

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dušanka D. Popović

**ULOGA MIKROBIOTE PLUĆA I CREVA U
IMUNSKOM ODGOVORU NA *ASPERGILLUS
FUMIGATUS* KOD DARK AGOUTI I ALBINO
OXFORD SOJEVA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dušanka D. Popović

**THE ROLE OF LUNG AND GUT
MICROBIOTA IN THE IMMUNE RESPONSE
TO *ASPERGILLUS FUMIGATUS* IN DARK
AGOUTI AND ALBINO OXFORD RAT
STRAINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTORI:

Dr Maja Tolinački, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo”, Univerzitet u Beogradu

Dr Branko Jovčić, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Jelena Lozo, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Svetlana Soković Bajić, naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena Kulaš, naučni saradnik

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

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Posvećeno mojoj deci. Dimitrije i Darija, voli vas mama najviše na svetu.

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za ekologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u saradnji sa Laboratorijom za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Koristim ove stranice i da se zahvalim:

Dr Maji Tolinački, mom mentoru, na pruženom znanju, a nadasve nesebičnom zalaganju i bezuslovnoj podršci kroz sve ove godine. Majče moja, hvala ti za sve prošlo i buduće.

Prof. dr Branku Jovčiću, na konstruktivnim razgovorima i najboljim savetima tokom izrade ove teze. Zahvalana sam što imam priliku da učim od tebe.

Prof. dr Jeleni Lozo, na podršci tokom svih ovih godina. I hvala na tome što je svaki naš razgovor bio nova doza optimizma.

Dr Svetlani Soković Bajić, mojoj Ceci, jer su njena pedantnosti i znanje dali neprocenljiv doprinos ovoj disertaciji.

Dr Jeleni Kulaš, čija staloženost je čini mojim omiljenim rad(t)nim drugom, dok je svaki eksperiment „piece of cake“.

Dr Ivani Mirkov, na prenesenom znanju i ogromnoj pomoći prilikom izrade disertacije, kao i na strpljenu tokom svih ovih godina. Zbog nje ponosno stojim iza svojih rezultata.

Mojim dragim kolegicama: dr Aleksandri Popov Aleksandrov, Anastasiji Malešević i dr Dini Tucović, čija nesebična pomoć je ovu doktorsku tezu učinila lako dostižnom. Hvala im i na svim nenaučnim temama i najslađim jutarnjim kafama.

*Dr Jasmini Glamočliji, zahvaljujući kojoj je gljiva *A. fumigatus* „ušla“ u moj laboratorijski život. Hvala za svo pruženo znanje prilikom praktične i teorijske izrade teze.*

Dr Nikoli Popoviću, koji je uvek tu kad treba, pomoć i podrška i razlog zbog kog se smejem do suza.

Mojoj Emi sa kojom je rad jednako lep i zabavan a druženje poseban užitak.

Mici i Kaći na divnim zajedničkim trenucima i nezaboravnim noćima u Rimu.

Dr Amareli Terzić-Vidojević, dragoj Amarelici koja me je približila svetu mikrobiologije i zbog koje početke rada na institutu pamtim kao najlepše.

Dr Nataši Golić, dragoj Nati, na korisnim savetima i pruženoj prilici da budem deo tima, a posebno hvala na bezrezervnoj podršci sve ove godine.

Dragom Dušanu, koji reši svaku moju nedoumicu i čija pomoć mi je bila od neprocenjivog značaja.

Kaćici i Milkici, Mini i Jeleni Đ. na saosećanju i razumevanju, uvek je lepo biti u vašem društvu.

Ostalim dragim kolegama iz lab 06, lab 09 i lab 66, na tome što mi samo osmeh izmame.

Dragom kolegi Blagoju Murganiću na divnom druženju i prijatnim razgovorima.

Mojim „Ženskicama“, mojim zvezdicama, uz vas je život pesma.

Mom tati, mojoj mami i bratu, srećna sam što vas imam.

Mom Branku, volim te.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Pešić, koja mi je te davne 2009. godine otvorila vrata instituta i bez čije nesebične pomoći verovatno ne bih bila gde sam sada.

ULOGA MIKROBIOTE PLUĆA I CREVA U IMUNSKOM ODGOVORU NA *ASPERGILLUS FUMIGATUS* KOD DARK AGOUTI I ALBINO OXFORD SOJEVA PACOVA

SAŽETAK

Bakterijska mikrobiota prisutna u organima uključena je u fiziološke (održavanje homeostaze) i patofiziološke procese (utiče na ishod bolesti) kako lokalno, tako i u udaljenim organima. Uticaj mikrobiote creva na imunske reakcije u plućima je dobro okarakterisan, ali malo je podataka o uticaju inflamacije u plućima na mikrobiotu u samim plućima, ali i u crevima. Upotrebom metode sekvenciranja najnovije generacije ispitane su promene u bakterijskoj mikrobioti pluća i creva kod jedinki dva soja pacova Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) (za koje je pokazano da ispoljavaju kvantitativno različit imunski odgovor na isti stimulus) kod kojih je infekcija pluća izazvana sa *A. fumigatus*. Bakterijska mikrobiota pluća zdravih jedinki ova dva soja se ne razlikuje, ali su u crevima primećene razlike u sastavu. Kod oba soja dolazi do disbioze u plućima nakon infekcije sa *A. fumigatus*, koja je verovatno posledica imunskog odgovora na gljivu (povećanje IFN- γ , IL-17 i MPO kod oba soja) i oksidativnog stresa (kod DA pacova). Tokom infekcije pluća javlja se inflamacija i oksidativni stres i u crevima kod oba soja, ali disbioza u crevima je primećena samo kod DA pacova. Narušavanje ravnoteže bakterijske mikrobiote samo u crevima (primenom antibiotika) dovodi do povećanja osetljivosti oba soja na infekciju sa *A. fumigatus*. Kod jedinki koje su pre infekcije pile antibiotike zapaža se veći stepen aktivacije ćelija limfnih čvorova pluća (Th1 i Treg ćelija kod DA, Th17 ćelija kod AO) i inflamacija u tkivu pluća (povećanje IL-1 β i IL-17) samo kod DA. Ovi rezultati doprinose saznanjima o ulozi mikrobiote creva i pluća tokom infekcije pluća i ukazuju na potencijalne mehanizme dvosmerne komunikacije između ovih organa.

Ključne reči: Mikrobiota pluća i creva, DA i AO pacovi, inflamacija, oksidativni stres, antibiotici, *Aspergillus fumigatus*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija prokariota

UDK broj: [582.28]:[611.24+ 591.434]: 612.017]:604.4:615.33

THE ROLE OF LUNG AND GUT MICROBIOTA IN THE IMMUNE RESPONSE TO *ASPERGILLUS FUMIGATUS* IN DARK AGOUTI AND ALBINO OXFORD RAT STRAINS

ABSTRACT

Bacterial microbiota is involved in physiological (maintenance of homeostasis) and pathophysiological processes (associated with disease outcome) both locally and in distant organs. The influence of gut microbiota on immune responses in the lungs is well characterized, but there is little data on the effect of lung inflammation on both lung and gut microbiota. Using the Next generation sequencing method, changes in the bacterial microbiota of the lungs and gut were examined in two rat strains, Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO) (shown to exhibit a quantitatively different immune response to the same stimulus) in which lung infection was caused by the fungus *A. fumigatus*. The lung microbiota between healthy DA and AO rat strains does not differ, but differences in the gut microbiota composition were observed. After infection with *A. fumigatus* dysbiosis was noted in the lungs of both strains, which is probably the result of immune response to the fungus (increased IFN- γ , IL-17 and MPO in both strains) and oxidative stress (in DA rats). During lung infection, inflammation and oxidative stress were noted in the gut of both strains, but dysbiosis only in DA rats. Gut microbiota disturbance limited to the intestines only (using antibiotics) in both strains, leads to an increased risk of infection with *A. fumigatus*. Only in DA animals who received antibiotics before infection, a higher lung lymph node cell activation (Th1 and Treg cells in DA, Th17 cells in AO) and lung tissue inflammation (an increase of IL-1 β and IL-17) were observed. These results contribute to knowledge about the role of gut and lung microbiota during lung infection and indicate potential mechanisms of bidirectional communication between these organs.

Key words: Lung and gut microbiota, DA and AO rat strains, inflammation, oxidative stress, antibiotics, *Aspergillus fumigatus*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of prokaryotes

UDC number: [582.28]:[611.24+ 591.434]: 612.017]:604.4:615.33

SADRŽAJ

UVOD	1
1.1 Mikrobiota-definicija i značaj	1
1.2. Bakterijska mikrobiota creva i pluća.....	2
1.2.1. Bakterijski sastav gastrointestinalnog trakta	2
1.2.2. Bakterijska mikrobiota respiratornih organa.....	4
1.3. Uloga mikrobiote u održavanju homeostaze	5
1.4. Bakterijska mikrobiota u bolesti.....	6
1.4.1. Uloga mikrobiote creva u razvoju plućnih bolesti (osa crevo-pluća)	7
1.4.2. Uloga inflamacije u plućima u nastanku crevne disbioze (osa pluća-crevo)	9
1.5. Gljiva <i>Aspergillus</i> spp.	10
1.5.1. Osnovne karakteristike gljive.....	10
1.5.2. Urođeni i adaptivni imunski odgovor na gljivu <i>A. fumigatus</i>	11
1.5.3. Mikrobiota creva i pluća tokom infekcije izazvane gljivom <i>A. fumigatus</i>	12
2.CILJ RADA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Eksperimentalne životinje	15
3.2. Uspostavljanje infekcije oportunističkom gljivom <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
3.3. Prikupljanje periferne krvi i uzorkovanje organa pluća i creva	15
3.4. Kvantitativna kultura gljive.....	16
3.5. Obrada tkiva, merenja sadržaja citokina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite	16
3.5.1. Priprema homogenata.....	16
3.5.2. Merenje koncentracije proteina	16
3.5.3. Merenje aktivnosti enzima katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)	17
3.5.4. Merenje aktivnosti enzima glutation S transferaze (GST, EC 2.5.1.18).....	17
3.5.5. Merenje redukovanog glutationa (GSH)	17
3.5.6. Određivanje količine lipidnih peroksida	17
3.5.7. Procena aktivnosti enzima mieloperoksidaze (MPO, E.C.1.11.1.7).....	18
3.6. Određivanje sadržaja citokina imunoenzimskim testom na čvstoj fazi (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	18
3.7. Izolovanje ukupne RNK, reakcija reverzne transkripcije i kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	18

3.7.1. Izolovanje ukupne RNK.....	18
3.7.2. Reakcija reverzne transkripcije (RT)	19
3.7.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-time qPCR)	19
3.8. Izolovanje bakterijske DNK i metagenomska analiza iz uzoraka pluća i creva	20
3.8.1. Izolovanje ukupne DNK.....	20
3.8.2. Gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu (engl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).....	20
3.8.3. Sekvenciranje V3-V4 regiona gena za 16S rRNK metagenomske DNK korišćenjem sekvencera najnovije generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS)	20
3.9. Statistička obrada rezultata.....	21
4. REZULTATI.....	22
4.1. Ispitivanje sastava bakterijske mikrobiote u plućima i crevima kod zdravih (netretiranih/neinficiranih) jedinki pacova.....	22
4.1.1. Sastav bakterijske mikrobiote u plućima dva soja pacova	22
4.1.2. Sastav bakterijske mikrobiote u crevima dva soja pacova	25
4.2. Ispitivanje promena mikrobiote u plućima i crevima tokom infekcije pluća izazvane gljivom <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
4.2.1. Promene mikrobiote pluća nakon infekcije izazvane gljivom	30
4.2.2. Promene mikrobiote creva nakon infekcije pluća izazvane infekcijom sa <i>A. fumigatus</i>	37
4.2.3. Mehanizmi komunikacije između pluća i creva.....	43
4.2.3.1. Migracija bakterija između organa.....	43
4.2.3.2. Sistemska inflamacija.....	43
4.2.3.3. Inflamacija u gastrointestinalnom traktu.....	45
4.3. Ispitivanje efekta smeše antibiotika na mikrobiotu pluća i creva	47
4.3.1. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu pluća	48
4.3.2. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu creva	49
4.3.3. Efekat primene antibiotika na imunsku homeostazu.....	51
4.4. Ispitivanje uticaja disbioze izazvane antibioticima na odgovor organizma tokom pulmonarne infekcije sa <i>A. fumigatus</i>	55
4.4.1. Karakteristike imunskog odgovora na gljivu <i>A. fumigatus</i> kod jedinki tretiranih antibioticima	55
4.4.2. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu pluća kod inficiranih jedinki	58

4.4.3.Efekat primene antibiotika na mikrobiotu creva kod inficiranih jedinki	59
5.DISKUSIJA	62
5.1. Sastav bakterijske mikrobiote u plućima i crevima kod netretiranih/neinficiranih jedinki DA i AO pacova.....	62
5.2. Ispitivanje promena mikrobiote pluća tokom pulmonarne infekcije izazvane gljivom A. fumigatus	63
5.3. Ispitivanje promena mikrobiote creva tokom pulmonarne infekcije izazvane gljivom A. fumigatus	65
5.4. Efekat smeše antibiotika na mikrobiotu pluća i creva.....	66
5.5. Efekat primene antibiotika na inflamaciju u plućima	67
6. ZAKLJUČCI	69
7. LITERATURA	70

1. UVOD

1.1 Mikrobiota-definicija i značaj

Pojam mikrobiota po prvi put su uveli mikrobiolozi Lederberg i McCray 2001. godine, ukazujući na značaj mikroorganizama koji naseljavaju ljudsko telo u zdravlju i bolesti (Lederberg i drugi, 2001). Ova grupa mikroorganizama definisana je kao zajednica sastavljena od bakterija, arhea, gljiva i virusa, koji žive zajedno u jednoj ekološkoj niši (Ogunrinola i drugi, 2020). U zavisnosti od regiona na domaćinu, deli se na mikrobiotu creva, pluća, oralnu, vaginalnu i mikrobiotu kože. Iako svaka grupa mikroorganizama ostvaruje svoj uticaj na domaćina, najviše je ispitivana bakterijska mikrobiota, posebno u crevima, kao i njen uticaj na zdravlje i bolest domaćina. Odnos koji mikrobna zajednica ostvaruje sa domaćinom se može definisati kao mutualistički (obostrana korist), komensalni (bez štetnog uticaja po domaćina) ili parazitski (korist na štetu domaćina).

Uspostavljanje mikrobiote započinje veoma rano, prema novim saznanjima već u materici majke, iako se dugo smatralo da je takva sredina sterilna (Wang i drugi, 2018). Molekularnim metodama je dokazano prisustvo bakterija u placenti, amniotskoj tečnosti, membrani fetusa i pupčanoj vrpici (Aagaard i drugi, 2014; Jiménez i drugi, 2005; Rautava i drugi, 2012; Steel i drugi, 2005). Odmah po rođenju, bakterije koje vode poreklo od majke i iz spoljašnje sredine, kolonizuju kožu i mukozna tkiva i njihov sastav je prilično ujednačen, ali se veoma brzo diferencira u mikrobiotu specifičnu za organe (Chu i drugi, 2017). Na sastav mikrobne zajednice, pored anatomskog mesta, mogu uticati i drugi faktori kao što su genotip domaćina, način ishrane, higijena, starenje, cirkadijalni ritam, hormonski status, i drugi. (Mariat i drugi, 2009; Kaczmarek i drugi, 2017; Cauci i drugi, 2002; Dekaboruah i drugi, 2020).

Kao što faktori domaćina utiču na sastav mikrobiote, tako i mikrobna zajednica nekog organa može uticati na različite fiziološke procese domaćina. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je bakterijska mikrobiota gastrointestinalnog trakta uključena u procese kao što su varenje hrane, sinteze vitamina, održavanja crevne barijere, odbrane od patogena, itd. (Hillman i drugi, 2017). Brojne metagenomske studije su pokazale da postoji korelacija u brojnosti i diverzitetu mikrobiote organa između zdravih i obolelih jedinki, što ukazuje na vezu mikrobiote i nekih patoloških stanja (Dekaboruah i drugi, 2020). U normalnim fiziološkim uslovima ova zajednica teži homeostazi (DeGruttola i drugi, 2016). Međutim, upotreba antibiotika, način ishrane, poremećen odnos komensala sa domaćinom mogu dovesti do brojnih poremećaja sa dugoročnim posledicama po zdravlje domaćina (Ruff i drugi, 2020; Zheng i drugi, 2020). Iako najnovije naučne studije pokušavaju da povežu određeni sastav mikrobne zajednice sa zdravstvenim stanjem domaćina, kompleksnost ove interakcije ukazuje na činjenicu da poremećaji ravnoteže nisu rezultat jednog činioca, već rezultat promene balansa većeg broja faktora (Belkaid i drugi, 2014). Uticaj bakterijske mikrobiote na zdravlje jedinki je posredovan imunskim sistemom jer je pokazano da sastav mikrobiote creva doprinosi pravilnom sazrevanju imunskog sistema domaćina (Zheng i drugi, 2020). Pokazano je da kod jedinki laboratorijskih sojeva miševa koje nisu kolonizovane mikrobiotom (*engl.* germ-free) nije došlo do sazrevanja imunskog sistema (Round i Mazmanian, 2009). Dodatno, mikrobna zajednica nekog organa može uticati i na aktivnost komponenti urođene i stečene imunosti (Belkaid i drugi, 2014). Pored efekta na okolno tkivo, mikrobiota može ispoljavati efekte i na udaljene organe. Bakterijska mikrobiota creva (koja je najviše ispitivana) uspostavlja komunikaciju sa udaljenim organima, poput kože, mozga ili pluća, preko neuralnih, endokrinih, humoralnih, imunoloških i

metaboličkih puteva (Afzaal i drugi, 2022). Interakcija između creva i pluća poznatija je kao osa crevo-pluća (*engl.* gut-lung axis).

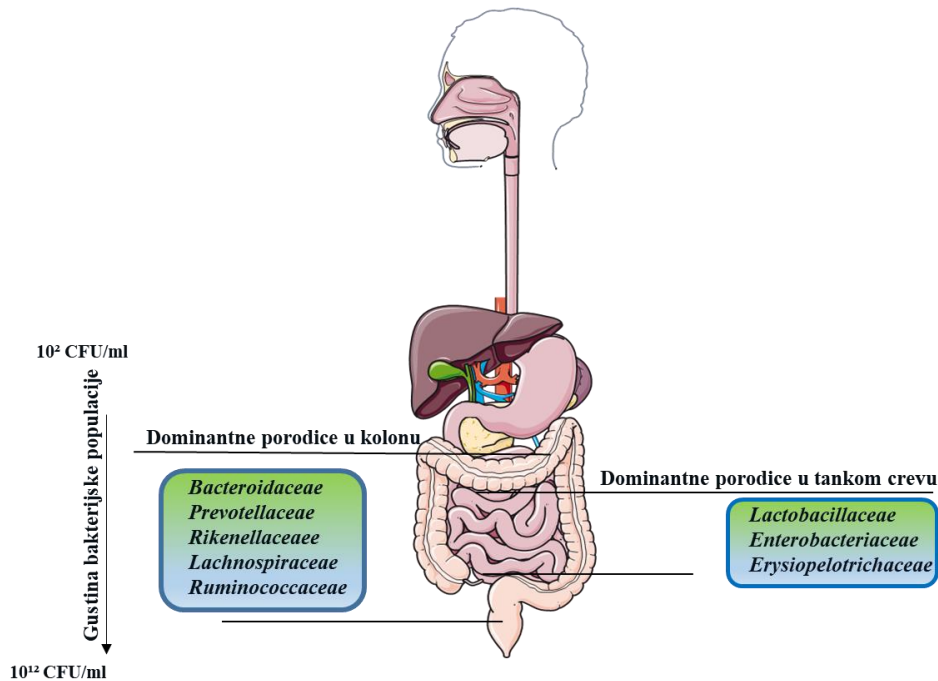
1.2. Bakterijska mikrobiota creva i pluća

Iako su pluća i creva dva prostorno udaljena organa, sa značajnim razlikama, ipak dele neke strukturne i funkcionalne sličnosti. Gastrointestinalni i respiratorni sistem imaju isto embrionalno poreklo (nastaju od endoderma) i zajednički početni deo (usna duplja i ždrelo) preko kojih različiti ksenobiotici dospevaju u organizam. Povezanost creva i pluća omogućava migraciju mikrobiote između ova dva organa (gutanje bronhijalnog ekskreta, mikroaspiracija, gastroezofagealni refluks) (Budden i drugi, 2017). Jednoslojni epitel koji predstavlja fizičku, hemijsku i fiziološku barijeru između organizma i spoljašnje sredine je karakterističan za oba organa (Invernizzi i drugi, 2020; Ali i drugi, 2020), dok peharaste ćelije prisutne u epitelu produkuju mukus i imunoglobulin A (IgA) (Budden i drugi, 2017). Respiratorni i gastrointestinalni sistem su deo zajedničkog mukoznog imunskog sistema (*engl.* Common Mucosal Immune System, CMIS) (Du i drugi, 2023) i, preko komponenti imunskog sistema, u stalnoj međusobnoj komunikaciji. Ono što je još zajedničko za ova dva organa je prisustvo mikrobiote.

1.2.1. Bakterijski sastav gastrointestinalnog trakta

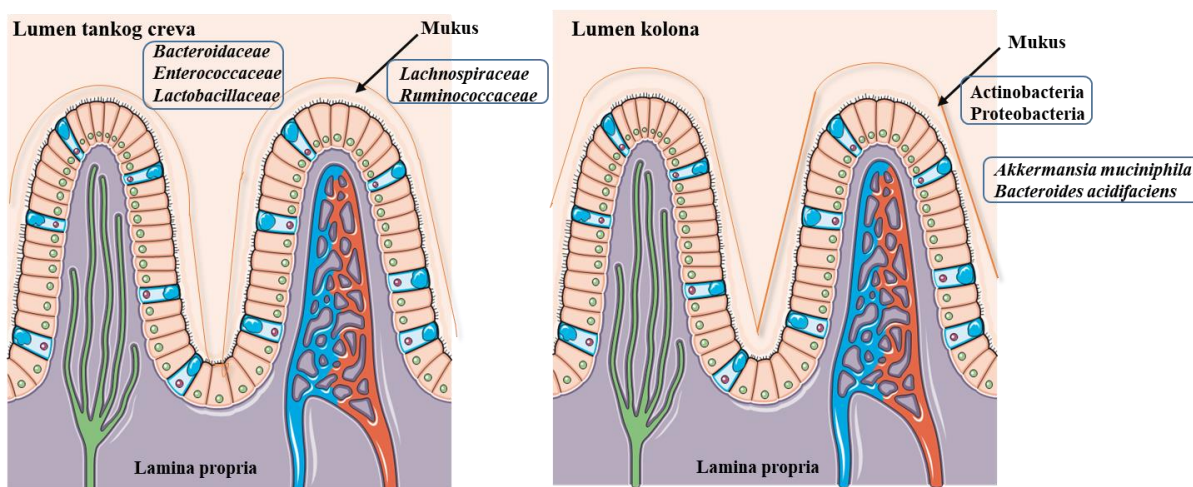
Gastrointestinalni trakt čoveka predstavlja jednu od najgušće naseljenih ekoloških niša, dok je koncentracija bakterija u kolonu čoveka procenjena na oko 10^{11} - 10^{12} bakterijskih ćelija/ml crevnog sadržaja (Ley i drugi, 2006). Mikrobiota creva ima višestruku ulogu kao što su sazrevanje imunskog odgovora, apsorpcija brojnih nutrijenata (masti, aminokiseline, žučne soli, vitamini i masne kiseline kratkog lanca (*engl.* Short Chain Fatty Acids, SCFAs)) (Rinninella i drugi, 2019). Takođe, mikrobiota doprinosi kontroli rasta patogeno posredovanoj kompeticijom za nutrijente i/ili proizvodnjom antimikrobnih peptida (Rinninella i drugi, 2019). Smatralo se da formiranje mikrobiote creva započinje rođenjem, a da je njen prvobitni sastav uslovljen načinom porođaja. Mikrobiota bebe rođene prirodnim putem po svom sastavu odgovara vaginalnoj mikrobioti majke, dok mikrobiota deteta rođenog carskim rezom odgovara mikrobioti kože majke i u određenim slučajevima mikrobioti kože medicinskog osoblja (Dominguez-Bello i drugi, 2010). Mikrobiota novorođenčeta prolazi kroz značajne promene u zastupljenosti bakterijskih taksona koje su praćene povećanjem diverziteta do treće godine kada se stabilizuje i počinje svojim sastavom da liči na mikrobiotu odraslog čoveka (Koenig i drugi, 2011). Iako relativno stabilna u odnosu na mikrobiotu drugih organa, mikrobiota creva čoveka se menja tokom godina (Odamaki i drugi, 2016) pod uticajem antibiotika, ishrane i starenjem (Rinninella i drugi, 2019). U bakterijskoj mikrobioti creva dominiraju predstavnici razdela (*lat.* phylum) Firmicutes i Bacteroidetes, koji su zastupljeni sa oko 90%, a prate ih predstavnici razdela Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria i Verrucomicrobiota (Rinninella i drugi, 2019). Razdeo Firmicutes, obuhvata preko 200 različitih rodova (*lat.* genus), od koji su najzastupljeniji *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* i *Ruminococcus*, sa rodom *Clostridium*, koji je u crevima zastupljen sa 95% (Rinninella i drugi, 2019). Rodovi *Bacteroides* i *Prevotella* su najdominantniji unutar razdela Bacteroidetes, dok je rod *Bifidobacterium* dominantan unutar razdela Actinobacteria (Rinninella i drugi, 2019). Sastav bakterijske zajednice kod sisara nije ujednačen celom dužinom gastrointestinalnog trakta s obzirom da uslovi unutrašnje sredine gastrointestinalnog trakta (gradijent pH, dostupnost nutrijenata, kao i aktivnost imunskog sistema) nisu uniformni (Donaldson i drugi, 2016) (Slika 1). Razlike u sastavu bakterijske

mikrobiote postoje duž longitudinalne ose (od usta do rektuma) (Tropini i drugi, 2017) pri čemu gustina i diverzitet bakterijskih taksona raste. Koncentracija bakterija u tankom crevu nije velika (sredina u kojoj su prisutni antimikrobni peptidi, žučne soli, gradijent kiseonika i kiseo pH) (Donaldson i drugi, 2016) i u njemu dominiraju fakultativni anaerobi koji pripadaju porodicama (*lat. familia*) *Lactobacillaceae* i *Enterobacteriaceae* (Donaldson i drugi, 2016). Suprotno tankom crevu, kolon je sredina koja se odlikuje manjom koncentracijom kiseonika i antimikrobnih peptida, sporijim tranzitom hrane. Ovakva sredina pogoduje rastu striktnih anaeroba sposobnim za metabolizam kompleksnih ugljenih hidrata. U kolonu su prisutne bakterije koje pripadaju porodicama *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* (Donaldson i drugi, 2016).



Slika 1. Sastav bakterijske zajednice u različitim segmentima gastrointestinalnog trakta. Slika je kreirana pomoću Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>).

Pored razlika u sastavu bakterijske mikrobiote duž longitudinalne ose, postoje i razlike duž poprečne ose, od mukoznog tkiva do lumena creva (Tropini i drugi, 2017, Donaldson i drugi, 2016) (Slika 2). Metagenomskom analizom bakterijske zajednice u tankom crevu miševa, pokazana je veća zastupljenost porodica *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* u mukoznom tkivu, za razliku od lumena creva u kome su bile zastupljene porodice *Bacteroidaceae*, *Enterococcaceae* i *Lactobacillaceae* (Nava i drugi, 2011). U kolonu čoveka veća zastupljenost bakterija koje pripadaju razdelu Actinobacteria i Proteobacteria uočena je u mukoznom tkivu u odnosu na lumen (Albenberg i drugi, 2014), kao i veće prisustvo bakterija koje razgrađuju mukus *Akkermansia muciniphila* i *Bacteroides acidifaciens* uočenih i kod čoveka i miševa (Berry i drugi, 2013). Povećana zastupljenost bakterija koje razgrađuju mukus zavisi i od tipa ishrane, pa tako ishrana siromašna vlaknima, povećava zastupljenost ovih bakterija (Paone i drugi, 2020).



Slika 2. Razlike u sastavu bakterijske mikrobiote od mukoznog tkiva do lumena creva. Slika je kreirana pomoću Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) prema Donaldson i drugi, 2016.

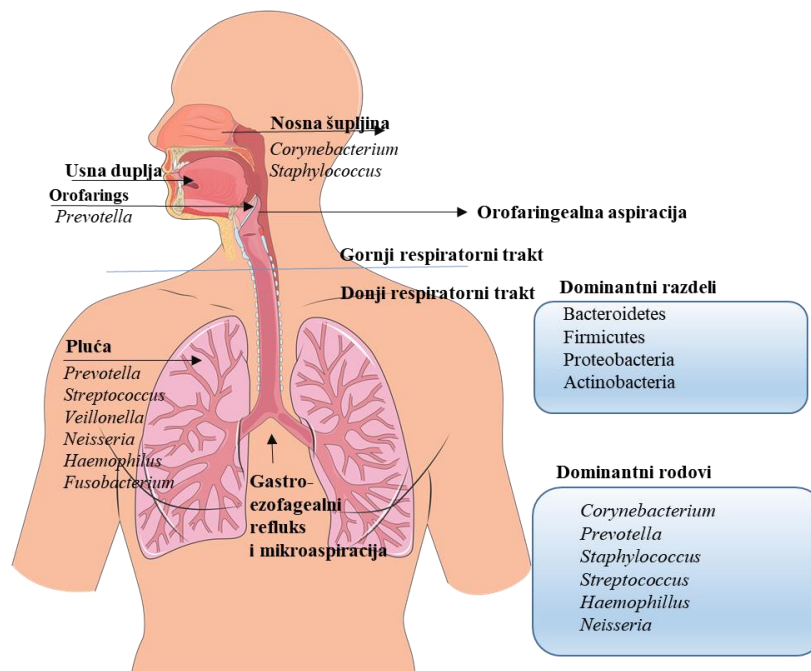
1.2.2. Bakterijska mikrobiota respiratornih organa

Za razliku od gastrointestinalnog trakta, mikrobiota respiratornih organa je mnogo manje ispitana. Zbog nedostatka mikrobioloških metoda za kultivaciju teško kultivabilnih bakterija, pluća su dugo smatrana za sterilan organ, ali je razvoj metode sekvenciranja najnovije generacije (*engl.* Next Generation Sequencing) omogućio identifikaciju bakterijske mikrobiote prisutne u plućima. Na sastav bakterijske zajednice u plućima utiče više faktora: imigracija (mikroaspiracija orofaringealnog sadržaja), eliminacija (kašalj, mukocilijarni transport i aktivnost urođenog i stečenog imunskog sistema) i lokalni uslovi rasta (kompeticija između bakterija, temperatura, pH i prisustvo kiseonika) (Dickson i drugi, 2014). Pored navedenih faktora, i genetska osnova domaćina može uticati na sastav mikrobiote koja kolonizuje pluća (Igartua i drugi, 2017). Iako relativno male koncentracije sa 10^3 – 10^5 kolonija/g tkiva kod miševa (Remot i drugi, 2017) odnosno $2,2 \times 10^3$ bakterijskih genoma/cm², kod čoveka (Hilty i drugi, 2010), ova mikrobna zajednica je važna za apsorpciju nutrijenata, inhibiciju rasta patogenih, detoksifikaciju, kao i za stimulaciju imunskog sistema domaćina (Dethlefsen i drugi, 2007).

Sastav mikrobne zajednice respiratornog trakta takođe zavisi od načina porođaja. Deca koja su rođena vaginalnim putem imaju mikrobiotu pluća u kojoj dominiraju vrste *Moraxella* spp., *Corynebacterium* spp. i *Dolosigranulum* spp., za razliku od dece rođene carskim rezom kod kojih je uspostavljanje plućne mikrobiote sporije, sa dominantnom vrstom *Staphylococcus aureus* i predstavnicima rodova *Prevotella*, *Veilonella* i *Porphyromonas* spp. (Bosch i drugi, 2016, 2017). Takođe je primećeno da se gornji respiratorni trakt, nezavisno od načina rođenja, inicijalno kolonizuje bakterijom *S. aureus* (Bosch i drugi, 2016). Praćenjem sastava mikrobiote gornjeg respiratornog trakta u nekoliko vremenskih intervala (1,5, 6, 12 i 24 meseca) pokazano je da se sastav mikrobiote menja tokom vremena (Biesbroek i drugi, 2014), pri čemu su promene najizraženije tokom prvih dva meseca života (Bosch i drugi, 2016). Istraživanja na miševima različite starosti pokazala su da kod jedinki starih dve nedelje dominira rod *Streptococcus*, dok su *Lactobacillus* i *Achromobacter* bili najdominantniji rodovi kod miševa starosti četiri nedelje (Singh i drugi, 2017).

Kod čoveka, sastav i koncentracija bakterija u gornjem i donjem respiratornom traktu se razlikuju (Slika 3). Gornji deo respiratornih organa čoveka karakteriše se raznovrsnijom i brojnijom mikrobiotom. Bakterije prisutne u respiratornom traktu mogu se svrstati u četiri razdela: Bacteroidetes, Firmicutes,

Proteobacteria, i Actinobacteria (Dickson i drugi, 2014; Segal i drugi, 2016; Yu i drugi, 2016). Najzastupljeniji rodovi u respiratornim organima čoveka su: *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus* i *Neisseria* (Hilty i drugi, 2010). U nosnoj šupljini dominantni su rodovi *Corynebacterium* (razdeo Actinobacteria), i *Staphylococcus* (razdeo Firmicutes) (Hilty i drugi, 2010), dok je *Prevotella* (razdeo Bacteroidetes) dominantna u orofarinksu (Hilty i drugi, 2010). Donji respiratorni trakt karakteriše se daleko manjom biomasom zahvaljujući brojnim fiziološkim procesima koji dovode do brze eliminacije bakterija (Natalini i drugi, 2023). U plućima zdravih ljudi, najzastupljeniji rodovi su: *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, i *Fusobacterium* (Mathieu i drugi, 2018). Mikrobiotu respiratornih organa odlikuje velika interindividualna raznovrsnost (Dickson i drugi, 2014).



Slika 3. Bakterijska mikrobiota respiratornog trakta. Slika je kreirana pomoću Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>).

1.3. Uloga mikrobiote u održavanju homeostaze

Respiratorni i gastrointestinalni trakt su kontinuirano izloženi različitim ksenobioticima iz spoljašnje sredine zbog čega su se u ovim organima razvili mehanizmi za održavanje homeostaze, čime je omogućeno pravilno funkcionisanje pluća i creva. Za oba organa je karakteristično da odgovaraju na patogene organizme, dok istovremeno tolerišu komensale kojima su konstantno izloženi (Kogut i drugi, 2020). U održavanje homeostaze u respiratornom i gastrointestinalnom traktu uključene su komensalne bakterije, epitelno tkivo (koje predstavlja fizičku barijeru i proizvodi mukus) i komponente imunskog sistema prisutne u ovim organima (Belkaid i drugi, 2014; Kogut i drugi, 2020).

Komensalna bakterijska mikrobiota sprečava invaziju patogena preko kompeticije za nutrijente i produkcije različitih sekundarnih metabolita (Kogut i drugi, 2020). Bakterije mogu da utiču i na sintezu mukusa u ovim organima. Iako mukus proizvode peharaste ćelije prisutne u epitelu, promene u

bakterijskom sastavu mogu da dovedu do povećane ili smanjene produkcije mukusa. Povećana produkcija je primećena kod mnogih bolesti pluća kao što su hronična opstruktivna bolest pluća, bronhijalna astma i cistična fibroza (Morinaga i drugi, 2009). Povećana relativna zastupljenost bakterije *Chlamydia pneumoniae* (u plućima osoba sa bronhijalnom astmom) dovodi do povećanja ekspresije gena za mucin (MUC5A) jedne od komponenti mukusa (Morinaga i drugi, 2009). Sa druge strane, bakterije u plućima mogu da koriste mukus kao supstrat, što dovodi do formiranja sredine koja pogoduje rastu drugih vrsta koje mogu izazvati oboljenja kod osetljivih osoba (kao što je *Pseudomonas aeruginosa* koji je čest oportunistički patogen kod pacijenata sa cističnom fibrozom) (Flynn i drugi, 2016). U mukusu su prisutni i antimikrobni proteini (sintetišu ih epitelijalne ćelije) i IgA (sintetisan od strane B ćelija) (Belkaid i drugi, 2014; Kogut i drugi, 2020) koji takođe doprinose odbrani od patogenih vrsta.

