959/
171. Wang TY, Li J, Jin Z, Wu F, Zhou Q. Inhibitory effect of TGF- β 1 on NO production in peritoneal macrophages from collagen-induced arthritis rats involving the LPS-TLR4 pathway. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2022 Apr 18];8(4):1143–8. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2013.1641/abstract>
172. Mostafa Mtairag E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, et al. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1

- secretion. *Cardiovascular Research* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2022 Apr 18];49(4):882–90. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article/49/4/882/340557>
173. Strle K, McCusker RH, Johnson RW, Zunich SM, Dantzer R, Kelley KW. Prototypical anti-inflammatory cytokine IL-10 prevents loss of IGF-I-induced myogenin protein expression caused by IL-1 β . *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 Apr 18];294(4):E709. Available from: [/pmc/articles/PMC2951888/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1711888/)
 174. Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLOS ONE* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Mar 23];11(6):e0153289. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153289>
 175. Emam M, Tabatabaei S, Sargolzaei M, Sharif S, Schenkel F, Mallard B. The effect of host genetics on in vitro performance of bovine monocyte-derived macrophages. *Journal of Dairy Science* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Mar 21];102(10):9107–16. Available from: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030219306733/fulltext>
 176. Janssen WJ, Henson PM. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. *Toxicologic Pathology* [Internet]. 2012 Nov 16 [cited 2022 Mar 21];40(2):166–73. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623311428477>
 177. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao C te, Scurr MJ, Brombacher F, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nature Communications* [Internet]. 2013 May 21 [cited 2022 Mar 21];4(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms2877>
 178. Ivanov S, Gallerand A, Gros M, Stunault MI, Merlin J, Vaillant N, et al. Mesothelial cell CSF1 sustains peritoneal macrophage proliferation. *European Journal of Immunology* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Mar 21];49(11):2012–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201948164>
 179. Campbell SM, Knipper JA, Ruckerl D, Finlay CM, Logan N, Minutti CM, et al. Myeloid cell recruitment versus local proliferation differentiates susceptibility from resistance to filarial infection. *Elife*. 2018 Jan 4;7.
 180. Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, Stewart-Akers AM. Macrophage Phenotype as a Determinant of Biologic Scaffold Remodeling. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2008 Oct 24 [cited 2021 Oct 13];14(11):1835–42. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2007.0264>
 181. Lim JE, Chung E, Son Y. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFN γ . *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Aug 25 [cited 2022 Mar 21];7(1):1–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09639-7>
 182. Moghaddami M, Cleland LG, Radisic G, Mayrhofer G. Recruitment of dendritic cells and macrophages during T cell-mediated synovial inflammation. *Arthritis Research and Therapy* [Internet]. 2007 Nov 20 [cited 2022 Mar 21];9(6):1–13. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar2328>

183. Gillett A, Marta M, Jin T, Tuncel J, Leclerc P, Nohra R, et al. TNF Production in Macrophages Is Genetically Determined and Regulates Inflammatory Disease in Rats. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2022 Mar 21];185(1):442–50. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/185/1/442>
184. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2022 Mar 21];198(12):1875–86. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20030152>
185. Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, et al. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2022 Mar 21];117(10):3020–8. Available from: <http://www.jci.org>
186. Liao C te, Rosas M, Davies LC, Giles PJ, Tyrrell VJ, O'Donnell VB, et al. IL-10 differentially controls the infiltration of inflammatory macrophages and antigen-presenting cells during inflammation. *European Journal of Immunology* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Mar 21];46(9):2222–32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201646528>
187. Rivollier A, Perrin-Cocon L, Luche S, Diemer H, Strub JM, Hanau D, et al. High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: Possible implications in atherosclerosis. *Molecular and Cellular Proteomics* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2022 Mar 21];5(4):726–36. Available from: <http://www.mcponline.org/article/S153594762030356X/fulltext>
188. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Hansen JM, Li T, Yamoah K, et al. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *The EMBO Journal* [Internet]. 2007 Oct 31 [cited 2022 Mar 21];26(21):4457–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.emboj.7601867>
189. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: A life or death issue. Vol. 21, *Critical Reviews in Immunology*. 2001. p. 399–425.
190. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the Arginase Pathway in the Context of Microbial Pathogenesis: A Metabolic Enzyme Moonlighting as an Immune Modulator. *PLOS Pathogens* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Mar 21];6(6):e1000899. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000899>
191. Foligné B, Grangette C, Pot B. Probiotics in IBD: mucosal and systemic routes of administration may promote similar effects. *Gut* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Mar 21];54(5):727. Available from: </pmc/articles/PMC1774502/>
192. Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, Cocchioni M, Silvi S, Cecchini C, et al. Effect of a Probiotic Intake on Oxidant and Antioxidant Parameters in Plasma of Athletes During Intense Exercise Training. *Current Microbiology* [Internet]. 2011 Mar 12 [cited 2022 Mar

