



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Бојана Ј. Симовић Марковић

Галектин-3 у експрименталном моделу акутног
КОЛИТИСА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Доц. др Владислав Воларевић

Крагујевац, 2016. године

Најискреније се захваљујем свом ментору доц. др Владиславу Воларевићу за неизмерну подршку и разумевање у тренуцима посустајања кроз све ове године заједничког рада.

Сећајући се својих првих корака, упућујем најдубљу захвалност својој породици за безрезервну подршку у сваком тренутку. Без њихове љубави, не бих успела.

Хвала најдражем стрицу!

Рад на овом докторату имао је посебну драж због екипе која ме је окруживала. Сања, Ацо, Марина и Јасмине од срца хвала на помоћи и подршци, били сте прави пријатељи када су се ствари чиниле безизлазне.

За велику помоћ и указано поверење на мом научном путу искрено се захваљујем проф. др Миодрагу Л. Лукићу и проф. др Небојши Арсенијевићу.

Посебну захвалност изражавам доц. др Слободанки Митровић и др Милошу Милосављевићу на стручној и пријатељској подршци.

Научни рад тражи упорност, стрпљење и много одрицања, али је изазов бити део марљивог колектива Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија.

Велико хвала!

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. ИНФЛАМАЦИЈСКА БОЛЕСТ ЦРЕВА	1
1.1.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија	1
1.1.2. Патогенеза	3
1.1.2.1. <i>Неутрофили</i>	4
1.1.2.2. <i>Мастоцити и еозинофили</i>	5
1.1.2.3. <i>NKT и NK ћелије</i>	5
1.1.2.4. <i>Дендритске ћелије</i>	6
1.1.2.5. <i>Макрофаги</i>	7
1.1.3. Клиничка слика	7
1.1.4. Дијагноза	8
1.1.5. Терапија	11
1.1.5.1. <i>Биолошка терапија улцерозног колитиса</i>	12
1.2. DSS КОЛИТИС: МОДЕЛ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА	13
1.2.1. Опште карактеристике декстран натријум сулфата	14
1.2.2. Индукција колитиса	15
1.2.3. Клинички ток и хистолошке промене у колитису изазваном DSS-ом	16
1.2.4. Патогенеза колитиса изазваног DSS-ом	16
1.2.4.1. <i>Улога ћелија урођене имуности у патогенези колитиса изазваног DSS-ом</i>	17
1.2.4.2. <i>Улога цитокина у патогенези колитиса изазваног DSS-ом</i>	20
1.3. ГАЛЕКТИН 3	20
1.3.1. Класификација и структура галектинских молекула ...	20
1.3.2. Експресија и функција галектина	22
1.3.3. Структура галектина 3	24
1.3.4. Физиолошка улога галектина 3	27
1.3.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора	28
1.3.6. Експресија галектина 3 у ткиву колона	31
2. ЦИЉ РАДА	32
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	33
3.1. Лабораторијске животиње	33
3.1.1. Поступак добијања C57/BL6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3	33
3.2. Индукција експерименталног акутног колитиса декстран натријум сулфатом	35
3.3. Одређивање клиничког скорa	35
3.4. Патохистолошке анализе	36
3.4.1. Фиксација и депарафинизација ткива колона	36
3.4.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	37
3.4.3. Одређивање хистолошког скорa	37
3.5. Апликација <i>Davanat</i>-a	38

3.6. Апликација α -галактоцерамида.....	39
3.7. Апликација MSCs	39
3.8. Изолација инфламацијских ћелија из <i>lamina propria</i> -е ткива дебелог црева	39
3.9. Проточна цитометријска анализа популација мононуклеарних ћелија.....	40
3.9.1. Бојење мембранских маркера	40
3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина	44
3.10. Изолација и активација макрофага <i>in vitro</i>	45
3.11. Делеција макрофага.....	46
3.12. Адоптивни трансфер макрофага	46
3.13. Изолација и адоптивни трансфер неутрофила	46
3.14. Изолација и адоптивни трансфер дендритских ћелија	47
3.15. Кокултивација перитонеалних макрофага и MSCs	48
3.16. Мерење концентрације IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 и TGF- β у серуму, изолату ткива колона и супернатанту	48
3.17. Имунохистохемијске анализе	49
3.18. Реакција ланчаног умножавања.....	50
3.18.1. Изолација RNA	50
3.18.2. Реверзна транскрипција	51
3.18.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, <i>real time polymerase chain reaction</i>)	51
3.19. Статистичка обрада података	52
4. РЕЗУЛТАТИ	53
4.1. Делеција гена за Gal-3 значајно смањује оштећење ткива ткива дебелог црева изазвано DSS-ом	53
4.1.1. Концентрације антиинфламацијских TGF- β и IL-10 су веће док су концентрације проинфламацијских citoкина IL-1 β и TNF- α мање у Gal-3 ^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а	56
4.1.2. Експресија Gal-3 молекула у ткиву дебелог црева	57
4.2. Укупан број и процентуална заступљеност M1 је значајно мања а M2 макрофага већа, у оболелих Gal-3 ^{-/-} мишева.....	58
4.2.1. Делеција гена за Gal-3 олакшава алтернативну активацију макрофага.....	62
4.2.2. Перитонеални макрофаги здравих Gal-3 ^{-/-} мишева активисани <i>in vitro</i> липополисахаридом и DSS-ом продуковали су значајно мање TNF- α и IL-1 β у поређењу са перитонеалним макрофагима C57BL/6 мишева.....	64
4.2.3. Адоптивни трансфер перитонеалних макрофага	65
4.2.4. Делеција гена за Gal-3 смањује експресију NALP-а и IL- 1 β у ткиву колона	68
4.2.5. Делеција макрофага укида разлике у тежини болести и степену оштећења ткива између C57BL/6 и Gal-3 ^{-/-} мишева.	70