U crevima i plućima su prisutne i ćelije urođenog i stečenog imunskog sistema na čiju aktivnost takođe mogu da utiču bakterije. Dendritske ćelije i alveolarni makrofagi u plućima, pored toga što imaju sposobnost da sami uklone patogene, usmeravaju adaptivni imunski odgovor prema regulatornom ili inflamatornom, u zavisnosti od tipa antigena kojima su izloženi (Patel i Metcalf, 2018). Komensalne i patogene bakterije u plućima poseduju različit potencijal za stimulaciju dendritskih ćelija (Larsen i drugi, 2012). Analizom bakterijske mikrobiote nižih disajnih puteva čoveka pokazano je da postoje dva tipa plućnog mikrobioma: pneumotip I (koji karakteriše mala koncentracija bakterija) i pneumotip II (sa visokom koncentracijom bakterija kod koga dominiraju oralni komensali) (Segal i drugi, 2016). Alveolarni makrofagi izolovani iz osoba sa pneumotipom II produkuju manje proinflamatornih citokina nakon stimulacije lipopolisaharidom (LPS, glavna komponenta zida Gram negativnih bakterija), u odnosu na makrofage osoba sa pneumotipom II (Segal i drugi, 2016). Pored komponenti urođenog imunskog sistema, važnu ulogu u održavanju homeostaze u plućima ima i adaptivna imunost, posebno regulatorne T ćelije (Treg ćelije). Mikrobiota pluća ima važnu ulogu u razvoju imunotolerancije kao što je pokazano kod čoveka i u eksperimentima na miševima (Sommariva i drugi, 2020). Jedinke miševa neposredno nakon rođenja imaju nezreo imunski sistem i razvijaju alergijski odgovor (infiltracija eozinofila, produkcija Th2 citokina). Tokom prve dve nedelje nakon rođenja dolazi do povećanja broja bakterija u plućima što je praćeno povećanjem relativne zastupljenosti razdela Bacteroidetes, i sazrevanjem imunskog odgovora. Kao posledica toga, aktiviraju se Treg ćelije i smanjuje reaktivnost na alergene (Gollwitzer i drugi, 2014). Analogno tome, redukovana mikrobiota pluća dovodi do nedovoljnog sazrevanja imunskog sistema domaćina čineći ga tako podložnim za nastanak brojnih bolesti pluća poput alergijske astme (Sabatel i drugi, 2017; Remot i drugi, 2017).

1.4. Bakterijska mikrobiota u bolesti

Promene u bakterijskoj mikrobioti mogu biti u osnovi različitih oboljenja. Lokalni efekti su najviše ispitivani pa je tako disbioza u crevima povezana sa bolestima gastrointestinalnog trakta (inflamatorna bolest creva, sindrom iritabilnog creva) (Chang i Lin, 2016), a disbioza u plućima sa respiratornim bolestima (Amati i drugi, 2022).

Osim lokalnog efekta, brojne studije su ukazale na povezanost disbioze u crevima sa različitim respiratornim poremećajima kao što su astma (Fрати i drugi, 2018; McAleer i Kolls, 2018; Sokolowska i drugi, 2018), hronična opstruktivna bolest pluća (Vaughan i drugi, 2019), cistična fibroza (Thavamani i drugi, 2021), kancer pluća (Liu i drugi, 2019, 2021; Zheng i drugi, 2020). Dok je veza između mikrobiote creva sa različitim bolestima respiratornog sistema dosta ispitivana (osa crevo-pluća), malo je podataka o promenama u bakterijskoj mikrobioti u crevima tokom respiratornih bolesti (osa pluća-crevo).

1.4.1. Uloga mikrobiote creva u razvoju plućnih bolesti (osa crevo-pluća)

Astma je jedno od najčešćih hroničnih respiratornih oboljenja koja pogađa preko 300 miliona ljudi širom sveta, od kojih 250 000 umre svake godine (Yagi i drugi, 2021). Nizak diverzitet mikrobiote creva (najčešće usled upotrebe antibiotika u različitim trimestrima ili kasnijoj fazi trudnoće, kao i tokom ranih godina života dece) povezan je sa visokim rizikom za razvoj dečje astme (Lapin i drugi, 2015; Mulder i drugi, 2016) i ranim razvojem astme kod deteta (Abrahamsson i drugi, 2014). Ispitivanja na miševima kojima je disbioza creva izazvana primenom antibiotika cefoperazona u trajanju od 7 dana pokazala su da dolazi do povećanja alergijske inflamacije u plućima (Kanj i drugi, 2023; Skalski i drugi, 2018) koja se karakteriše većom infiltracijom ćelija (prvenstveno eozinofila), hiperplazijom peharastih ćelija, povećanom produkcijom interleukina (IL)-13 i imunoglobulina E (IgE). Intenzivniji alergijski odgovor kod ovih jedinki najverovatnije je povezan sa kolonizacijom creva oportunističkim gljivama iako one nisu detektovane u plućima (Kanj i drugi, 2023; Skalski i drugi, 2018). U skladu sa tim, nakon tretmana antibiotikom je zapažena kolonizacija gljivom *Wallemia mellicola* (sredinska izloženost ovoj gljivi smatra se važnim faktorom rizika za razvoj astme kod ljudi) (Skalski i drugi, 2018). Uloga oportunističkih gljiva u razvoju astme je potvrđena u drugoj studiji u kojoj su jedinke nakon tretmana antibiotikom bile izložene gljivi *Candida albicans* (oralnim putem) i kod kojih je zapažen odgovor većeg intenziteta nakon stimulacije alergenima prisutnim u vazduhu (Kanj i drugi, 2023). Za modulaciju odgovora na alergene su bitne bakterijske komponente kao što je LPS. Tretman jedinki miševa otpornih na razvoj astme (jedinke sa delimičnim ili potpunim odsustvom ekspresije gena za aciloksiacil hidrolazu, *Aoah^{-/-}*) tokom tri nedelje antibioticima neomicinom i metronidazolom (u cilju eliminacije Gram-negativnih bakterija) doveo je do pojave simptoma bolesti u odgovoru na grinje (infiltracije eozinofila, neutrofila i limfocita u pluća, hiperplazije peharastih ćelija i povećane produkcije mukusa) (Qian i drugi, 2018). I drugi metaboliti bakterija mogu da utiču na karakteristike odgovora u plućima. Poređenjem jedinki miševa hranjenih standardnom hranom i hranom sa niskim sadržajem vlakana, pokazano je da su miševi koji su bili na ishrani sa malo vlakana, nakon izlaganja alergenima iz vazduha, imali veći stepen infiltracije limfocita u plućima, kao i povećanje proinflamatornih citokina (Trompette i drugi, 2014). Zaštita od alergijske inflamacije u plućima posredovana je masnim kiselinama kratkog lanca (kao što su acetat, butirat, propionat) koje su produkt fermentacije dijetetskih vlakana od strane bakterija prisutnih u cekumu i kolonu (Zhou i drugi, 2021). Masne kiseline kratkog lanca mogu da se translociraju iz creva i tako modulišu imunske odgovore u plućima (McAleer i Kolls 2018). Tretman jedinki miševa sa masnim kiselinama kratkog lanca rastvorenim u vodi, pre izlaganja ovalbuminu, doveo je do veće ekspanzije mijeloidnih supresorskih ćelija i Treg ćelija u poređenju sa jedinkama koje nisu primale SCFAs, što je rezultiralo slabijim alergijskim odgovorom (Huang i drugi, 2023).

Hronična opstruktivna bolest pluća (*engl.* Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) je bolest sa visokom prevalencom koja se karakteriše opstrukcijom disajnih puteva, izazvanih pušenjem ili izloženošću različitim zagađujućim supstancama iz vazduha. Iako nije potvrđena direktna veza između disbioze u crevima i pojave simptoma bolesti, postoje podaci da je bolja funkcija pluća kod pacijenata obolelih od COPD povezana sa višom relativnom zastupljenošću nekih vrsta iz rodova *Streptococcus* i familije *Lachnospiraceae* i nižom zastupljenošću roda *Desulfovibrio* (Bowerman i drugi, 2020). Korelacija koja je pokazana između ishrane bogate vlaknima sa uspostavljanjem bolje funkcije pluća i redukcijom simptoma karakterističnim za ovu bolest (Kan i drugi, 2008) dodatno potvrđuje ulogu mikrobiote creva u patogenezi bolesti.

Cistična fibroza je nasledna bolest izazvana mutacijom gena za transmembranski regulator cistične fibroze (*engl.* Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) protein), koja se karakteriše preteranom produkcijom viskoznog mukusa u plućima i u crevima. Studija koje je pratila sastav mikrobiote creva tokom prve godine života novorođenčadi obolelih od ove bolesti i zdrave dece, pokazala je postojanje

značajnih razlika između ove dve grupe (Antosca i drugi, 2019; Hoen i drugi, 2015). Pad relativne zastupljenosti bakterija roda *Parabacteroides* u crevima je prethodio pojavi respiratornih komplikacija, praćenih i kolonizacijom *P. aeruginosa* (Hoen i drugi, 2015). Dodatno, osobe obolele od cistične fibroze, koje imaju značajno smanjenje diverziteta crevne mikrobiote, imaju teže manifestacije bolesti u plućima u odnosu na osobe sa manjim stepenom crevne disbioze (Burke i drugi, 2017). Sa druge strane, kod dece sa cističnom fibrozom koja su primala oralni probiotik *Lactobacillus* GG zapaženo je značajno ublažavanje simptoma bolesti u plućima, kao i smanjena potreba za bolničkim lečenjem (Bruzese i drugi, 2007).

Uticaj crevne mikrobiote na imunski odgovor u plućima ispitivan je u različitim eksperimentalnim modelima u kojima je infekcija pluća izazvana bakterijama ili virusima. Eksperimenti rađeni na miševima koji nisu kolonizovani mikrobiotom, pokazali su da su ove jedinke mnogo više podložne infekciji pluća izazvanom bakterijom *Klebsiella pneumoniae* u odnosu na konvencionalno gajene miševe (Fagundes i drugi, 2012). I tretman miševa lekovima koji izazivaju disbiozu u crevima dovodi do smanjene otpornosti na infekciju. Kod jedinki kojima je redukovana crevna mikrobiota upotrebom antibiotika širokog spektra (ampicilin, neomicin, metronidazol i vankomicin) u trajanju od tri nedelje zapaženo je veće oštećenje unutrašnjih organa, veći stepen diseminacije bakterije u plućima i veći stepen mortaliteta nakon infekcije izazvane bakterijom *Streptococcus pneumoniae* u odnosu na miševe koji nisu primili antibiotike (Schuijt i drugi, 2016). Dodatno, primena izonijazida i pirazinamida (lekova koji se koriste u terapiji tuberkuloze) značajno redukuje crevnu mikrobiotu i smanjuje otpornost domaćina na infekciju izazvanu bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* (Khan i drugi, 2019). Podložnost infekciji kod ovih jedinki je posledica smanjenog metabolizma alveolarnih makrofaga, a samim tim i njihovog baktericidnog potencijala (Khan i drugi, 2019). Bez obzira na koji način je izazvana disbioza u crevima, transplantacija fecesa iz zdravih (konvencionalno gajenih) miševa u jedinke sa disbiozom creva je dovela do povećanja otpornosti na infekciju izazvanu različitim bakterijama (Fagundes i drugi, 2012; Khan i drugi, 2019; Schuijt i drugi, 2016) što dodatno potvrđuje ulogu mikrobiote creva u imunskom odgovoru u plućima. Smatra se da su u komunikaciji između creva i pluća uključene mikrobne komponente (peptidoglikani ili lipopolisaharidi) koje cirkulacijom dospevaju od creva do pluća, a koje prepoznaju receptori za molekulske obrasce (*engl.* Pattern Recognition Receptors) prisutni na površini ćelija domaćina (Wypych i drugi, 2019).

Komensalne bakterije prisutne u crevima doprinose razvoju adekvatnog urođenog i adaptivnog odgovora na viruse (Abt i drugi, 2012; Ichinohe i drugi, 2011). Primena smeše antibiotika (ampicilin, gentamicin, metronidazol, neomicin i vankomicin) tokom dve do četiri nedelje je dovela do nižeg antivirusnog odgovora u makrofagama, kao i do smanjene responsivnosti ovih ćelija na stimulaciju interferonom (IFN) β i γ (Abt i drugi, 2012). Povećana osetljivost na infekciju izazvanu virusom gripa kod jedinki tretiranih antibioticima je posledica poremećaja homeostaze dendritskih ćelija u plućima, njihove smanjene migracije u regionalne drenirajuće limfne čvorove, neadekvatne aktivacije virus specifičnih CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija i produkcije antitela (Ichinohe i drugi, 2011). Efekat bakterijske mikrobiote creva na pluća je verovatno posredovan metabolitima bakterija jer je pokazano da ishrana bogata vlaknima (Trompette i drugi, 2018) ili primena acetata (Antunes i drugi, 2019) povećava imunski odgovor na viruse u plućima.

Poremećaj crevne mikrobiote dovodi i do razvoja alergijskog odgovora na gljivu *Aspergillus fumigatus* (Noverr i drugi, 2004). Kod miševa kod kojih je disbioza creva izazvana primenom antibiotika (cefoperazon u trajanju od pet dana) i oralnom aplikacijom gljive *Candida albicans*, dolazi do razvoja alergijskog odgovora na spore gljive *A. fumigatus* koji se karakteriše povećanjem broja eozinofila, mast ćelija, povećanom produkcijom IL-5, IL-13, IFN- γ i IgE (Noverr i drugi, 2004).

1.4.2. Uloga inflamacije u plućima u nastanku crevne disbioze (osa pluća-crevo)

Kao što disbioza u crevima može da utiče na karakteristike imunskog odgovora u plućima, i inflamacija u plućima može da dovede do disbioze bakterijske mikrobiote u crevima. Kod osoba obolelih od granulocitne astme pokazano je da nema razlika u alfa i beta diverzitetu bakterija u crevima između zdravih osoba i obolelih, ali su primećene razlike u relativnoj zastupljenosti pojedinih rodova i porodica u okviru razdela Firmicutes (Gu i drugi, 2022). Promene u sastavu mikrobiote creva, koja je važna za brojne metaboličke procese u domaćinu, je praćena povećanjem broja Treg ćelija u kolonu. Gastrointestinalni simptomi (nadutost i gastroezofagealni refluks) su primećeni i kod 85% osoba koje boluju od hronične obstruktivne bolesti pluća (Rutten i drugi, 2014). Dodatno, prevalenca za nastanak Kronove bolesti (inflamatorna bolest creva) je 2,72 puta veća kod ovih osoba u odnosu na zdrave kontrole (Ekbohm i drugi, 2008). Kod osoba obolelih od hronične obstruktivne bolesti pluća primećeni su poremećaji u homeostazi creva koji se ogledaju u povećanju propustljivosti creva i povećanoj infiltraciji inflamatornih ćelija (Keely i drugi, 2014). Sve ovo je praćeno i pojavom disbioze u crevima, koja predstavlja rizik za razvoj inflamatornih bolesti creva (Wang, i drugi, 2013). I kod pacijenata obolelih od cistične fibroze se javljaju brojni gastrointestinalni simptomi, kao što su gastroezofagealni refluks, konstipacija, inflamacija, upala slepog creva, rektalni prolaps, disboiza bakterijske mikrobiote i dr. (Slae i Wilschanski, 2020). Smatra se da su ove promene u crevima u osnovi povećane incidence kancera creva kod mlađe populacije obolele od ove bolesti u odnosu na zdravu populaciju (Maisonneuve, 2003; Neglia i drugi, 1995). Svi navedeni podaci ukazuju na postojanje veze između pluća i creva.

Disbioza u crevima javlja se i kod dece sa infekcijom pluća izazvanom bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* kod kojih je zapaženo smanjenje indeksa alfa diverziteta, ali bez statistički značajnih razlika u sastavu mikrobne zajednice između obolelih osoba i zdrave populacije (beta diverzitet) (Basu i drugi, 2019). Značajne promene crevne mikrobiote su primećene i kod odraslih pacijenata obolelih od tuberkuloze, izražene kroz pad broja vrsta i poremećen sastav mikrobne zajednice, kao i kroz poremećaj metaboličke aktivnosti masnih kiselina kratkog lanca (Hu i drugi, 2019). Promene u bakterijskoj mikrobioti do kojih je dovela ova bolest ogledaju se i na nivou relativne zastupljenosti određenih taksonomskih jedinica. Povećanje relativne zastupljenosti rodova *Prevotella* i *Enterococcus* (čiji pojedini predstavnici spadaju u grupu oportunističkih patogena), i smanjenje relativne zastupljenosti korisnih bakterija *Ruminococcaceae*, *Bifidobacteriaceae* i *Faecalibacterium prausnitzii* su primećeni kod pacijenata sa tuberkulozom (Li i drugi, 2019). Ispitivanja na miševima kod kojih je infekcija pluća izazvana bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* (Winglee i drugi, 2014) ili *Klebsiella pneumoniae* (Wu i drugi, 2020) su potvrdila da je infekcija pluća bakterijama uzrok disbioze koja se javlja u crevima. Pad relativne zastupljenosti bakterijskih vrsta koje pripadaju *Clostridiales* i *Bacteriodales* kod miševa nakon infekcije izazvane bakterijom *M. tuberculosis* povezan je sa aktivacijom imunskog odgovora (Winglee i drugi, 2014). I infekcija izazvana bakterijom *K. pneumoniae* je dovela do promena u brojnosti i sastavu crevne mikrobiote, smanjenja relativne zastupljenosti vrsta *Lactobacillus reuteri* i *Bifidobacterium pseudolongum* i pada koncentracije masnih kiselina kratkog lanca (Wu i drugi, 2020).

Postojanje gastrointestinalnih tegoba (bol u stomaku, mučnina, povraćanje i dijareja) takođe je detektovano kod osoba sa infekcijom pluća izazvanim virusima (Dilantika i drugi, 2010). Respiratorna infekcija izazvana virusom gripa H7N9 značajno je uticala na smanjenje indeksa alfa diverziteta koje je praćeno povećanjem relativne zastupljenosti vrsta *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium* kod pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (Qin i drugi, 2015). Analiza biomarkera je pokazala da je za grupu osoba obolelih od gripa karakteristično prisustvo *Clostridium* sp. 7243FAA i *Enterococcus faecium* u fecesu, dok je kod zdravih osoba dominirala *Roseburia inulinivorans* DSM 16841 (Qin i drugi, 2015). U eksperimentalnim studijama u kojima je infekcija pluća izazvana virusima je takođe detektovano postojanje disbioze u crevima (Deriu i drugi, 2016; Wang i drugi, 2014), pri čemu je

pokazano da je infekcija partikulama virusa odgovorna za ove promene jer aplikacija vakcine sa oslabljenim virusom nije dovela do promena u sastavu bakterijske zajednice creva (Zu i drugi, 2018). Analiza fecesa pilića pre i posle infekcije virusom gripa H9N2, pokazala je značajno povećanje relativne zastupljenosti razdela Proteobacteria, kao i povećanje rodova *Vampirovibrio*, *Pseudoflavonifactor*, *Ruminococcus*, *Clostridium* cluster XIVb i *Isobaculum* (Yitbarek i drugi, 2018). Kod miševa sa infekcijom pluća izazvanom virusom gripa ili respiratornim sincicijalnim virusom zapaženo je povećanje relativne zastupljenosti razdela Bacteroidetes, praćeno smanjenjem relativne zastupljenosti razdela Firmicutes (Groves i drugi, 2018). Dodatno, smanjenje relativne zastupljenosti komensala, primećeno u tankom crevu miševa inficiranih virusom gripa, praćeno je narušavanjem integriteta mukusa (Yildiz i drugi, 2018). Analiza sastava bakterijske zajednice u crevima pacijenata sa infekcijom pluća izazvanom SARS-Cov-2 virusom je pokazala da ova infekcija dovodi do povećanja oportunističkih patogena i smanjenja komensala u odnosu na zdrave pacijente (Zuo i drugi, 2020). Veća zastupljenost *Eubacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, i *Lachnospiraceae* bila je karakteristična za zdrave osobe, dok su kod COVID-19 pacijenata dominirale *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus* i *Bacteroides nordii* (Zuo i drugi, 2020).

Osim navedenog, svaka inflamacija i/ili povreda pluća, bez obzira na poreklo, može dovesti do disbioze u crevima, jer je disbioza creva primećena kod pacijenata obolelih od kancera pluća (Zhang i drugi, 2018), kod miševa nakon intratrahealne aplikacije lipopolisaharida (Sze i drugi, 2014), izloženim visokim koncentracijama kiseonika (hiperoksija) (Ashley i drugi, 2020) i aerozagađujućim česticama (Mazumder i drugi, 2023).

Za razliku od infekcije pluća izazvane bakterijama i virusima, malo je podataka o ulozi bakterijske mikrobiote i njenim promenama tokom infekcije izazvane gljivama.

1.5. Gljiva *Aspergillus* spp.

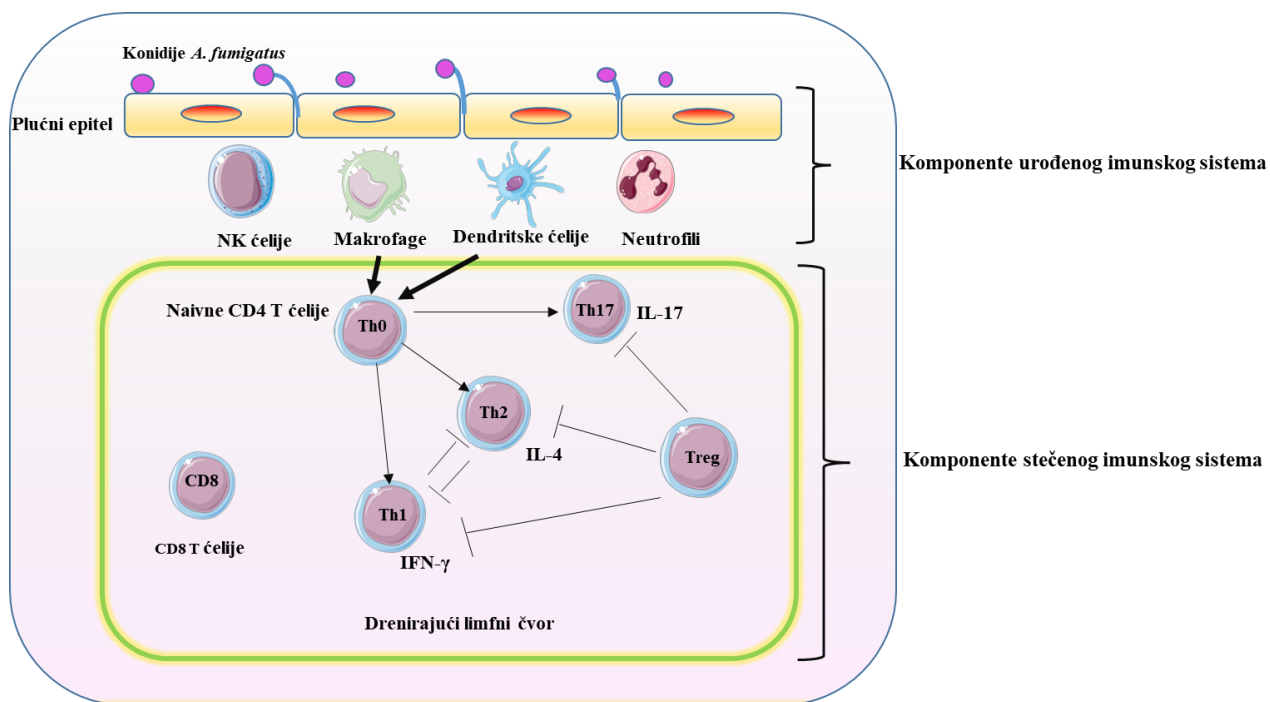
1.5.1. Osnovne karakteristike gljive

Rod *Aspergillus* je široko rasprostranjena filamentozna saprofitska gljiva, koja ima važnu ulogu u kruženju ugljenika i azota. Rod *Aspergillus* broji nekoliko stotina vrsta, od koji su najrasprostranjeniji *A. fumigatus*, *A. flavus* i *A. niger*. Najčešći uzročnik oboljenja kod čoveka je *A. fumigatus*. To je široko rasprostranjena, termotolerantna gljiva, koja raste pri velikom temperaturnom opsegu od 12-72 °C. Odlikuje se sporama (konidijama) koje brzo sporulišu, malog su dijametra (2 do 3 μm) i kao takve lako dospevaju do pluća (Veerdonk i drugi, 2017). Zbog svoje široke rasprostranjenosti, visoke stope sporulacije i diseminacije konidija pasivnim putem, posredstvom vazduha, ljudi su svakodnevno izloženi konidijama *A. fumigatus* i procenjuje se da na dnevnom nivou udahnu oko 200 konidija (Dagenais i drugi, 2009). Kod imunokompetentnih osoba (osoba sa očuvanom funkcijom imunskog sistema) konidije se aktivnošću cilija izbacuju iz pluća ili ih uklanjaju aktivirani alveolarni makrofagi (Li i drugi, 2019). Kod osoba sa oslabljenom funkcijom imunskog sistema (imunokompromitovane osobe) kao posledica izloženosti konidijama može da se razvije spektar bolesti (alergijska bronhopulmonarna aspergiloza, aspergilomi, hronična pulmonarna aspergiloza i invazivna aspergiloza) koje se jednim imenom označavaju kao aspergiloze (Bongomin i drugi, 2020; Burgel i drugi, 2016; Taccone i drugi, 2015).

1.5.2. Urođeni i adaptivni imunski odgovor na gljivu *A. fumigatus*

U odbranu od infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus* uključene su komponente i urođene i adaptivne imunosti (Sales-Campos i drugi 2013) (Slika 4). Prvu liniju odbrane predstavljaju mukusne membrane i epitelijalne ćelije, koje predstavljaju fizičku barijeru i onemogućavaju prodiranje gljive u dublje slojeve tkiva (Bartemes i drugi, 2018). Kod imunokompetentnih osoba, ova linija odbrane, zajedno sa aktivnošću ćelija urođene imunosti (polimorfonuklearni leukociti i makrofagi koji uklanjaju konidije u slučaju da dospeju do plućnih alveola) je dovoljna za sprečavanje kolonizacije pluća (Morton i drugi, 2012).

Ćelije urođenog imunskog sistema prepoznaju molekulske obrasce prisutne na površini gljive (proteaze, β glukane i sl.) preko receptora urođene imunosti u koje spadaju receptori slični Toll proteinu (*engl.* Toll Like Receptors, TLR), receptor za manozu, kao i preko citosolnih receptora (*engl.* Nod-like receptor, NLR) (Briard i drugi, 2019). Nakon prepoznavanja gljive od strane alveolarnih makrofaga i neutrofila dolazi do fagocitoze i eliminacije gljive *A. fumigatus* (Braem i drugi, 2015; Latge 1999). U ćelije urođene imunosti koje su bitne za imunski odgovor na gljivu se ubrajaju i dendritske ćelije (Bozza i drugi, 2002). Ove ćelije nakon ingestije gljive migriraju do regionalnih drenirajućih limfnih čvorova gde dovode do aktivacije $CD4^+$ T ćelija (Bozza i drugi, 2002). Prepoznavanje konidija vodi diferencijaciji $CD4^+$ T ćelija u pravcu Th1 ćelija (sintetišu proinflamatorne citokine IFN- γ , IL-12) koje su odgovorne za efikasno uklanjanje gljive iz pluća (Thakur i drugi, 2015). Prepoznavanje hifa gljive od strane dendritskih ćelija dovodi do diferencijacije T ćelija u pravcu Th2 ćelija (produkuju IL-4, IL-5 i IL-10) što doprinosi progresiji bolesti (Thakur i drugi, 2015). Pored Th1 i Th2 ćelija, u odgovor na gljivu uključene su i Th17 ćelije (produkuju IL-17) koje doprinose uklanjanju gljive, ali mogu da dovedu i do preterane inflamacije i oštećenja tkiva (Zelante i drugi, 2009).



Slika 4. Komponente imunskog odgovora uključene u odgovor na gljivu *A. fumigatus*. Slika je kreirana pomoću Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) prema Sales-Campos i drugi, 2013

1.5.3. Mikrobiota creva i pluća tokom infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus*

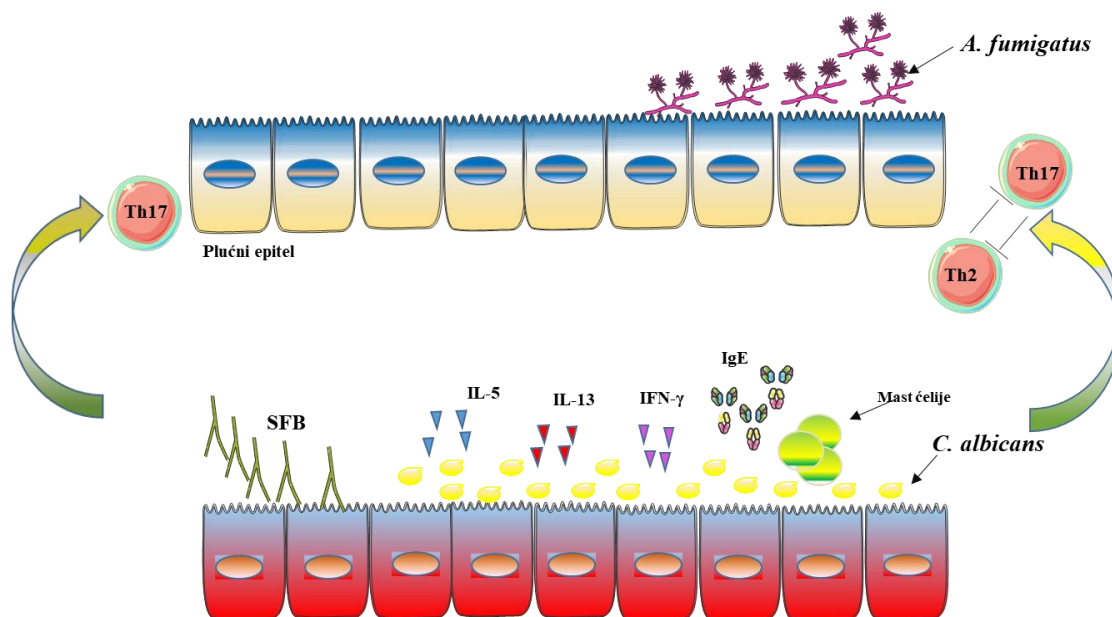
Malo je podataka o ulozi bakterijske mikrobiote tokom imunskog odgovora na gljivu *A. fumigatus*.

Kod imunokompromitovanih osoba sa invazivnom plućnom aspergilozom pokazano je da se sastav mikrobiote pluća razlikuje kod inficiranih i neinficiranih osoba (pacijenti kod kojih nije pokazano prisustvo gljive u plućima) (Hérivaux i drugi, 2022). Pored nižeg alfa diverziteta, kod osoba inficiranih sa *A. fumigatus*, je pokazana veća relativna zastupljenost rodova *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Paraclostridium* i *Finegoldia* (za razliku od neinficiranih osoba kod kojih su dominirali rodovi *Prevotella* i *Veillonella*). Svi pacijenti uključeni u ovu studiju su bolovali od druge osnovne bolesti i primali neku vrstu terapije (steroidi, imunosupresivi, antibiotici), tako da bi prikazane rezultate trebalo pažljivo razmatrati.

Uloga mikrobiote creva u odgovoru na gljivice je detaljnije ispitivana. Disbioza creva usled primene antibiotika i kolonizacije sa *C. albicans*, dovodi do razvoja alergijskog odgovora na konidije *A. fumigatus* u plućima (Noverr i drugi, 2004). Posledica disbioze u crevima je veći broj eozinofila, mast ćelija, IgE, IL-5, IL-13 i IFN- γ nakon inhalacije konidija u poređenju sa kontrolnim jedinkama. Osim toga, pokazano je da prisustvo *C. albicans* u crevima dovodi do indukcije Th17 odgovora u plućima tokom infekcije izazvane sa *A. fumigatus* (Bacher i drugi, 2019; Gonçalves i drugi, 2017) (Slika 5). I drugi istraživači su pokazali da sastav mikrobiote creva može da utiče na nivo antifungalnog Th17 odgovora, pa su viši nivoi IL-17 zapaženi kod jedinki čija su creva kolonizovana segmentisanim filamentoznim bakterijama (Bradley i drugi, 2017; McAleer i drugi, 2016).

Retki su i podaci o uticaju pulmonarne aspergiloze na mikrobiotu creva. Upotrebom metode gel elektroforeze u denaturišućem gradijentu je pokazano da tokom infekcije pluća izazvane sa *A. fumigatus*

kod DA jedinki dolazi do disbioze u duodenumu i poremećaja intestinalne homeostaze (Kulas i drugi, 2019).



Slika 5. Uloga mikrobiote creva u odgovoru na prisustvo gljive *A. fumigatus* u plućima. Slika je kreirana pomoću Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) prema Gonçalves i drugi, 2017.

2. CILJ RADA

Polazeći od trenutno dostupnih podataka, cilj istraživanja doktorske disertacije bio je da se u modelu pulmonarne infekcije izazvane gljivom *Aspergillus fumigatus* ispita uticaj inflamacije na mikrobiotu pluća i creva, postojanje dvosmerne komunikacije između ova dva organa i potencijalni mehanizmi ove interakcije. Ispitivanja su rađena na dva soja pacova Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) za koje je pokazano da ispoljavaju kvantitativno različit imunski odgovor na prisustvo *A. fumigatus* u plućima (Mirkov i drugi, 2015).

Za realizaciju cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje sastava bakterijske mikrobiote u plućima i crevima kod zdravih (netretiranih/neinficiranih) jedinki pacova;
2. Ispitivanje promena mikrobiote u ova dva organa tokom infekcije pluća izazvane gljivom *Aspergillus fumigatus*;
3. Ispitivanje efekta smeše antibiotika na mikrobiotu pluća i creva;
4. Ispitivanje uticaja disbioze izazvane antibioticima na odgovor organizma tokom pulmonarne infekcije sa *A. fumigatus*.

Rezultati ovih istraživanja doprinose novim saznanjima o ulozi mikrobiote creva i pluća tokom infekcije pluća i ukazuju na potencijalne mehanizme dvosmerne komunikacije između ova dva organa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Mužjaci Dark Agouti (DA) i Albino Oxford (AO) sojeva pacova, starosti deset do dvanaest nedelja, korišćeni su u eksperimentima. Životinje su konvencionalno gajene (poštovanje ciklusa 12h svetlo/12h mrak, ambijentalne temperature od 22 ± 2 °C i relativne vlažnosti vazduha od 60%, uz neograničen pristup vodi i hrani) na Institutu za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković” (IBISS) -Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalne procedure kao i tretiranje životinja sprovedeni su u skladu sa Direktivom EU (2010/63/EU) o zaštiti životinja korišćenih u naučne svrhe i odobreni su od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede - Uprave za veterinu (rešenje broj 323-07-12685/2020-05).

U prvoj eksperimentalnoj postavci, jedinkama DA i AO pacova je intratrahealno ubrizgavano 10^7 konidija gljive *A. fumigatus* rastvorene u 0,5 ml fiziološkog rastvora. Kontrolne jedinke su primale fiziološki rastvor u istoj zapremini. Životinje su žrtvovane 1. i 3. dana nakon infekcije (n.i.) iskrvarenjem u opštoj anesteziji (15 mg/kg Zoletila 100, Virbac, Carros, Francuska).