- 21];62(6):1689–96. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-011-9915-3>
193. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* [Internet]. 2018 Sep 6 [cited 2022 Apr 30];174(6):1406-1423.e16. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867418311085/fulltext>
 194. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* [Internet]. 2018 Sep 6 [cited 2022 Apr 30];174(6):1388-1405.e21. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867418311024/fulltext>
 195. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity* [Internet]. 2005 Jan [cited 2022 Mar 21];73(1):166–73. Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/IAI.73.1.166-173.2005>
 196. Chang HC, Lin KH, Tai YT, Chen JT, Chen RM. Lipoteichoic acid-induced *tnf- α* and *il-6* gene expressions and oxidative stress production in macrophages are suppressed by ketamine through downregulating toll-like receptor 2-mediated activation of *erk1/2* and *nfb*. *Shock* [Internet]. 2010 May [cited 2021 Oct 14];33(5):485–92. Available from: https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2010/05000/LIPOTEICHOIC_ACID_INDUCED_TNF___AND_IL_6_GENE.7.aspx
 197. Zidek Z, Farghali H, Kmoníčková E. Intrinsic nitric oxide-stimulatory activity of lipoteichoic acids from different Gram-positive bacteria. *Nitric Oxide*. 2010 Dec 15;23(4):300–10.
 198. Ryan JL, Yohe WB, Morrison DC. Stimulation of peritoneal cell arginase by bacterial lipopolysaccharides. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 1980 [cited 2021 Oct 14];99(2):451. Available from: </labs/pmc/articles/PMC1903489/?report=abstract>
 199. da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecílio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Mar 21];7(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07397-0>
 200. Strus M, Okoń K, Nowak B, Pilarczyk-Zurek M, Heczko P, Gawda A, et al. Distinct effects of *Lactobacillus plantarum* KL30B and *Escherichia coli* 3A1 on the induction and development of acute and chronic inflammation. *Central European Journal of Immunology*. 2015;40(4):420–30.
 201. Matsuura M. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(MAY):109.
 202. Ho NK, Hawley SP, Ossa JC, Mathieu O, Tompkins TA, Johnson-Henry KC, et al. Immune signalling responses in intestinal epithelial cells exposed to pathogenic *Escherichia coli* and lactic acid-producing probiotics. *Beneficial Microbes* [Internet]. 2013 Feb 26 [cited 2022 Mar