4.3. У ламини проприји оболелих Gal-3^{-/-} мишева присутно је мање инфламацијских а више регулаторних дендритских ћелија.....	72
4.3.1. Адоптивни трансфер дендритских ћелија	75
4.4. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом	77
4.5. Делеција гена за Gal-3 смањује број неутрофила у ткиву колона	79
4.6. Делеција гена за Gal-3 не мења заступљеност мастоцита, еозинофила и NK ћелија у ткиву колона мишева третираних DSS-ом.....	82
4.7. Примена <i>Davanat</i>-а значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом	85
4.7.1. <i>Davanat</i> значајно смањује концентрације IL-1 β и TNF- α у серуму.....	87
4.7.2. Примена <i>Davanat</i> -а смањује експресију NALP-а и IL-1 β	88
4.8. Фармаколошка инаktivација Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага у ткиву колона.....	88
4.8.1. Превентивна примена MSCs значајно смањује колитис мишева третираних DSS-ом	88
4.8.2. Фармаколошка инаktivација Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом	91
4.8.3 Примена MSCs значајно смањује инфилтрацију инфламаторних ћелија у ткиво колона мишева третираних DSS-ом	92
4.8.4. Фармаколошка инаktivација Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага	93
5. ДИСКУСИЈА	96
5.1. Делеција гена за Gal-3 редукује оштећење ткива колона у колитису изазваном DSS-ом	96
5.2. Делеција гена за Gal-3 смањује присуство M1 макрофага у ткиву колона у колитису изазваном DSS-ом.....	97
5.3. Делеција гена за Gal-3 смањују инфлукс инфламацијских ћелија у ткиву колона	101
5.4. Примена антагонисте Gal-3 је смањила оштећење ткива колона и инфламацију изазвану DSS-ом	103
5.5. Фармаколошка инаktivација Gal-3 у MSCs поспешила је алтернативну активацију макрофага у ткиву колона	104
6. ЗАКЉУЧАК	107
СКРАЋЕНИЦЕ	108
7. РЕФЕРЕНЦЕ	110

8. ПРИЛОГ	147
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	147
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION	151
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА	154
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	156
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS	159
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	163

1. УВОД

У уводном делу објашњене су етиологија и патогенеза инфламацијске болести црева у људи, описана имунопатогенеза експерименталног колитиса, приказани биолошки ефекти галектина 3, а посебно његов утицај на имунски одговор.

1.1. ИНФЛАМАЦИЈСКА БОЛЕСТ ЦРЕВА

1.1.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија

Инфламацијска болест црева је хронична болест непредвидивог тока, која се карактерише акутним фазама и фазама ремисије. Два главна клиничка ентитета ове болести су Улцерозни колитис и Кронова болест (1). Постоји и интермедијарни облик болести у који се убраја 10-15% оболелих, који се на темељу клиничких и дијагностичких критеријума, не могу са сигурношћу сврстати ни у улцерозни колитис нити у Кронову болест. Етиологија и патогенеза инфламацијске болести црева нису у потпуности разјашњене (Слика 1).



Слика 1. Етиолошки фактори у инфламацијској болести црева. Многобројни фактори утичу на развој инфламацијске болести црева, као што су фактори средине, генетска предиспозиција, коменсална микрофлора и имунски одговор.

Инфламацијску болест црева су први описали *Wilks* и *Moxon* 1875. године (2). Претпоставља се да је инфламацијска болест црева резултат неадекватног одговора имунског система домаћина на коменсалне бактерије у особа са генетском предиспозицијом (2-5). Генетски фактори играју важну улогу у патогенези инфламацијске болести црева. Око 5 до 10 % пацијената потврђује позитивну породичну анамнезу (6). Фактори средине, као и навике особа могу да утичу на развој инфламацијске болести црева. Иако је попис инкриминишућих фактора дуг (Табела 1), пушење је једини јасно доказани фактор средине који повећава ризик од појаве Кроне болести, а смањује ризик од настанка улцерозног колитиса (7). Велики значај се придаје и психосоцијалним факторима који могу допринети клиничком погоршању болести (Табела 1) (7).

Подаци из литературе (7-10) указују да коменсална бактеријска флора утиче на развој инфламацијске болести црева. Запаљенска болест црева се не развија када се животиње гаје под стерилним условима.

Преваленца улцерозног колитиса и Кроне болести у Северној Америци и Европи је 10-200 случајева на 100.000 становника. Највећа инциденца ове болести је у развијеним земљама и јасно је повезана са северном географском ширином, а релативно је ретка у Азији, Африци и Латинској Америци. Инциденца Кроне болести је порасла током последњих неколико деценија, док тренд за улцерозни колитис није јасно дефинисан. Претпоставља се да преко два милиона људи широм света болује од инфламацијске болести црева (11, 12). Болест се јавља између 15 и 35 године живота. Оба пола су подједнако погођена овом болешћу (13).

Табела 1. Фактори средине који су повезани са настанком и развојем инфламацијске болести црева.