U drugoj eksperimentalnoj postavci, životinje su pre infekcije pile vodu bez smeše antibiotika ili sa smešom antibiotika (neomicin 0,5 g/l, gentamicin 0,5 g/l i vankomicin 0,25 g/l) rastvorenih u dH₂O u trajanju od 30 dana. Voda je menjana dva puta nedeljno, i tom prilikom je merena količina popijene vode. Masa tela jedinki je merena jednom nedeljno. Nakon završetka tretmana antibioticima, polovina jedinki koje su pile čistu vodu i polovina jedinki koje su pile vodu sa antibioticima su inficirane sa *A. fumigatus* (intratrahealno, 10^7 konidija). U ovim eksperimentima su postojale četiri eksperimentalne grupe: 1. jedinke koje su pile vodu bez antibiotika i nisu inficirane sa *A. fumigatus* (primile su intratrahealno fiziološki rastvor); 2. jedinke koje su pile vodu sa antibioticima i nisu inficirane sa *A. fumigatus*; 3. jedinke koje su pile vodu bez antibiotika i inficirane su sa *A. fumigatus*; i 4. jedinke koje su pile vodu sa antibioticima i inficirane su sa *A. fumigatus*. U svakoj grupi je bilo po 8 jedinki. Životinje su žrtvovane trećeg dana nakon infekcije iskrvarenjem u opštoj anesteziji.

3.2. Uspostavljanje infekcije oportunističkom gljivom *Aspergillus fumigatus*

Humani izolat *A. fumigatus* korišćen u eksperimentima (dobijen sa Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanovic-Batut”) gajen je na selektivnoj mikološkoj podlozi Sabouraud maltoznom agaru (SMA) (Torlak, Beograd, Srbija) sedam dana do produkcije konidija, koje su potom sakupljane ispiranjem površine agarozne podloge sterilnim nepirogenim fiziološkim rastvorom. Dobijene konidije brojane su pomoću hemocitometra i podešavane na odgovarajuću koncentraciju.

3.3. Prikupljanje periferne krvi i uzorkovanje organa pluća i creva

Krv je vađena iz abdominalne arterije pacova, radi izolacije plazme i određivanja hematoloških parametara. Duodenum (uzeto je 5 cm ispod piloro-duodenalnog spoja), ileum (uzeto je 3 cm iznad ileo-cekalnog spoja), cekum, kolon i pluća su uzimani prilikom žrtvovanja za dalje analize. Iz svakog segmenta creva je prikupljan sadržaj (istiskivanjem) i uziman deo tkiva (nakon ispiranja lumena sterilnim fiziološkim rastvorom). Sadržaj segmenata gastrointestinalnog trakta i tkivo (deo svakog segmenta creva

i levo plućno krilo) su zamrzavani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i kasnije korišćeni za izolovanje metagenomske DNK. Ostatak tkiva creva i desno plućno krilo je korišćen za pripremu homogenata tkiva.

3.4. Kvantitativna kultura gljive

Kvantitativna kultura *A. fumigatus* je korišćena za određivanje broja formiranih kolonija (*engl.* Colony Forming Units, CFU) u plućima (Sheppard i drugi, 2006). Od primarnog homogenata (pripreman homogenizacijom pluća u 5 ml fiziološkog rastvora) pravljena su dva serijska razblaženja i sejana na petri šolje sa SMA podlogom sa streptomycin-sulfatom. Nakon inkubacije (na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u periodu od 24 do 48 h) brojane su kolonije koje su izrasle na petri šoljama i računat broj formiranih kolonija/g tkiva.

3.5. Obrada tkiva, merenja sadržaja citokina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite

3.5.1. Priprema homogenata

Tkivo pluća i creva je pre homogenizacije odmereno na analitičkoj vagi i homogenizovano električnim homogenizerom (IKA T18 Basic Homogenizer, IKA Works Inc., Wilmington NC, SAD) na ledu u saharoznom puferu (pH 7,4, 0,25 mol/l saharoza (Fisher Scientific, Loughborough, UK), 0,05 mol/l Tris-HCl (tris-(hidroksimetil)-aminometan, Serva, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), 0,1 mol/l etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina (EDTA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka), 1 mM fenilmetansulfonil-fluorid (PMSF, Sigma-aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD)) u odnosu 1:10. Homogenati su sonifikovani laboratorijskim sonifikatorom (Bandelin electronic, UW 2070, Berlin, Nemačka) na ledu sa ciklusom od $3 \times 15\text{ s}$ i potom centrifugirani (20 min na $3000 \times g$, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dobijeni supernatanti su iskorišćeni za analizu sadržaja citokina i markera/parametara oksidativnog stresa.

3.5.2. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Lowry-ju (Lowry i drugi, 1951). Reakciona smeša je pripremana mešanjem 20 μl uzorka ili standarda sa 300 μl reagensa C (2% Na_2CO_3 (Carlo Erba, Milano, Italija) u 0,1 M NaOH (LachNer, Neratovice, Češka), 1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i 2% K-Na-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija)). Nakon inkubacije od 15 min, dodavano je 60 μl Folin-Ciocalteu reagensa (Merck, Darmstadt, Nemačka) i inkubacija je nastavljena još 30 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom nalivani u mikrotitar ploču u triplikatu i apsorbancija je merena na 670 nm talasne dužine, upotrebom spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Kjoto, Japan), dok su koncentracije proteina određivane preko standardne krive, koristeći referentne koncentracije albumina iz seruma govečeta (AppliChem, Darmstadt, Nemačka) (u rasponu od 0,1 do 1 mg/ml).

3.5.3. Merenje aktivnosti enzima katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaza je enzim koji razlaže vodonik peroksid (H_2O_2) do vode i kiseonika. Aktivnost ovog enzima procenjuje se na osnovu promene apsorbanca na talasnoj dužini od 240 nm (apsorbanca je merena na svakih 30 s, tokom 3 min) pomoću spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Beutler, 1982). Reakciona smeša dobijena je mešanjem 10 μ l uzorka homogenata tkiva sa 50 μ l Tris-EDTA pufera (pH 8,0) i 1 ml H_2O_2 . Kao mera aktivnosti (U) katalaze uzimana je količina enzima koja razloži 1 mmol H_2O_2 u minuti na 25 °C, a dobijene vrednosti izražavane su po miligramu proteina (U/mg).

3.5.4. Merenje aktivnosti enzima glutathion S transferaze (GST, EC 2.5.1.18)

Glutathion S transferaza (GST) je enzim koji katalizuje vezivanje elektrofilnih supstrata (nastaju posredstvom reaktivnih vrsta kiseonika) za redukovani glutathion (GSH) (Habig, 1974). Promena apsorbanca kompleksa dinitrochlorobenzen-redukovani glutathion (DNCB-GSH kompleks) koji nastaje delovanjem enzima GST korišćena je za određivanje aktivnosti ovog enzima. Po 10 μ l homogenata tkiva mešano je sa 2 ml dejonizovane vode, 100 μ l dinitrochlorobenzena (DNCB rastvorenim u 95% etanolu), 600 μ l fosfatnog pufera (pH 6,5) i 300 μ l redukovanog glutathiona (GSH). Promena apsorbanca očitavana je na 340 nm spektrofotometrijski (Shimadzu UV-1800) (u intervalima od po 30 s tokom 3 min) na temperaturi od 25 °C. Aktivnost enzima je izražavana u jedinicama (broj nanomolekula formiranog u minuti ($U = nM \text{ DNCB-GSH/min}$)) po miligramu proteina (U/mg proteina).

3.5.5. Merenje redukovanog glutathiona (GSH)

Za određivanje koncentracije redukovanog glutathiona korišćena je metoda zasnovana na promeni apsorbanca 5-tio-2 nitrobenzoične kiseline (TNB) merenoj na 412 nm (ELISA čitaču (GRD)), a koja je proporcionalna koncentraciji GSH (Rahman, 2005). TNB nastaje u procesu oksidacije GSH pomoću Elmanovog reagensa ((5,5'-ditio-bis)2-nitrobenzoične kiseline, DTNB). Reakciona smeša se sastojala od 100 μ l homogenata oslobođenog od proteina (pripremljen u 10% sulfosalicilnoj kiselini (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD) u cilju odstranjivanja velikih proteinskih kompleksa), 400 μ l Tris-HCl (pH 8,9), 10 μ l Elmanovog reagensa. Smeša je inkubirana 20 min (na sobnoj temperaturi, u mraku). Standardna kriva je pravljen na osnovu poznatih koncentracija GSH. Koncentracija GSH u uzorku je izražavana kao μ mol/mg proteina.

3.5.6. Određivanje količine lipidnih peroksida

Količina lipidnih peroksida određivana je na osnovu nivoa malon-dialdehida (MDA) koji nastaje kao krajni produkt lipidne peroksidacije. Nivo MDA određivan je na osnovu intenziteta boje nastale u reakciji MDA sa tiobarbituratnom kiselinom po metodi Villacara i drugih (1989). Reakcija je izvođena dodavanjem 50 μ l homogenata tkiva ili standarda u 2 ml TBA reagensa (0,375% tiobarbiturna kiselina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, SAD), 0,25 M hlorovodonična kiselina (HCl) (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i 15% trihlor-sirćetna kiselina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, SAD)) i 950 μ l Tris-

HCl (pH 7,4). Smeša je zagrevana u vodenom kupatilu na temperaturi od 95 °C, u trajanju od 60 min, a zatim centrifugirana (1620 × g, 10 min). Supernatant (200 µl) je nalivan u duplikatu u mikrotitar ploču sa 96 mesta. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 535 nm. Koncentracija MDA je preračunavana sa standardne prave konstruisane na osnovu apsorbanci poznatih koncentracija MDA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka) i izražavana kao nmol/mg proteina.

3.5.7. Procena aktivnosti enzima mijeloperoksidaze (MPO, E.C.1.11.1.7)

Aktivnost mijeloperoksidaze je merena u homogenatima tkiva po metodi koja se zasniva na sposobnosti ovog enzima da oksiduje supstrat o-dianizidin dihidrohlorid u prisustvu H₂O₂ (Bozeman i drugi, 1990). U 967 µl rastvora supstrata za određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze (50 mM kalijum-fosfatni pufer (pH 6,0), 0,167 mg/ml o-dianizidin dihidrohlorid (Sigma, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) i 0,0005% H₂O₂ (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)) je dodavano po 33 µl uzorka. Reakciona smeša je inkubirana 10 min nakon čega su uzorci nalivani na mikrotitar ploču i očitavani na 450 nm, sa korekcijom na 540 nm, na spektrofotometru Shimadzu UV-1800. Vrednosti su očitavane sa standardne krive konstruisane pomoću poznatih koncentracija MPO (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, SAD) i izražavane kao MPO jedinice (U)/ml homogenata.

3.6. Određivanje sadržaja citokina imunoenzimskim testom na čvstoj fazi (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*)

Sadržaj citokina je određivan u homogenatima pluća i creva upotrebom komercijalnih ELISA testova za IL-10, IL-6, TNF, IL-1β (R&D Systems, Minneapolis, USA), IL-17, i IFN-γ (eBioscience Inc., San Diego, CA, SAD), prema uputstvu proizvođača. Koncentracije ispitivanih citokina određivane su pomoću standardne krive konstruisane pomoću poznatih koncentracija odgovarajućih citokina i izražavane u pg/ml.

3.7. Izolovanje ukupne RNK, reakcija reverzne transkripcije i kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

3.7.1. Izolovanje ukupne RNK

Određivanje nivoa ekspresije gena za ciljne proteine u ćelijama regionalnih drenirajućih limfnih čvorova (limfni čvorovi mediastinuma i mezenterični limfni čvorovi) vršeno je pomoću reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu nakon izolacije ukupne RNK i reverzne transkripcije (Bustin, 2000). Ukupna RNK izolovana je pomoću mi-Total RNA Isolation Kit (Metabion, Martinsried, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Količina RNK je merena pomoću aparata NanoPhotometer N60/N50 (Implen, Minhen, Nemačka) i podešena tako da u reakciju reverzne transkripcije uđe ista količina RNK iz svakog uzorka (1 µg RNK).

3.7.2. Reakcija reverzne transkripcije (RT)

Reakcija reverzne transkripcije je korišćena za prevođenje izolovane RNK u komplementarnu DNK (cDNK). Reakciona smeša se sastojala od ukupne RNK, nasumičnih heksamernih prajmera (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i smeše dezoksiribonukleotidtrifosfata (dNTP, Fermentas, Vilnius, Litvanija). Nakon inkubacije na temperaturi od 70 °C, u cilju denaturacije sekundarne strukture RNK, je u reakcionu smešu dodavan enzim reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije (Fermentas, Vilnius, Litvanija), pufer za reverznu transkripciju (5× Reaction buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija) i inhibitor RNaza (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Reakcija je nastavljena prema zadatom programu za reverznu transkripciju (Biometra T-personal Combi Thermo Cycler 050-552, Nemačka): inkubacija na 25 °C (15 min), zatim inkubacija na 42 °C (60 min) i prekid inkubacije na 70 °C (10 min) i 95 °C (3 min). Dobijena cDNK razblažena je u DEPC H₂O (*engl.* diethylpyrocarbonate treated water) i čuvana na -20 °C do dalje upotrebe.

3.7.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (*engl.* Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-time qPCR)

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu korišćena je za analizu relativne promene nivoa informacione RNK (iRNK) gena od interesa. Amplifikacija reakcione smeše (2 µl cDNK, 5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), 2 µl DEPC H₂O i 1 µl prajmera za ciljne gene (Microsynth AG, Balgach, Švajcarska)) rađena je u aparatu za Real-time qPCR (QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Umnožavanje ciljnih gena vršeno je po unapred zadatom programu na aparatu: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), 95 °C (15 s) i 40 ciklusa umnožavanja (60 °C tokom 60 s), zatim 95 °C (15 s), 60 °C (60 s) i 95 °C (1s). Rezultati su analizirani pomoću softverskog programa (QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.3, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Nivo ekspresije iRNK preračunavan je na osnovu ekspresije iRNK za referentni protein (β-aktin) u uzorcima po formuli $2^{-\Delta Ct}$ gde je ΔCt razlika između Ct (*engl.* threshold cycle) vrednosti iRNK gena od interesa i iRNK β-aktina. Nukleotidne sekvence ciljnih gena predstavljene su u Tabeli 1.

Tabela 1. Nukleotidne sekvence prajmera.

	5' - 3' nizvodni (forward)	3' - 5' uzvodni (reverse)
β-aktin	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	GAGCCACCAATCCACACAGA
IFN-γ	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG	TGCAGGATTTTCATGTCACCA
IL-17	ATCAGGACGCGCAAACATG	TGATCGCTGCTGCCTTCA
IL-10	GAAGACCCTCTGGATACAGCTGC	TGCTCCACTGCCTTGCTTTT

3.8. Izolovanje bakterijske DNK i metagenomska analiza iz uzoraka pluća i creva

3.8.1. Izolovanje ukupne DNK

Ekstrakcija DNK iz zamrznutih uzoraka pluća i creva rađena je upotrebom komercijalno dostupnih kitova, ZR Tissue DNA MiniPrep™ Kit i ZR Faecal and Soil DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA SAD) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija izolovane DNK merena je na BioSpec-nano spektrofotometru (Shimadzu UV-1800).

3.8.2. Gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu (*engl.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu je rađena u uzorcima gastrointestinalnog trakta (sadržaj i tkivo) da bi se odredilo u kojim segmentima su najizraženije promene sastava bakterijskih zajednica. Metoda je rađena po protokolu Lukić i drugi (2013) korišćenjem seta univerzalnih prajmera (komplementarni 16s DNK, specifičnim za sve Eubakterije) U-968-GC-f (5'– AAC GCG AAG AAC CTT AC–3') i L1401-r (5'– CGG TGT GTA CAA GAC CC–3'). Reakciona smeša se sastojala od po 10 pmol svakog prajmera, 1 U Kapa Taq DNK Polimeraze (Kapa Biosystems, Kejp Taun, Južna Afrika), 1 × TaqA pufera sa magnezijumom, 0,2 mM dNTP (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija) i 1 µl izolovane DNK. Reakcija lančanog umnožavanja rađena je na Gene AmpPCR system 2700 (AppliedBiosystems, Foster Siti, SAD) uz variranje temperaturnih uslova i broja ciklusa radi sprečavanja nespecifičnih umnožavanja fragmenata. Nakon PCR reakcije uzorci su mešani sa bojom 6 × Loading Dye Solution (Thermo Scientific) u odnosu 3:1. Po 10 µl smeše je nanošeno na denaturišuću gel i elektroforeza je puštana na DGGE-2001 aparatu (C.B.S. SCIENTIFIC, San Diego, Kalifornija, SAD). Gelovi su fiksirani (10% etanol i 0,5% glacijalnoj sirćetnoj kiselini tokom 20 min) nakon čega su dobijene trake bojene (0,1% srebro-nitrat u trajanju od 10 min) i vizuelizovane (1,5% rastvor natrijum hidroksida (NaOH), 0,1 % natrijum-borhidrida (NaBH₄) i 0,048% formaldehida, do pojave traka). Gelovi su fotografisani na Bio-Rad ChemiDoc Imaging System aparatu i analizirani. Na osnovu dobijenih rezultata, odabran je segment creva u kojem su najizraženije promene u broju detektovanih traka i DNK dobijena iz ovih uzoraka poslata je na sekvenciranje u kompaniju Novogene (Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.8.3. Sekvenciranje V3-V4 regiona gena za 16S rRNK metagenomske DNK korišćenjem sekvencera najnovije generacije (*engl.* Next Generation Sequencing, NGS)

Metagenomska DNK (>12 ng/µl) izolovana iz tkiva pluća i fecesa uslužno je sekvencirana u kompaniji Novogene (Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo). V3-V4 hipervarijabilni regioni 16S rRNK amplifikovani su korišćenjem prajmera 341F (5'–CCTAYGGGRBGCASCAG–3'), i 806R (5'–GGACTACNNGGTATCTAAT– 3') sa barkodom. Nakon toga konstruisane su biblioteke, i sekvenciranje uparenih krajeva (*engl.* paired-end sequencing) je urađeno na Illumina NovaSeq 6000 platformi. Očitane sekvence su obrađivane uklanjanjem barkodova, adaptera i prajmera i potom spajane pomoću softvera FLASH (Verzija 1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>). Za dobijanje očitanih sekvenci visokog kvaliteta korišćen je Qiime program (*engl.* Quantitative insights into microbial ecology) (Verzija 1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html). Efektivne sekvence, nastale nakon uklanjanja himernih sekvenci, grupisane su u operativne taksonomske jedinice (*engl.* Operational

Taxonomic Units, OTU). Za anotaciju vrsta na svakom taksonomskom nivou primenjena je SILVA 138 baza podataka (engl. Silva Database 138, <http://www.arb-silva.de/>) upotrebom Mothur algoritma u programu Qiime. Sudeći po indeksu pokrivenosti (engl. Coverage index), koji je bio veći od 0,991 za svaki uzorak, postignut je dovoljan obim podataka kojim se može opisati stvarno stanje bakterijske zajednice u ispitivanim uzorcima (Chao i Jost, 2012).

Pre analize alfa i beta diverziteta, operacione taksonomske jedinice su normalizovane. Alfa diverzitet, kao i beta diverzitet računati su u Qiime programu. Alfa diverzitet je prikazan kroz sledeće indekse: Indeks posmatranih vrsta (engl. The observed species index), Šenonov indeks diverziteta (engl. The Shannon diversity index) i Čao1 indeks (engl. Chao1 index). Za grafički prikaz kompleksnih metapodataka beta diverziteta korišćena je metoda analize glavnih koordinata (engl. Principal coordinates analysis, PCoA) rađena u R programu (R core team 2021). U cilju određivanja razlika u sastavu mikrobiote između ispitivanih grupa, primenjeni su statistički testovi: Analiza sličnosti (engl. Analysis of similarity, Anosim) i metoda neparametrijskog multivarijantnog testa varijansi, bazirana na matricama udaljenosti (engl. Nonparametric Multivariate Analysis of Variance, MANOVA ili Adonis). Navedeni testovi su izvedeni u programu R koristeći vegan i ggplot2 pakete. Svi navedeni testovi su rađeni u kompaniji Novogene.

Analiza biomarkera ili Linearna diskriminativna analiza algoritma veličine efekta (engl. Linear discriminant analysis effect size, LEfSe) urađena je pomoću Galaxy softver platforme (The Huttenhower Lab, Harvard, 2021. LEfSe platform from Galaxy <https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>).

Sve dobijene sekvence gena za 16S rRNK deponovane su u Evropskom nukleotidnom arhivu (engl. European nucleotide archive, ENA), pod oznakom „PRJEB51019“ (za sekvence dobijene sekvenciranjem mikrobiote pluća) i „PRJEB60516“ (za sekvence dobijene sekvenciranjem mikrobiote creva) i pristupnim brojevima ERP135609, odnosno ERA20766614.

3.9. Statistička obrada rezultata

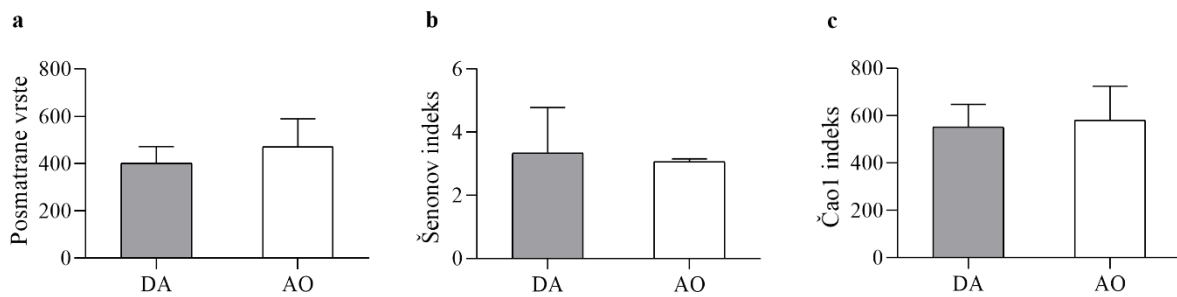
Za statističku obradu podataka korišćeni su softveri GraphPad Prism (San Diego, Kalifornija, SAD) i Statistika 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Rezultati su prikazivani kao srednja vrednost (SV) ± standardna devijacija (SD). Statistička značajnost između dve grupe određivana je Studentovim t testom, dok je poređenje između više grupa računato jednofaktorskom analizom varijansi (engl. One-way analysis of variance, ANOVA), sa Tuckey post hoc testom. Za ispitivanje veze između dve varijable korišćen je Spirmanov neparametrijski test (engl. Spearman's nonparametric rank test). Interval poverenja od 95% je korišćen, a vrednosti manje od 0,05 ($p < 0,05$) su smatrane statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje sastava bakterijske mikrobiote u plućima i crevima kod zdravih (netretiranih/neinficiranih) jedinki pacova

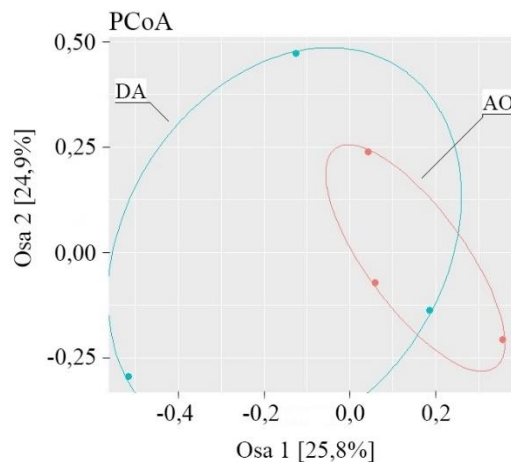
4.1.1. Sastav bakterijske mikrobiote u plućima dva soja pacova

Analiza mikrobiote pluća pokazala je sličan diverzitet i brojnost, izražen preko broja Posmatranih vrsta, Šenonovog indeksa diverziteta i Čao1 indeksa (Slika 6) kod jedinki DA i AO pacova.



Slika 6. Alfa diverzitet pluća predstavljen preko broja Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Analiza glavnih koordinata (Slika 7), analiza sličnosti ($R = 0,037$, $p = 0,4$) i Adonis analiza ($R^2 = 0,1913$, $p = 0,5$) pokazale su da nema statistički značajnih razlika ni u sastavu bakterijske zajednice pluća između jedinki ova dva soja.



Slika 7. Grafički prikaz beta diverziteta u plućima dva soja pacova. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

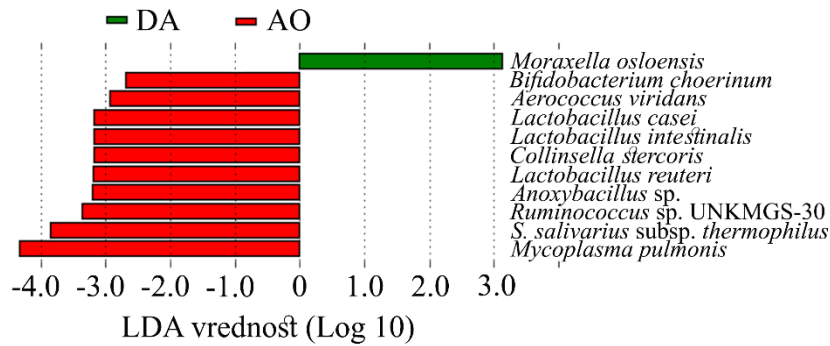
U plućima DA i AO jedinki zapažena je slična relativna zastupljenost razdela Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria i Tenericutes, kao i analiziranih rodova u okviru ovih razdela (rodovi čija je relativna zastupljenost iznad 0,001) (Tabela 2).

Tabela 2. Relativna zastupljenost na nivou razdela i rodova u plućima DA i AO pacova.

	DA	AO
Razdeo Firmicutes	0,186 ± 0,135	0,698 ± 0,320
<i>Lactobacillus</i>	0,010 ± 0,006	0,019 ± 0,004
<i>Streptococcus</i>	0,034 ± 0,024	0,211 ± 0,191
<i>Romboutsia</i>	0,002 ± 0,002	0,014 ± 0,002
<i>Turicibacter</i>	0,001 ± 0,001	0,008 ± 0,001
<i>Allobaculum</i>	0,002 ± 0,003	0,001 ± 0,001
Neidentifikovane <i>Ruminococcaceae</i>	0,003 ± 0,001	0,012 ± 0,006
<i>Blautia</i>	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Clostridiales</i>	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,002
<i>Dubosiella</i>	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001
Neidentifikovane <i>Lachnospiraceae</i>	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,003
Razdeo Bacteroidetes	0,594 ± 0,273	0,187 ± 0,267
<i>Filobacterium</i>	0,558 ± 0,166	0,473 ± 0,155
<i>Bacteroides</i>	0,006 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Razdeo Proteobacteria	0,118 ± 0,043	0,073 ± 0,032
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,000
<i>Acinetobacter</i>	0,004 ± 0,002	0,006 ± 0,005
<i>Ralstonia</i>	0,041 ± 0,012	0,035 ± 0,014
Neidentifikovane <i>Enterobacteriaceae</i>	0,002 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Helicobacter</i>	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,000
Razdeo Actinobacteria	0,054 ± 0,068	0,054 ± 0,068
<i>Collinsella</i>	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,001
<i>Cutibacterium</i>	0,004 ± 0,003	0,004 ± 0,001
Razdeo Tenericutes	0,048 ± 0,032	0,048 ± 0,032
<i>Mycoplasma</i>	0,000 ± 0,000	0,037 ± 0,021
Ostali rodovi	0,324 ± 0,143	0,163 ± 0,023

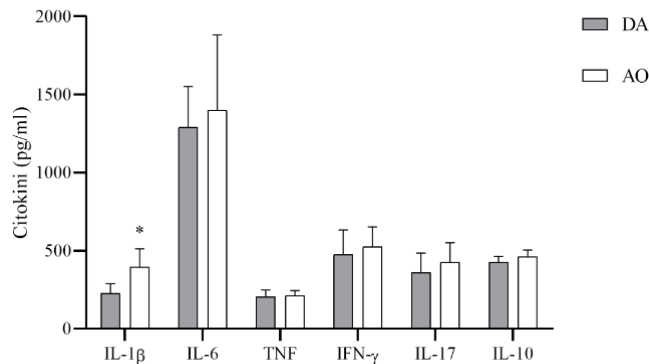
Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test.

Analizom zastupljenosti vrsta u plućima dva soja pacova primećene su diferencijalno zastupljene vrste: *Moraxella osloensis* (iz razdela Proteobacteria) je više zastupljena kod DA jedinki dok je 10 vrsta, od kojih najveći broj pripada razdelu Firmicutes, više zastupljeno kod AO pacova (*Bifidobacterium choerinum*, *Aerococcus viridans*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus intestinalis*, *Collinsella stercoris*, *Lactobacillus reuteri*, *Anoxybacillus* sp., *Ruminococcus* sp. UNKMGS-30, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* i *Mycoplasma pulmonis*) (Slika 8).



Slika 8. Diferencijalno zastupljeni biomarkeri na nivou vrsta. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

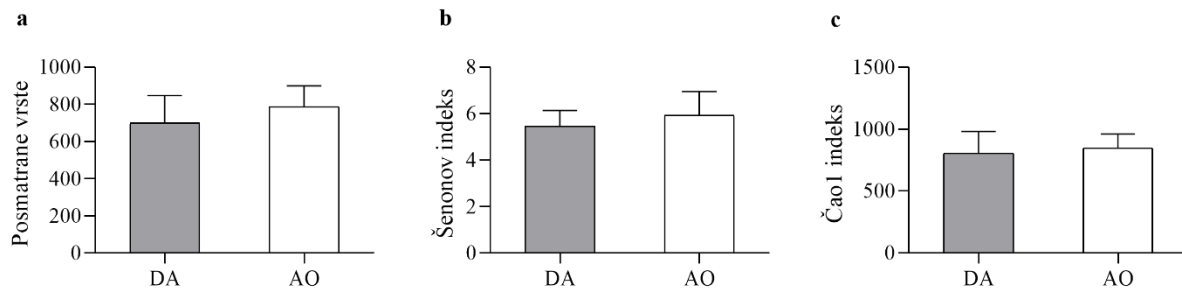
Pored analize bakterijske mikrobiote u plućima, ispitano je da li postoje razlike u sadržaju citokina u plućima DA i AO jedinki. Osim statistički značajno većeg sadržaja IL-1 β kod AO jedinki u poređenju sa DA, nivoi ostalih ispitivanih citokina (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17 i IL-10) se nisu razlikovali između ova dva soja pacova (Slika 9).



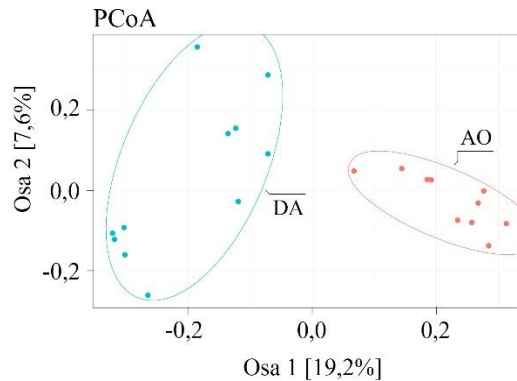
Slika 9. Sadržaj citokina u homogenatu pluća kod zdravih/neinficiranih jedinki pacova. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.1.2. Sastav bakterijske mikrobiote u crevima dva soja pacova

Imajući u vidu uticaj koji mikrobiota creva ostvaruje na pluća, analizirali smo i bakterijsku zajednicu u fecesu kod zdravih/neinficiranih jedinki. Iako nisu primećene razlike u alfa diverzitetu (Slika 10) između dva soja pacova, sastav bakterijske zajednice se razlikuje. Bakterijske zajednice u fecesu DA i AO pacova su jasno prostorno razdvojene u koordinatnom sistemu (Slika 11), što je potvrđeno i analizom sličnosti ($R = 0,531$, $p = 0,001$) i Adonis testom ($R^2 = 0,239$, $p = 0,001$).



Slika 10. Alfa diverzitet u fecesu predstavljen preko Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.



Slika 11. Beta diverzitet u fecesu kod dva soja pacova. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Analiza relativne zastupljenosti taksonomskih jedinica na nivou razdela, pokazala je da su kod obe grupe najzastupljeniji razdeli Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria i Actinobacteria, ali da ne postoje statistički značajne razlike u relativnoj zastupljenosti na nivou razdela između DA i AO jedinki. Analiza na nivou rodova, čija je relativna zastupljenost bila veća od 0,001, takođe nije pokazala postojanje značajnih razlika između sojeva pacova (Tabela 3).

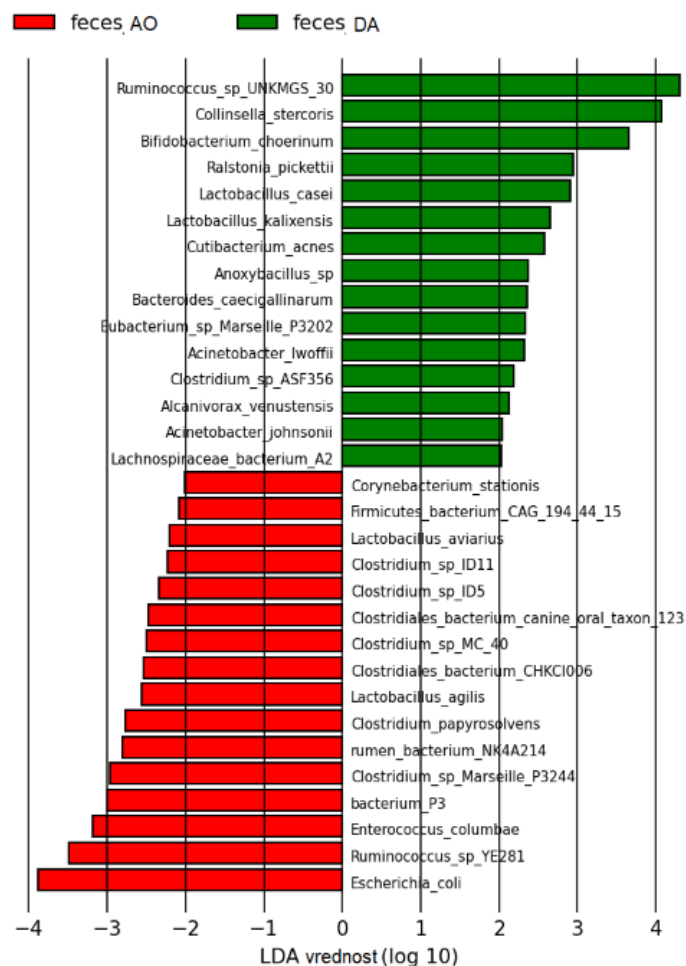
Tabela 3. Relativna zastupljenost na nivou razdela i rodova u fecesu DA i AO pacova.