- 21];4(2):195–209. Available from: <https://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/BM2012.0038>
203. Llewellyn A, Foey A. Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients* [Internet]. 2017 Oct 23 [cited 2022 Mar 21];9(10):1156. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/10/1156/htm>
 204. Chondrou P, Karapetsas A, Kiouisi DE, Vasileiadis S, Ypsilantis P, Botaitis S, et al. Assessment of the Immunomodulatory Properties of the Probiotic Strain *Lactobacillus paracasei* K5 In Vitro and In Vivo. *Microorganisms* [Internet]. 2020 May 11 [cited 2022 Mar 21];8(5):709. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/5/709/htm>
 205. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* (1979) [Internet]. 2015 Nov 27 [cited 2022 Mar 21];350(6264):1084–9. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aac4255>
 206. Elson C 0, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, et al. Hapten-Induced Model of Murine Inflammatory Bowel Disease Mucosal Immune Responses and Protection by Tolerance'. Vol. 157, *The Journal of immunology*. 1996.
 207. Tozawa K, Hanai H, Sugimoto K, Baba S, Sugimura H, Aoshi T, et al. Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- γ in the pathogenesis of experimental colitis in mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2022 Apr 10];18(5):578–87. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1440-1746.2003.03024.x>
 208. Motavallian-Naeini A, Andalib S, Rabbani M, Mahzouni P, Afsharipour M, Minaiyan M. Validation and optimization of experimental colitis induction in rats using 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012;7(389362):159–69.
 209. Lamb K, Zhong F, Gebhart GF, Bielefeldt K. Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006 Mar;290(3).
 210. Jaszewski R, Tolia V, Ehrinpreis MN, Bodzin JH, Peleman RR, Korlipara R, et al. Increased Colonic Mucosal Angiotensin I and II Concentrations in Crohn's Colitis. *Gastroenterology*. 1990;99:1543–8.
 211. Aloamaka EO, Amabebe E, Ozoene JO, Obika LFO. Thirst perception, drinking, arginine vasopressin activity and associated neurohumoral factors. *Journal of African Association of Physiological Sciences Official Publication of the African Association of Physiological Sciences* [Internet]. 2018;6(1):1–13. Available from: <http://www.jaaps.aapsnet.org>
 212. Antoniou E, Margonis A, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Annals of Medicine and Surgery* [Internet]. 2016 [cited 2020 Oct 23];(11):9–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2016.07.019>

213. Cao Q, Lin Y, Yue C, Wang Y, Quan F, Cui X, et al. IL-6 deficiency promotes colitis by recruiting Ly6Chi monocytes into inflamed colon tissues in a CCL2-CCR2-dependent manner. *European Journal of Pharmacology*. 2021 Aug 5;904:174165.
214. Lin R, Chen H, Shu W, Sun M, Fang L, Shi Y, et al. Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Translational Medicine*. 2018 Dec 17;16(1).
215. Harmsen HJM, Pouwels SD, Funke A, Bos NA, Dijkstra G. Crohn's Disease Patients Have More IgG-Binding Fecal Bacteria than Controls. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Mar 17];19(4):515. Available from: /pmc/articles/PMC3318288/
216. MacPherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. Vol. 1, *Mucosal Immunology*. 2008. p. 11–22.
217. Bauché D, Marie JC. Transforming growth factor β : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clinical & Translational Immunology* [Internet]. 2017 Apr 7 [cited 2022 Apr 17];6(4):e136. Available from: /pmc/articles/PMC5418590/
218. Tokuyama H, Tokuyama Y. The Regulatory Effects of All-trans-Retinoic Acid on Isotype Switching: Retinoic Acid Induces IgA Switch Rearrangement in Cooperation with IL-5 and Inhibits IgG1 Switching. *Cellular Immunology*. 1999 Feb 25;192(1):41–7.
219. Wilmore JR, Gaudette BT, Gomez Atria D, Hashemi T, Jones DD, Gardner CA, et al. Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host and Microbe*. 2018 Mar 14;23(3):302-311.e3.
220. Grusby MJ, Berton MT, Linehan LA, Warren WD, Thompson PA. Gene Transcription and Switch Recombination STAT6 Is Required for IL-4-Induced Germline Ig. *Journal of Immunology* [Internet]. 1998;161(1):302–10. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/161/1/302>
221. Dissanayake S, Khan N, Shahin A, Wijesinghe S, Lukic M. Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates. *Immunology* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2022 Feb 13];107(4):411–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2567.2002.01519.x>
222. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon- γ -dependent switching of IgG alloantibody subclass. *European Journal of Immunology* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2022 Feb 13];26(6):1217–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830260605>
223. Zhang Y, Dominguez-Medina C, Cumley NJ, Heath JN, Essex SJ, Bobat S, et al. IgG1 Is Required for Optimal Protection after Immunization with the Purified Porin OmpD from *Salmonella Typhimurium*. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2022 Mar 18];199(12):4103. Available from: /pmc/articles/PMC5713499/
224. Benckert J, Schmolka N, Kreschel C, Zoller MJ, Sturm A, Wiedenmann B, et al. The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *The Journal*