Фактори	Епидемиолошка повезаност	Патофизиолошка повезаност
Пушење	<ul style="list-style-type: none"> • активно пушење: смањује ризик и повезано је са блажим клиничким током болести • бивши пушачи: повећан ризик од појаве улцерозног колитиса •• активно пушење: повећава ризик и повезано је са тежом клиничком сликом болести 	<p>Мења цитокински профил мукозе</p> <p>Мења бактерицидну активност и еикосаноидну каскаду</p> <p>Смањује секрецију интестиналног IgA. Утиче на стварање слободних кисеоничких радикала</p>
Апендектомија	<ul style="list-style-type: none"> • смањује ризик од појаве болести 	<p>Мења баланс између ефекторских и регулаторних фактора</p> <p>“Хигијенска теорија”. Виши економски статус је повезан са мањим излагањем паразитским инфестацијама током детињства.</p>
Социоекономски фактори	<p>◇ Високи економски статус повећава ризик за појаву инфламацијске болести црева.</p>	<p>Ово резултира смањеним Th2 имунским одговором и продукцијом регулаторних цитокина.</p>

◇ Инфламацијска болест црева

- Улцерозни колитис
- Кронова болест

1.1.2. Патогенеза

Патогенеза инфламацијске болести црева је мултифакторијална, а ток често непредвидив. У основи патогенезе улцерозног колитиса и Кронове болести је неадекватан и продужен имунски одговор на цревне микроорганизме, а тип имунског одговора одређује и манифестације болести. Код Кронове болести се, патохистолошки, уочавају грануломатозни инфилтрати у мукози, док се код улцерозног колитиса јављају неутрофилне инфилтрације са деструкцијом епитела.

У патогенези инфламацијске болести црева значајну улогу имају следеће ћелије: неутрофили, мастоцити, еозинофили, НКТ ћелије, НК ћелије, дендритске ћелије и макрофаги.

1.1.2.1. Неутрофили

Сматра се да је у основи аутоимунског механизма инфламацијске болести црева деструктивни инфламацијски одговор, који је директно усмерен на сопствене антигене муцина, пехарстих ћелија, епителних ћелија дебелог црева и других ћелија (14-17). Антитела усмерена против неутрофила су пронађена код већине пацијената оболелих од улцерозног колитиса (16, 18-20). Титар анти-неутрофилних антитела не корелира са активношћу болести (21) и њихов биолошки значај није још дефинисан у овом обољењу. *Hanai* и сарадници су показали да је у крви пацијената са улцерозним колитисом број неутрофила три пута већи у односу на онај у здравих особа (22). Запаљена мукоза у пацијената са улцерозним колитисом се карактерише продукцијом цитокина IL-8 и експресијом mRNA за IL-8 (23). Интерлеукин-8 није само хемоатрактант већ поспешује и ослобађање кисеоничких радикала из неутрофила. У инфилтратима мукозе дебелог црева код активне улцерозног колитиса доминирају неутрофили (24).

Основна хистолошка карактеристика лезија активне форме улцерозног колитиса је инфилтрација мукозе неутрофилима, која се такође налази и код активне форме Крнове болести, али у субмукози (25, 26). Измењени биохемизам утиче на прикупљање неутрофила на местима запаљења, па тако леукотријен B4 (енгл. *leukotriene B4*, LTB4) (27), фактор активације тромбоцита (енгл. *platelet-activating factor*, PAF) (28), продукт активације комплемента C5a (29), а нарочито IL-8 (30-32) поспешују миграцију неутрофила. Главни извор IL-8 (30-32), цитокина који је најважнији фактор миграције неутрофила, су активирани макрофаги (30-34).

Неутрофили представљају кључне инфламацијске ћелије у улцерозном колитису, па тако број неутрофила у ткиву дебелог црева корелира са активношћу болести (35). Повећана инфилтрација неутрофилима, се може детектовати у раним фазама улцерозног колитиса (36, 37).

1.1.2.2. Мастоцити и еозинофили

Мастоцити и еозинофили, присутни у мукози, играју важну улогу у патогенези улцерозног колитиса.

Током активне фазе инфламације мастоцити и еозинофили секретују бројне медијаторе, укључујући и триптазу. Број еозинофила и мастоцита позитивних на триптазу је значајно повећан у активној форми улцерозног колитиса (38, 39).

Еозинофили, резидентне ћелије у зиду дебелог црева, играју важну улогу у имунском одговору на хелминте (40). Помоћу бројних медијатора, активирани еозинофили могу да иницирају инфламацију у цревима. Велика концентрација медијатора пореклом из еозинофила, детектована је у фецесу (41) и течности добијене након перфузије дебелог црева (42) у пацијената са хроничним колитисом. Ово позитивно корелира са инфилтрацијом еозинофила у ткиву дебелог црева. CD98 је гликолипид, кога под нормалним физиолошким условима експримирају интестиналне епителне ћелије. Недавна студија (43) показала је да се CD98⁺ еозинофили могу детектовати у дебелом цреву како оболелих од инфламацијске болести црева, тако и у здравих особа. IFN- γ је главни регулатор експресије рецептора CD98 (44). Овако активирани еозинофили ослобађају запаљенске медијаторе и мењају функцију епителне баријере, што омогућује повећану апсорпцију макромолекулских антигена (43).

1.1.2.3. NKT и NK ћелије

Дендритске и епителне ћелије дебелог црева у склопу CD1d приказују антигене NKT ћелијама, које затим продукују IL-13 који узрокује оштећење епителне баријере и подстиче развој улцерација у цревима (46). Међутим, у периферној крви, као и у мукози дебелог црева оболелих од улцерозног колитиса број NKG2A⁺ Т лимфоцита је смањен (45).