	DA	AO
Razdeo Firmicutes	0,626 ± 0,085	0,690 ± 0,122
<i>Lactobacillus</i>	0,166 ± 0,115	0,085 ± 0,048
<i>Streptococcus</i>	0,077 ± 0,076	0,017 ± 0,003
<i>Romboutsia</i>	0,028 ± 0,028	0,190 ± 0,115
<i>Turicibacter</i>	0,005 ± 0,002	0,073 ± 0,077
<i>Allobaculum</i>	0,113 ± 0,106	0,005 ± 0,003
Neidentifikovane		
<i>Ruminococcaceae</i>	0,024 ± 0,006	0,098 ± 0,033
<i>Blautia</i>	0,011 ± 0,015	0,004 ± 0,002
Neidentifikovane <i>Clostridiales</i>	0,005 ± 0,004	0,008 ± 0,002
<i>Holdemanella</i>	0,028 ± 0,045	0,001 ± 0,000
<i>Dubosiella</i>	0,002 ± 0,002	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane		
<i>Lachnospiraceae</i>	0,005 ± 0,006	0,012 ± 0,005
<i>Butyricoccus</i>	0,007 ± 0,006	0,002 ± 0,001
<i>Intestinimonas</i>	0,002 ± 0,002	0,005 ± 0,001
<i>Quinella</i>	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,000
<i>Faecalibaculum</i>	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001
Razdeo Bacteroidetes	0,111 ± 0,078	0,109 ± 0,086
<i>Filobacterium</i>	0,009 ± 0,013	0,005 ± 0,002
<i>Bacteroides</i>	0,026 ± 0,034	0,014 ± 0,021
<i>Alloprevotella</i>	0,025 ± 0,033	0,015 ± 0,013
<i>Porphyromonas</i>	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Prevotellaceae</i>	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001
<i>Paraprevotella</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001
<i>Parabacteroides</i>	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,004
Razdeo Proteobacteria	0,133 ± 0,085	0,020 ± 0,010
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,038 ± 0,049	0,003 ± 0,003
<i>Acinetobacter</i>	0,001 ± 0,002	0,000 ± 0,000
<i>Ralstonia</i>	0,002 ± 0,004	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane		
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,000 ± 0,000	0,004 ± 0,003
<i>Enhydrobacter</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Pseudomonas</i>	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000

<i>Sphingomonas</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Massilia</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Parasutterella</i>	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Novosphingobium</i>	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Caulobacter</i>	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Bradyrhizobium</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Pelomonas</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Methylobacterium</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Brevundimonas</i>	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Acidibacter</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Aliihoeflea</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Razdeo Actinobacteria	0,054 ± 0,042	0,011 ± 0,000
<i>Collinsella</i>	0,087 ± 0,071	0,000 ± 0,000
<i>Actinomyces</i>	0,004 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Cutibacterium</i>	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Enterorhabdus</i>	0,007 ± 0,004	0,004 ± 0,002
<i>Micrococcus</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ostali rodovi	0,076 ± 0,083	0,000 ± 0,000
<i>Mycoplasma</i>	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,000
<i>Helicobacter</i>	0,017 ± 0,014	0,000 ± 0,000
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,005 ± 0,006	0,012 ± 0,011
Neidentifikovane		
<i>Spirochaetaceae</i>	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
<i>Thermus</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

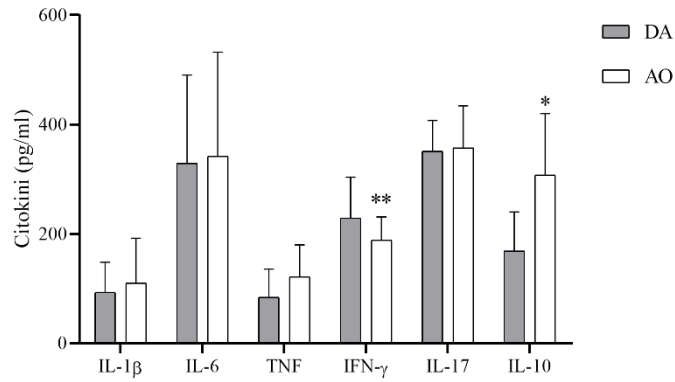
Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test.

Analizom relativne zastupljenosti vrsta kod DA i AO jedinki ustanovljeno je da postoji 31 diferencijalno zastupljena vrsta kod ovih sojeva (15 vrsta je više zastupljeno kod DA, 16 kod AO) (Slika 12). Od identifikovanih vrsta najviše je bilo predstavnika klase Clostridia (26,7% kod DA i 56,2% kod AO), Bacilli (20,0% i 18,7% kod DA i AO jedinki) i Gammaproteobacteria (26,7% kod DA i 0,6% kod AO). Kada je analizirana relativna zastupljenost na nivou klasa primećena je veća relativna zastupljenost klase Clostridia kod AO ($0,488 \pm 0,048$) u poređenju sa DA ($0,344 \pm 0,129$, $p = 0,0037$) dok se relativna zastupljenost klasa Bacilli ($0,112 \pm 0,058$ kod DA i $0,141 \pm 0,061$ kod AO) i Gammaproteobacteria ($0,022 \pm 0,010$ kod DA i $0,026 \pm 0,019$ kod AO) nije razlikovala između sojeva.



Slika 12. Diferencijalno zastupljeni biomarkeri na nivou vrsta u fecesu. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Određivanjem nivoa proinflammatoryh citokina (IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17) i anti-inflamatornog citokina IL-10 u homogenatu kolona zapažen je statistički značajno veći sadržaj IFN- γ , a manji IL-10 u kolonu DA jedinki u poređenju sa AO (Slika 13).



Slika 13. Sadržaj citokina u homogenatu kolona kod dva soja pacova. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t-test. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.2. Ispitivanje promena mikrobiote u plućima i crevima tokom infekcije pluća izazvane gljivom *Aspergillus fumigatus*

Nakon intratrahealnog ubrizgavanja konidija gljive, dolazi do njihovog progresivnog uklanjanja iz pluća jedinki oba soja pacova, pri čemu je stepen infekcije (meren na osnovu broja formiranih kolonija) statistički značajno veći kod AO u odnosu na DA jedinke (Tabela 4).

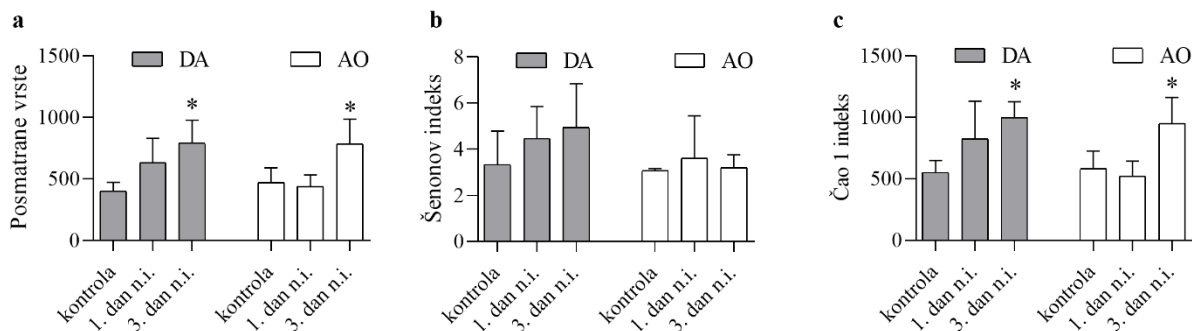
Tabela 4. Stepen infekcije u plućima pacova nakon intratrahealnog ubrizgavanja gljive *A. fumigatus*.

Dan nakon infekcije	DA	AO	p
1	848,3 \pm 249,2	1146,8 \pm 93,8	0,0163
3	147,9 \pm 42,7	308,2 \pm 94,9	0,0038

Rezultati su prikazani kao SV \pm SD broja formiranih kolonija po g tkiva pluća. Za poređenje između dve grupe korišćen je Studentov t- test. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

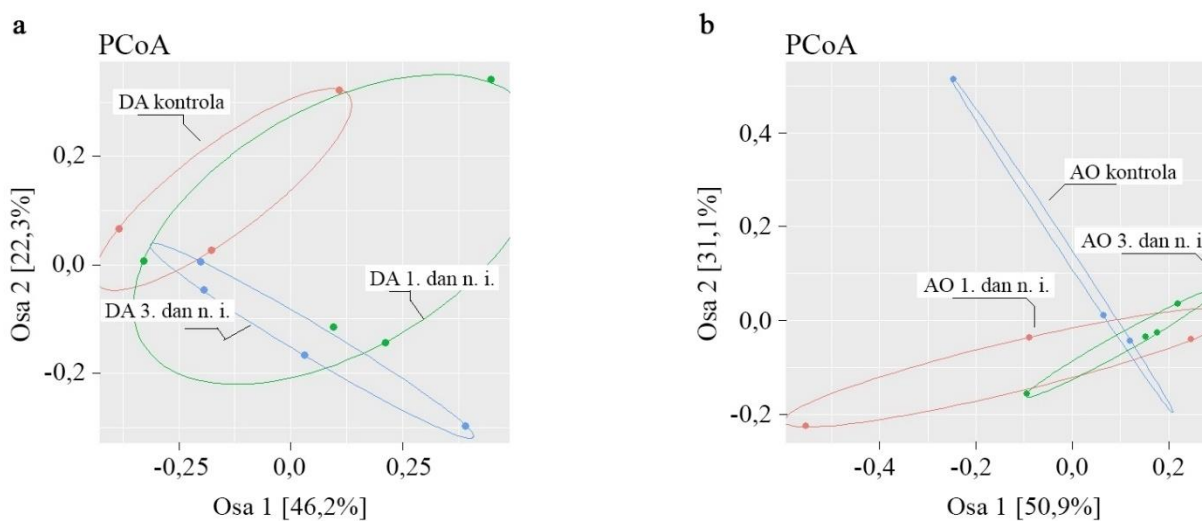
4.2.1. Promene mikrobiote pluća nakon infekcije izazvane gljivom

Infekcija pluća izazvana gljivom *A. fumigatus* dovela je do disbioze u ovom organu kod DA i AO jedinki koja je se ogledala u povećanju broja Posmatranih vrsta (Slika 14a) i Čao1 indeksa (Slika 14c) 3. dana nakon infekcije u odnosu na odgovarajuće kontrole.



Slika 14. Alfa diverzitet pluća predstavljen preko broja Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Analiza glavnih koordinata (Slika 15), analiza sličnosti i Adonis analiza (Tabela 5) pokazale su da se sastav bakterijske zajednice pluća ne menja tokom infekcije.



Slika 15. Beta diverzitet mikrobiote pluća tokom infekcije izazvane gljivom kod a) DA i b) AO jedinki.

Tabela 5. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote pluća tokom infekcije izražen kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA				
kontrola /1. dan n.i.	-0,093	0,639	0,172	0,377
kontrola /3. dan n.i.	0,074	0,272	0,210	0,256
AO				
kontrola /1. dan n.i.	-0,037	0,800	0,156	0,900
kontrola /3. dan n.i.	0,185	0,173	0,257	0,057

Relativna zastupljenost na nivou razdela nije bila statistički značajno promenjena tokom infekcije (u odnosu na kontrolne jedinke), ali su statistički značajne promene primećene na nivou rodova (Tabela 6). Infekcija pluća nije dovela do promena u relativnoj zastupljenosti rodova u okviru razdela Bacteroidetes, Actinobacteria i Tenericutes ni kod jednog soja. Infekcija gljivom kod DA soja izazavala je značajno povećanje relativne zastupljenosti rodova *Romboutsia* i *Turicibacter* 3. dana nakon infekcije i roda Neidentifikovane *Ruminococcaceae* 1. i 3. dana nakon infekcije. Suprotno tome, kod AO pacova prisustvo gljive u plućima dovelo je do pada relativne zastupljenosti roda *Turicibacter* 1. dana nakon infekcije. Smanjenje relativne zastupljenosti roda *Ralstonia* (pripadnik razdela Proteobacteria) u oba ispitivana termina zapaženo je kod oba soja.

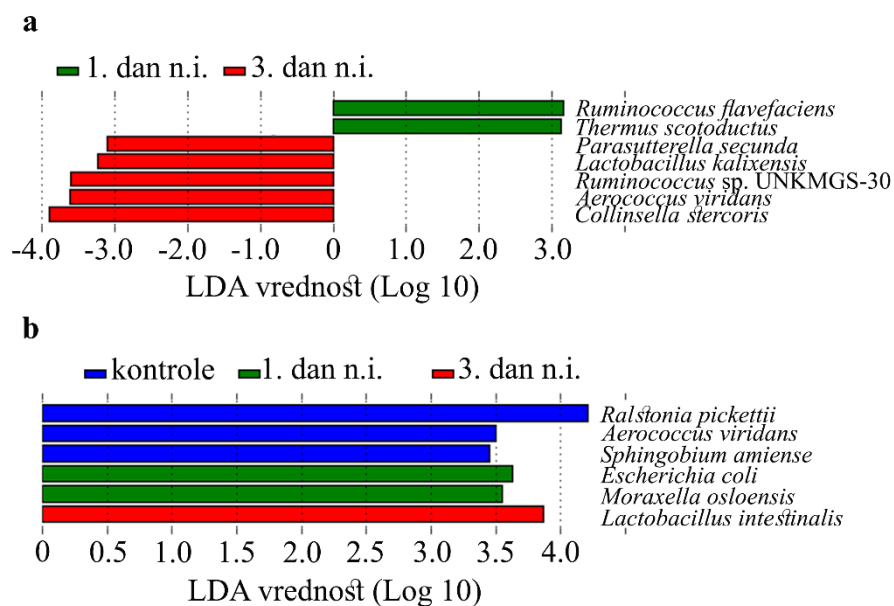
Tabela 6. Promene u relativnoj zastupljenosti razdela i rodova u plućima pacova tokom infekcije.

	DA			AO		
	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.
Razdeo Firmicutes	0,186 ± 0,135	0,355 ± 0,235	0,235 ± 0,187	0,698 ± 0,320	0,185 ± 0,098	0,218 ± 0,033
<i>Lactobacillus</i>	0,010 ± 0,006	0,111 ± 0,190	0,039 ± 0,036	0,019 ± 0,004	0,019 ± 0,015	0,066 ± 0,036
<i>Streptococcus</i>	0,034 ± 0,024	0,104 ± 0,178	0,010 ± 0,005	0,211 ± 0,191	0,007 ± 0,010	0,012 ± 0,004
<i>Romboutsia</i>	0,002 ± 0,002	0,011 ± 0,008	0,020 ± 0,009*	0,014 ± 0,002	0,010 ± 0,007	0,029 ± 0,016
<i>Turicibacter</i>	0,001 ± 0,001	0,005 ± 0,004	0,011 ± 0,007*	0,008 ± 0,001	0,003 ± 0,004*	0,006 ± 0,001
<i>Allobaculum</i>	0,002 ± 0,003	0,005 ± 0,002	0,005 ± 0,004	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Neidentifikovane <i>Ruminococcaceae</i>	0,003 ± 0,001	0,019 ± 0,006**	0,018 ± 0,005*	0,012 ± 0,006	0,017 ± 0,018	0,017 ± 0,005
<i>Blautia</i>	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Clostridiales</i>	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,006 ± 0,003	0,005 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,002
<i>Dubosiella</i>	0,000 ± 0,000	0,0021 ± 0,001	0,011 ± 0,017	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Lachnospiraceae</i>	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,004	0,003 ± 0,003	0,012 ± 0,015	0,004 ± 0,004
Razdeo Bacteroidetes	0,594 ± 0,273	0,323 ± 0,298	0,458 ± 0,231	0,187 ± 0,267	0,415 ± 0,397	0,686 ± 0,119
<i>Filobacterium</i>	0,558 ± 0,166	0,296 ± 0,310	0,399 ± 0,290	0,473 ± 0,155	0,432 ± 0,406	0,638 ± 0,121
<i>Bacteroides</i>	0,006 ± 0,002	0,006 ± 0,004	0,017 ± 0,027	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Razdeo Proteobacteria	0,118 ± 0,043	0,156 ± 0,026	0,125 ± 0,052	0,073 ± 0,032	0,034 ± 0,053	0,030 ± 0,006
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,003 ± 0,001	0,009 ± 0,003	0,007 ± 0,005	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Acinetobacter</i>	0,004 ± 0,002	0,035 ± 0,044	0,044 ± 0,053	0,006 ± 0,005	0,003 ± 0,002	0,000 ± 0,000
<i>Ralstonia</i>	0,041 ± 0,012	0,007 ± 0,010*	0,007 ± 0,008*	0,035 ± 0,014	0,002 ± 0,003*	0,004 ± 0,002*
Neidentifikovane <i>Enterobacteriaceae</i>	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,005 ± 0,005	0,000 ± 0,000	0,009 ± 0,008	0,002 ± 0,002
<i>Helicobacter</i>	0,000 ± 0,000	0,013 ± 0,021	0,006 ± 0,006	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000

Razdeo Actinobacteria	0,054 ± 0,068	0,059 ± 0,055	0,059 ± 0,035	0,054 ± 0,068	0,011 ± 0,026	0,007 ± 0,002
<i>Collinsella</i>	0,001 ± 0,000	0,008 ± 0,004	0,015 ± 0,022	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,004	0,000 ± 0,000
<i>Cutibacterium</i>	0,004 ± 0,003	0,007 ± 0,004	0,010 ± 0,016	0,004 ± 0,001	0,009 ± 0,03	0,001 ± 0,001
Razdeo Tenericutes	0,048 ± 0,032	0,018 ± 0,029	0,001 ± 0,001	0,048 ± 0,032	0,031 ± 0,246	0,003 ± 0,112
<i>Mycoplasma</i>	0,000 ± 0,000	0,018 ± 0,029	0,001 ± 0,001	0,037 ± 0,021	0,157 ± 0,246	0,058 ± 0,112
Ostali rodovi	0,324 ± 0,143	0,337 ± 0,077	0,361 ± 0,106	0,163 ± 0,023	0,310 ± 0,190	0,157 ± 0,050

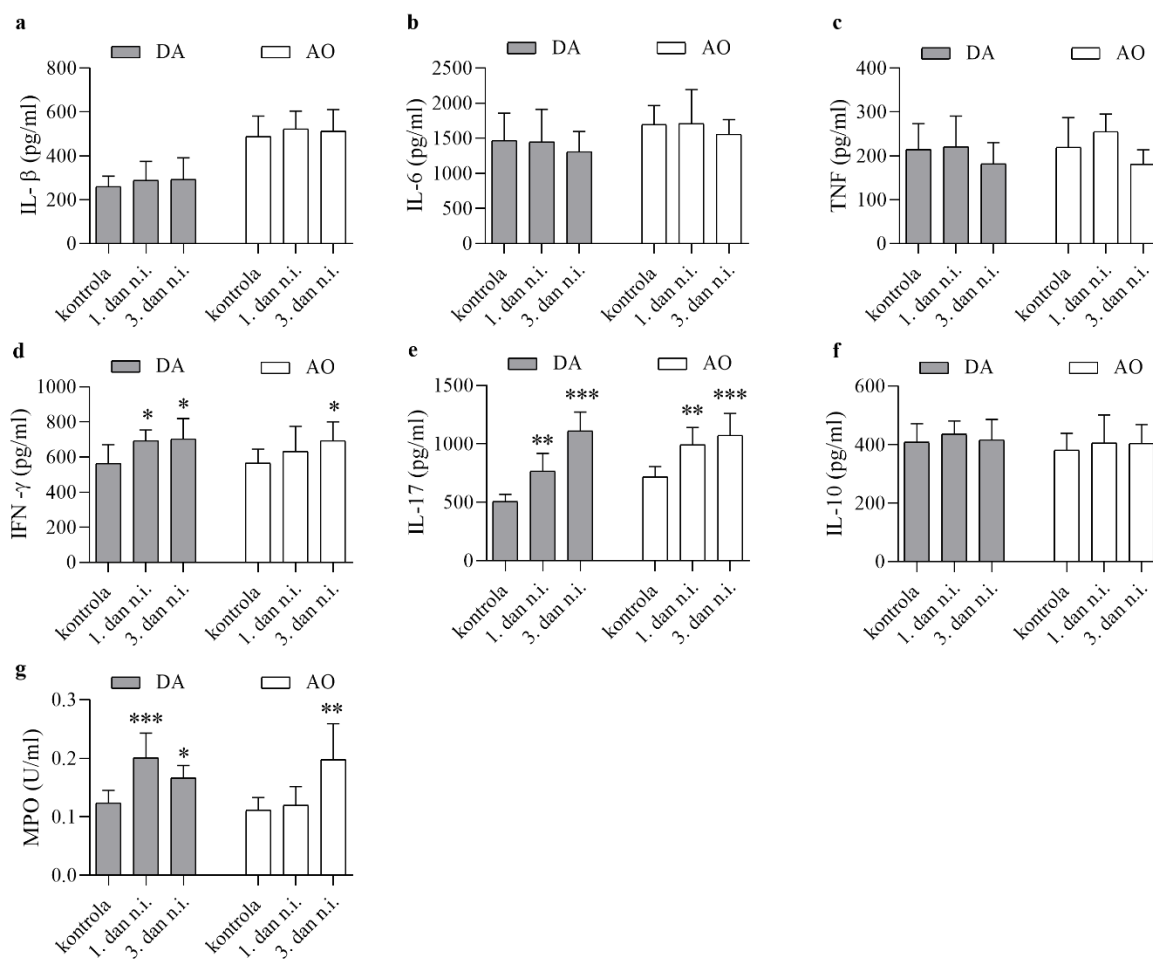
Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Analiza diferencijalno zastupljenih vrsta tokom infekcije kod DA pacova je pokazala veću zastupljenost *Ruminococcus flavefaciens* i *Thermus scotoeductus* 1. dana nakon infekcije, dok su 3. dana n.i. detektovane vrste *Parasutterella secunda*, *Lactobacillus kalixensis*, *Ruminococcus* sp. UNKMGS-30, *Aerococcus viridans* i *Collinsella stercoris* (Slika 16a). Infekcija pluća gljivom kod AO soja dovela je do veće zastupljenosti vrsta *Escherichia coli* i *Moraxella osloensis* 1. dana i *Lactobacillus intestinalis* 3. dana u odnosu na kontrolu (koja se odlikovala diferencijalnom zastupljenošću vrsta *Ralstonia pickettii* i *Aerococcus viridans*) (Slika 16b).



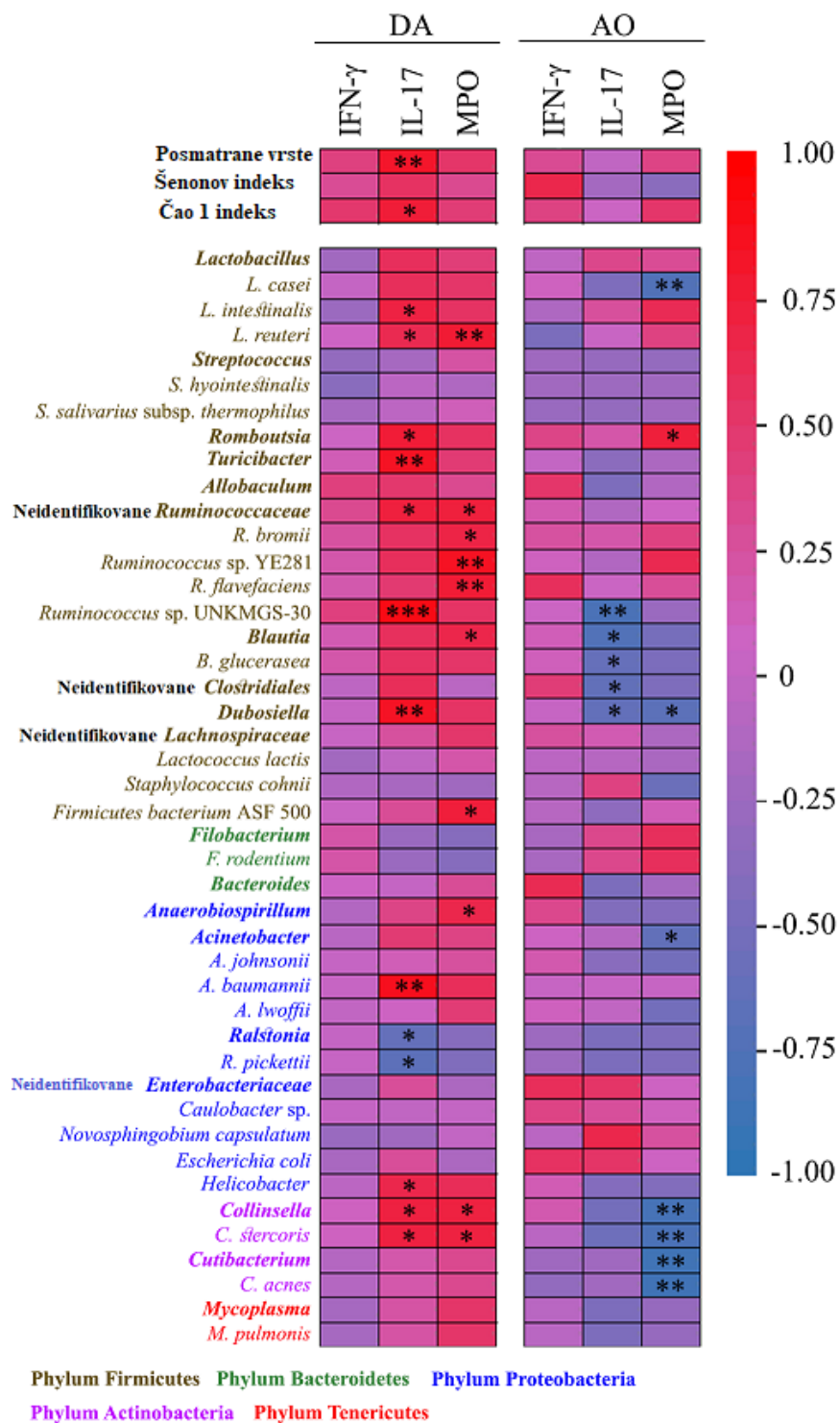
Slika 16. Diferencijalno zastupljeni biomarkeri na nivou vrsta u plućima tokom infekcije kod (a) DA i (b) AO pacova.

Da bi ispitali šta bi moglo da dovede do promena u mikrobioti pluća, određivan je sadržaj citokina i aktivnost enzima MPO (marker inflamacije) u plućima tokom infekcije gljivom (Slika 17). Nije bilo statistički značajnih promena u sadržaju citokina IL-1 β (Slika 17a), IL-6 (Slika 17b), TNF (Slika 17c) i IL-10 (Slika 17f) kod inficiranih jedinki u odnosu na kontrole. Sadržaj citokina IFN- γ (Slika 17d) i aktivnost enzima MPO (Slika 17g) bili su značajno povišeni kod oba soja (kod DA 1. i 3. dana, a kod AO soja samo 3. dana nakon infekcije). Statistički značajno povećanje sadržaja proinflamatornog citokina IL-17 (Slika 17e) primećeno je kod inficiranih jedinki oba soja u oba ispitivana termina.



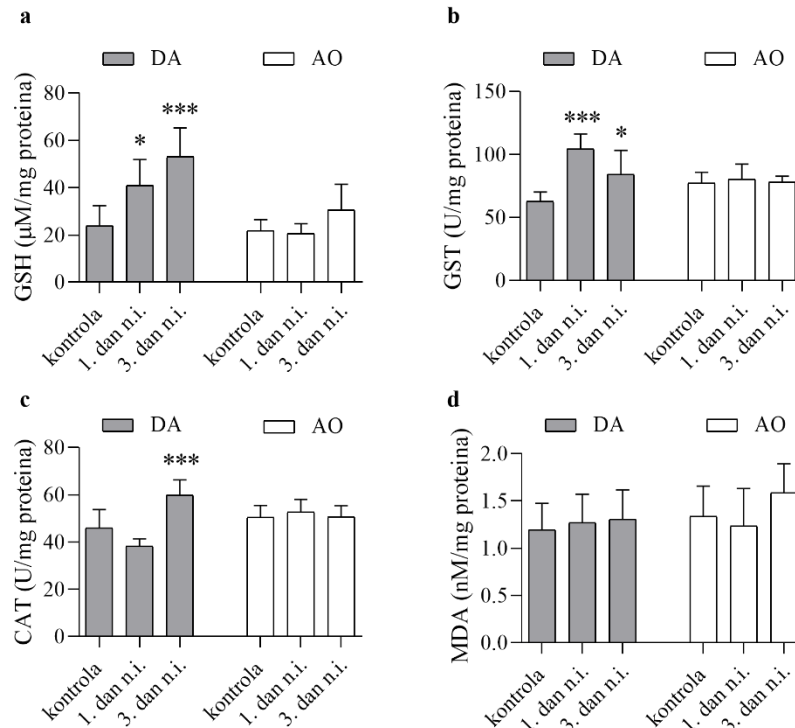
Slika 17. Sadržaj citokina i aktivnost enzima MPO mereni u plućima tokom infekcije. (a) IL-1 β , (b) IL-6, (c) TNF, (d) IFN- γ , (e) IL-17 (f) IL-10, (g) MPO. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Ispitivanje korelacije između parametara inflamatornog odgovora (INF- γ , IL-17 i MPO) i indeksa alfa diverziteta ili relativne zastupljenosti taksonomskih jedinica (Slika 18) je pokazalo da sadržaj citokina INF- γ nije u korelaciji sa promenama u alfa diverzitetu niti sa promenama u relativnoj zastupljenosti taksonomskih jedinica. Pozitivne korelacije pronađene su kod DA pacova između proinflamatornog citokina IL-17 i indeksa alfa diverziteta (Posmatrane vrste i Čao1 indeks) za razliku od AO jedinki kod kojih nisu postojale korelacije među ovim parametrima (Slika 18). Pored toga, sadržaj citokina IL-17 i enzima MPO je u pozitivnoj korelaciji sa relativnom zastupljenošću rodova i vrsta tokom infekcije kod DA jedinki, dok su kod AO soja uočene negativne korelacije.



Slika 18. Korelacije alfa diverziteta i relativnih zastupljenosti rodova i vrsta sa parametrima inflamacije. Za poređenje odnosa između dve varijable korišćen je Spirmanov neparametrijski test. Statistički značajne vrednosti pri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

S obzirom da oksidativni stres, pored inflamacije može da bude uzrok disbioze (Qiao i drugi, 2019), ispitivali smo da li je infekcija gljivom dovela do pojave oksidativnog stresa u plućima (Slika 19). Značajno povećanje sadržaja glutaciona (Slika 19a) i aktivnosti glutacion S transferaze (Slika 19b) u oba termina tokom infekcije i aktivnosti katalaze (Slika 19c) 3. dana nakon infekcije detektovano je samo kod jedinki DA soja. Nije bilo promena u sadržaju malondialdehida (Slika 19d) ni kod jednog soja pacova tokom infekcije.



Slika 19. Parametri oksidativnog stresa u plućima. (a) Nivo redukovanog glutaciona (GSH), (b) Aktivnost glutacion S transferaze (GST), (c) Aktivnost enzima katalaze, (d) Nivo malondialdehida (MDA). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$.

4.2.2. Promene mikrobiote creva nakon infekcije pluća izazvane infekcijom sa *A. fumigatus*

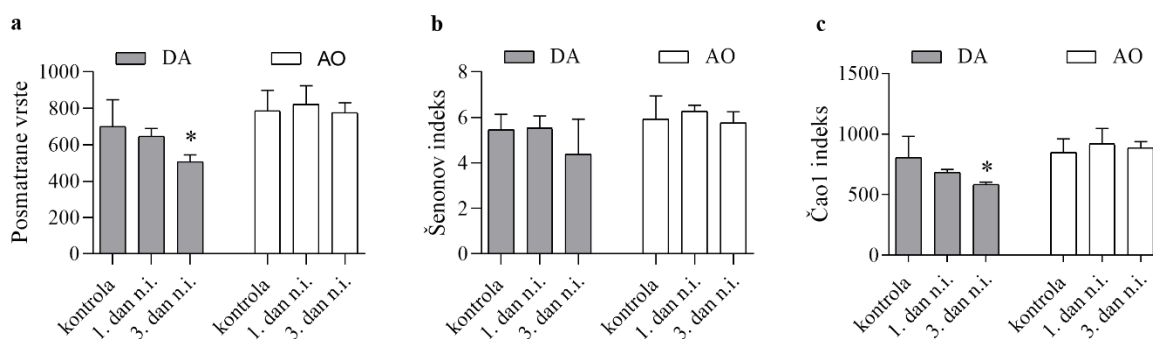
Prvo je upotrebom DGGE metode analizirano u kom segmentu creva je došlo do najvećeg stepena promena tokom infekcije (praćene su promene u broju bakterija u zidu creva, kao i crevni sadržaj duodenuma, ileuma, cekuma i kolona). Smanjenje broja DGGE traka (Tabela 7) primećeno je u duodenumu (1. dana n. i. u zidu) i fecesu u oba ispitivana termina samo kod jedinki DA soja. Kako je najveći broj traka primećen u fecesu, a s obzirom da su fekalni uzorci lako dostupni, odlučili smo da ove uzorke detaljno analiziramo.

Tabela 7. Broj DGGE traka u segmentima creva tokom infekcije pluća izazvane gljivom.

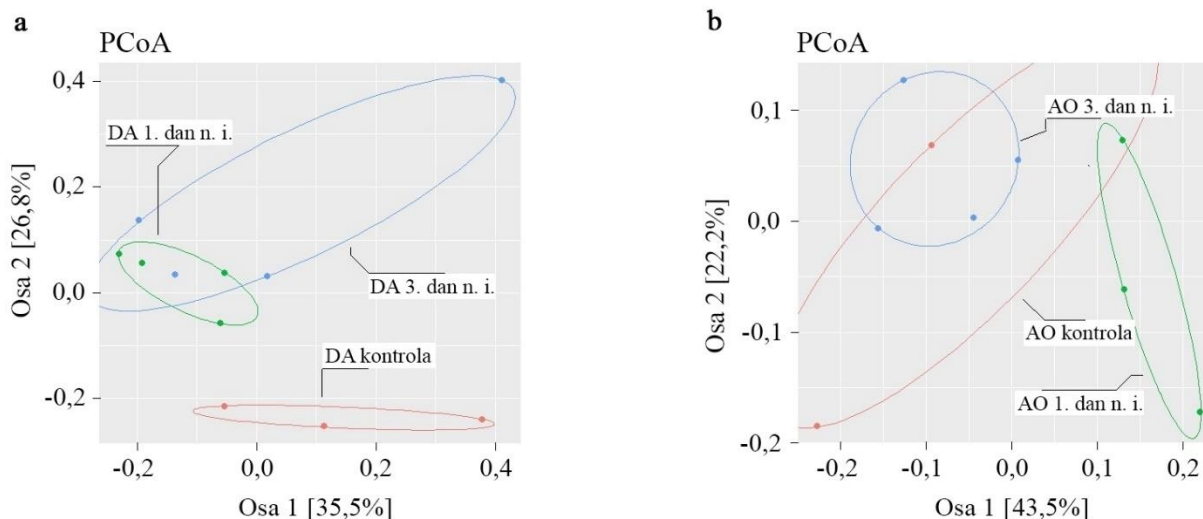
	DA			AO		
	Kontrola	1. dan n.i.	3. dan n.i.	Kontrola	1. dan n.i.	3. dan n.i.
Duodenum						
zid	20,3 ± 2,7	12,5 ± 3,8***	18,0 ± 3,5	15,9 ± 4,2	17,7 ± 9,1	15,6 ± 7,1
lumen	22,0 ± 2,0	22,0 ± 2,9	19,5 ± 2,8	21,2 ± 9,5	20,3 ± 7,4	20,5 ± 6,7
Ileum						
zid	25,0 ± 2,9	22,0 ± 4,7	22,0 ± 5,5	17,7 ± 4,8	22,1 ± 9,1	19,1 ± 6,1
lumen	21,0 ± 4,3	22,0 ± 3,2	19,0 ± 2,8	22,3 ± 3,7	24,5 ± 6,3	25,9 ± 8,8
Cekum						
zid	22,0 ± 2,8	22,0 ± 4,2	18,0 ± 4,1	25,6 ± 6,2	25,9 ± 6,0	28,1 ± 7,4
lumen	26,0 ± 4,7	28,0 ± 5,0	24,0 ± 4,4	34,9 ± 6,4	35,4 ± 5,7	27,7 ± 8,3
Kolon						
zid	20,5 ± 3,5	22,0 ± 3,7	20,0 ± 4,9	24,1 ± 3,7	22,7 ± 8,7	21,1 ± 3,5
lumen (feces)	32,0 ± 5,0	25,5 ± 4,5***	20,5 ± 2,3***	37,8 ± 5,0	36,4 ± 3,0	33,8 ± 3,7

Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Analizom uzoraka fecesa pokazano je da tokom infekcije pluća izazvane sa *A. fumigatus* dolazi do statistički značajnog pada broja Posmatranih vrsta (Slika 20a) i Čao1 indeksa (Slika 20c) kod jedinki DA soja, dok kod AO nisu primećene promene. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja sastava bakterijske zajednice. Dok kod jedinki AO soja nisu primećene promene, kod DA soja postoje razlike u sastavu bakterijske zajednice (Slika 21, Tabela 8).



Slika 20. Alfa diverzitet creva predstavljen preko broja Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.



Slika 21. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote u fecesu kod (a) DA i (b) AO jedinki tokom infekcije pluća izazvane gljivom *A. fumigatus*. (DA) Dark Agouti i (AO) Albino Oxford.

Tabela 8. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote creva tokom infekcije pluća izražen kroz Adonis i Anosim.