- of Clinical Investigation [Internet]. 2011 May 2 [cited 2022 Mar 17];121(5):1946. Available from: [/pmc/articles/PMC3083800/](#)
225. Greenstein AJ, Sachar DB, Mann D, Lachman P, Heimann T, Aufses AH, et al. Spontaneous free perforation and perforated abscess in 30 patients with Crohn's disease. *Annals of Surgery*. 1987;205(1):72.
 226. Kambouri K, Gardikis S, Agelidou M, Vaos G. Local peritonitis as the first manifestation of Crohn's disease in a child. *J Indian Assoc Pediatr Surg*. 2014;19(2):100.
 227. Desai J, Elnaggar M, Hanfy AA, Doshi R. Toxic Megacolon: Background, Pathophysiology, Management Challenges and Solutions. *Clinical and Experimental Gastroenterology* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 19];13:203. Available from: [/pmc/articles/PMC7245441/](#)
 228. Walker Dinesh Goswami EG, Rubio AJ, Mata J, Munoz S, Gallegos A, Goswami DG, et al. Large Peritoneal Macrophages and Transitional Premonocytes Promote Survival during Abdominal Sepsis. *Immunohorizons* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Mar 17];5(12):994–1007. Available from: <https://www.immunohorizons.org/content/5/12/994>
 229. Fabrick BO, Bruggen R van, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* [Internet]. 2009 Jan 22 [cited 2022 Mar 15];113(4):887–92. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/113/4/887/25016/The-macrophage-scavenger-receptor-CD163-functions>
 230. Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, et al. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1984 [cited 2022 Mar 16];81(15 D):4917–21. Available from: <https://www.pnas.org>
 231. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunology*. 1999 Jul 1;60(7):562–7.
 232. Jurewicz MM, Stern LJ. Class II MHC Antigen Processing in Immune Tolerance and Inflammation. *Immunogenetics* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Mar 16];71(3):171. Available from: [/pmc/articles/PMC6377339/](#)
 233. Buxadé M, Encabo HH, Riera-Borrull M, Quintana-Gallardo L, López-Cotarelo P, Tellechea M, et al. Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2018 Nov 5 [cited 2022 Jan 18];215(11):2901–18. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20180314>
 234. Tellechea M, Buxadé M, Tejedor S, Aramburu J, López-Rodríguez C. NFAT5-Regulated Macrophage Polarization Supports the Proinflammatory Function of Macrophages and T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Mar 16];200(1):305–15. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/200/1/305>
 235. Kim KW, Williams JW, Wang YT, Ivanov S, Gilfillan S, Colonna M, et al. MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating

- monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2016 Sep 19 [cited 2022 Mar 16];213(10):1951. Available from: [/pmc/articles/PMC5030807/](#)
236. Bodel PT, Nichols BA, Bainton DF. Differences in peroxidase localization of rabbit peritoneal macrophages after surface adherence. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 1978 [cited 2022 Mar 21];91(1):107. Available from: [/pmc/articles/PMC2018168/?report=abstract](#)
 237. Warnock ML, Sniezek M, Shellito J. Endogenous Peroxidase Activity as a Marker of Macrophage Renewal During BCG-Induced Inflammation in the Rat Lung. *American Journal of Pathology*. 1987;128(1).
 238. Sulowicz W, Pawlicki R, Hanicki Z, Cichocki T. Peroxidase Activity in Peritoneal Macrophages of Patients with Terminal Renal Failure Treated by Intermittent Peritoneal Dialysis. *Nephron* [Internet]. 1990 [cited 2022 Mar 16];54(3):229–33. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/185860>
 239. Wang S, Liu K, Seneviratne CJ, Li X, Cheung GSP, Jin L, et al. Lipoteichoic acid from an *Enterococcus faecalis* clinical strain promotes TNF- α expression through the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways in differentiated THP-1 macrophages. *Biomedical Reports*. 2015;3(5):697–702.
 240. Tawaratsumida K, Furuyashiki M, Katsumoto M, Fujimoto Y, Fukase K, Suda Y, et al. Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2009 Apr 3 [cited 2022 Mar 17];284(14):9147. Available from: [/pmc/articles/PMC2666565/](#)
 241. Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, Verdino P, Ainge GD, Larsen DS, et al. Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 Oct 22 [cited 2022 Mar 17];4(10). Available from: [/pmc/articles/PMC2760212/](#)
 242. Zou J, Shankar N. Surface protein Esp enhances pro-inflammatory cytokine expression through NF- κ B activation during enterococcal infection. *Innate Immunity* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Feb 8];22(1):31–9. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753425915611237>
 243. Vogel SN, Fenton MJ, Schilling D, Thomas K, Nixdorff K. IL-6 Expression in Macrophages Adapter-Like (Mal) Contribute to Maximal (TIRAP)/Myeloid Differentiation Protein 88 Domain-Containing Adapter Protein Toll-Like Receptor 4 and Toll-IL-1 Receptor. *J Immunol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Feb 8];169:5874–80. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/169/10/5874><http://www.jimmunol.org/content/169/10/5874.full#ref-list-1>
 244. Demirel I, Vumma R, Mohlin C, Svensson L, Säve S, Persson K. Nitric Oxide Activates IL-6 Production and Expression in Human Renal Epithelial Cells. *American Journal of Nephrology* [Internet]. 2012 Dec [cited 2022 Feb 8];36(6):524–30. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/345351>

245. Yimin, Kohanawa M. A Regulatory Effect of the Balance between TNF- α and IL-6 in the Granulomatous and Inflammatory Response to *Rhodococcus aurantiacus* Infection in Mice. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2022 Jan 21];177(1):642–50. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/177/1/642>
246. Saleh MM, Frisbee AL, Leslie JL, Buonomo EL, Cowardin CA, Ma JZ, et al. Colitis-Induced Th17 Cells Increase the Risk for Severe Subsequent *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host & Microbe*. 2019 May 8;25(5):756-765.e5.
247. Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, et al. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 1995 [cited 2022 Mar 18];39(6):1336. Available from: </pmc/articles/PMC162737/?report=abstract>
248. Kawabe T, Suzuki N, Yamaki S, Sun SL, Asao A, Okuyama Y, et al. Mesenteric lymph nodes contribute to proinflammatory Th17-cell generation during inflammation of the small intestine in mice. *European Journal of Immunology* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Mar 18];46(5):1119–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201545907>
249. Kawabe T, Sun S lan, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, et al. Homeostatic Proliferation of Naive CD4 + T Cells in Mesenteric Lymph Nodes Generates Gut-Tropic Th17 Cells . *The Journal of Immunology*. 2013 Jun 1;190(11):5788–98.
250. Teramoto K, Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Watanabe C, Inamura T, et al. Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLARC/CCL20 in DSS-induced mice colitis. *Clinical and Experimental Immunology* [Internet]. 2005 Mar [cited 2022 Mar 18];139(3):421. Available from: </pmc/articles/PMC1809314/>
251. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2017 Jul 1;4(1):33–46.
252. Zocco MA, Verme LZD, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2021 Oct 13];23(11):1567–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2036.2006.02927.x>
253. Bauer TM, Fernández J, Navasa M, Vila J, Rodés J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *Journal of Hepatology* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2021 Oct 12];36(4):501–6. Available from: <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S01682780200003X/fulltext>
254. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*. 1999 Sep 1;117(3):577–83.
255. Girgin F, Muha OK. Effects of Trimetazidine on Oxidant/Antioxidant Status in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Chronic Colitis. *Journal of Toxicology and*