Постоје опречни ставови и о улози и броју NK ћелија у пацијената са улцерозним колитисом (47, 48). Показано је да број NK ћелија са цитотоксичном активношћу је значајно повећан у ламини проприји дебелог црева оболелих од улцерозног колитиса (47). Међутим, NK ћелије периферне

крви пацијената са улцерозним колитисом показују дефицијентне функције укључујући смањену цитотоксичност (49).

1.1.2.4. Дендритске ћелије

Примарна функција интестиналних дендритских ћелија је транспорт антигена у секундарно лимфно ткиво (мезентеричне лимфне чворове) и Пајерове плоче и на тај начин се генерише Т лимфоцитни имунски одговор специфичан за антигене у гастроинтестиналном тракту. Дендритске ћелије из ламине проприје гастроинтестиналног тракта, транспортују антигене интестиналних бактерија у мезентеричне лимфне чворове (50, 51) чиме се изазива толеранција на антигене из хране (52). Интестиналне дендритске ћелије остварују динамичку равнотежу активног одговора на патогене и толеранције на коменсалне бактерије (53). Код оболелих од улцерозног колитиса регистроване су промене у функционалном статусу и броју дендритских ћелија (53, 54). Дендритске ћелије се сматрају кључним у иницијацији, одржавању и контроли запаљења у овим болестима (55). Показано је да су TLR-2 и TLR-4, као и маркер сазревања- CD40, појачано експримирани на интестиналним дендритским ћелијама пацијената са Кроновом болешћу (53). У мукози оболелих од инфламацијске болести црева повећан је и број MDC8+ моноцита који продукују TNF- α , а који могу да буду прекурсори популације дендритских ћелија. Примена антитела специфичних за TNF- α у терапији оболелих од Кронове болести редукује активацију дендритских ћелија (56, 57). Дендритске ћелије сазревају *in situ*, а регистрован је повећан број ових ћелија (CD86+CD40+) како у ламини проприји тако и у периферној оболелих од инфламацијске болести црева. Дендритске ћелије изоловане из периферне крви пацијената са инфламацијском болести црева показују повећану способност да стимулишу имунски одговор (58-60). Ова ћелијска популација, као и њени прекурсори, сензитивна је на активацију проинфламацијским сигнаlima, што може указати на перзистентну активацију Т лимфоцита у ткиву што све заједно одржава инфламацију. Функционално стање дендритских ћелија одлучујуће одређује активацијски статус Т лимфоцита као и смер следственог имунског

одговора у правцу активације или толеранције антигена коменсалних бактерија (61, 62).

1.1.2.5. Макрофаги

Ткивни макрофаги, обично не мигрирају у лимфно ткиво, али учествују у ефекторској фази имунског одговора приказујући обрађени антиген ефекторским Т лимфоцитима у ламини проприји (63, 64). Интестинални макрофаги и дендритске ћелије исказују молекуле II класе МНС, CD11c и CD11b. Осим CXCR1 који исказују сви макрофаги, ове ћелије у гастроинтестиналном тракту експримирају још и F4/80, CD68 и CD64 (65).

Активирани макрофаги продукују инфламацијске цитокине (TNF- α и IL-1 β) и слободне кисеоничке радикале (66, 67) и на тај начин учествују у патогенези улцерозног колитиса (68). Инхибиторни фактор миграције макрофага (енгл. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF) је прво описан као продукт активираних Т лимфоцита, који инхибира перитонеалне макрофаге *in vitro* и поспешује акумулацију макрофага *in vivo* (69, 70). Показано је да су сами макрофаги извор овог инхибиторног фактора (71). Проинфламацијски цитокини пореклом из макрофага оштећују мукозу дебелог црева, а за акумулацију макрофага у ткиву одговоран је инхибицијски фактор миграције макрофага (72), чија је концентрација повећана у ткиву и серуму оболелих од улцерозног колитиса (73).

У прилог повећане проинфламацијске улоге M1 макрофага потврђено је и присуство активисаног NF- κ B у макрофагима и епителним ћелијама у запаљеној мукози у пацијената са инфламацијском болести црева (74). NF- κ B је транскрипциони фактор који има важну улогу у регулацији проинфламацијских цитокина у запаљенској болести црева (75).

1.1.3. Клиничка слика

Инфламацијски процес код улцерозног колитиса је ограничен на дебело црево, док се промене код Кронево болести могу уочити дуж целог гастроинтестиналног тракта. У улцерозном колитису болест најчешће захвата читаву дужину дебелог црева (*pancolitis*), а ређе је сегменталног карактера

(*proctitis, proctosigmoiditis*). Клинички симптоми улцерозног колитиса су тешка дијареја, ректално крварење и следствени губитак крви, тенезми и грчеви у абдомену, а прогресивни губитак перисталтике, води у такозвано ригидно дебело црево. У налазу оболелих врло чест је налаз крваво-слузавих дијареја. Интезитет абдоминалног бола је углавном сразмеран степену болести, а и тежина осталих симптома корелира са екстензивношћу болести.

Болест је често удружена са реуматоидним артритисом, спондилитисом, нодозним еритемом, нодозном пиодермијом и склерозирајућим холангитисом. Код дужег трајања болести (честе егзацербације) битно се ремети опште стање болесника, јавља се анемија, хипопротеинемија, мршављење, хиповитаминоза и хидроелектролитски дисбаланс.

Као компликације улцерозног колитиса настају токсични мегаколон, перфорације, крварења и стриктуре дебелог црева. Након десет година од појаве првих знакова болести расте ризик од појаве карцинома (1, 76, 77).