	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA				
kontrola /1. dan n.i.	0,593	0,029	0,377	0,001
kontrola /3. dan n.i.	0,315	0,080	0,277	0,059
AO				
kontrola /1. dan n.i.	1,000	0,100	0,259	0,200
kontrola /3. dan n.i.	0,889	0,100	0,076	1,000

Daljim ispitivanjem promena relativne zastupljenosti (Tabela 9) na nivou razdela tokom infekcije pokazano je da nema razlika na ovom taksonomskom nivou između inficiranih jedinki i kontrola ni kod jednog soja pacova. Promene su detektovane u relativnoj zastupljenosti na nivou rodova. Analiza promena u okviru razdela Firmicutes kod DA pacova pokazala je povećanje relativne zastupljenosti roda *Romboutsia* (u oba termina tokom infekcije), neidentifikovanih rodova reda *Clostridiales* (1. dana n.i.) i *Dubosiella* (3. dana n.i.). Dodatno, infekcija pluća kod DA pacova dovela je do smanjenja relativne zastupljenosti rodova *Streptococcus*, *Allobaculum* i *Butyricoccus* u fecesu u oba termina tokom infekcije, kao i do smanjenja relativne zastupljenosti roda *Quinella* 3. dana n.i.. Povećanje relativne zastupljenosti roda *Paraprevotella* (razdeo Bacteroidetes) 1. dana n.i., i smanjenje roda *Novosphingobium* (razdeo Proteobacteria) 3. dana n.i., *Enterorhabdus* (razdeo Actinobacteria) u oba ispitivana termina i *Candidatus Saccharimonas* 3. dana n.i. je takođe primećeno u fecesu DA jedinki. Jedina promena tokom infekcije koja je primećena u fecesu AO jedinki je smanjenje *Filobacterium* (razdeo Bacteroidetes) 3. dana nakon infekcije.

Tabela 9. Promene u relativnoj zastupljenosti razdela i rodova u crevima pacova tokom infekcije pluća.

	DA			AO		
	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.
Razdeo Firmicutes	0,626 ± 0,085	0,620 ± 0,148	0,555 ± 0,250	0,690 ± 0,122	0,654 ± 0,010	0,666 ± 0,061
<i>Lactobacillus</i>	0,166 ± 0,115	0,063 ± 0,034	0,121 ± 0,120	0,085 ± 0,048	0,202 ± 0,082	0,056 ± 0,040
<i>Streptococcus</i>	0,077 ± 0,076	0,003 ± 0,003*	0,007 ± 0,002*	0,017 ± 0,003	0,034 ± 0,024	0,019 ± 0,006
<i>Romboutsia</i>	0,028 ± 0,028	0,204 ± 0,099*	0,148 ± 0,026*	0,190 ± 0,115	0,088 ± 0,023	0,205 ± 0,044
<i>Turicibacter</i>	0,005 ± 0,002	0,104 ± 0,059	0,117 ± 0,111	0,073 ± 0,077	0,022 ± 0,012	0,066 ± 0,017
<i>Allobaculum</i>	0,113 ± 0,106	0,011 ± 0,007**	0,008 ± 0,007**	0,005 ± 0,003	0,006 ± 0,007	0,004 ± 0,002
Neidentifikovane <i>Ruminococcaceae</i>	0,024 ± 0,006	0,037 ± 0,004	0,015 ± 0,013	0,098 ± 0,033	0,076 ± 0,023	0,073 ± 0,015
<i>Blautia</i>	0,011 ± 0,015	0,009 ± 0,003	0,012 ± 0,013	0,004 ± 0,002	0,002 ± 0,001	0,004 ± 0,003
Neidentifikovane <i>Clostridiales</i>	0,005 ± 0,004	0,067 ± 0,050*	0,02 ± 0,012	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,014 ± 0,012
<i>Holdemanella</i>	0,028 ± 0,045	0,000 ± 0,001	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001
<i>Dubosiella</i>	0,002 ± 0,002	0,007 ± 0,004	0,026 ± 0,019*	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Lachnospiraceae</i>	0,005 ± 0,006	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,012 ± 0,005	0,009 ± 0,006	0,010 ± 0,009
<i>Butyricoccus</i>	0,007 ± 0,006	0,002 ± 0,001*	0,000 ± 0,001*	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001
<i>Intestinimonas</i>	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,010 ± 0,007	0,004 ± 0,002
<i>Quinella</i>	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000*	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
<i>Faecalibaculum</i>	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,000
Razdeo Bacteroidetes	0,111 ± 0,078	0,258 ± 0,131	0,129 ± 0,087	0,109 ± 0,086	0,145 ± 0,044	0,096 ± 0,020
<i>Filobacterium</i>	0,009 ± 0,013	0,004 ± 0,001	0,009 ± 0,009	0,005 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,000 ± 0,000*
<i>Bacteroides</i>	0,026 ± 0,034	0,021 ± 0,009	0,031 ± 0,034	0,014 ± 0,021	0,003 ± 0,001	0,008 ± 0,013
<i>Alloprevotella</i>	0,025 ± 0,033	0,035 ± 0,021	0,003 ± 0,003	0,015 ± 0,013	0,005 ± 0,004	0,009 ± 0,015
<i>Porphyromonas</i>	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Neidentifikovane <i>Prevotellaceae</i>	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,000
<i>Paraprevotella</i>	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,001**	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Parabacteroides</i>	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,004	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,002
Razdeo Proteobacteria	0,133 ± 0,085	0,079 ± 0,042	0,264 ± 0,342	0,020 ± 0,010	0,020 ± 0,010	0,018 ± 0,005
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,038 ± 0,049	0,004 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,005
<i>Acinetobacter</i>	0,001 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,015 ± 0,028	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Ralstonia</i>	0,002 ± 0,004	0,003 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Neidentifikovane <i>Enterobacteriaceae</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,004	0,005 ± 0,004
<i>Enhydrobacter</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Pseudomonas</i>	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Sphingomonas</i>	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Massilia</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Parasutterella</i>	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Novosphingobium</i>	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000*	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Caulobacter</i>	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Bradyrhizobium</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Pelomonas</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Methylobacterium</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Brevundimonas</i>	0,000 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Acidibacter</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Aliihoeflea</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Razdeo Actinobacteria	0,054 ± 0,042	0,020 ± 0,009	0,027 ± 0,032	0,011 ± 0,000	0,022 ± 0,012	0,012 ± 0,009
<i>Collinsella</i>	0,087 ± 0,071	0,055 ± 0,036	0,222 ± 0,341	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Actinomyces</i>	0,004 ± 0,001	0,002 ± 0,003	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
<i>Cutibacterium</i>	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

<i>Enterorhabdus</i>	0,007 ± 0,004	0,002 ± 0,001*	0,003 ± 0,002*	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,003	0,004 ± 0,003
<i>Micrococcus</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
Ostali rodovi	0,076 ± 0,083	0,023 ± 0,013	0,025 ± 0,032	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Mycoplasma</i>	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,006 ± 0,009	0,000 ± 0,000
<i>Helicobacter</i>	0,017 ± 0,014	0,018 ± 0,014	0,021 ± 0,033	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	0,005 ± 0,006	0,001 ± 0,001	0,000 ± 0,000*	0,012 ± 0,011	0,014 ± 0,007	0,012 ± 0,009
Neidentifikovane <i>Spirochaetaceae</i>	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,004 ± 0,003	0,001 ± 0,001
<i>Thermus</i>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.2.3. Mehanizmi komunikacije između pluća i creva

4.2.3.1. Migracija bakterija između organa

Da bi ispitali da li postoji migracija bakterija između pluća i creva, analiziran je sastav bakterijske zajednice ova dva organa, i pokazano da se mikrobiota pluća i creva međusobno razlikuju kako pre infekcije, tako i tokom infekcije (iako zbog visokih varijacija unutar pojedinih grupa razlike nisu bile statistički značajne) (Tabela 10). Dodatno, analizom taksonomskih jedinica (operational taxonomic units, OTU) je pokazano da je kod DA jedinki moguće identifikovati 1581 taksonomsku jedinicu u plućima i 837 u crevima, pri čemu je 190 prisutno u svim eksperimentalnim grupama u oba organa. Kod jedinki AO soja je identifikovano 2377 taksonomskih jedinica u plućima i 2070 u crevima od kojih je 342 prisutno kod svih jedinki u oba organa. Nakon infekcije izazvane gljivom, u plućima se pojavljuju taksonomske jedinice koje nisu detektovane kod kontrolnih jedinki (923 kod DA i 1399 kod AO) pri čemu većina nije prisutna u crevima (537/923 kod DA i 750/1399 kod AO).

Tabela 10. Razlike u sastavu bakterijskih zajednica pluća i creva tokom infekcije pluća izražene kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA				
Kontrole	1,000	0,100	0,521	0,100
1. dan n.i.	0,760	0,027	0,443	0,031
3. dan n.i.	0,729	0,035	0,390	0,032
AO				
Kontrole	1,000	0,100	0,612	0,001
1. dan n.i.	0,889	0,100	0,493	0,001
3. dan n.i.	1,000	0,027	0,736	0,024

4.2.3.2. Sistemska inflamacija

Tokom pulmonarne infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus* nisu primećene promene u perifernoj krvi (ukupan i diferencijalan broj leukocita, broj eritrocita i trombocita) kao ni u koncentraciji citokina (IL-6, TNF i IL-17) u plazmi (Tabela 11).

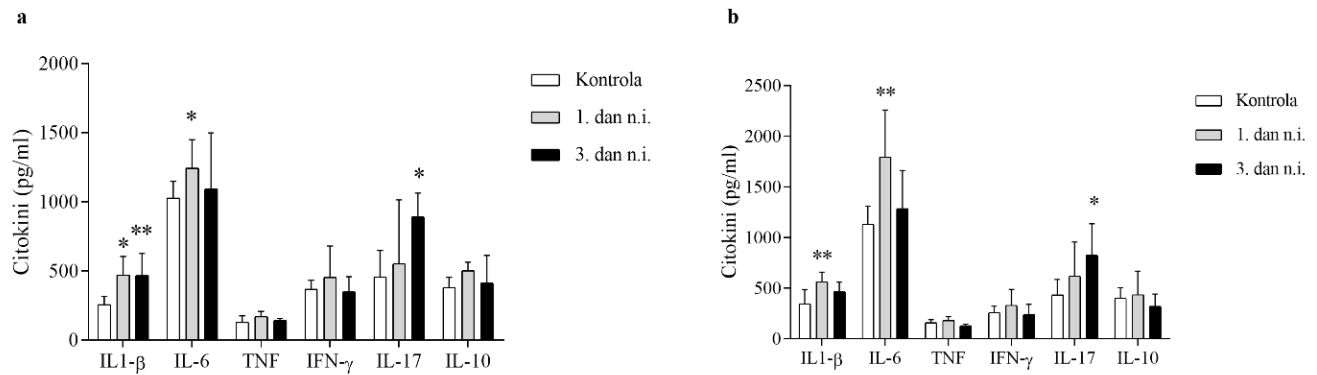
Tabela 11. Parametri u perifernoj krvi tokom infekcije pluća izazvane gljivom kod DA i AO pacova.

Ispitani parametri	DA			AO		
	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.	kontrole	1. dan n.i.	3. dan n.i.
Leukociti ($\times 10^9/l$)	10,3 \pm 0,8	9,1 \pm 1,1	8,7 \pm 0,5	5,2 \pm 1,1	5,1 \pm 0,9	4,8 \pm 1,3
Limfociti ($\times 10^9/l$)	5,8 \pm 0,6	3,8 \pm 0,6	3,6 \pm 0,9	2,3 \pm 0,9	2,0 \pm 0,7	2,4 \pm 0,7
Neutrofili ($\times 10^9/l$)	3,5 \pm 0,4	4,9 \pm 0,9	4,8 \pm 0,7	2,2 \pm 0,5	2,9 \pm 0,7	2,2 \pm 0,9
Monociti ($\times 10^9/l$)	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Eozinofili ($\times 10^9/l$)	0,09 \pm 0,03	0,13 \pm 0,06	0,11 \pm 0,03	0,05 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,04
Bazofili ($\times 10^9/l$)	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
Eritrociti ($\times 10^{12}/l$)	8,1 \pm 0,3	8,1 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1	7,7 \pm 0,3	7,9 \pm 0,3	7,5 \pm 1,4
Hemoglobin (g/l)	137,5 \pm 2,8	137,4 \pm 1,7	137,1 \pm 1,7	140,8 \pm 5,2	144,3 \pm 5,1	137,9 \pm 24,6
Hematokrit (%)	0,45 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	0,43 \pm 0,08
Trombociti ($\times 10^9/l$)	659,4 \pm 37,3	615,5 \pm 42,7	733,0 \pm 19,9	779,1 \pm 113,8	710,7 \pm 65,7	799,9 \pm 95,7
Citokini u plazmi						
IL-6 (pg/ml)	248,9 \pm 25,4	266,7 \pm 23,3	279,0 \pm 22,6	216,6 \pm 60,6	207,9 \pm 23,6	225,4 \pm 53,4
TNF (pg/ml)	112,5 \pm 11,8	107,5 \pm 7,5	108,8 \pm 6,9	103,3 \pm 20,8	95,0 \pm 10,0	102,0 \pm 20,8
IL-17(pg/ml)	35,1 \pm 4,6	36,9 \pm 2,4	31,0 \pm 4,1	30,5 \pm 11,4	30,5 \pm 4,5	32,8 \pm 10,2

Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

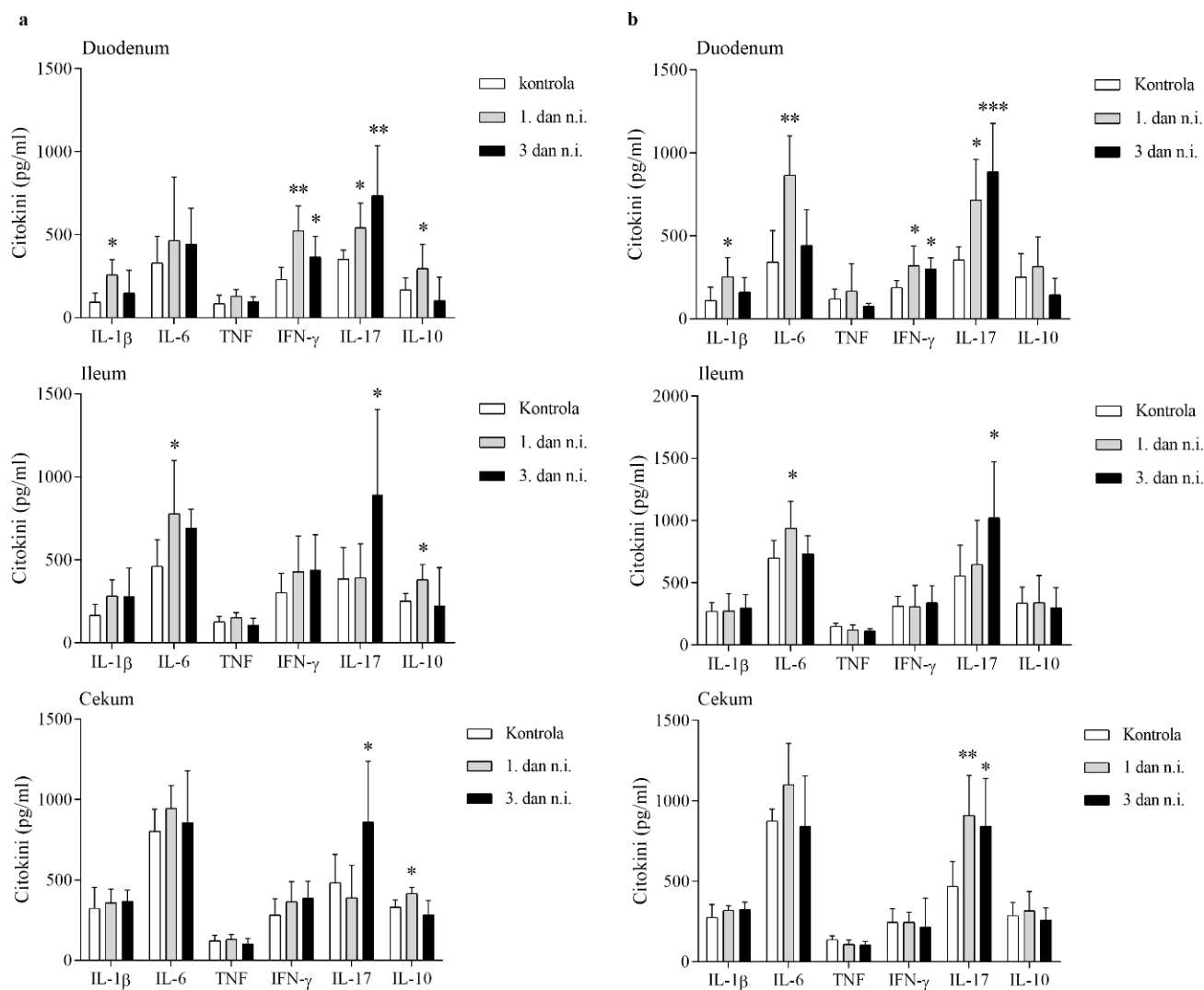
4.2.3.3. Inflamacija u gastrointestinalnom traktu

Analiza sadržaja citokina u kolonu je pokazala statistički značajno povećanje nivoa IL-1 β (u oba ispitivana termina kod DA i 1. dana nakon infekcije kod AO), IL-6 (1. dana n.i.) i IL-7 (3. dana n.i.) kod inficiranih jedinki u odnosu na kontrole (Slika 22).



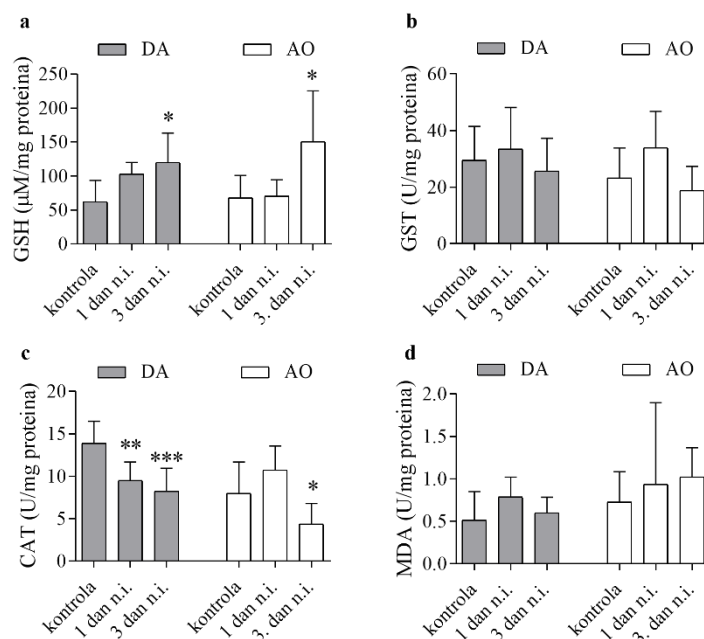
Slika 22. Sadržaj citokina u kolonu DA (a) i AO (b) pacova tokom infekcije pluća izazvane gljivom. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

Statistički značajno povećanje sadržaja citokina primećeno je i u drugim segmentima gastrointestinalnog trakta (Slika 23). U duodenumu je primećeno povećanje sadržaja IL-1 β (1. dana n.i. kod oba soja), IL-6 (1. dana n.i. samo kod AO), IFN- γ (oba ispitivana termina kod oba soja) i IL-17 (oba ispitivana termina kod oba soja). U ileumu oba soja je povećan sadržaj IL-6 (1. dana n.i.) i IL-17 (3. dana n.i.). Sadržaj IL-17 je bio povećan i u cekumu kod jedinki oba soja (3. dana n.i. kod DA, i u oba termina kod AO jedinki). Sadržaj IL-10 je povećan u duodenumu, ileumu i cekumu samo kod jedinki DA soja 1. dana nakon infekcije.



Slika 23. Sadržaj citokina u drugim segmentima gastrointestinalnog trakta tokom infekcije pluća. (Panel a) DA, (Panel b) AO jedinke. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$.**

Pored sadržaja citokina, u kolonu su mereni i parametri oksidativnog stresa (Slika 24). Nivo redukovano glutationa je statistički značajno povišen kod jedinki oba soja (Slika 24a) 3. dana n.i.. Pored toga, aktivnost katalaze je smanjena kod jedinki DA soja u oba termina nakon infekcije, a kod AO samo 3. dana nakon infekcije (Slika 24c). Aktivnost enzima glutation S transferaze i nivo malondialdehida nisu bili promenjeni (Slika 24b,d).



Slika 24. Parametri oksidativnog stresa u kolonu. (a) Nivo redukovanog glutationa (GSH), (b) Aktivnost glutation s transferaze (GST), (c) aktivnost enzima katalaze (CAT), (d) Nivo malondialdehida (MDA). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tukey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.3. Ispitivanje efekta smeše antibiotika na mikrobiotu pluća i creva

Da bi ispitali da li bakterijska mikrobiota može da utiče na karakteristike imunskog odgovora tokom infekcije, kod jedinki DA i AO pacova je izazvana disbioza oralnom primenom smeše antibiotika (neomicin 0,5 g/l, gentamicin 0,5 g/l i vankomicin 0,25 g/l) u trajanju od 30 dana pre intratrahealnog ubrizgavanja konidija gljive. Pre izazivanja infekcije je prvo ispitano kako primena antibiotika utiče na bakterijske zajednice u plućima i crevima.

U toku 30 dana tretmana antibioticima nisu primećene razlike u prinosu telesne mase između jedinki koje su pile vodu i vodu sa antibioticima, ali je veći unos vode zapažen kod jedinki koje su primale antibiotike. Kada je na osnovu koncentracije antibiotika i dnevnog unosa vode po jedinki, preračunat dnevni unos antibiotika, nisu primećene razlike u koncentraciji unetog antibiotika između DA i AO jedinki (Tabela 12).

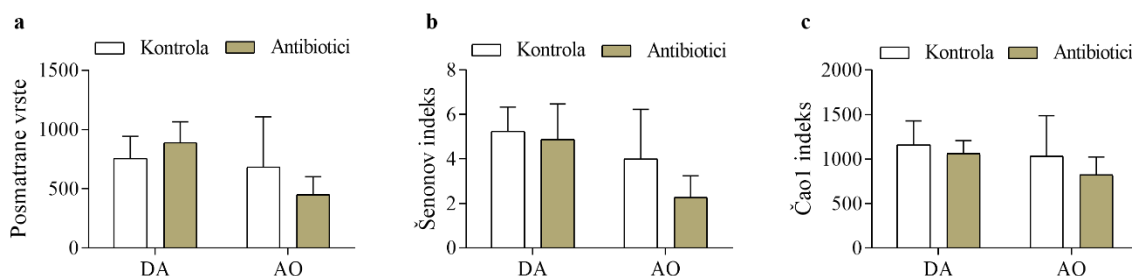
Tabela 12. Osnovni podaci o jedinkama tretiranim antibioticima.

	DA		AO	
	Kontrola	Antibiotici	Kontrola	Antibiotici
Masa tela na početku tretmana (g)	134,2 ± 49,0	156,9 ± 34,0	179,2 ± 63,0	171,1 ± 43,6
Masa tela na kraju tretmana (g)	203,3 ± 27,6	215,6 ± 19,4	324,6 ± 33,0	294,1 ± 53,4
Dnevni unos vode (ml)	31,4 ± 2,6	38,0 ± 3,1***	42,9 ± 5,1	46,3 ± 3,1*
Unos antibiotika				
Neomicin (g/kg/dnevno)		0,11 ± 0,02		0,10 ± 0,02
Gentamicin (g/kg/dnevno)		0,11 ± 0,02		0,10 ± 0,02
Vankomicin (g/kg/dnevno)		0,05 ± 0,01		0,05 ± 0,01

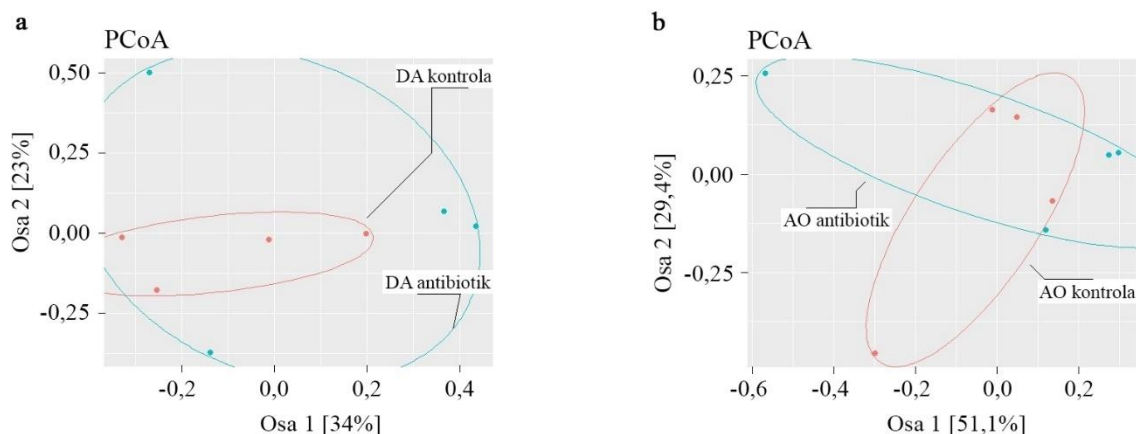
Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.3.1. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu pluća

Nakon tretmana antibioticima nisu primećene statistički značajne promene u bakterijskoj zajednici pluća ni kod jednog soja životinja (Slika 25, Slika 26, Tabela 13). Detaljnija analiza je pokazala da je kod DA jedinki tretiranih antibioticima moguće identifikovati 2775 taksonomskih jedinica, u poređenju sa 1948 kod jedinki koje su pile čistu vodu (pri čemu je 891 zajednička za obe grupe). Kod AO jedinki je identifikovano 1235 taksonomskih jedinica u grupi tretiranoj antibioticima i 2022 kod kontrolne grupe od čega je 603 bilo zajedničko za obe grupe.



Slika 25. Alfa diverzitet u plućima jedinki tretiranih antibioticima predstavljen preko Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.



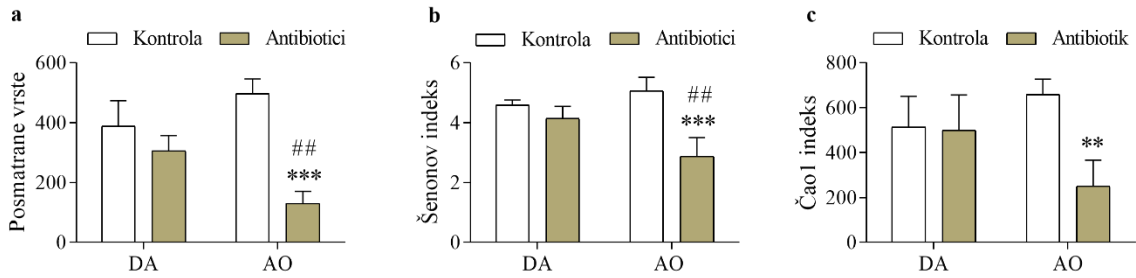
Slika 26. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote u plućima kod (a) DA i (b) AO jedinki nakon oralne primene antibiotika. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Tabela 13. Razlike u sastavu bakterijskih zajednica pluća nakon primene antibiotika izražene kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

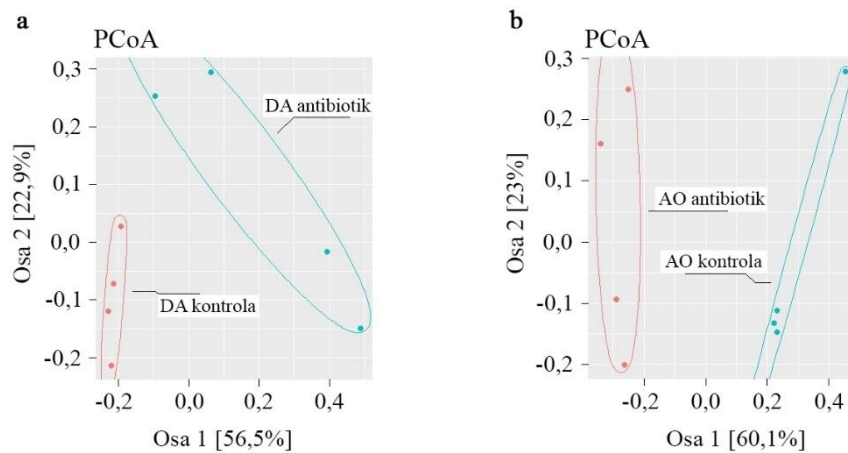
	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA kontrole/antibiotici	0,146	0,224	0,156	0,251
AO kontrole/antibiotici	-0,052	0,626	0,071	0,946
DA/AO jedinke				
Kontrole	0,573	0,053	0,316	0,057
Antibiotici	0,385	0,062	0,233	0,059

4.3.2. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu creva

Tretman antibioticima nije doveo do statistički značajnih promena u alfa diverzitetu kod DA jedinki (Slika 27). Kod jedinki ovog soja su identifikovane 764 taksonomske jedinice kod kontrola i 719 taksonomskih jedinica kod jedinki tretiranih antibioticima, od čega je 398 prisutno u obe grupe. Nasuprot DA jedinkama, kod AO soja je došlo do značajnog smanjenja broja Posmatranih vrsta, Šenonovog i Čao1 indeksa (Slika 27). Broj identifikovanih taksonomskih jedinica kod AO kontrola je bio 786 u poređenju sa 330 identifikovanih kod jedinki tretiranih antibioticima (202 zajedničke za obe grupe). Oralno primenjeni antibiotici su doveli do promene u sastavu bakterijskih zajednica creva kod jedinki oba soja (Slika 28, Tabela 14).



Slika 27. Alfa diverzitet u fecesu jedinki tretiranih antibioticima predstavljen preko Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jedinke koje nisu pile antibiotike), i pri ## $p < 0,01$ za DA vs. AO jedinke. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.



Slika 28. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote u fecesu kod (a) DA i (b) AO jedinki nakon oralne primene antibiotika. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Tabela 14. Razlike u sastavu bakterijskih zajednica creva nakon primene antibiotika izražene kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

	Anosim		Adonis	
	R	p	R^2	p
DA kontrola/antibiotici	0,688	0,038	0,461	0,030
AO kontrola/antibiotici	1,000	0,031	0,655	0,001
DA/AO jedinke				
Kontrola	0,760	0,029	0,470	0,001
Antibiotici	0,562	0,024	0,405	0,031

Kako su kod zdravih/netretiranih jedinki u većini predstavnici klasa Bacilli, Clostridia i Gammaproteobacteria bili diferencijalno zastupljeni kod DA i AO jedinki, analizirali smo relativnu zastupljenost klasa kod jedinki koje su pile antibiotike. Nisu zapažene promene u klasi Bacilli nakon primene antibiotika, kao ni razlike između DA ($0,558 \pm 0,080$ kod jedinki koje su pile vodu i $0,475 \pm 0,123$ kod jedinki koje su pile antibiotike) i AO ($0,502 \pm 0,129$ kod jedinki koje su pile vodu i $0,495 \pm 0,161$ kod jedinki koje su pile antibiotike) pacova. Relativna zastupljenost Gammaproteobacteria je slična kod ova dva soja pacova u grupi koja je pila čistu vodu, ali primena antibiotika dovodi do statistički značajnog porasta relativne zastupljenosti ove klase kod DA ($0,024 \pm 0,003$ u grupi koja je pila vodu u odnosu na $0,105 \pm 0,010$ u grupi koja je pila antibiotike, $p = 0,0004$) dok se kod AO jedinki nije menjala ($0,039 \pm 0,025$ kod kontrola u odnosu na $0,055 \pm 0,026$ u grupi koja je pila antibiotike, $p = 0,353$), pri čemu je to rezultiralo u većoj relativnoj zastupljenosti Gammaproteobacteria kod DA u odnosu na AO jedinke ($p = 0,0158$). Pod uticajem antibiotika došlo je do smanjenja relativne zastupljenosti klase Clostridia kod jedinki oba soja (sa $0,222 \pm$ na $0,064 \pm 0,012$, $p = 0,0002$, kod DA i $0,317 \pm 0,045$ na $0,049 \pm 0,019$, $p = 0,0002$, kod AO jedinki) pri čemu nisu primećene razlike između sojeva kod jedinki koje su pile antibiotike.

4.3.3. Efekat primene antibiotika na imunsku homeostazu

Da bi proverili da li oralna primena antibiotika utiče na imunsku homeostazu kod neinficiranih jedinki, ispitivani su osnovni parametri inflamacije u plućima, crevima i perifernoj krvi (Tabela 15).

U plućima DA jedinki koje su pile antibiotike primećeno je statistički značajno povećanje sadržaja IL-1 β i TNF u odnosu na jedinke koje su pile vodu bez antibiotika. Ispitivanje aktivnosti ćelija regionalnih limfnih čvorova koji dreniraju pluća pokazalo je da primena antibiotika ne dovodi do statistički značajnih promena na nivou ekspresije gena za citokine relevantne za antifungalni odgovor.

Veći broj promena uzrokovan primenom antibiotika je primećen u crevima. Kod oba soja je zapaženo statistički značajno povećanje relativne mase cekuma. Kod jedinki DA soja je došlo do statistički značajnog povećanja sadržaja TNF u ileumu i IL-17 u ileumu i cekumu, dok je kod AO soja primećeno povećanje sadržaja citokina u duodenumu (IFN- γ i IL-10), ileumu (IL-17), cekumu (IFN- γ) i kolonu (IL-1 β i IL-6). Viši nivoi citokina primećeni su kod jedinki AO soja u poređenju sa DA jedinkama. U obe eksperimentalne grupe (jedinke koje su pile čistu vodu ili vodu sa antibioticima) primećen je statistički značajno viši sadržaj IL-1 β , IFN- γ i IL-17 u duodenumu, IL-17 u ileumu i IL-10 u kolonu kod AO u odnosu na DA jedinke. Kod jedinki koje su pile samo vodu je zapažen viši IL-10 u duodenumu i ileumu, i viši IL-1 β u cekumu, dok je kod grupe koja je pila antibiotike viši IL-1 β i IL-6 u kolonu AO jedinki.

U mezenteričnim limfnim čvorovima zapaženo je statistički značajno povećanje ekspresije gena za IFN- γ kod jedinki oba soja i IL-17 kod AO pacova koji su pili antibiotike u poređenju sa jedinkama koje su pile vodu.

Jedina promena koja je primećena u perifernoj krvi je porast koncentracije IL-6 kod AO jedinki koje su pile antibiotike.

Tabela 15. Efekat primene antibiotika na imunsku homeostazu kod pacova.