- Environmental Health, Part A [Internet]. 2000 Apr 28 [cited 2021 Oct 12];59(8):641–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/009841000156637>
256. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2007 Jul;41(1):18–26.
257. Kühl AA, Erben U, Kredel LI, Siegmund B. Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2015;0(DEC):613.
258. Watanabe N, Ikuta K, Okazaki K, Nakase H, Tabata Y, Matsuura M, et al. Elimination of local macrophages in intestine prevents chronic colitis in interleukin-10-deficient mice. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2021 Oct 13];48(2):408–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12643623/>
259. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2021 Oct 13];115(2):357–69. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508598702021/fulltext>
260. Feagins LA. Role of transforming growth factor- β in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Inflammatory Bowel Diseases* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2021 Oct 12];16(11):1963–8. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/16/11/1963/4628300>
261. Marlow GJ, Gent D van, Ferguson LR. Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn's disease patients. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2013 Jul 7 [cited 2021 Oct 13];19(25):3931–41. Available from: <https://www.wjnet.com/1007-9327/full/v19/i25/3931.htm>
262. Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2021 Oct 13];117(10):3097–106. Available from: <http://www.jci.org>Volume
263. Hove T ten, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, et al. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF- α production in mice. *Gastroenterology*. 2001 Dec 1;121(6):1372–9.
264. Gregoret V, Perezlindo MJ, Vinderola G, Reinheimer J, Binetti A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiology*. 2013 May 1;34(1):19–28.
265. Inic-Kanada A, Stojanovic M, Marinkovic E, Becker E, Stein E, Lukic I, et al. A Probiotic Adjuvant *Lactobacillus rhamnosus* Enhances Specific Immune Responses after Ocular Mucosal Immunization with Chlamydial Polymorphic Membrane Protein C. *PLOS ONE* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Oct 13];11(9):e0157875. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157875>

266. Kaplan JL, Shi HN, Walker WA. The Role of Microbes in Developmental Immunologic Programming. *Pediatric Research* [Internet]. 2011 Jun [cited 2021 Oct 13];69(6):465–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2011102>
267. al Nabhani Z, Dulauroy S, Marques R, Cousu C, al Bounny S, Déjardin F, et al. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity* [Internet]. 2019 May 21 [cited 2022 Apr 30];50(5):1276-1288.e5. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761319300810/fulltext>
268. Flemer B, Gaci N, Borrel G, Sanderson IR, Chaudhary PP, Tottey W, et al. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes* [Internet]. 2017 Sep 3 [cited 2021 Oct 12];8(5):428–39. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19490976.2017.1334033>
269. Saliganti V, Kapila R, Kapila S. Consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC: 5897) containing fermented milk plays a key role in development of the immune system in newborn mice during the suckling–weaning transition. *Microbiology and Immunology* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Oct 13];60(4):261–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1348-0421.12342>
270. Gueimonde M, Sakata S, Kalliomäki M, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus GG* on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2006;42(2):166–70.
271. Duranti S, Gaiani F, Mancabelli L, Milani C, Grandi A, Bolchi A, et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiology Ecology* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Oct 12];92(12):fiw191. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/92/12/fiw191/2570427>
272. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1992 Jan 1 [cited 2021 Oct 12];55(1):299S-308S. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/55/1/299S/4715344>
273. Dong P, Yang Y, Wang W ping. The role of intestinal bifidobacteria on immune system development in young rats. *Early Human Development* [Internet]. 2010;86(1):51–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.002>
274. Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clinical & Experimental Allergy* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2021 Oct 13];39(12):1842–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2222.2009.03326.x>
275. Ghadimi D, Helwig U, Schrezenmeir J, Heller KJ, de Vrese M. Epigenetic imprinting by commensal probiotics inhibits the IL-23/IL-17 axis in an in vitro model of the intestinal mucosal immune system. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Mar 22];92(4):895–911. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730546/>

276. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell* [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2021 Oct 12];158(4):705–21. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867414008216/fulltext>
277. Karimi K, Kandiah N, Chau J, Bienenstock J, Forsythe P. A *Lactobacillus rhamnosus* Strain Induces a Heme Oxygenase Dependent Increase in Foxp3+ Regulatory T Cells. *PLOS ONE* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2022 Apr 16];7(10):e47556. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047556>
278. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ccedia M, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clinical & Experimental Allergy* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2022 Apr 16];40(5):811–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2222.2009.03437.x>
279. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):121–41.
280. Hu L, Jin L, Xia D, Zhang Q, Ma L, Zheng H, et al. Nitrate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by regulating the homeostasis of the intestinal microbiota. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020 May 20;152:609–21.
281. Horuluoglu BH, Kayraklioglu N, Tross D, Klinman D. PAM3 protects against DSS-induced colitis by altering the M2:M1 ratio. *Scientific Reports* [Internet]. 2020 Apr 8 [cited 2022 Apr 16];10(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-63143-z>
282. Kimoto-Nira H, Suzuki C, Kobayashi M, Sasaki K, Kurisaki JI, Mizumachi K. Anti-ageing effect of a lactococcal strain: Analysis using senescence-accelerated mice. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(6):1178–86.
283. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* (1979) [Internet]. 2016 Apr 22 [cited 2022 Apr 16];352(6284):427. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aaf1098>
284. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2020 Mar 4 [cited 2022 Apr 16];20(6):375–88. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0285-6>
285. Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell Host & Microbe*. 2012 Aug 16;12(2):223–32.
286. Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe* [Internet]. 2011 May 19 [cited 2022 Apr 16];9(5):355–61. Available from: <http://www.cell.com/article/S1931312811001284/fulltext>

287. Licciardi P v., Wong SS, Tang MLK, Karagiannis TC. Epigenome targeting by probiotic metabolites. *Gut Pathogens* [Internet]. 2010 Dec 21 [cited 2022 Apr 16];2(1):1–5. Available from: <https://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-2-24>

8. BIOGRAFIJA

Veljko Blagojević rođen je 17.01.1988. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu, a školske 2006/2007. godine upisao je osnovne akademske studije - studijski profil diplomirani biolog, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,53 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Školske 2013/2014. godine upisao je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Modul: Imunobiologija.

Od februara 2014. godine je zaposlen kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik u Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“.

U periodu 2013-2019. godine učestvovao je u realizaciji projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena (OI175050, MPNTR RS), oblast Medicina, pod rukovodstvom dr Gordane Lepsavić, redovnog profesora na Katedri za patobiologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon toga, u periodu 2020-2021. godine, istraživački rad Veljka Blagojevića je finansiran na osnovu Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO između Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu Veljko Blagojević je kao autor ili koautor objavio 14 radova, i to 6 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), 7 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22) i 1 rad u međunarodnom časopisima (kategorije M23). Na skupovima međunarodnog značaja učestvovao je sa 5 saopštenja, a na skupu nacionalnog značaja sa 4 saopštenja.

9. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Вељко Благојевић

Број индекса Б3029/2013

Изјављујем

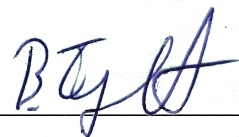
да је докторска дисертација под насловом

Фенотипске карактеристике перитонеалних макрофага два соја пацова током развоја инфламаторног одговора: значај представника цревне микробиоте

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

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вељко Благојевић
Број индекса Б3029/2013
Студијски програм Имунобиологија
Наслов рада Фенотипске карактеристике перитонеалних макрофага два соја пацова током развоја инфламаторног одговора: значај представника цревне микробиоте
Ментор др Станислава Станојевић

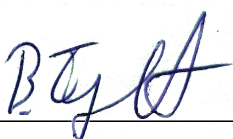
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.



Изјава о коришћењу

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

Фенотипске карактеристике перитонеалних макрофага два соја пацова током развоја инфламаторног одговора: значај представника цревне микробиоте
која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.06.2022.



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

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

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

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

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

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