1.1.4. Дијагноза

До данас није пронађен тачан патогномични дијагностички тест за потврду улцерозног колитиса или Кронове болести. Дијагноза улцерозног колитиса се темељи на анамнестичким подацима, клиничкој слици, ендоскопском налазу, биопсији слузнице и радиолошком прегледу са лабораторијским налазима. У диференцијалној дијагнози је најважније да се разликује улцерозни колитис од Кронове болести. Разлике постоје у клиничкој слици, ендоскопском налазу, налазу биопсије и радиолошком прегледу црева.

У лабораторијским налазима у активној фази инфламацијске болести црева карактеристична је убрзана седиментација еритроцита, повишене вредности С-реактивног протеина, као и повишене вредности фибриногена, хипоалбуминемија и повишени јетрини ензими, који могу бити последица токсемије или сепсе (78). У хематолошким налазима се потврђује анемија, леукоцитоза и тромбоцитоза. Неопходна је детаљна микробиолошка анализа фецеса, којом је потребно искључити суперинфекцију у колону. Ендоскопски прегледи су најважнији дијагностички поступци за постављање дијагнозе и процену проширености болести у пацијената са улцерозним колитисом

(проктосигмоидоскопија и колоноскопија) и Кроновом болешћу (колоноскопија са терминалном илеоскопијом, езофагогастродуоденоскопија и ентроскопија). Слuzница колона је нормално влажна и сјајна, са јасним васкуларним цртежом. Најраније промене слuzнице колона које се дијагностикују ендоскопски у улцерозном колитису јесу хиперемеја, едем и губитак васкуларног цртежа, затим гранулираност, фријабилност и крварење слuzнице, а у узнапредовалој болести могу се уочити улцерације, псеудополипи и стриктуре. Како еритематозна мукоза колона се карактерише фрагилношћу, она тежи да крвари и при најмањој стимулацији. Када је фрагилност значајна може се јавити спонтано крварење, без контакта (79). Површина слuzнице показује неравномерност и неправилност, а степен ткивне грануларности варира у смислу финоће или грубости (80, 81, 82). Слuzница између улкуса је увек запаљенски измењена. У фази ремисије слuzница је равна и бледа. Псеудополипи су одраз процеса зацељења ранијих запаљенских промена са хипетрофијом преосталих делова слuzнице. У Кроновој болести ректум је захваћен тек у 50% пацијената тако да степен болести се процењује и тоталном колоноскопијом и илеоскопијом. Ендоскопске промене у Кроновој болести су по правилу дисконтинуиране (*skip lesions*). Карактеристична је оштра граница између запаљенски измењене и нормалне слuzнице.

У тешким облицима болести важно је урадити нативни снимак абдомена којим се искључује или потврђује токсични мегаколон, илеус или перфорација црева. Иригографија је корисна за процену проширености болести у колону, као и откривање компликација попут стриктура и карцинома. Промене у улцерозном колитису су ограничене на слuzницу дебелог црева, док су у Кроновој болести трансмуралне. Свакако, најранија лезија у инфламацијској болести црева је запаљење крипти и формирање криптог абцеса. Стварање апцеса прелази у мале површинске улцерације које заузимају целу дебљину слuzнице. У мишићном слоју нити поступно хипертрофирају што доводи до скраћења црева, а због ожиљних промена често настају стриктуре. Лезија је слична и код улцерозног колитиса и код Кронове болести, али је код Кронове болести више фокалног карактера. Оток запаљеног ткива уз дубоке фисуре и улцерације, даје слuzници калдрмаст изглед. Слuzница око улкуса код

улцерозног колитиса је увек промењена за разлику код Кронове болести где је улкус окружен нормалном слузницом. У 50-60% пацијената са Кроновом болешћу формирају се грануломи. Накупљају се макрофаги и друге запаљенске ћелије и формирају се грануломи без казеозне некрозе који садрже епителоидне и мултинуклеарне циновске ћелије (78). Грануломи могу бити у свим слојевима цревног зида, од слузнице до серозе, а макроскопски се могу видети као милијарни чворићи (5). Поред цревног зида грануломи могу постојати и у лимфним чворовима, мезентеријуму, перитонеуму и јетри. Грануломи су присутни код 50-60% болесника (5).

Колитиси друге етиологије, као што су инфективни колитиси, исхемични колитис и радијациони колитис могу да отежају дефинитивну дијагнозу улцерозног колитиса. Амебна дизентерија може да створи дијагностичке потешкоће исто као ентероколитис узрокован хеликобактером, који у појединим случајевима може да опонаша и улцерозни колитис и Кронову болест. Сличну клиничку слику може да да и псеудомембранозни колитис узрокован са *Clostridium difficile*. Једна од карактеристика инфективног колитиса је дијареја, често праћена крварењем (80, 83). Проспективна студија (84) је показала да трећина пацијената са крвавом дијарејом и почетном сумњом на улцерозни колитис има инфективни колитис. Дијагноза може бити додатно комплексна, због чињенице да пацијенти који имају инфламацијску болест црева могу да имају и инфекцију. За разлику од пацијената који пате од инфламацијске болести црева, пацијенти са инфективним колитисом се спонтано и веома често брзо сами опораве. Зато је неопходно у акутној фази пратити клинички прогрес. У случају оштећења мукозе, ректум остаје интактан, док су улцерације прекривене жутим ексудатом, што је индикација за озбиљније праћење болести. Биопсијом је могуће искључити инфективни колитис на основу хроничних промена, као што су нарушена морфологија крипти, атрофија крипти и базални лимфоидни агрегати, које се јављају код улцерозног колитиса и Кронове болести. Такође, инфективни колитис је могуће дијагностиковати ако су уочљиве псеудомембране, вирусне инклузије и трофозоити амеба. Тест засејавања култура користећи ткиво узето на биопсији је много валиднији од микробиолошког теста фецеса у откривању патогена. У терапији улцерозног