Ispitivani parametri	DA		AO	
	Kontrola	Antibiotici	Kontrola	Antibiotici
Pluća				
Relativna masa pluća	0,67 ± 0,06	0,69 ± 0,08	0,64 ± 0,14	0,58 ± 0,09
Sadržaj citokina (pg/ml)				
IL-1β	368,4 ± 154,9	643,8 ± 203,1*	595,7 ± 184,6 [#]	559,3 ± 171,7
IL-6	478,8 ± 93,8	383,6 ± 143,0	326,3 ± 177,0	283,3 ± 140,1
TNF	58,9 ± 6,6	87,7 ± 21,3**	62,5 ± 12,9	73,7 ± 17,4
IFN-γ	37,0 ± 5,8	40,3 ± 11,0	48,3 ± 9,6	44,0 ± 16,1
IL-17	175,3 ± 32,7	144,4 ± 24,2	176,2 ± 58,3	172,2 ± 27,8
IL-10	291,5 ± 75,2	272,1 ± 71,0	251,0 ± 89,2	245,0 ± 95,0
Aktivnost MPO (U/ml)	0,47 ± 0,08	0,57 ± 0,13	0,32 ± 0,09	0,40 ± 0,09
Regionalni limfni čvorovi				
Broj ćelija (×10 ⁶)	13,5 ± 7,2	23,3 ± 14,0	12,8 ± 5,0	14,7 ± 8,0
IFN-γ (2 ^{-ΔCt})	0,008 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,009 ± 0,004	0,012 ± 0,002
IL-17 (2 ^{-ΔCt})	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
IL-10 (2 ^{-ΔCt})	0,033 ± 0,005	0,038 ± 0,004	0,030 ± 0,006	0,019 ± 0,004
Creva				
Relativna masa cekuma	1,74 ± 0,28	5,43 ± 1,74**	1,82 ± 0,54	5,53 ± 1,37**
Sadržaj citokina (pg/ml)				
Duodenum				
IL-1β	63,0 ± 15,9	62,5 ± 37,2	159,6 ± 37,6 ^{###}	178,3 ± 43,6 ^{###}
IL-6	75,0 ± 26,5	101,4 ± 13,3	92,0 ± 17,4	94,0 ± 40,6
TNF	59,7 ± 15,2	65,8 ± 18,5	65,6 ± 13,8	69,7 ± 12,8
IFN-γ	118,0 ± 10,9	128,1 ± 16,4	137,3 ± 6,5 ^{##}	156,7 ± 11,0 ^{**##}
IL-17	414,8 ± 41,5	408,3 ± 55,4	501,6 ± 45,1 ^{##}	496,3 ± 50,5 ^{##}
IL-10	65,2 ± 13,5	94,0 ± 29,7	143,8 ± 60,8 ^{###}	93,8 ± 33,7*
Ileum				
IL-1β	120,0 ± 20,5	103,0 ± 17,4	160,8 ± 24,6	144,0 ± 81,1
IL-6	136,2 ± 18,8	132,1 ± 57,8	169,0 ± 31,7	167,0 ± 69,3
TNF	38,3 ± 12,7	65,8 ± 27,6*	47,1 ± 22,8	48,3 ± 17,1

IFN- γ	100,0 \pm 15,4	136,5 \pm 54,4	105,6 \pm 23,0	100,0 \pm 16,7
IL-17	118,5 \pm 21,2	310,2 \pm 96,0***	297,3 \pm 39,7###	511,1 \pm 107,2***###
IL-10	75,0 \pm 20,9	74,7 \pm 19,5	106,6 \pm 18,3#	95,2 \pm 29,7
Cekum				
IL-1 β	396,7 \pm 48,7	415,8 \pm 80,7	490,0 \pm 36,3#	447,5 \pm 38,3
IL-6	250,0 \pm 33,0	225,8 \pm 42,2	286,9 \pm 47,5	287,9 \pm 38,5##
TNF	121,8 \pm 23,7	126,7 \pm 7,7	132,8 \pm 35,3	147,1 \pm 28,5
IFN- γ	292,9 \pm 36,6	323,8 \pm 36,3	266,7 \pm 23,6	364,3 \pm 50,7***
IL-17	348,1 \pm 190,1	562,4 \pm 84,5**	470,4 \pm 27,3	573,5 \pm 108,2
IL-10	120,0 \pm 25,2	151,8 \pm 21,8	151,7 \pm 15,5	184,4 \pm 44,6
Kolon				
IL-1 β	235,0 \pm 31,5	240,0 \pm 58,5	273,1 \pm 48,9	340,8 \pm 70,4*##
IL-6	205,6 \pm 53,1	247,5 \pm 71,4	227,5 \pm 108,5	375,0 \pm 101,6*##
TNF	73,3 \pm 17,8	82,7 \pm 16,5	93,3 \pm 12,6	91,1 \pm 24,4
IFN- γ	128,6 \pm 38,5	169,4 \pm 46,6	183,3 \pm 71,3	197,2 \pm 54,5
IL-17	270,9 \pm 67,5	290,1 \pm 82,0	286,0 \pm 91,5	333,3 \pm 53,3
IL-10	93,3 \pm 12,9	105,5 \pm 15,3	146,6 \pm 21,9###	165,0 \pm 26,9###
Mezenterični limfni čvorovi				
Broj ćelija ($\times 10^6$)	54,4 \pm 20,4	43,9 \pm 11,3	70,8 \pm 11,5	63,2 \pm 23,7
IFN- γ ($2^{-\Delta Ct}$)	0,005 \pm 0,002	0,018 \pm 0,003***	0,004 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001**
IL-17 ($2^{-\Delta Ct}$)	0,002 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000	0,001 \pm 0,000	0,002 \pm 0,000***
IL-10 ($2^{-\Delta Ct}$)	0,018 \pm 0,008	0,018 \pm 0,007	0,018 \pm 0,007	0,018 \pm 0,001
Periferna krv				
Leukociti ($\times 10^9/l$)	5,8 \pm 1,9	4,7 \pm 2,0	3,0 \pm 1,2	3,1 \pm 0,5
Limfociti ($\times 10^9/l$)	49,0 \pm 13,1	61,2 \pm 7,4	35,5 \pm 5,5	42,1 \pm 14,6
Neutrofili ($\times 10^9/l$)	48,0 \pm 12,8	36,1 \pm 7,2	60,1 \pm 5,3	53,4 \pm 14,6
Monociti ($\times 10^9/l$)	1,5 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3	1,6 \pm 0,4	1,7 \pm 0,5
Eozinofili ($\times 10^9/l$)	1,3 \pm 0,5	1,4 \pm 0,4	2,0 \pm 0,7	2,3 \pm 0,8
Bazofili ($\times 10^9/l$)	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
Eritrociti ($\times 10^{12}/l$)	8,2 \pm 0,3	8,2 \pm 0,2	8,2 \pm 0,6	8,5 \pm 0,8
Hemoglobin (g/l)	147,6 \pm 5,0	147,0 \pm 3,9	151,6 \pm 4,7	152,5 \pm 6,5
Hematokrit (%)	0,45 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02	0,46 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02
Trombociti ($\times 10^9/l$)	782,8 \pm 35,1	753,2 \pm 19,9	857,6 \pm 26,0	802,5 \pm 66,2
Citokini u plazmi				

IL-6 (pg/ml)	34,3 ± 10,6	43,6 ± 16,4	35,0 ± 18,7	56,7 ± 11,2*
TNF (pg/ml)	58,6 ± 7,9	54,2 ± 13,1	50,0 ± 21,9	49,0 ± 16,8
IL-17(pg/ml)	108,0 ± 24,9	135,8 ± 16,2	108,0 ± 23,0	126,5 ± 27,0

Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ za jedinke koje su pile antibiotike u odnosu na jedinke koje su pile čistu vodu, i # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ za DA u odnosu na AO jedinke. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Pored sadržaja citokina u tkivu, ispitivani su i parametri oksidativnog stresa u plućima i kolonu kod jedinki tretiranih antibioticima (Tabela 16). Nakon tretmana antibioticima uočeno je samo statistički značajno povećanje sadržaja redukovano g glutaciona u plućima jedinki DA soja.

Tabela 16. Efekat primene antibiotika na parametre oksidativnog stresa u plućima i kolonu kod pacova.

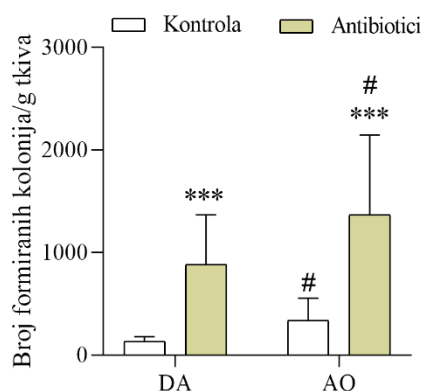
Ispitivani parametri	DA		AO	
	Kontrola	Antibiotici	Kontrola	Antibiotici
Pluća				
GSH (µM/mg proteina)	309,6 ± 7,8	397,0 ± 19,3*	311,8 ± 22,8	359,1 ± 33,5
GST (U/mg proteina)	114,2 ± 9,8	117,2 ± 5,8	170,7 ± 14,4	182,5 ± 6,8
CAT (U/mg proteina)	53,0 ± 8,6	53,8 ± 7,8	50,3 ± 12,4	48,1 ± 9,4
MDA (nM/mg proteina)	3,9 ± 0,4	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,3
Kolon				
GSH (µM/mg proteina)	85,0 ± 23,3	84,0 ± 20,3	128,5 ± 25,7	146,6 ± 31,9
GST (U/mg proteina)	35,6 ± 4,6	35,1 ± 4,7	47,8 ± 6,5	36,2 ± 4,3
CAT (U/mg proteina)	22,3 ± 1,7	26,6 ± 2,5	30,6 ± 3,1	24,1 ± 2,4
MDA (nM/mg proteina)	5,9 ± 0,6	5,5 ± 0,5	5,8 ± 0,6	5,0 ± 0,4

Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

4.4. Ispitivanje uticaja disbioze izazvane antibioticima na odgovor organizma tokom pulmonarne infekcije sa *A. fumigatus*

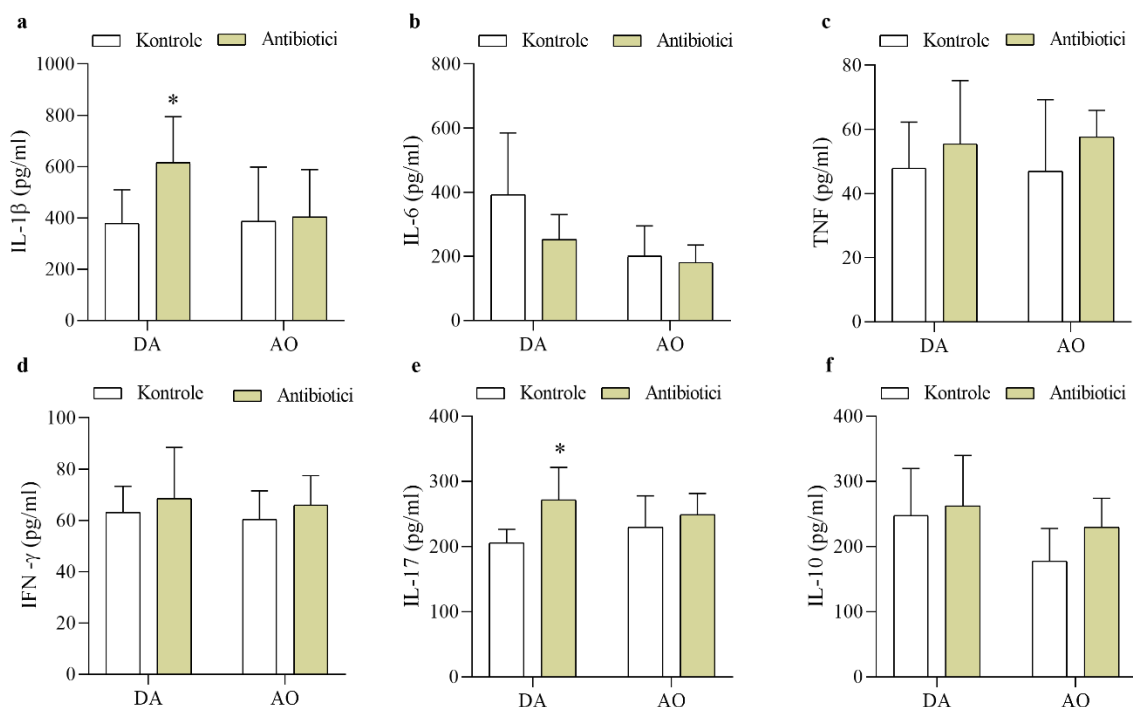
4.4.1. Karakteristike imunskog odgovora na gljivu *A. fumigatus* kod jedinki tretiranih antibioticima

Da bi ispitali da li postoje posledice primene antibiotika na imunski odgovor u plućima, inficirali smo gljivom kontrolne životinje i životinje koje su prethodno pile antibiotik. Ispitivanjem prisustva ovog oportunističkog patogena u plućima 3. dana nakon infekcije, pokazana je sporija eliminacija konidija iz pluća kod jedinki oba soja tretiranih antibioticima (Slika 29).



Slika 29. Stepen infekcije pluća izražen preko broja formiranih kolonija po g tkiva kod jedinki koje su pile antibiotike. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jedinke koje nisu pile antibiotike), i pri # $p < 0,01$ za DA vs. AO jedinke. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

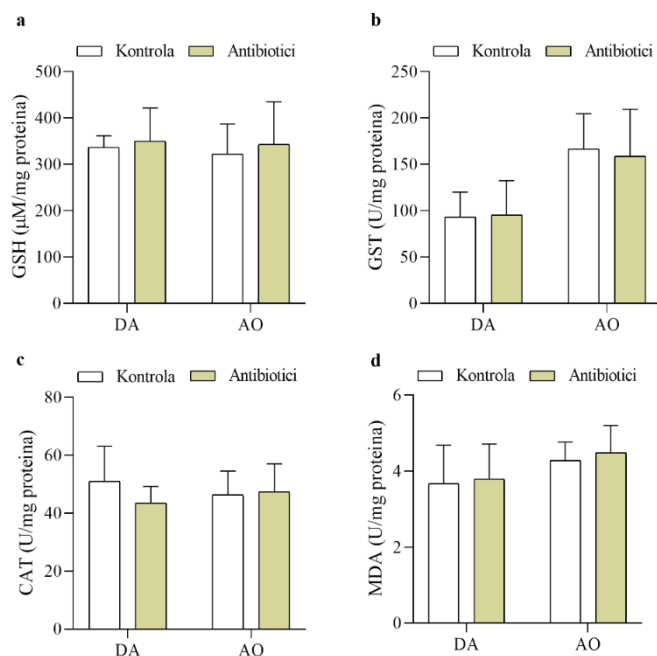
Ispitivanje sadržaja citokina u plućima tokom infekcije pokazalo je statistički značajno povećanje sadržaja IL-1 β i IL-17 samo kod inficiranih DA jedinki tretiranih antibioticima u poređenju sa inficiranim jedinkama koje nisu pile antibiotike, dok pad IL-6 nije bio statistički značajan ($p = 0,114$) (Slika 30). Pored citokina, kod DA jedinki tretiranih antibioticima je primećen i porast sadržaja MPO ($0,78 \pm 0,08$ U/ml) u odnosu na inficirane jedinke koje nisu pile antibiotike ($0,54 \pm 0,07$ U/ml, $p = 0,0005$), dok kod jedinki AO soja nije bilo promena ($0,67 \pm 0,07$ U/ml kod jedinki koje nisu tretirane antibioticima vs. $0,79 \pm 0,15$ U/ml kod jedinki koje su pile antibiotike pre infekcije, $p = 0,129$).



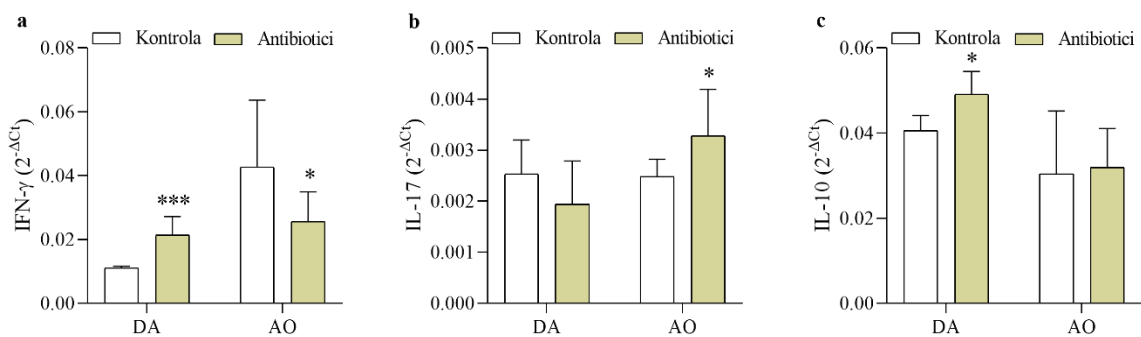
Slika 30. Sadržaj citokina u plućima jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima. a) IL-1 β , b) IL-6, c) TNF, d) IFN- γ , e) IL-17 f) IL-10. Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

U sledećem koraku ispitivani su parametri oksidativnog stresa u plućima kod jedinki koje su pre infekcije pile smešu antibiotika (Slika 31). Nisu primećene statistički značajne razlike u nivou redukovano glutationa, aktivnosti enzima glutation S transferaze i katalaze, kao ni u nivou malondialdehida kod inficiranih jedinki tretiranih antibioticima u poređenju sa jedinkama koje nisu pile antibiotike.

Da bi ispitali da li primena antibiotika pre infekcije utiče na aktivaciju adaptivnog T ćelijskog odgovora na gljivu, ispitivali smo ekspresiju gena za citokinske predstavnike Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-17) i Treg ćelija (IL-10) u regionalnim limfnim čvorovima (Slika 32). Kod jedinki DA soja primećeno je statistički značajno povećanje ekspresije gena za IFN- γ i IL-10, dok kod AO jedinki dolazi do statistički značajno niže ekspresije gena za IFN- γ i više za IL-17 kod jedinki tretiranih antibioticima u odnosu na jedinke koje su pile vodu pre infekcije.



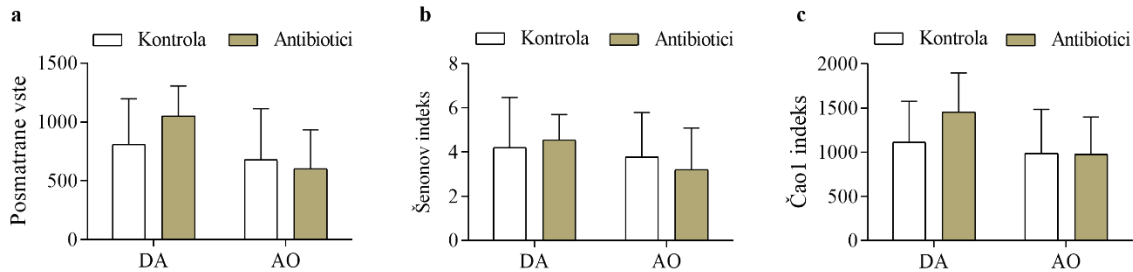
Slika 31. Parametri oksidativnog stresa u plućima jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima. (a) Nivo redukovanog glutationa (GSH), (b) Aktivnost glutation S transferaze (GST), (c) aktivnost enzima katalaze (CAT), (d) Nivo malondialdehida (MDA). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.



Slika 32. Ekspresija gena relevantnih za antifungalni odgovor u regionalnim limfnim čvorovima pluća. (a) IFN- γ , (b) IL-17, (c) IL-10. Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

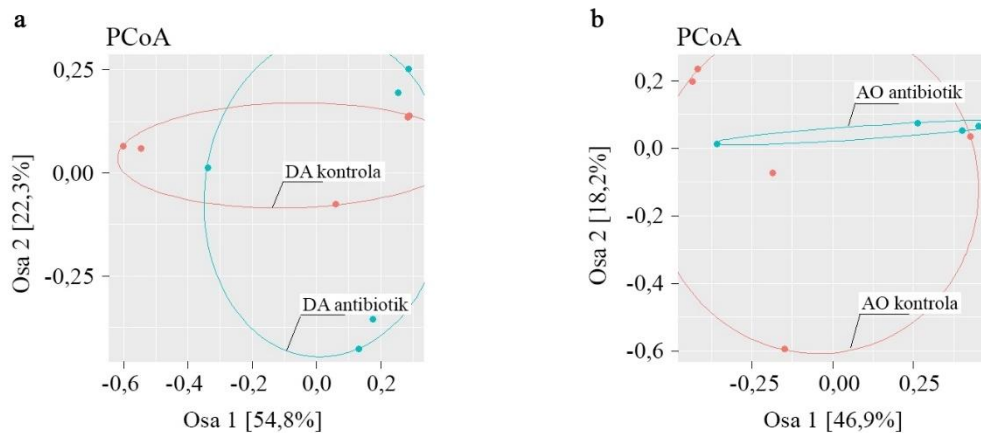
4.4.2. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu pluća kod inficiranih jedinki

Tretman antibioticima kod inficiranih životinja, nije doveo do statistički značajnih promena u alfa diverzitetu mikrobiote pluća ni kod DA ni kod AO soja (Slika 33).



Slika 33. Alfa diverzitet u plućima jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima predstavljen preko Posmatranih vrsta (a), Šanonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV \pm SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Prethodna primena antibiotika kod inficiranih DA i AO jedinki nije dovela do promena u sastavu bakterijske zajednice pluća ni kod jednog soja (Slika 34 i Tabela 17).



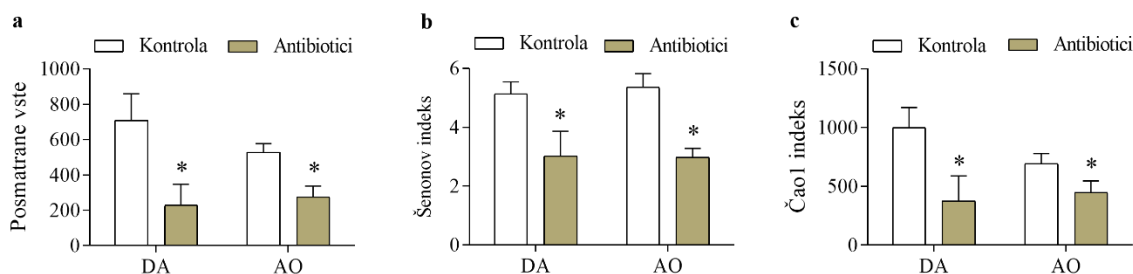
Slika 34. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote u plućima kod inficiranih DA (a) i AO (b) jedinki nakon oralne primene antibiotika. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford

Tabela 17. Razlike u sastavu bakterijskih zajednica pluća jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima izražene kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA <i>A. fumigatus</i> / <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	-0,024	0,428	0,107	0,408
AO <i>A. fumigatus</i> / <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	0,125	0,713	0,160	0,201

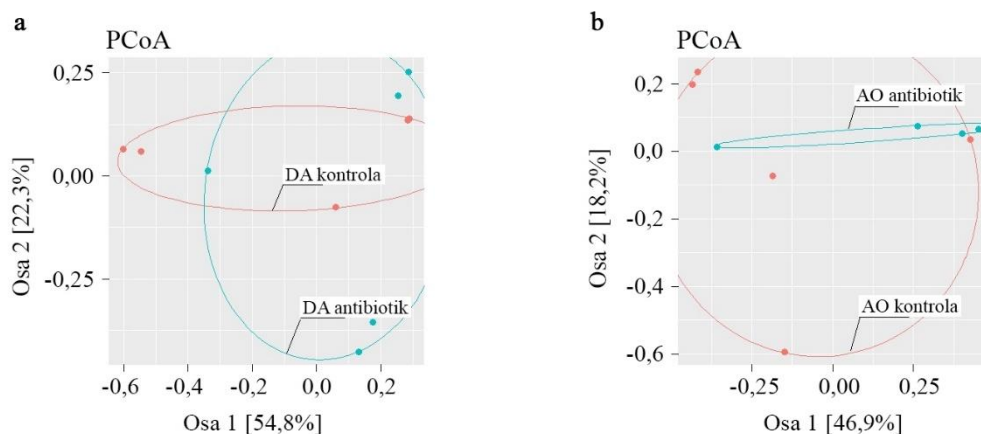
4.4.3. Efekat primene antibiotika na mikrobiotu creva kod inficiranih jedinki

Statistički značajne promene u alfa diverzitetu u crevima su primećene kod inficiranih jedinki DA i AO pacova izraženim kroz pad broja Posmatranih vrsta (Slika 35a), Šenonovog indeksa diverziteta (Slika 35b) i Čao1 indeksa (Slika 35c). Kod jedinki DA soja zapaženo smanjenje parametara alfa diverziteta nije samo posledica primene antibiotika, jer su nivoi indeksa statistički značajno niži kod inficiranih jedinki tretiranih antibioticima u odnosu na promene koje su zapažene samo nakon tretmana antibioticima ($p < 0,05$). Kod inficiranih jedinki AO soja koje su pre infekcije pile antibiotike nisu primećene statistički značajne razlike u odnosu na neinficirane jedinke tretirane antibioticima.



Slika 35. Alfa diverzitet u fecesu jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima predstavljen preko Posmatranih vrsta (a), Šenonovog indeksa diverziteta (b) i Čao1 indeksa (c). Rezultati su prikazani kao SV ± SD. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$ u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jedinke koje nisu pile antibiotike). (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Sastav bakterijske zajednice u crevima kod inficiranih jedinki koje su prethodno tretirane antibioticima, značajno se razlikovao i kod jednog i kod drugog soja u odnosu na inficirane jedinke koje nisu pile antibiotike (Slika 36, Tabela 18). Dodatno, analiza sastava bakterijske zajednice kod neinficiranih i inficiranih jedinki koje su pile antibiotike (Tabela 18) je pokazala da postoje statistički značajne razlike i između ovih grupa kod jedinki oba soja.

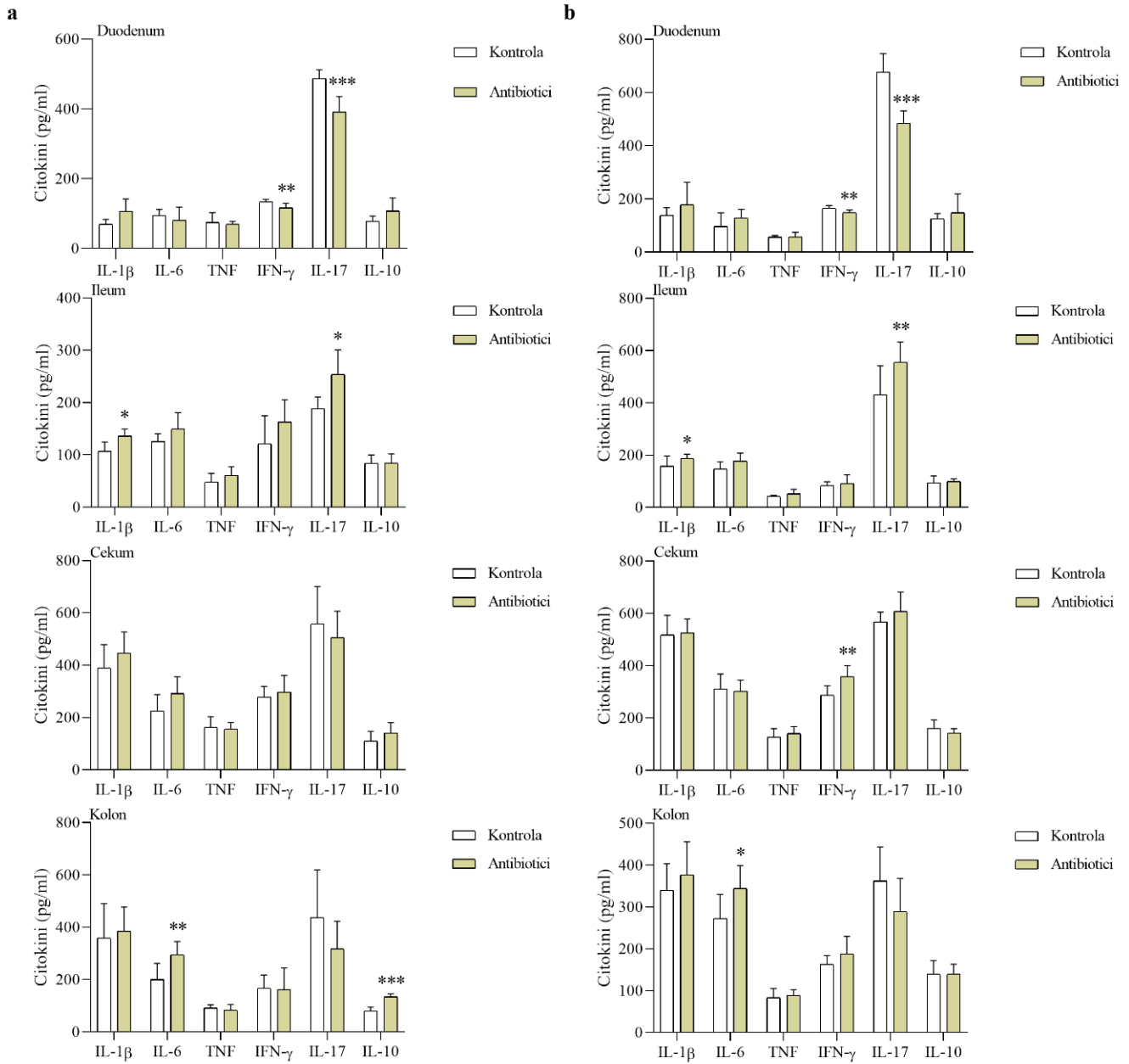


Slika 36. Beta diverzitet bakterijske mikrobiote u fecesu kod inficiranih DA (a) i AO (b) jedinki nakon oralne primene antibiotika. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

Tabela 18. Razlike u sastavu bakterijskih zajednica u fecesu jedinki inficiranih gljivom *A. fumigatus* nakon tretmana antibioticima izražene kroz Adonis i Anosim. (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

	Anosim		Adonis	
	R	<i>p</i>	R ²	<i>p</i>
DA <i>A. fumigatus</i> / <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	0,892	0,011	0,480	0,001
AO <i>A. fumigatus</i> / <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	0,875	0,008	0,459	0,011
DA antibiotici/ <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	0,337	0,045	0,241	0,057
AO antibiotici/ <i>A. fumigatus</i> + antibiotici	0,344	0,061	0,285	0,001

Kako su prethodni rezultati pokazali da inflamacija koincidira sa disbiozom u gastrointestinalnom traktu odredili smo sadržaj citokina u segmentima gastrointestinalnog trakta kod inficiranih jedinki koje su tretirane antibioticima (Slika 37). Kod jedinki oba soja je zapažen statistički značajno niži nivo IFN- γ i IL-17 u duodenumu, viši nivo IL-1 β i IL-17 u ileumu i IL-6 u kolonu u grupi koja je pila antibiotike u poređenju sa grupom koja je pila čistu vodu. Dodatno, kod DA jedinki je bio povišen i IL-10 u kolonu, a kod AO IFN- γ u cekumu u grupi koja je pre infekcije primila antibiotike.



Slika 37. Sadržaj citokina u segmentima gastrointestinalnog trakta kod jedinki sa infekcijom pluća izazvanom gljivom koje su prethodno pile vodu ili vodu sa rastvorenim antibioticima. (Panel a) DA jedinke, (Panel b) AO jedinke. Rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA sa post hoc Tuckey testom. Statistički značajne razlike pri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na odgovarajuću kontrolu (jedinke koje nisu pile antibiotike). (DA) Dark Agouti, (AO) Albino Oxford.

5. DISKUSIJA

Bakterijska mikrobiota pluća uglavnom je ispitivana u hroničnim bolestima pluća (Hilty i drugi, 2010; Wang i drugi, 2016; Carmody i drugi, 2013), ali su efekti infekcije pluća izazvane bakterijama, virusima ili gljivama na mikrobiotu ovog organa malo poznati. Osim toga, retki su i podaci o efektu koji inflamacija u plućima ima na mikrobiotu creva (osa pluća-crevo) iako je u brojnim studijama pokazano da mikrobiota creva utiče na inflamaciju u plućima (osa crevo-pluća) (Fрати i drugi, 2018; Vaughan i drugi, 2019; Thavamani i drugi, 2021; Liu i drugi, 2021). U ovoj disertaciji analiziran je uticaj inflamacije izazvane oportunističkom gljivom *A. fumigatus* na mikrobiotu pluća i creva, dvosmerna komunikacija između ova dva organa (potencijalni mehanizmi interakcije pluća-crevo uključujući migraciju bakterija između organa, sistemska inflamaciju i inflamaciju u gastrointestinalnom traktu) kao i uticaj mikrobiote pluća i creva na imunski odgovor na gljivu. Gljiva *A. fumigatus* se dugo vremena smatrala patogenom sa slabim virulentnim potencijalom, ali sa povećanjem broja osoba sa oslabljenom funkcijom imunskog sistema (usled primene imunosupresivnih agenasa kod pacijenata nakon transplantacije organa, porasta broja osoba inficiranih HIV, i sl.) značajno se povećala incidenca infekcija izazvanih ovom vrstom (Latge, 1999). Promene u bakterijskoj mikrobioti su praćene kod dva soja pacova, DA i AO, za koje je u prethodnim istraživanjima pokazano da razvijaju kvantitativno/kvalitativno različit imunski odgovor u pulmonarnoj infekciji izazvanoj ubrizgavanjem neletalne doze konidija *A. fumigatus* (Mirkov i drugi, 2015). U ovom modelu infekcije je upotrebom DGGE metode detektovana i promena u bakterijskoj mikrobioti creva (Kulaš i drugi, 2019). Sastav mikrobiote pluća i creva kod dva soja pacova analiziran je upotrebom metode sekvenciranja najnovije generacije pre i tokom infekcije kod jedinki sa homeostatskom mikrobiotom ili kod jedinki kojima je disbioza izazvana primenom smeše antibiotika.

5.1. Sastav bakterijske mikrobiote u plućima i crevima kod netretiranih/neinficiranih jedinki DA i AO pacova

Intratrahealno ubrizgavanje konidija gljive *A. fumigatus* jedinkama DA i AO soja rezultira većim stepenom infekcije u plućima AO jedinki (Mirkov i drugi, 2015) na koji bi mogle da utiču razlike u sastavu bakterijske mikrobiote pluća pre infekcije (Igartua i drugi, 2017; Chung i drugi, 2023). Međutim, analiza bakterijske mikrobiote pluća zdravih/neinficiranih jedinki DA i AO pacova pokazala je da ne postoje razlike u alfa i beta diverzitetu između ova dva soja pacova. Dobijeni rezultati sugerisu da genetski faktor ne doprinosi mnogo oblikovanju mikrobiote pluća, iako postoje podaci da bi genetska osnova mogla uticati na sastav bakterija u plućima (Igartua i drugi, 2017; Chung i drugi, 2023). S obzirom na sličnost u sastavu bakterijske zajednice pluća kod DA i AO jedinki, može se pretpostaviti da sredinski faktor ima veći uticaj jer su jedinke ovih sojeva odgajane u istom odgajalištu pri identičnim uslovima. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima o uticaju sredine na sastav mikrobiote pluća koji pokazuju da se sastav mikrobiote pluća jedinki istog soja eksperimentalnih glodara razlikuje između različitih odgajališta (Dickson i drugi, 2018). Iako nisu primećene razlike u sastavu bakterijske zajednice između DA i AO jedinki, LEfSe analiza biomarkera identifikovala je vrste koje su diferencijalno zastupljene kod ova dva soja pacova, a koje bi mogle da doprinesu razlikama u stepenu infekcije sa *A. fumigatus*. U prilog ovome govori podatak da je prisustvo *A. fumigatus* u plućima pacijenata obolelih od tuberkuloze detektovano samo kod pacijenata sa visokom relativnom zastupljenošću bakterije *M. tuberculosis* (Hu i drugi, 2020). Za veću zastupljenost predstavnika razdela Proteobacteria kod DA pacova, odnosno predstavnika razdela Firmicutes, Actinobacteria i Tenericutes kod AO životinja bi mogle da budu odgovorne razlike u mikrosredini pluća kao što je dostupnost

nutrijenata, aktivnost ćelija imunskog sistema ili sadržaj antimikrobnih peptida. U tom kontekstu, veći nivo citokina IL-1 β primećen je u plućima AO jedinki u odnosu na DA. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima studije koja je pokazala postojanje korelacije između bazalnog nivoa inflamatornih citokina u plućima i sastava mikrobiote ovog organa (Dickson i drugi, 2018). Razlike primećene u relativnoj zastupljenosti vrsta pre infekcije bi mogle da doprinesu različitom imunskom odgovoru na infekciju pluća gljivom *A. fumigatus*.

Nasuprot sličnoj mikrobioti pluća, sastav bakterijske mikrobiote creva se razlikuje između DA i AO jedinki što ukazuje da genetička osnova ima veliki uticaj na formiranje mikrobiote u crevima. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima dobijenim na miševima kod kojih su varijacije u sastavu mikrobiote primećene između različitih sojeva (Guo i drugi, 2022; Nagarajan i drugi, 2023). Dodatno, i u zdravoj humanoj populaciji su primećene razlike u sastavu mikrobiote creva između različitih rasa i etničkih grupa (Syromyatnikov i drugi, 2022). Između jedinki DA i AO sojeva identifikovana je 31 diferencijalno zastupljena vrsta pri čemu su kod DA jedinki dominirali predstavnici klase *Gammaproteobacteria*, a kod AO predstavnici klase *Clostridia*. Diferencijalno zastupljene vrste su verovatno doprinele razlikama u sadržaju citokina u kolonu kod neinficiranih jedinki (viši IFN- γ , a niži IL-10 kod DA jedinki u odnosu na AO). U tom smislu, pokazano je da prisustvo klase *Clostridia* utiče na veću aktivnost Treg ćelija (koje proizvode IL-10) i da ove bakterije doprinose većoj otpornosti na kolitis i alergije (Atarashi i drugi, 2011). Nasuprot klasi *Clostridia*, veća relativna zastupljenost Proteobacteria (klase *Gammaproteobacteria* i *Betaproteobacteria*) je zapažena kod jedinki miševa kod kojih je prisutna inflamacija u crevima (Chi i drugi, 2021; Panpetch i drugi, 2020).