колитиса би требало имати у виду суперинфекцију цитомегаловирусом, јер је могуће да не успе терапија или се основна болест погорша. Коришћењем стероида и имуносупресивне терапије у улцерозном колитису, ствара се идеална средина за инфекцију и настањење цитомегаловируса. Цитомегаловирус се у великом проценту може детектовати у рекуретном улцерозном колитису, који не реагује добро на терапију. У неким случајевима клинички ток и погоршање улцерозном колитиса се може унапредити третирањем са антивиралним агенсом ганцикловиром (85-87).

Ишемични колитис се јавља најчешће код старијих пацијената и удружен је са срчаним болестима или васкуларном склерозом. Већина пацијената са ишемичним колитисом пати од изненадног абдоминалног бола и крвавих столица. Колоноскопијом се уочава едем мукозе и еритем, док ректум остаје интактан. Овај тип колитиса најчешће захвата ректосигмоидалну везу или спленичну флексуру, што може да доведе до инсуфицијентног снабдевања крвљу. Лезије се протежу дуж целог лумена и заузимају само фокалне сегменте, док су остали делови прекривени нормалном слузницом. Лезије мукозе су сличне улцерозном колитису, али на основу клиничке прогресије се може поставити диференцијална дијагноза (80, 83).

Када су пацијенти подвргнути поновљеном излагању радијацијског зрачења приликом третмана код карцинома простате или цервикса, а имају крваве дијареје, требало би посумњати на радијацијски колитис. У овом случају предилекциона места промена су проксимални ректум и дистални сигмоидни колон. Да би се диференцијално дијагностички разликовали радијацијски колитис од улцерозног колитиса потребно је обратити пажњу на карактеристичне промене мукозе код улцерозног колитиса (80, 83).

1.1.5. Терапија

Лечење улцерозног колитиса примарно је конзервативно и у већини болесника даје добре резултате. Прва терапија у лечењу улцерозног колитиса код блажих и средње активних форми је сулфасалазин и друга једињења аминсалицилата. Аминсалицилати (месалазин 5-ASA-а) представљају активне супстанце које делују анти-инфламацијски, тако што инхибирају продукцију

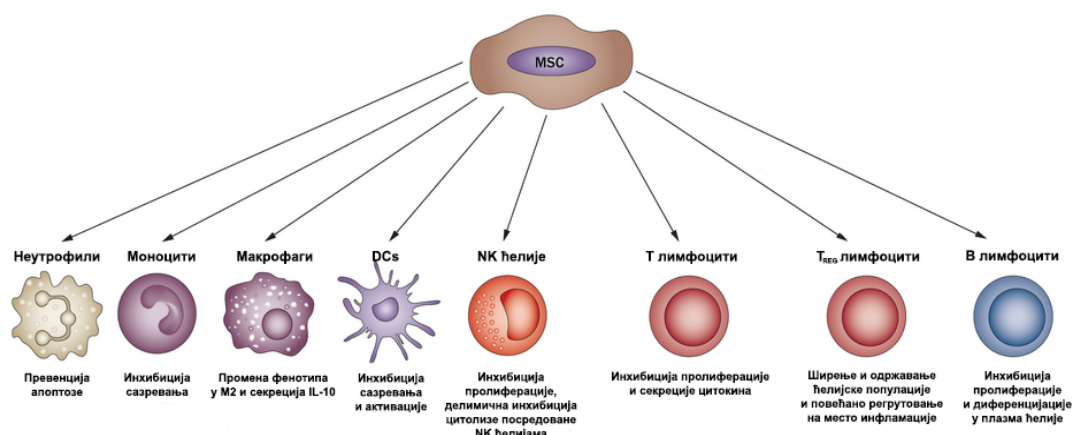
про-инфламацијских цитокина и других медијатора запаљења. Недавно је откривено да ови лекови делују преко појачане експресије PPA рецептора (енгл. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*, PPA) на епителним ћелијама дебелог црева (88).

Упркос, бројним студијама антибиотици немају улогу у лечењу активне и мирне фазе улцерозног колитиса. Поред наведених лекова користе се и кортикостероиди, азатриоприн, интравенски циклоспорин и на крају колектомија. Скоро половина пацијената са екстензивним хроничним улцерозним колитисом се лечи хирушки у првих десет година болести (89). Процена квалитета живота пацијената са улцерозним колитисом или Кроновом болешћу игра значајну улогу у лечењу.

1.1.5.1. Биолошка терапија улцерозног колитиса

Терапија матичним ћелијама завређује све више пажње како у наследним, аутоимунским болестима, тако и у инфламацијској болести црева. Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells* - MSCs) су адултне, мултипотентне ћелије, које се могу наћи у скоро сваком постнаталном ткиву (90, 91). MSCs могу да мењају имунски одговор, регулишу пролиферацију, активацију и ефекторске функције Т лимфоцита. Своје дејство могу да остварују било директним контактом са ћелијама које презентују антигене (енгл. *antigen presenting cells*, APCs) као и са NK ћелијама било помоћу солубилних фактора (Слика 2) (92). Показано је да MSCs значајно ублажавају клинички ток и смањују хистопатолошке промене у експерименталном колитису (93-99). Вероватни механизам који лежи у основи имуносупресивног ефекта ових ћелија је велика продукција анти-инфламацијског цитокина TGF- β (100). Група аутора (101) је показала да MSCs секретују и галектин 3 (енгл. *Galectin-3*, Gal-3), а да MSCs код којих је овај молекул генском делецијом "укинут" имају редуковане имуносупресивне ефекте. Liu и сарадници (102) су потврдили да MSCs експримирају и секретују молекул галектина 3 и да се експресија овог молекула није значајно мењала током пресејавања ћелија. Експресија Gal-3 позитивно корелира са имуносупресивним функцијама MSCs (102). Требало би

напоменути да је примена матичних ћелија у терапији многих болести још увек у експерименталној фази.



Слика 2. Имуносупресивни ефекти MSCs на различите ћелијске популације. MSCs имају имуносупресивно дејство на ћелије урођене и стечене имуности. Своје имуносупресивно дејство мезенхималне матичне ћелије испољавају инхибицијом пролиферације као и сазревавања у функционалне имунске ћелије. (кориговано према: Tyndall A. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10:117-24).

1.2. DSS КОЛИТИС: МОДЕЛ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА

Да би се боље истражили различити етиолошки фактори инфламацијске болести црева, последњих неколико деценија развијен је велики број експерименталног модела колитиса. Ти модели су обезбедили велики број информација зависно од њихове сличности са биолошким системом и клиничким карактеристикама инфламацијске болести црева у људи.

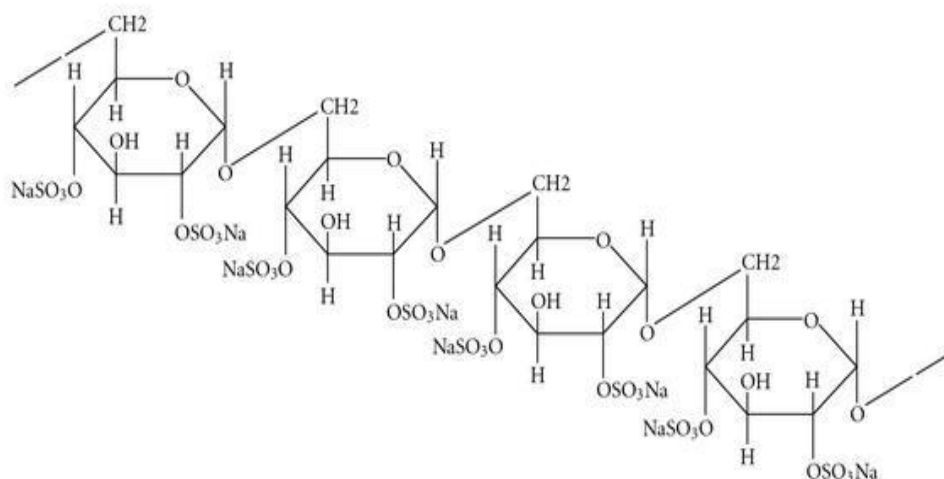
У ширем смислу експериментални модели колитиса се могу поделити на спонтано настали колитис, индуковани колитис, моделе настале генском манипулацијом и оне настале адоптивним трансфером (103-105). Најчешће коришћени експериментални модели колитиса су они у којима се инфламација изазива хемијски, јер се болест лако индукује, а почетка, трајања и средње тешка инфламација која се развија погодну једноставној контроли процеса. У ове моделе колитиса спадају колитиси индуковани: декстран натријум сулфатом (енгл. *dextran sulphate sodium*, DSS), тринитробензен сулфонском киселином (енгл. *2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid*, TNBS), динитробензен сулфонском

киселином (енгл. *dinitrobenzene sulfonic acid*, DNBS), оксазолоном, сирћетном киселином, карагинаном и јодоацетамидом (106).

1.2.1. Опште карактеристике декстран натријум сулфата

Декстран је комплексни полимер синтетизован из сахарозе одређених бактерија, најчешће *Leuconostoc spp* и *Streptococcus spp* (107). Декстран натријум сулфат је полианјонски дериват декстрана, добијен естерификацијом са хлорсумпорном киселином, различите молекулске тежине, од 5 kDa до 1400 kDa (Слика 3). Садржај сумпора је приближно 17% молекулске масе, сконцентрисан у две сулфатне групе по глукозним резидуама у молекулу декстрана. На собној температури је у облику белог пудера, који је лако растворљив у води (100mg/ml).

Први експериментални колитиси индуковани су различитим екстрактима добијеним из морске алги. Ови екстракти растворени у пијаћој води узроковали су колитисе мишева, пацова и кунића (108). Поменути екстракти садрже карагинан- сулфатисан полисахарид велике молекулске масе. Ово откриће снажно је утицало на развоја других модела акутног колитиса изазваних деградираним карагинаном (109). *Okayasu* и сарадници су 1985. године први пут индуковали колитис хрчака DSS-ом (110). Овај модел је модификован за коришћење у мишева (111), а такође је развијен и хронични модел у хрчака (112). Експериментални модел акутног колитиса изазваног DSS-ом је данас један од најчешће коришћених модела за изазивање болести у мишева, пацова, хрчака и гвинејских прасића.



Слика 3. Хемијска структура декстран натријум сулфата. Декстран натријум сулфат је полианјонски дериват декстрана, добијен естерификацијом са хлорсумпорном киселином, различите молекулске тежине.