5.2. Ispitivanje promena mikrobiote pluća tokom pulmonarne infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus*

Infekcija gljivom *A. fumigatus* kod imunokompetentnih jedinki, dovela je do porasta bogatstva vrsta u plućima oba soja pacova, što je u suprotnosti sa nalazima dobijenim na ljudima kod kojih je zapaženo odsustvo promena u alfa i beta diverzitetu kod pacijenata sa oportunističkom infekcijom izazvanom gljivom (Kehrmann i drugi, 2017), ili smanjenje alfa diverziteta u plućima pacijenata obolelih od invazivne plućne aspergiloze (Hérivaux i drugi, 2022). Zapažene razlike mogu da budu posledica razlika u aktivnosti imunskog sistema, jer su jedinke korišćene u ovoj studiji imale intaktan imunski sistem, dok je kod pacijenata funkcija imunskog sistema oslabljena. Dodatno, ispitivana grupa pacijenata je bila na mehaničkoj ventilaciji u jedinicama intenzivne nege, a poznato je da izloženost visokim koncentracijama kiseonika (hiperoksija) može da utiče na mikrobiotu pluća (Ashley i drugi, 2020). Do sada publikovana istraživanja pokazuju da inflamacija u plućima nema konzistentan efekat na bogatstvo i diverzitet mikrobiote jer je u prisustvu inflamacije zapaženo odsustvo efekta na bogatstvo i diverzitet (Barford i drugi 2015), smanjenje (Ashley i drugi, 2020; Yadava i drugi, 2016) ili povećanje diverziteta (Poroyko i drugi, 2015; O'Dwyer i drugi, 2019; Li i drugi, 2020). Za razliku od alfa diverziteta, pokazano je da se sastav bakterijske zajednice pluća kod miševa (beta diverzitet) menja pod uticajem inflamacije (Ashley i drugi, 2020; Yadava i drugi, 2016; Poroyko i drugi, 2015; O'Dwyer i drugi, 2019; Li i drugi, 2020), što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji koji su pokazali odsustvo promena u beta diverzitetu. Ova odstupanja bi mogla da se objasne vrstom životinja na kojima su istraživanja rađena (pacovi u ovoj studiji, a miševi u ostalim publikovanim studijama), njihovim poreklom ili uslovima sredine u kojoj se gaje životinje (Dickson i drugi, 2018).

Promene zapažene kod jedinki oba soja pacova u relativnoj zastupljenosti rodova bakterija u plućima su u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima (Ashley i drugi, 2020; Poroyko i drugi, 2015; O'Dwyer i drugi, 2019; Li i drugi, 2020). Prisustvo *A. fumigatus* u plućima kod DA soja uglavnom je

dovelo do povećanja relativne zastupljenosti rodova, za razliku od AO životinja kod kojih je primećeno njihovo smanjenje. Kod inficiranih jedinki oba soja je zapaženo smanjenje relativne zastupljenosti roda *Ralstonia*. S obzirom da su predstavnici ovog roda oportunistički patogeni (Gram-negativne, aerobne bakterije), normalno prisutni u gornjem respiratornom traktu (Stelzmueller i drugi, 2006; Liao i drugi, 2023) može se pretpostaviti da je aktivacija imunskog sistema, dovela do smanjenja njegove relativne zastupljenosti. Najveći broj promena izazvanih prisustvom gljive u plućima je primetan kod taksonomskih jedinica čija je relativna zastupljenost pre infekcije bila niska, što ukazuje da su rodovi/vrste sa visokom zastupljenošću stabilne kao što je prethodno sugerisano (Yadava i drugi, 2016). Diferencijalno zastupljene vrste kod inficiranih DA jedinki pripadaju razdelu Firmicutes, a kod AO jedinki razdelu Proteobacteria.

Detektovana inflamacija u plućima (povećanje sadržaja proinflamatornih citokina IFN- γ i IL-17, kao i infiltracija neutrofila u pluća merena kroz aktivnost enzima MPO) je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Mirkov i drugi, 2014, 2015) i mogla bi da bude uzrok disbioze u plućima. U prilog ovome govori postojanje korelacija između sadržaja citokina IL-17 i enzima MPO sa indeksima alfa diverziteta i relativne zastupljenosti rodova i vrsta. Povećan nivo IL-17 je primećen i u drugim modelima inflamacije u kojima dolazi do disbioze u plućima (Ashley i drugi, 2020; Yadava i drugi, 2016; O'Dwyer i drugi, 2019; Li i drugi, 2020; Segal i drugi 2016), kao i infiltracija neutrofila u tkivo (Yadava i drugi, 2016).

Inflamacija nije jedini faktor koji utiče na mikrobnu zajednicu u plućima, posebno tokom bolesti (Dickson i drugi, 2014), s obzirom da su slični nivoi citokina IFN- γ , IL-17 i enzima MPO primećeni kod oba soja, ali sa različitim efektom na relativnu zastupljenost taksonomskih jedinica (povećanje kod DA i smanjenje kod AO). Oksidativni stres je parametar koji takođe oblikuje mikrobnu zajednicu, a povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, kao i povećanje koncentracije redukovano glutaciona samo kod DA soja, sugeriše postojanje oksidativnog stresa u plućima ovih životinja. Oksidativni stres može da bude posledica aktivnosti imunskog odgovora na *A. fumigatus*, s obzirom da imunske ćelije proizvode reaktivne vrste kiseonika (*engl.* reactive oxygen species, ROS), i reaktivne vrste azota (*engl.* reactive nitrogen species, RNS) (Morcillo i drugi, 1999). U tom smislu, postojanje oksidativnog stresa samo kod jedinki DA soja se može povezati sa većom aktivnošću leukocita izolovanih iz pluća inficiranih jedinki DA soja u odnosu na AO (Mirkov i drugi, 2015). Kako kod DA jedinki dolazi do povećanja relativne zastupljenosti vrsta, može se pretpostaviti da u uslovima oksidativnog stresa ove vrste imaju selektivnu prednost jer je poznato da su bakterije koje žive u sredini sa visokim nivoom kiseonika razvile brojne mehanizme kojima prevazilaze oksidativni stres (Storz i drugi, 1990; Gusarov i Nudler, 2005). Dodatno, male doze reaktivnih vrsta kiseonika mogu da podstiču preživljavanje bakterija (Rodriguez i drugi, 2020). Sve zajedno, inflamacija i oksidativni stres mogu da formiraju sredinu koja omogućava rast pojedinih vrsta tako što utiču na dostupnost nutrijenata i na lokalne uslove rasta (Ashley i drugi, 2020).

Iako dobijeni rezultati sugerišu da su promene u bakterijskoj mikrobioti pluća posredovane promenama u aktivnosti imunskog sistema i prisustvom oksidativnog stresa, ne može se zanemariti i direktna interakcija između gljive i bakterija. *In vitro* studije su pokazale antagonističko delovanje gljive *A. fumigatus* na rast patogenih bakterija iz pluća (Margalit i drugi, 2021), verovatno posredstvom produkcije sekundarnih metabolita koji mogu da utiču na rast bakterija (Shaaban i drugi, 2013). Dodatno, ne treba zanemariti ni postojanje pozitivnog ili negativnog uticaja koji jedna bakterijska vrsta ostvaruje na drugu.

5.3. Ispitivanje promena mikrobiote creva tokom pulmonarne infekcije izazvane gljivom *A. fumigatus*

S obzirom da literaturni podaci navode da različiti segmenti gastrointestinalnog trakta mogu da se koriste za ispitivanje promena u mikrobioti creva, prvo je pomoću DGGE metode analizirano u kom segmentu creva je došlo do najvećeg stepena promena tokom infekcije. Smanjenje broja traka u DGGE analizi, koje sugeriše smanjenje diverziteta, tokom infekcije je primećeno u zidu duodenuma i sadržaju kolona samo kod DA pacova. Promene zapažene u duodenumu su u skladu sa ranijim istraživanjima u kojima je smanjenje broja detektovanih traka tokom infekcije primećeno u uzorcima duodenuma (Kulaš i drugi, 2019). Iako promene u ostalim segmentima gastrointestinalnog trakta nisu primećene, ne znači da ih nema, s obzirom da ova metoda ima i svoja ograničenja (korišćenje univerzalnih prajmera, ograničen broj bakterijskih taksona koji je moguće detektovati, itd.) (Al-Mailem i drugi, 2017). Kako je DGGE metoda ukazala da do najintenzivnijih promena dolazi u sadržaju kolona (feces), a feces je lako dostupan, ovi uzorci su odabrani za analizu mikrobiote metodom sekvenciranja najnovije generacije.

Prisustvo gljive *A. fumigatus* u plućima, dovelo je do disbioze u crevima samo kod DA životinja. Ova promena je u skladu sa do sada publikovanim rezultatima koji ukazuju da inflamacija u plućima dovodi do disbioze u crevima (Ashley i drugi, 2020; Yildiz i drugi, 2018; Sze i drugi, 2014). Izostanak promena kod jedinki AO soja može biti posledica razlika u specifičnom sastavu bakterijske zajednice creva kod ovog soja koje su primećene kod neinficiranih jedinki. Različita reaktivnost bakterijske zajednice creva kod ova dva soja pacova je prethodno pokazana u modelu oralne intoksikacije kadmijumom u kome je zapaženo smanjenje zastupljenosti predstavnika roda *Lactobacillus* u duodenumu samo kod DA jedinki (Ninkov i drugi, 2016).

Od predloženih mehanizama interakcije između pluća i creva kao što su migracija bakterija između organa (Tulic i drugi, 2016; Mandell i drugi, 2019), sistemska inflamacija (Bartley i drugi, 2017; Zhang i drugi, 2018) ili lokalna inflamacija (Wang i drugi, 2014; Deriu i drugi, 2016; Tulic i drugi, 2016), disbiozi u crevima kod DA jedinki najviše bi mogla da doprinese lokalna inflamacija. Sudeći prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji, sastav mikrobiote pluća i creva unutar oba soja se razlikuje kako kod zdravih životinja, tako i tokom infekcije. Razlike u sastavu bakterijske zajednice u ova dva organa su već pokazane u ranijim istraživanjima (Liu i drugi, 2020; Barfod i drugi, 2013). Tokom infekcije gljivom, kod oba soja se zapaža povećanje broja taksonomskih jedinica u plućima, pri čemu je deo njih moguće detektovati u fecesu, pa se može pretpostaviti da u nekom stepenu dolazi do migracije bakterija iz creva u pluća. Kako su pacovi koprofagne životinje, verovatno je mikroaspiracija doprinela pojavi fekalnih taksona u plućima. Međutim, preko 50% taksonomskih jedinica koje se pojavljuju u plućima nakon infekcije nije moguće detektovati u fecesu. Pojava novih taksonomskih jedinica u plućima mogla bi da bude rezultat izmenjene mikrosredine koja pogoduje rastu retko zastupljenih vrsta, koje zbog limita metode nisu mogle da se detektuju kod zdravih jedinki, jer su bile ispod definisanog praga detekcije. Dodatno, pojava novih taksona mogla bi i da bude je posledica promena u mehanizmima odgovornim za kontrolu imigracije i eliminacije bakterija iz pluća (Dickson i drugi, 2015).

Imunski sistem je najviše istražena komponenta koja leži u osnovi interakcije između pluća i creva (Wang i drugi, 2014; Deriu i drugi, 2016; Tulic i drugi, 2016). Kako nisu zapažene promene u perifernoj krvi tokom infekcije pluća, verovatno sistemska inflamacija nije odgovorna za ovu interakciju nego lokalna inflamacija. Može se pretpostaviti da T ćelije koje se aktiviraju u odgovoru na *A. fumigatus* u limfnim čvorovima koji dreniraju pluća (El-Muzghi i drugi, 2013) migriraju u creva i uzrokuju disbiozu. U skladu sa ovom pretpostavkom primećeno je povećanje sadržaja IFN- γ u duodenumu i IL-17 u svim segmentima creva. Migracija CD4⁺ T ćelija iz pluća u creva zapažena je i u plućnoj infekciji izazvanoj virusima (Wang i drugi, 2014). Dodatno, postoji i podatak da dendritske ćelije iz pluća mogu indukovati migraciju

T ćelija u creva tako što dovode do ekspresije molekula na površini ćelija odgovornih za migraciju u creva (Ruane i drugi, 2013). Pored inflamacije u gastrointestinalnom traktu, rezultati ukazuju i na prisustvo oksidativnog stresa u kolonu kod inficiranih jedinki oba soja. Inflamacija i oksidativni stres su verovatno doprineli disbiozi zapaženoj u crevima jedinki DA soja, ali nisu uticali na mikrobiotu creva kod AO jedinki.

5.4. Efekat smeše antibiotika na mikrobiotu pluća i creva

Najviše korišćen pristup za ispitivanja uloge bakterijske mikrobiote u imunskom odgovoru u plućima je primena antibiotika kojima se izaziva disbioza (Abt i drugi, 2012; Ichnohe i drugi, 2011; Chen i drugi, 2011, Schuijt i drugi 2016), a koji se karakterišu sistemskom difuzijom. Pokazano je međutim, da upotreba ovog tipa antibiotika dovodi do disbioze i u plućima i u crevima (Brown i drugi, 2017; Robak i drugi, 2018), stoga je teško proceniti doprinos same mikrobiote creva u patogenezi plućnih bolesti (Dessein i drugi, 2020). U ovoj tezi su korišćeni samo antibiotici koji imaju malu oralnu apsorpciju (neomicin, gentamicin i vankomicin) (Rao i drugi, 2011; Veirup i drugi, 2023; Moghaddam i drugi, 2016). Kombinacija antibiotika bi trebalo da ima širok baktericidni spektar jer vankomicin deluje na Gram-pozitivne (Watanakunakorn, 1981), a neomicin i gentamicin na Gram-negativne bakterije (Tam i drugi, 2006; Veirup i drugi, 2023).

Primena smeše antibiotika nije dovela do promene u sastavu mikrobiote pluća, ali je uzrokovala disbiozu u crevima. Kod DA jedinki koje su pile antibiotik došlo je do promene u sastavu mikrobiote creva, ali bez razlika u bogatstvu i diverzitetu bakterijskih vrsta (alfa diverzitet) u odnosu na zdrave životinje. Tretman antibioticima kod AO jedinki je takođe doveo do promena u sastavu bakterijske zajednice, ali je uzrokovao i smanjenje ukupnog broja bakterijskih vrsta. Primećene razlike u dejstvu antibiotika na mikrobiotu creva verovatno nisu posledica razlika u koncentracijama antibiotika koje su životinje pile jer je dnevni unos svakog antibiotika bio isti kod oba soja. Verovatno su razlike u sastavu mikrobiote doprinele različitoj reaktivnosti na antibiotike. Različita reaktivnost na iste antibiotike primećena je i kod ljudi (Raymond i drugi, 2016), a potvrđena je kod miševa koji su kolonizovani humanom mikrobiotom poreklom od različitih donora (Lavelle i drugi, 2019). Potrebno je istaći da je razlika u sastavu mikrobiote creva koja se uočava kod zdravih jedinki DA i AO soja, prisutna i nakon tretmana antibioticima. Primena smeše antibiotika dovela je kod DA jedinki do povećanja relativne zastupljenosti pripadnika klase Gammaproteobacteria (klasa čiji su predstavnici diferencijalno zastupljeni kod zdravih/neinficiranih DA jedinki). Povećanje relativne zastupljenosti Proteobacteria primećeno je i kod miševa nakon oralne primene smeše antibiotika (ampicilin, gentamicin, metronidazol, neomicin i vankomicin) (Hill i drugi, 2009; Yuan i drugi, 2023). Iako je u crevima sisara zastupljen u malom procentu, povećana zastupljenost razdela Proteobacteria povezana je sa brojnim patološkim stanjima (Shin i drugi 2015), a po nekim autorima promene na nivou ovog razdela mogu se posmatrati kao marker bakterijske nestabilnosti i determinanta bolesti (Shin i drugi, 2015), kao što su metabolički poremećaji (Fei i drugi, 2013) i inflamacija creva (Morgan i drugi, 2012). Porast zastupljenosti ovog razdela kod DA soja mogao bi biti posledica prisustva gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike jer je poznato da su pripadnici Proteobacteria nosioci velikog broja gena za ovaj tip rezistencije (Shin i drugi, 2015; Parnanen i drugi, 2018; Hi i drugi, 2013). Dodatno, predstavnici razdela Proteobacteria proizvode jedan od najpotentnijih proinflamatornih lipopolisaharida (Lin i drugi, 2020), koji može da aktivira različite ćelije imunskog sistema i dovede do povećane produkcije proinflamatornih citokina (Garcia i drugi, 1999).

Iako nisu primećene promene u bakterijskoj zajednici pluća, primena antibiotika je dovela do promena imunske homeostaze u plućima, ali samo kod DA jedinki. Do sada publikovane studije pokazuju da oralno primenjeni antibiotici mogu dovesti do supresije ćelija urođene imunosti (Dessein i drugi, 2020)

ili da nemaju efekta na produkciju citokina (Abt i drugi, 2012; Robak i drugi, 2018). Ovakve razlike su verovatno posledica primene različitih antibiotika ili razlika u dužini tretmana.

U našoj studiji disbioza u crevima, kao posledica primene antibiotika, dovela je do narušavanja imunske homeostaze u ovom tkivu. Kod jedinki oba soja povećana je relativna masa cekuma. Ova promena je verovatno posledica smanjene raznovrsnosti bakterija u crevima jer se zapaža i kod miševa koji nisu kolonizovani mikrobiotom, kao i kod miševa sa redukovanom mikrobiotom (Hill i drugi 2009). Povećanje relativne mase cekuma može biti posledica delovanja vankomicina (Sun i drugi 2019). Osim ove promene, primena antibiotika je rezultirala i inflamacijom u gastrointestinalnom traktu kod jedinki oba soja pacova, ali je kod DA soja bila ograničena na ileum i cekum, a kod AO je detektovana u svim segmentima. Ova razlika može biti rezultat izraženije disbioze kod AO u odnosu na DA jedinke. Inflamacija u gastrointestinalnom traktu koja se javlja kao posledica bakterijske disbioze je prethodno dokumentovana (Lange i drugi, 2016; Singh i drugi, 2017; Huttenhower i drugi, 2014; Olaisen i drugi, 2020; Kesavelu i Jog, 2023; Lee i drugi, 2018). Disbioza creva i inflamacija mogu da poremete integritet crevne barijere, povećaju propustljivost creva što bi omogućilo translokaciju patogena preko krvnog sistema u ostale organe (Eladham i drugi, 2024; Al-Sadi i Ma 2007; Yang i drugi, 2003). U tom kontekstu, izraženija disbioza i inflamacija u svim segmentima creva kod jedinki AO soja, verovatno je dovela do narušavanja integriteta creva i time uzrokovala povećanje koncentracije IL-6 u plazmi ovih jedinki. Narušena homeostaza gastrointestinalnog trakta uticala je i na povećanje aktivnosti ćelija u drenirajućim mezenteričnim limfnim čvorovima.

5.5. Efekat primene antibiotika na inflamaciju u plućima

Primena antibiotika pre infekcije pluća izazvane gljivom *A. fumigatus* dovela je do većeg stepena infekcije pluća kod oba soja pacova, pri čemu je stepen infekcije veći kod AO soja u odnosu na DA soj (isto kao i kod jedinki koje nisu pile antibiotike pre infekcije). Veća podložnost infekcijama (sporije uklanjanje patogena iz pluća) je primećena kod jedinki koje su primale antibiotike i nakon toga bile inficirane sa *Pseudomonas aeruginosa* (Dessein i drugi, 2020; Robak i drugi, 2018), *Staphylococcus pneumoniae* ili *Klebsiella pneumoniae* (Brown i drugi, 2017; Schujit i drugi, 2016) i virusima (Abt i drugi, 2012; Ichinohe i drugi, 2011). Veći stepen infekcije, meren na osnovu broja formiranih kolonija, kod jedinki koje su pile antibiotike verovatno nije posledica supresije imenskog odgovora u plućima, jer je isti nivo citokina primećen kod AO jedinki koje nisu pile antibiotike ili su pile smešu antibiotika pre infekcije, a čak i viši sadržaj citokina IL-1 β , IL-17 i mijeloperoksidaze je detektovan kod inficiranih DA jedinki koje su pile antibiotike. Povećana produkcija citokina kod jedinki koje su pre infekcije pile antibiotik je zapažena kod miševa sa infekcijom pluća izazvanih bakterijama *E. coli*, odnosno *S. pneumoniae* (Chen i drugi, 2011; Schujit i drugi, 2016). Moguće je da je sporije uklanjanje *A. fumigatus* iz pluća rezultat supresije aktivnosti koje nisu praćene u ovoj studiji. U tom kontekstu, primećeno je da tretman antibioticima može da dovede do smanjene aktivnosti makrofaga (Chen i drugi, 2011; Brown i drugi, 2017; Schujit i drugi, 2016). Tretman antibioticima je uticao i na aktivaciju adaptivnog imenskog odgovora u regionalnim limfnim čvorovima. Kod DA jedinki veća aktivacija Th1 (produkcija IFN- γ), ali i Treg ćelija (produkcija IL-10) je primećena kod inficiranih jedinki tretiranih antibioticima, dok je kod AO jedinki povećana aktivacija Th17 ćelija (produkcija IL-17), a smanjena Th1. Povećanje anti-inflamatornog citokina IL-10 kod DA jedinki i smanjenje proinflamatornog IFN- γ kod AO je verovatno doprinelo razvoju neadekvatnog antifungalnog odgovora kod jedinki tretiranih antibioticima. Dodatno, veća aktivacija Th17 ćelija, koje su važne za antifungalnu odbranu (Gurczynski i drugi, 2018), ali koje mogu da dovedu i do većeg oštećenja tkiva (Zelante i drugi, 2007) ukazuje na nepovoljne efekte primene antibiotika na infekciju u plućima. Iako je inflamacija važna u kontroli infekcije izazvane gljivama,

kontrolisana/ograničena inflamacija je neophodna da bi se sprečila imunopatologija (Romani 2004; Yamada i drugi, 2023).

Zapažene promene u osetljivosti jedinki na infekciju pluća izazvanu gljivom *A. fumigatus* verovatno nisu posledica promene u sastavu mikrobiote pluća, zato što primenjeni antibiotici nisu uzrokovali disbiozu u ovom organu. Takođe nisu primećene ni razlike u alfa i beta diverzitetu kod inficiranih jedinki koje su pile antibiotike ili nisu bile tretirane njima.

Disbioza u crevima je zapažena kod inficiranih jedinki koje su pile antibiotike u odnosu na inficirane jedinke koje su pile čistu vodu. Promene u alfa diverzitetu zapažene kod jedinki DA soja su verovatno posledica kombinovanog dejstva antibiotika i same infekcije. Nasuprot tome, promene primećene kod AO jedinki su posledica primene samih antibiotika, a infekcija nije dodatno smanjila parametre alfa diverziteta. Promenjen sastav bakterijske zajednice u crevima inficiranih jedinki koje su pile antibiotike je verovatno posledica kombinovanog dejstva antibiotika i inflamacije u crevima izazvane plućnom infekcijom.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ne postoje razlike u bogatstvu i sastavu bakterijske mikrobiote pluća zdravih/neinficiranih jedinki DA i AO pacova, dok se sastav mikrobiote creva razlikuje između ovih sojeva.
2. Infekcija pluća izazvana gljivom *A. fumigatus* dovodi do porasta bogatstva bakterijskih vrsta u plućima kod oba soja, ali ne menja sastav bakterijske zajednice.
3. Promene mikrobiote pluća tokom infekcije su najverovatnije posledica antifungalnog imunskog odgovora u ovom tkivu kod oba soja i oksidativnog stresa samo kod jedinki DA soja.
4. Infekcija pluća izazvana gljivom *A. fumigatus* dovodi do inflamacije i oksidativnog stresa u gastrointestinalnom traktu kod oba soja, ali se disbioza bakterijske zajednice javlja samo kod jedinki DA pacova.
5. Oralna primena antibiotika neomicina, gentamicina i vankomicina kod zdravih/neinficiranih jedinki DA i AO pacova dovodi do disbioze u crevima, ali ne i u plućima.
6. Disbioza izazvana primenom antibiotika kod zdravih/neinficiranih jedinki dovodi do inflamacije u crevima.
7. Oralna primena antibiotika dovodi do povećanja osetljivosti na infekciju izazvanu oportunističkom gljivom *A. fumigatus*.
8. Oralna primena smeše antibiotika kod jedinki koje su inficirane gljivom *A. fumigatus* u crevima dovodi do veće disbioze i inflamacije kod oba soja.

Rezultati ovih istraživanja ukazuju da mikrobiota creva, ali ne i pluća, utiče na osetljivost/rezistenciju na infekciju pluća izazvanu gljivom *A. fumigatus*. Inflamacija koja se detektuje u plućima i crevima tokom pulmonarne infekcije dovodi do disbioze bakterijskih zajednica u ovim organima. Prikazani rezultati doprinose novim saznanjima o ulozi mikrobiote creva i pluća tokom infekcije pluća i ukazuju na potencijalne mehanizme dvosmerne komunikacije između ova dva organa.

7. LITERATURA

Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Science Transl Med* 6: 237ra65.

Abrahamsson, T. R., Jakobsson, H. E., Andersson, A. F., Björkstén, B., Engstrand, L., & Jenmalm, M. C. (2014). Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(6), 842–850.

Abt, M. C., Osborne, L. C., Monticelli, L. A., Doering, T. A., Alenghat, T., Sonnenberg, G. F., Paley, M. A., Antenus, M., Williams, K. L., Erikson, J., Wherry, E. J., & Artis, D. (2012). Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*, 37(1), 158–170.

Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y. A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C. T., Hassoun, A., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Rusu, A. V., & Aadil, R. M. (2022). Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in microbiology*, 13, 999001.

Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Li, H., Thom, S. R., Bushman, F. D., Vinogradov, S. A., & Wu, G. D. (2014). Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 147(5), 1055–63.e8.

Ali, A., Tan, H., & Kaiko, G. E. (2020). Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Frontiers in immunology*, 11, 604054.

Al-Mailem, D. M., Kansour, M. K., & Radwan, S. S. (2017). Capabilities and limitations of DGGE for the analysis of hydrocarbonoclastic prokaryotic communities directly in environmental samples. *MicrobiologyOpen*, 6(5), e00495.

Al-Sadi, R. M., & Ma, T. Y. (2007). IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7), 4641–4649.

Amati, F., Stainer, A., Mantero, M., Gramegna, A., Simonetta, E., Suigo, G., Voza, A., Nambiar, A. M., Cariboni, U., Oldham, J., Molyneaux, P. L., Spagnolo, P., Blasi, F., & Aliberti, S. (2022). Lung Microbiome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Other Interstitial Lung Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 977.

Antosca, K. M., Chernikova, D. A., Price, C. E., Ruoff, K. L., Li, K., Guill, M. F., Stewart J. E., Karagas R.M., O'Toole A. G., Madan, J. C. (2019). Altered stool microbiota of infants with cystic fibrosis shows a reduction in genera associated with immune programming from birth. *Journal of bacteriology*, 201(16), 10-1128.

Antunes, K. H., Fachi, J. L., de Paula, R., da Silva, E. F., Pral, L. P., Dos Santos, A. Á., Dias, G. B. M., Vargas, J. E., Puga, R., Mayer, F. Q., Maito, F., Zárata-Bladés, C. R., Ajami, N. J., Sant'Ana, M. R., Candreva, T., Rodrigues, H. G., Schmiele, M., Silva Clerici, M. T. P., Proença-Modena, J. L., Vieira, A. T., Mackay, R. C., Mansur D., Caballero T. M., Marcez J., Li J., Wang X., Bell D., Polak P. F., Kleeberger R. S., Stein T. R., Vinolo M. A. R., de Souza, A. P. D. (2019). Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nature communications*, 10(1), 3273.

- Ashley, S. L., Sjoding, M. W., Popova, A. P., Cui, T. X., Hoostal, M. J., Schmidt, T. M., Branton, W. R., Dieterle, M. G., Falkowski, N. R., Baker, J. M., Hinkle, K. J., Konopka, K. E., Erb-Downward, J. R., Huffnagle, G. B., & Dickson, R. P. (2020). Lung and gut microbiota are altered by hyperoxia and contribute to oxygen-induced lung injury in mice. *Science translational medicine*, *12*(556), eaau9959.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6015), 337–341.
- Bacher, P., Hohnstein, T., Beerbaum, E., Röcker, M., Blango, M. G., Kaufmann, S., Röhmel, J., Eschenhagen, P., Grehn, C., Seidel, K., Rickerts, V., Lozza, L., Stervbo, U., Nienen, M., Babel, N., Milleck, J., Assenmacher, M., Cornely, O. A., Ziegler, M., Wisplinghoff, H., Heine G., Worm M., Siegmund B., Maul J., Creutz P., Tabeling C., Ruwwe-Glosenkamp C., Sander E. L., Knosalla C., Brunke S., Hube B., Kniemeyer O., Brakhage A.A., Schwartz C., Scheffold, A. (2019). Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell*, *176*(6), 1340–1355.e15.
- Barfod, K. K., Roggenbuck, M., Hansen, L. H., Schjørring, S., Larsen, S. T., Sørensen, S. J., & Kroghfelt, K. A. (2013). The murine lung microbiome in relation to the intestinal and vaginal bacterial communities. *BMC microbiology*, *13*(1), 1-12.
- Barfod, K. K., Vrankx, K., Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Hansen, J. S., Hougaard, K. S., Larsen, S. T., Ouwenhand, A. C., & Kroghfelt, K. A. (2015). The Murine Lung Microbiome Changes During Lung Inflammation and Intranasal Vancomycin Treatment. *The open microbiology journal*, *9*, 167–179.
- Bartemes, K. R., & Kita, H. (2018). Innate and adaptive immune responses to fungi in the airway. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *142*(2), 353–363.
- Bartley, J. M., Zhou, X., Kuchel, G. A., Weinstock, G. M., & Haynes, L. (2017). Impact of Age, Caloric Restriction, and Influenza Infection on Mouse Gut Microbiome: An Exploratory Study of the Role of Age-Related Microbiome Changes on Influenza Responses. *Frontiers in immunology*, *8*, 1164.
- Basu Roy, R., Whittaker, E., Seddon, J. A., & Kampmann, B. (2019). Tuberculosis susceptibility and protection in children. *The Lancet. Infectious diseases*, *19*(3), e96–e108.
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, *157*(1), 121–141.
- Berry, D., Stecher, B., Schintlmeister, A., Reichert, J., Brugiroux, S., Wild, B., Wanek, W., Richter, A., Rauch, I., Decker, T., Loy, A., & Wagner, M. (2013). Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(12), 4720–4725.
- Biesbroek G., Tsvitshivadze E., Sanders E. A., Montijn R., Veenhoven R. H., Keijser B. J., et al. (2014). Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 1283–1292. 10.1164/rccm.201407-1240OC
- Bongomin F. (2020). Post-tuberculosis chronic pulmonary aspergillosis: An emerging public health concern. *PLoS pathogens*, *16*(8), e1008742.
- Bosch, A. A. T. M., de Steenhuijsen Piers, W. A. A., van Houten, M. A., Chu, M. L. J. N., Biesbroek, G., Kool, J., Pernet, P., de Groot, P. C. M., Eijkemans, M. J. C., Keijser, B. J. F., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2017). Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health

- Consequences. A Prospective Cohort Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 196(12), 1582–1590.
- Bosch, A. A. T. M., Levin, E., van Houten, M. A., Hasrat, R., Kalkman, G., Biesbroek, G., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., de Groot, P. C. M., Pernet, P., Keijser, B. J. F., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2016). Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*, 9, 336–345.
- Bowerman, K. L., Rehman, S. F., Vaughan, A., Lachner, N., Budden, K. F., Kim, R. Y., Wood, D. L. A., Gellatly, S. L., Shukla, S. D., Wood, L. G., Yang, I. A., Wark, P. A., Hugenholtz, P., & Hansbro, P. M. (2020). Disease-associated gut microbiome and metabolome changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Nature communications*, 11(1), 5886.
- Bozeman, P. M., Learn, D. B., & Thomas, E. L. (1990). Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of immunological methods*, 126(1), 125–133.
- Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., & Romani, L. (2002). Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(3), 1362–1371.
- Bradley, C. P., Teng, F., Felix, K. M., Sano, T., Naskar, D., Block, K. E., Huang, H., Knox, K. S., Littman, D. R., & Wu, H. J. (2017). Segmented Filamentous Bacteria Provoke Lung Autoimmunity by Inducing Gut-Lung Axis Th17 Cells Expressing Dual TCRs. *Cell host & microbe*, 22(5), 697–704.e4.
- Braem, S. G., Rooijackers, S. H., van Kessel, K. P., de Cock, H., Wösten, H. A., van Strijp, J. A., & Haas, P. J. (2015). Effective Neutrophil Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* Is Mediated by Classical Pathway Complement Activation. *Journal of innate immunity*, 7(4), 364–374.
- Briard, B., Karki, R., Malireddi, R. K. S., Bhattacharya, A., Place, D. E., Mavuluri, J., Peters, J. L., Vogel, P., Yamamoto, M., & Kanneganti, T. D. (2019). Fungal ligands released by innate immune effectors promote inflammasome activation during *Aspergillus fumigatus* infection. *Nature microbiology*, 4(2), 316–327.
- Brown, R. L., Sequeira, R. P., & Clarke, T. B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nature communications*, 8(1), 1512.
- Bruzzese, E., Raia, V., Spagnuolo, M. I., Volpicelli, M., De Marco, G., Maiuri, L., & Guarino, A. (2007). Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 26(3), 322–328.
- Budden, K. F., Gellatly, S. L., Wood, D. L., Cooper, M. A., Morrison, M., Hugenholtz, P., & Hansbro, P. M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nature reviews. Microbiology*, 15(1), 55–63.
- Burgel, P. R., Paugam, A., Hubert, D., & Martin, C. (2016). *Aspergillus fumigatus* in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. *Infection and drug resistance*, 9, 229–238.
- Burke, D. G., Fouhy, F., Harrison, M. J., Rea, M. C., Cotter, P. D., O'Sullivan, O., Stanton, C., Hill, C., Shanahan, F., Plant, B. J., & Ross, R. P. (2017). The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. *BMC microbiology*, 17(1), 58.
- Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169–193.

- Carmody, L. A., Zhao, J., Schloss, P. D., Petrosino, J. F., Murray, S., Young, V. B., Li, J. Z., & LiPuma, J. J. (2013). Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Annals of the American Thoracic Society*, *10*(3), 179–187.
- Cauci, S., Driussi, S., De Santo, D., Penacchioni, P., Iannicelli, T., Lanzafame, P., De Seta, F., Quadrifoglio, F., de Aloysio, D., & Guaschino, S. (2002). Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *Journal of clinical microbiology*, *40*(6), 2147–2152.
- Chang, C., & Lin, H. (2016). Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, *30*(1), 3–15.
- Chen, L. W., Chen, P. H., & Hsu, C. M. (2011). Commensal microflora contribute to host defense against *Escherichia coli* pneumonia through Toll-like receptors. *Shock (Augusta, Ga.)*, *36*(1), 67–75.
- Chi, T., Zhao, Q., & Wang, P. (2021). Fecal 16S rRNA Gene Sequencing Analysis of Changes in the Gut Microbiota of Rats with Low-Dose Aspirin-Related Intestinal Injury. *BioMed research international*, *2021*, 8848686.
- Chu, D. M., Ma, J., Prince, A. L., Antony, K. M., Seferovic, M. D., & Aagaard, K. M. (2017). Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine*, *23*(3), 314–326.
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I. P., Kwon, A. H., Vasconcelos, A. C., Cunha, L. D., Mayer, A. E., Shen, Y., Wu, W. L., Kambal, A., Targan, S. R., Xavier, R. J., Ernst, P. B., Green, D. R., McGovern, D. P., Virgin, H. W., & Mazmanian, S. K. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6289), 1116–1120.
- Chung, C. J., Hermes, B. M., Gupta, Y., Ibrahim, S., Belheouane, M., & Baines, J. F. (2023). Genome-wide mapping of gene-microbe interactions in the murine lung microbiota based on quantitative microbial profiling. *Animal microbiome*, *5*(1), 31.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, *22*(3), 447–465.
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory bowel diseases*, *22*(5), 1137–1150.
- Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., & Verma, A. K. (2020). Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of microbiology*, *202*(8), 2147–2167.
- Deriu, E., Boxx, G. M., He, X., Pan, C., Benavidez, S. D., Cen, L., Rozengurt, N., Shi, W., & Cheng, G. (2016). Influenza Virus Affects Intestinal Microbiota and Secondary Salmonella Infection in the Gut through Type I Interferons. *PLoS pathogens*, *12*(5), e1005572.
- Dessein, R., Bauduin, M., Grandjean, T., Le Guern, R., Figeac, M., Beury, D., Faure, K., Faveeuw, C., Guery, B., Gosset, P., & Kipnis, E. (2020). Antibiotic-related gut dysbiosis induces lung immunodepression and worsens lung infection in mice. *Critical care (London, England)*, *24*(1), 611.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, *449*(7164), 811–818.
- Dickson R. P., Martinez F. J., Huffnagle G. B. (2014). The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 384 691–702. 10.1016/s0140-6736(14)61136-3
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Falkowski, N. R., Hunter, E. M., Ashley, S. L., & Huffnagle, G. B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and

Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 198(4), 497–508.

Dickson, Robert P., and Gary B. Huffnagle. "The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease." *PLoS pathogens* 11.7 (2015): e1004923.

Dilantika, C., Sedyaningsih, E. R., Kasper, M. R., Agtini, M., Listiyaningsih, E., Uyeki, T. M., Burgess, T. H., Blair, P. J., & Putnam, S. D. (2010). Influenza virus infection among pediatric patients reporting diarrhea and influenza-like illness. *BMC infectious diseases*, 10, 3.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971-11975.

Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 14(1), 20–32.

Drajac C., Laubreton D., Riffault S., Descamps D. (2017). Pulmonary susceptibility of neonates to respiratory syncytial virus infection: a problem of innate immunity? *J. Immunol. Res.* 2017:8734504. 10.1155/2017/8734504

Du, B., Fu, Y., Han, Y., Sun, Q., Xu, J., Yang, Y., & Rong, R. (2023). The lung-gut crosstalk in respiratory and inflammatory bowel disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1218565.

Ekbom, A., Brandt, L., Granath, F., Löfdahl, C. G., & Egesten, A. (2008). Increased risk of both ulcerative colitis and Crohn's disease in a population suffering from COPD. *Lung*, 186(3), 167–172.

Eladham, M. W., Selvakumar, B., Saheb Sharif-Askari, N., Saheb Sharif-Askari, F., Ibrahim, S. M., & Halwani, R. (2024). Unraveling the gut-Lung axis: Exploring complex mechanisms in disease interplay. *Heliyon*, 10(1), e24032.

El-Muzghi i drugi, 2013. El-Muzghi, A. A. M., Mirkov, I., Djokic, J., Aleksandrov, A. P., Miljkovic, D., Glamoclija, J., ... & Kataranovski, M. (2013). Regional cytokine responses to pulmonary aspergillosis in immunocompetent rats. *Immunobiology*, 218(12), 1514-1523

Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Vieira, A. T., Soares, A. C., Pinho, V., Nicoli, J. R., Vieira, L. Q., Teixeira, M. M., & Souza, D. G. (2012). Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:1950)*, 188(3), 1411–1420.

Flynn, J. M., Niccum, D., Dunitz, J. M., & Hunter, R. C. (2016). Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLoS pathogens*, 12(8), e1005846.

Frati, F., Salvatori, C., Incorvaia, C., Bellucci, A., Di Cara, G., Marcucci, F., & Esposito, S. (2018). The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut-Lung Axis. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 123.

Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., Nicod, L. P., Lloyd, C. M., & Marsland, B. J. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature medicine*, 20(6), 642–647.

Gonçalves, S. M., Lagrou, K., Duarte-Oliveira, C., Maertens, J. A., Cunha, C., & Carvalho, A. (2017). The microbiome-metabolome crosstalk in the pathogenesis of respiratory fungal diseases. *Virulence*, 8(6), 673–684.

- Groves, H. T., Cuthbertson, L., James, P., Moffatt, M. F., Cox, M. J., & Tregoning, J. S. (2018). Respiratory Disease following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota. *Frontiers in immunology*, 9, 182.
- Gu, B. H., Rim, C. Y., Lee, S., Kim, T. Y., Joo, S. S., Lee, S. J., Park, H. K., & Kim, M. (2022). Alteration of Gut Immunity and Microbiome in Mixed Granulocytic Asthma. *Biomedicines*, 10(11), 2946.
- Guo, J., Song, C., Liu, Y., Wu, X., Dong, W., Zhu, H., Xiang, Z., & Qin, C. (2022). Characteristics of gut microbiota in representative mice strains: Implications for biological research. *Animal models and experimental medicine*, 5(4), 337–349.
- Gurczynski, S. J., & Moore, B. B. (2018). IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 314(1), L6–L16.
- Gusarov, I., & Nudler, E. (2005). NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13855–13860.
- Hérivaux, A., Willis, J. R., Mercier, T., Lagrou, K., Gonçalves, S. M., Gonçalves, R. A., Maertens, J., Carvalho, A., Gabaldón, T., & Cunha, C. (2022). Lung microbiota predict invasive pulmonary aspergillosis and its outcome in immunocompromised patients. *Thorax*, 77(3), 283–291.
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and environments*, 32(4), 300–313.
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., Moffatt, M. F., & Cookson, W. O. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one*, 5(1), e8578.
- Hoeh, A. G., Li, J., Moulton, L. A., O'Toole, G. A., Housman, M. L., Koestler, D. C., Guill, M. F., Moore, J. H., Hibberd, P. L., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Karagas, M. R., & Madan, J. C. (2015). Associations between Gut Microbial Colonization in Early Life and Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis. *The Journal of pediatrics*, 167(1), 138–47.e473.
- Hu, Y., Cheng, M., Liu, B., Dong, J., Sun, L., Yang, J., Yang, F., Chen, X., & Jin, Q. (2020). Metagenomic analysis of the lung microbiome in pulmonary tuberculosis - a pilot study. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1444–1452.
- Hu, Y., Feng, Y., Wu, J., Liu, F., Zhang, Z., Hao, Y., Liang, S., Li, B., Li, J., Lv, N., Xu, Y., Zhu, B., & Sun, Z. (2019). The Gut Microbiome Signatures Discriminate Healthy From Pulmonary Tuberculosis Patients. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 90.
- Huang, M. T., Chiu, C. J., Tsai, C. Y., Lee, Y. R., Liu, W. L., Chuang, H. L., & Huang, M. T. (2023). Short-chain fatty acids ameliorate allergic airway inflammation via sequential induction of PMN-MDSCs and Treg cells. *The journal of allergy and clinical immunology. Global*, 2(4), 100163.
- Huttenhower, C., Kostic, A. D., & Xavier, R. J. (2014). Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity*, 40(6), 843–854.
- Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S., & Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(13), 5354–5359.
- Igartua, C., Davenport, E. R., Gilad, Y., Nicolae, D. L., Pinto, J., & Ober, C. (2017). Host genetic variation in mucosal immunity pathways influences the upper airway microbiome. *Microbiome*, 5(1), 16.

- Invernizzi, R., Lloyd, C. M., & Molyneaux, P. L. (2020). Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*, *160*(2), 171–182.
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., *et al.* (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* *51*: 270–274.
- Kaczmarek, J. L., Musaad, S. M., & Holscher, H. D. (2017). Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota. *The American journal of clinical nutrition*, *106*(5), 1220–1231.
- Kan, H., Stevens, J., Heiss, G., Rose, K. M., & London, S. J. (2008). Dietary fiber, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease in the atherosclerosis risk in communities study. *American journal of epidemiology*, *167*(5), 570–578.
- Kanj, A. N., Kottom, T. J., Schaeffbauer, K. J., Choudhury, M., Limper, A. H., & Skalski, J. H. (2023). Dysbiosis of the intestinal fungal microbiota increases lung resident group 2 innate lymphoid cells and is associated with enhanced asthma severity in mice and humans. *Respiratory research*, *24*(1), 144.
- Keely, S., & Hansbro, P. M. (2014). Lung-gut cross talk: a potential mechanism for intestinal dysfunction in patients with COPD. *Chest*, *145*(2), 199–200.
- Kehrmann, J., Veckollari, B., Schmidt, D., Schildgen, O., Schildgen, V., Wagner, N., Zeschnigk, M., Klein-Hitpass, L., Witzke, O., Buer, J., & Steinmann, J. (2017). The lung microbiome in patients with pneumocystosis. *BMC pulmonary medicine*, *17*(1), 170.
- Kesavelu, D., & Jog, P. (2023). Current understanding of antibiotic-associated dysbiosis and approaches for its management. *Therapeutic advances in infectious disease*, *10*, 20499361231154443.
- Khan, N., Mendonca, L., DJohanssonwal, A., Fontes, G., Menzies, D., Xia, J., Divangahi, M., & King, I. L. (2019). Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal immunology*, *12*(3), 772–783.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*(Suppl 1), 4578–4585.
- Kogut, M. H., Lee, A., & Santin, E. (2020). Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poultry science*, *99*(4), 1906–1913.
- Kulas, J., Mirkov, I., Tucovic, D., Zolotarevski, L., Glamoclija, J., Veljovic, K., Tolinacki, M., Golic, N., & Kataranovski, M. (2019). Pulmonary Aspergillus fumigatus infection in rats affects gastrointestinal homeostasis. *Immunobiology*, *224*(1), 116–123.
- Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., & Bruns, T. (2016). Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, *34*(3), 260–268.
- Lapin, B., Piorkowski, J., Ownby, D., Freels, S., Chavez, N., Hernandez, E., Wagner-Cassanova, C., Pelzel, D., Vergara, C., & Persky, V. (2015). Relationship between prenatal antibiotic use and asthma in at-risk children. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, *114*(3), 203–207.
- Larsen, J. M., Steen-Jensen, D. B., Laursen, J. M., Søndergaard, J. N., Musavian, H. S., Butt, T. M., & Brix, S. (2012). Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS one*, *7*(2), e31976.

- Latgé J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310–350.
- Lavelle, A., Hoffmann, T. W., Pham, H. P., Langella, P., Guédon, E., & Sokol, H. (2019). Baseline microbiota composition modulates antibiotic-mediated effects on the gut microbiota and host. *Microbiome*, 7(1), 111.
- Lederberg, J. and McCray, A.T. (2001) 'Ome Sweet 'Omics—A Genealogical Treasury of Words. *Scientist*, 15, 8.
- Lee, S. H., Kwon, J. E., & Cho, M. L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal research*, 16(1), 26–42.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023.
- Li, J., Hu, Y., Liu, L., Wang, Q., Zeng, J., & Chen, C. (2020). PM2.5 exposure perturbs lung microbiome and its metabolic profile in mice. *The Science of the total environment*, 721, 137432.
- Li, W., Zhu, Y., Liao, Q., Wang, Z., & Wan, C. (2019). Characterization of gut microbiota in children with pulmonary tuberculosis. *BMC pediatrics*, 19(1), 445.
- Li, Z., Lu, G., & Meng, G. (2019). Pathogenic Fungal Infection in the Lung. *Frontiers in immunology*, 10, 1524.
- Liao, L., Lin, D., Liu, Z., Gao, Y., & Hu, K. (2023). A case of meningitis caused by *Ralstonia insidiosa*, a rare opportunistic pathogen. *BMC infectious diseases*, 23(1), 548.
- Liu, F., Li, J., Guan, Y., Lou, Y., Chen, H., Xu, M., Deng, D., Chen, J., Ni, B., Zhao, L., Li, H., Sang, H., & Cai, X. (2019). Dysbiosis of the Gut Microbiome is associated with Tumor Biomarkers in Lung Cancer. *International journal of biological sciences*, 15(11), 2381–2392.
- Liu, X., Cheng, Y., Zang, D., Zhang, M., Li, X., Liu, D., Gao, B., Zhou, H., Sun, J., Han, X., Lin, M., & Chen, J. (2021). The Role of Gut Microbiota in Lung Cancer: From Carcinogenesis to Immunotherapy. *Frontiers in oncology*, 11, 720842.
- Liu, X., Cheng, Y., Zang, D., Zhang, M., Li, X., Liu, D., Gao, B., Zhou, H., Sun, J., Han, X., Lin, M., & Chen, J. (2021). The Role of Gut Microbiota in Lung Cancer: From Carcinogenesis to Immunotherapy. *Frontiers in oncology*, 11, 720842.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., & Begovic, J. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Applied and environmental microbiology*, 79(18), 5735–5744.
- Maisonneuve, P., FitzSimmons, S. C., Neglia, J. P., Campbell, P. W., 3rd, & Lowenfels, A. B. (2003). Cancer risk in nontransplanted and transplanted cystic fibrosis patients: a 10-year study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(5), 381–387.
- Margalit, A., Carolan, J. C., & Kavanagh, K. (2021). Bacterial Interactions with *Aspergillus fumigatus* in the Immunocompromised Lung. *Microorganisms*, 9(2), 435.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., & Furet, J. P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9, 123.

- Mathieu, E., Escribano-Vazquez, U., Descamps, D., Cherbuy, C., Langella, P., Riffault, S., Remot, A., & Thomas, M. (2018). Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Frontiers in physiology*, *9*, 1168.
- Mazumder, M. H. H., Gandhi, J., Majumder, N., Wang, L., Cumming, R. I., Stradtman, S., Velayutham, M., Hathaway, Q. A., Shannahan, J., Hu, G., Nurkiewicz, T. R., Tighe, R. M., Kelley, E. E., & Hussain, S. (2023). Lung-gut axis of microbiome alterations following co-exposure to ultrafine carbon black and ozone. *Particle and fibre toxicology*, *20*(1), 15.
- McAleer, J. P., & Kolls, J. K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *European journal of immunology*, *48*(1), 39–49.
- McAleer, J. P., Nguyen, N. L., Chen, K., Kumar, P., Ricks, D. M., Binnie, M., Armentrout, R. A., Pociask, D. A., Hein, A., Yu, A., Vikram, A., Bibby, K., Umesaki, Y., Rivera, A., Sheppard, D., Ouyang, W., Hooper, L. V., & Kolls, J. K. (2016). Pulmonary Th17 Antifungal Immunity Is Regulated by the Gut Microbiome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *197*(1), 97–107.
- Mirkov, I., Demenesku, J., Popov Aleksandrov, A., Ninkov, M., Glamoclija, J., Kataranovski, D., & Kataranovski, M. (2015). Strain differences in the immune mechanisms of resistance of immunocompetent rats to pulmonary aspergillosis. *Immunobiology*, *220*(9), 1075–1084.
- Mirkov, I., El-Muzghi, A. A., Djokic, J., Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Glamoclija, J., & Kataranovski, M. (2014). Pulmonary immune responses to *Aspergillus fumigatus* in rats. *Biomedical and environmental sciences : BES*, *27*(9), 684–694.
- Moghaddam, A., Graeser, V., Westhauser, F., Dapunt, U., Kamradt, T., Woerner, S. M., & Schmidmaier, G. (2016). Patients' safety: is there a systemic release of gentamicin by gentamicin-coated tibia nails in clinical use?. *Therapeutics and clinical risk management*, *12*, 1387–1393.
- Morcillo, E. J., Estrela, J., & Cortijo, J. (1999). Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants. *Pharmacological research*, *40*(5), 393–404.
- Morinaga, Y., Yanagihara, K., Miyashita, N., Seki, M., Izumikawa, K., Takeya, H., Yamamoto, Y., Mukae, H., Yamada, Y., Kohno, S., & Kamihira, S. (2009). Azithromycin, clarithromycin and telithromycin inhibit MUC5AC induction by *Chlamydomyces pneumoniae* in airway epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, *22*(6), 580–586.
- Morton, C. O., Bouzani, M., Loeffler, J., & Rogers, T. R. (2012). Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity?. *Frontiers in microbiology*, *3*, 413.
- Mulder, B., Pouwels, K. B., Schuiling-Veninga, C. C., Bos, H. J., de Vries, T. W., Jick, S. S., & Hak, E. (2016). Antibiotic use during pregnancy and asthma in preschool children: the influence of confounding. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *46*(9), 1214–1226.
- Nagarajan, A., Scoggin, K., Gupta, J., Threadgill, D. W., & Andrews-Polymenis, H. L. (2023). Using the collaborative cross to identify the role of host genetics in defining the murine gut microbiome. *Microbiome*, *11*(1), 149.
- Natalini, J. G., Singh, S., & Segal, L. N. (2023). The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nature reviews. Microbiology*, *21*(4), 222–235.
- Nava, G. M., Friedrichsen, H. J., & Stappenbeck, T. S. (2011). Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *The ISME journal*, *5*(4), 627–638.

- Neglia, J. P., FitzSimmons, S. C., Maisonneuve, P., Schöni, M. H., Schöni-Affolter, F., Corey, M., & Lowenfels, A. B. (1995). The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *The New England journal of medicine*, 332(8), 494–499.
- Ninkov, M., Popov Aleksandrov, A., Mirkov, I., Demenesku, J., Mileusnic, D., Jovanovic Stojanov, S., Golic, N., Tolinacki, M., Zolotarevski, L., Kataranovski, D., Brceski, I., & Kataranovski, M. (2016). Strain differences in toxicity of oral cadmium intake in rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 96, 11–23.
- Noverr, M. C., Noggle, R. M., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2004). Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infection and immunity*, 72(9), 4996–5003.
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J. Z., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC microbiology*, 16, 90.
- O'Dwyer, D. N., Ashley, S. L., Gurczynski, S. J., Xia, M., Wilke, C., Falkowski, N. R., Norman, K. C., Arnold, K. B., Huffnagle, G. B., Salisbury, M. L., Han, M. K., Flaherty, K. R., White, E. S., Martinez, F. J., Erb-Downward, J. R., Murray, S., Moore, B. B., & Dickson, R. P. (2019). Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 199(9), 1127–1138.
- Ogunrinola, G. A., Oyewale, J. O., Oshamika, O. O., & Olasehinde, G. I. (2020). The Human Microbiome and Its Impacts on Health. *International journal of microbiology*, 2020, 8045646.
- Panpetch, W., Hiengrach, P., Nilgate, S., Tumwasorn, S., Somboonna, N., Wilantho, A., Chatthanathon, P., Prueksapanich, P., & Leelahavanichkul, A. (2020). Additional *Candida albicans* administration enhances the severity of dextran sulfate solution induced colitis mouse model through leaky gut-enhanced systemic inflammation and gut-dysbiosis but attenuated by *Lactobacillus rhamnosus* L34. *Gut microbes*, 11(3), 465–480.
- Paone, P., & Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?. *Gut*, 69(12), 2232–2243.
- Patel, V. I., & Metcalf, J. P. (2018). Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets in the Resting Human Lung. *Critical reviews in immunology*, 38(4), 303–331.
- Poroyko, V., Meng, F., Meliton, A., Afonyushkin, T., Ulanov, A., Semenyuk, E., Latif, O., Tesic, V., Birukova, A. A., & Birukov, K. G. (2015). Alterations of lung microbiota in a mouse model of LPS-induced lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 309(1), L76–L83.
- Qian, G., Jiang, W., Zou, B., Feng, J., Cheng, X., Gu, J., Chu, T., Niu, C., He, R., Chu, Y., & Lu, M. (2018). LPS inactivation by a host lipase allows lung epithelial cell sensitization for allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*, 215(9), 2397–2412.
- Qin, N., Zheng, B., Yao, J., Guo, L., Zuo, J., Wu, L., Zhou, J., Liu, L., Guo, J., Ni, S., Li, A., Zhu, Y., Liang, W., Xiao, Y., Ehrlich, S. D., & Li, L. (2015). Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. *Scientific reports*, 5, 14771.
- Rahman, I., Biswas, S. K., Jimenez, L. A., Torres, M., & Forman, H. J. (2005). Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(1-2), 42–59.
- Rao, S., Kupfer, Y., Pagala, M., Chapnick, E., & Tessler, S. (2011). Systemic absorption of oral vancomycin in patients with *Clostridium difficile* infection. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 43(5), 386–388.

- Rautava, S., Collado, M.C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2012). Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology* 102: 178–184.
- Remot, A., Descamps, D., Noordine, M. L., Boukadiri, A., Mathieu, E., Robert, V., Riffault, S., Lambrecht, B., Langella, P., Hammad, H., & Thomas, M. (2017). Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *The ISME journal*, 11(5), 1061–1074.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.
- Robak, O. H., Heimesaat, M. M., Kruglov, A. A., Prepens, S., Ninnemann, J., Gutbier, B., Reppe K., Hochrein, H., Suter, M., Kirchning, J. C., Marathe, V., Buer, J., Hornef, W. M., Schnare, M., Schneider, P., Witzenzath, M., Bereswill, S., Steinhoff, U., Suttorp, N., Sander, E. L., Chaput, C., & Opitz, B. (2018). Antibiotic treatment–induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*, 128(8), 3535–3545.
- Rodríguez-Rojas, A., Kim, J. J., Johnston, P. R., Makarova, O., Eravci, M., Weise, C., Hengge, R., & Rolf, J. (2020). Non-lethal exposure to H₂O₂ boosts bacterial survival and evolvability against oxidative stress. *PLoS genetics*, 16(3), e1008649.
- Romani L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature reviews. Immunology*, 4(1), 1–23.
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(5), 313–323.
- Ruane, D., Brane, L., Reis, B. S., Cheong, C., Poles, J., Do, Y., Zhu, H., Velinzon, K., Choi, J. H., Studt, N., Mayer, L., Lavelle, E. C., Steinman, R. M., Mucida, D., & Mehandru, S. (2013). Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*, 210(9), 1871–1888.
- Ruff, W. E., Greiling, T. M., & Kriegel, M. A. (2020). Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 18(9), 521–538.
- Rutten, E. P., Spruit, M. A., Franssen, F. M., Buurman, W. A., Wouters, E. F., & Lenaerts, K. (2014). GI symptoms in patients with COPD. *Chest*, 145(6), 1437–1438.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., Quatresooz, P., Sirard, J. C., Cataldo, D., Gillet, L., Bouabe, H., Desmet, C. J., Ginhoux, F., Marichal, T., & Bureau, F. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity*, 46(3), 457–473.
- Sales-Campos, H., Tonani, L., Cardoso, C. R., & Kress, M. R. (2013). The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *BioMed research international*, 2013, 693023.
- Schuijt, T. J., Lankelma, J. M., Scicluna, B. P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J. J., de Boer, J. D., Hoogendijk, A. J., de Beer, R., de Vos, A., Belzer, C., de Vos, W. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2016). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*, 65(4), 575–583.
- Schwartz, D. J., Langdon, A. E., & Dantas, G. (2020). Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome medicine*, 12(1), 82.

- Segal, L. N., Clemente, J. C., Tsay, J. C., Koralov, S. B., Keller, B. C., Wu, B. G., Li, Y., Shen, N., Ghedin, E., Morris, A., Diaz, P., Huang, L., Wikoff, W. R., Ubeda, C., Artacho, A., Rom, W. N., Serman, D. H., Collman, R. G., Blaser, M. J., & Weiden, M. D. (2016). Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nature microbiology*, *1*, 16031.
- Shaaban, Mohamed, et al. "Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: Structural elucidation and bioactivity studies." *Revista latinoamericana de química* 41.1 (2013): 50-60.
- Sheppard, D. C., Marr, K. A., Fredricks, D. N., Chiang, L. Y., Doedt, T., & Filler, S. G. (2006). Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *12*(4), 376–380.
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in biotechnology*, *33*(9), 496–503.
- Singh N., Vats A., Sharma A., Arora A., Kumar A. (2017). The development of lower respiratory tract microbiome in mice. *Microbiome* 5:61.
- Singh, H., Nugent, Z., Yu, B. N., Lix, L. M., Targownik, L. E., & Bernstein, C. N. (2017). Higher Incidence of *Clostridium difficile* Infection Among Individuals With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, *153*(2), 430–438.e2.
- Skalski, J. H., Limon, J. J., Sharma, P., Gargus, M. D., Nguyen, C., Tang, J., Coelho, A. L., Hogaboam, C. M., Crother, T. R., & Underhill, D. M. (2018). Expansion of commensal fungus *Walleimia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS pathogens*, *14*(9), e1007260.
- Slae, M., & Wilschanski, M. (2020). Cystic fibrosis and the gut. *Frontline gastroenterology*, *12*(7), 622–628.
- Sokolowska, M., Frei, R., Lunjani, N., Akdis, C. A., & O'Mahony, L. (2018). Microbiome and asthma. *Asthma research and practice*, *4*, 1.
- Sommariva, M., Le Noci, V., Bianchi, F., Camelliti, S., Balsari, A., Tagliabue, E., & Sfondrini, L. (2020). The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *77*(14), 2739–2749.
- Steel, J.H., Malatos, S., Kennea, N., Edwards, A.D., Miles, L., Duggan, P., et al. (2005) Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 57: 404–411.
- Stelzmueller, I., Biebl, M., Wiesmayr, S., Eller, M., Hoeller, E., Fille, M., Weiss, G., Lass-Floerl, C., & Bonatti, H. (2006). *Ralstonia pickettii*-innocent bystander or a potential threat?. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *12*(2), 99–101.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B., & Ames, B. N. (1990). Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in genetics : TIG*, *6*(11), 363–368.
- Sun, L., Zhang, X., Zhang, Y., Zheng, K., Xiang, Q., Chen, N., Chen, Z., Zhang, N., Zhu, J., & He, Q. (2019). Antibiotic-Induced Disruption of Gut Microbiota Alters Local Metabolomes and Immune Responses. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *9*, 99.
- Syromyatnikov, M., Nesterova, E., Gladkikh, M., Smirnova, Y., Gryaznova, M., & Popov, V. (2022). Characteristics of the Gut Bacterial Composition in People of Different Nationalities and Religions. *Microorganisms*, *10*(9), 1866.

- Sze, M. A., Tsuruta, M., Yang, S. W., Oh, Y., Man, S. F., Hogg, J. C., & Sin, D. D. (2014). Changes in the bacterial microbiota in gut, blood, and lungs following acute LPS instillation into mice lungs. *PLoS one*, 9(10), e111228.
- Taccone, F. S., Van den Abeele, A. M., Bulpa, P., Misset, B., Meersseman, W., Cardoso, T., Paiva, J. A., Blasco-Navalpotro, M., De Laere, E., Dimopoulos, G., Rello, J., Vogelaers, D., Blot, S. I., & AspICU Study Investigators (2015). Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Critical care (London, England)*, 19(1), 7.
- Tam, V. H., Kabbara, S., Vo, G., Schilling, A. N., & Coyle, E. A. (2006). Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2626–2631.
- Thakur, R., Anand, R., Tiwari, S., Singh, A. P., Tiwary, B. N., & Shankar, J. (2015). Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells?. *Frontiers in microbiology*, 6, 429.
- Thavamani, A., Salem, I., Sferra, T. J., & Sankararaman, S. (2021). Impact of Altered Gut Microbiota and Its Metabolites in Cystic Fibrosis. *Metabolites*, 11(2), 123.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Pattaroni, C., Lopez-Mejia, I. C., Riva, E., Pernot, J., Ubags, N., Fajas, L., Nicod, L. P., & Marsland, B. J. (2018). Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c⁺ Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8⁺ T Cell Metabolism. *Immunity*, 48(5), 992–1005.e8.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine*, 20(2), 159–166.
- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., & Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell host & microbe*, 21(4), 433–442.
- Tulic, M. K., Piche, T., & Verhasselt, V. (2016). Lung-gut cross-talk: evidence, mechanisms and implications for the mucosal inflammatory diseases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 46(4), 519–528.
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., & Latgé, J. P. (2017). *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 15(11), 661–674.
- Vaughan, A., Frazer, Z. A., Hansbro, P. M., & Yang, I. A. (2019). COPD and the gut-lung axis: the therapeutic potential of fibre. *Journal of thoracic disease*, 11(Suppl 17), S2173–S2180.
- Veirup, N., & Kyriakopoulos, C. (2023). Neomycin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Villacara, A., Kumami, K., Yamamoto, T., Mrsulja, B. B., & Spatz, M. (1989). Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible in vitro lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry*, 53(2), 595–601.
- Wang, H., Liu, J. S., Peng, S. H., Deng, X. Y., Zhu, D. M., Javidiparsijani, S., Wang, G. R., Li, D. Q., Li, L. X., Wang, Y. C., & Luo, J. M. (2013). Gut-lung crosstalk in pulmonary involvement with inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 19(40), 6794–6804.
- Wang, J., Li, F., Wei, H., Lian, Z. X., Sun, R., & Tian, Z. (2014). Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 211(12), 2397–2410.

- Wang, J., Zheng, J., Shi, W., Du, N., Xu, X., Zhang, Y., Ji, P., Zhang, F., Jia, Z., Wang, Y., Zheng, Z., Zhang, H., & Zhao, F. (2018). Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus. *Gut*, *67*(9), 1614–1625.
- Wang, Z., Bafadhel, M., Haldar, K., Spivak, A., Mayhew, D., Miller, B. E., Tal-Singer, R., Johnston, S. L., Ramsheh, M. Y., Barer, M. R., Brightling, C. E., & Brown, J. R. (2016). Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *The European respiratory journal*, *47*(4), 1082–1092.
- Winglee, K., Eloie-Fadrosh, E., Gupta, S., Guo, H., Fraser, C., & Bishai, W. (2014). Aerosol Mycobacterium tuberculosis infection causes rapid loss of diversity in gut microbiota. *PLoS one*, *9*(5), e97048.
- Wu, H., Xie, S., Miao, J., Li, Y., Wang, Z., Wang, M., & Yu, Q. (2020). Lactobacillus reuteri maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa. *Gut microbes*, *11*(4), 997-1014.
- Wu, T., Xu, F., Su, C., Li, H., Lv, N., Liu, Y., Gao, Y., Lan, Y., & Li, J. (2020). Alterations in the Gut Microbiome and Cecal Metabolome During *Klebsiella pneumoniae*-Induced Pneumosepsis. *Frontiers in immunology*, *11*, 1331.
- Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C., & Marsland, B. J. (2019). The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature immunology*, *20*(10), 1279–1290.
- Yadava, K., Pattaroni, C., Sichelstiel, A. K., Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Salami, O., von Garnier, C., Nicod, L. P., & Marsland, B. J. (2016). Microbiota Promotes Chronic Pulmonary Inflammation by Enhancing IL-17A and Autoantibodies. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *193*(9), 975–987.
- Yagi, K., Huffnagle, G. B., Lukacs, N. W., & Asai, N. (2021). The Lung Microbiome during Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, *22*(19), 10872.
- Yamada, T., Nakashima, T., Masuda, T., Sakamoto, S., Yamaguchi, K., Horimasu, Y., Miyamoto, S., Iwamoto, H., Fujitaka, K., Hamada, H., Kamada, N., & Hattori, N. (2023). Intestinal overgrowth of *Candida albicans* exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice with dysbiosis. *The Journal of pathology*, *261*(2), 227–237.
- Yang, R., Han, X., Uchiyama, T., Watkins, S. K., Yaguchi, A., Delude, R. L., & Fink, M. P. (2003). IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *285*(3), G621–G629.
- Yildiz, S., Mazel-Sanchez, B., Kandasamy, M., Manicassamy, B., & Schmolke, M. (2018). Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. *Microbiome*, *6*(1), 9.
- Yitbarek, A., Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D. C., Read, L., Nagy, É., Weese, J. S., Caswell, J. L., Parkinson, J., & Sharif, S. (2018). Gut microbiota-mediated protection against influenza virus subtype H9N2 in chickens is associated with modulation of the innate responses. *Scientific reports*, *8*(1), 13189.
- Yu, G., Gail, M. H., Consonni, D., Carugno, M., Humphrys, M., Pesatori, A. C., Caporaso, N. E., Goedert, J. J., Ravel, J., & Landi, M. T. (2016). Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome biology*, *17*(1), 163.
- Yuan, X., Zhou, F., Wang, H., Xu, X., Xu, S., Zhang, C., Zhang, Y., Lu, M., Zhang, Y., Zhou, M., Li, H., Zhang, X., Zhang, T., & Song, J. (2023). Systemic antibiotics increase microbiota pathogenicity and oral bone loss. *International journal of oral science*, *15*(1), 4.

- Zelante, T., Bozza, S., De Luca, A., D'Angelo, C., Bonifazi, P., Moretti, S., Giovannini, G., Bistoni, F., & Romani, L. (2009). Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. *Medical mycology*, *47 Suppl 1*, S162–S169.
- Zelante, T., De Luca, A., Bonifazi, P., Montagnoli, C., Bozza, S., Moretti, S., Belladonna, M. L., Vacca, C., Conte, C., Mosci, P., Bistoni, F., Puccetti, P., Kastelein, R. A., Kopf, M., & Romani, L. (2007). IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *European journal of immunology*, *37*(10), 2695–2706.
- Zhang, W. Q., Zhao, S. K., Luo, J. W., Dong, X. P., Hao, Y. T., Li, H., Shan, L., Zhou, Y., Shi, H. B., Zhang, Z. Y., Peng, C. L., & Zhao, X. G. (2018). Alterations of fecal bacterial communities in patients with lung cancer. *American journal of translational research*, *10*(10), 3171–3185.
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*, *30*(6), 492–506.
- Zheng, Y., Fang, Z., Xue, Y., Zhang, J., Zhu, J., Gao, R., Yao, S., Ye, Y., Wang, S., Lin, C., Chen, S., Huang, H., Hu, L., Jiang, G. N., Qin, H., Zhang, P., Chen, J., & Ji, H. (2020). Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer. *Gut microbes*, *11*(4), 1030–1042.
- Zhou, A., Lei, Y., Tang, L., Hu, S., Yang, M., Wu, L., Yang, S., & Tang, B. (2021). Gut Microbiota: the Emerging Link to Lung Homeostasis and Disease. *Journal of bacteriology*, *203*(4), e00454-20.
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A. C. K., Cheung, C. P., Chen, N., Lai, C. K. C., Chen, Z., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D. S. C., Chan, F. K. L., Chan, P. K. S., Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology*, *159*(3), 944–955.e8.

BIOGRAFIJA

Dušanka D. Popović rođena je 1982. godine u Trebinju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine, na studijskom programu Biologija. Fakultet je završila u aprilu 2009. godine, sa prosečnom ocenom 8.25 i diplomskim radom pod nazivom „Uloga neurotrofina u nervnom sistemu i bihevioralnoj plastičnosti” sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je školske 2013/2014. godine na studijskom programu Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota. Iste godine je zaposlena na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju. U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je u junu 2017. godine. Od 2019. zaposlena je na Odeljenju za ekologiju, u grupi za imunotoksikologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač-saradnik stiče u aprilu 2021. godine. Učesnica je jednog projekta Fonda za inovacionu delatnost, jednog projekta Fonda za nauku, kao i dva projekta Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj. Dušanka je autor/koautor na 14 radova u časopisima međunarodnog značaja i 10 saopštenja na međunarodnim i domaćim kongresima. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada u časopisima M21 kategorije. Članica je Društva imunologa Srbije i Srpskog biološkog društva.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Душанка Д. Поповић

број индекса M3013/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Улога микробиоте плућа и црева у имунском одговору на *Aspergillus fumigatus* код Dark Agouti и Albino Oxford сојева пацова»

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Душанка Д. Поповић

Број индекса M3013/2013

Студијски програм Молекуларна биологија; Модул: Молекуларна биологија прокариота

Наслов рада Улога микробиоте плућа и црева у имунском одговору на *Aspergillus fumigatus* код Dark Agouti и Albino Oxford сојева пацова

Ментор др Маја Толиначки, др Бранко Јовчић

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 докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога микробиоте плућа и црева у имунском одговору на *Aspergillus fumigatus* код Dark Agouti и Albino Oxford сојева пацова

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).

У Београду, _____

Потпис докторанда

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.