Мале количине DSS-а могу се наћи у макрофагима дебелог црева и мезентеричним лимфним чворовима, као и Купферовим ћелијама јетре, првог дана након администрације. У Купферовим ћелијама DSS се детектује и 8 дана после последње администрације DSS-а, док га нема у ткиву мозга, тимуса, плућа и срца. DSS се излучује урином и фецесом (113).

1.2.2. Индукција колитиса

Молекулска тежина DSS-а је битан фактор у индукцији колитиса (114), као и моделу карциногенезе (115). Тежина колитиса и канцерогенетског потенцијала DSS-а корелира са његовом молекулском масом. У зависности од концентрације раствора DSS-а, дужине и учесталости администрације DSS-а, животиње могу да развију акутни или хронични колитис (111).

Акутни колитис се индукује администрацијом 2-5% раствора DSS-а у пијаћој води, *ad libitum*, током 7 дана (111, 116-118). Хронични колитис се може развити константном индукцијом ниским концентрацијама DSS-а (1-2%) у раствору током дужих временским интервала (111, 112, 119-121).

1.2.3. Клинички ток и хистолошке промене у колитису изазваном DSS-ом

Клиничке и хистопатолошке карактеристике овог колитиса наликују онима код оболелих од улцерозног колитиса. Клиничке манифестације у акутној фази колитиса изазваног DSS-ом су губитак телесне масе, дијареја, окултно крварење у столицама, пилоерекција, анемија и евентуална смрт (122). Типичне хистолошке промене су деплација муцина, дегенерација епитела и некроза која прогредира у нестанак епителних ћелија. Касније, се јавља инфилтрација ламине проприје и субмукозе неутрофилима- криптитис и сам апсес крипти (123).

1.2.4. Патогенеза колитиса изазваног DSS-ом

Тачан механизам како DSS иницира колитис није познат. Један од могућих механизма је повећање пропустљивости мукозе дебелог црева, што омогућава пропуштање великих молекула као што је молекул DSS. Почетне промене су уочљиве након првог дана третмана DSS-ом и очитују се губитком једне компоненте чврсте везе *zonulae occludens-1* и повећањем експресије проинфламацијских цитокина (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ и IL-12) у ткиву дебелог црева (124-128). Ови подаци подржавају теорију о повећаној пропустљивости у раној фази патогенезе колитиса изазваног DSS-ом.

Други могући механизам је директно токсично дејство DSS-а на мукозу колона, што мења интегрин- $\alpha 4$ и M290 субјединицу на епителним ћелијама, прекидајући њихову интеракцију са $\gamma\delta$ -интраепителним Т лимфоцитима (129). Улога $\gamma\delta$ -интраепителних Т лимфоцита у патогенези колитиса није позната. Сматра се да учествују у очувању мукозе и зарастању након излагања различитим штетним ноксима, као што је DSS (130).

Улога луменских бактерија у патогенези колитиса изазваног DSS-ом је нејасна. Примена метронидазола и ципрофлоксацина смањује тежину акутног експерименталног колитиса, док не утиче на ток хроничног обољења у мишева (131). У *germ-free* условима, мишеви развијају веома тежак DSS колитис (132), који се може ублажити применом антигена нормалне интестиналне флоре (133).

CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити, такође немају кључну улогу у индукцији акутног колитиса. Број CD8⁺ Т лимфоцита је смањен, док CD4⁺ Т лимфоцита остаје непромењен у акутном DSS колитису у BALB/c и C57BL/6 мишева (134). Колитис изазван DSS-ом се може развити у SCID, CD4⁺ дефицијентних, NK-дефицијентних и атимичних CD-1 *nude* мишева, имплицирајући да ове ћелије немају кључну улогу у индукцији колитиса DSS-ом (135, 136).

Тачан механизам индукције колитиса DSS-ом није познат, али чињеница да губитак крипти и повећана пропустљивост обично претходе инфламацији, указују да се иницијалне промене одигравају на нивоу епителних ћелија, а инфламација се развија као секундарна реакција (122).

1.2.4.1. Улога ћелија урођене имуности у патогенези колитиса изазваног DSS-ом

Ћелије урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, еозинофили, неутрофили, NK и NKT ћелије) учествују у експерименталном акутном колитису изазваном DSS-ом (Слика 4) (137).

Новија истраживања указују да макрофаги играју важну улогу у индукцији акутног колитиса изазваног DSS-ом (138). Макрофаги преузимају DSS што активира NLRP3 инфламазом (енгл. *NOD-like receptor- NLR family, pyrin domain containing 3*) и тако повећавају продукцију инфламацијских цитокина IL-1 β и IL-18. Каспаза-1 регулише секрецију биолошки активних IL-1 β и IL-18, за које је показано да имају улогу централних медијатора у колитису изазваном DSS-ом (139). Показано је да DSS индукује ослобађање IL-1 β из мишијих макрофага (140). Активација инфлазома је повезана са стварањем слободних радикала кисеоника (енгл. *reactive oxygen species, ROSs*) у одговору на различите стимулусе (141, 142), а DSS стимулише макрофаге да продукују слободне радикале кисеоника (143). Појачана експресија индуцибилне азот моноксид синтетазе (енгл. *inducible nitric oxide synthase, iNOS*) у макрофагама повећава продукцију азот монооксида (енгл. *nitrogen oxide, NO*) и погоршава колитис изазван DSS-ом (144).

Инвазија интестиналних бактерија у субепително ткиво је последица токсичних ефеката DSS-а на епителне ћелије дебелог црева. Бактерије, које су

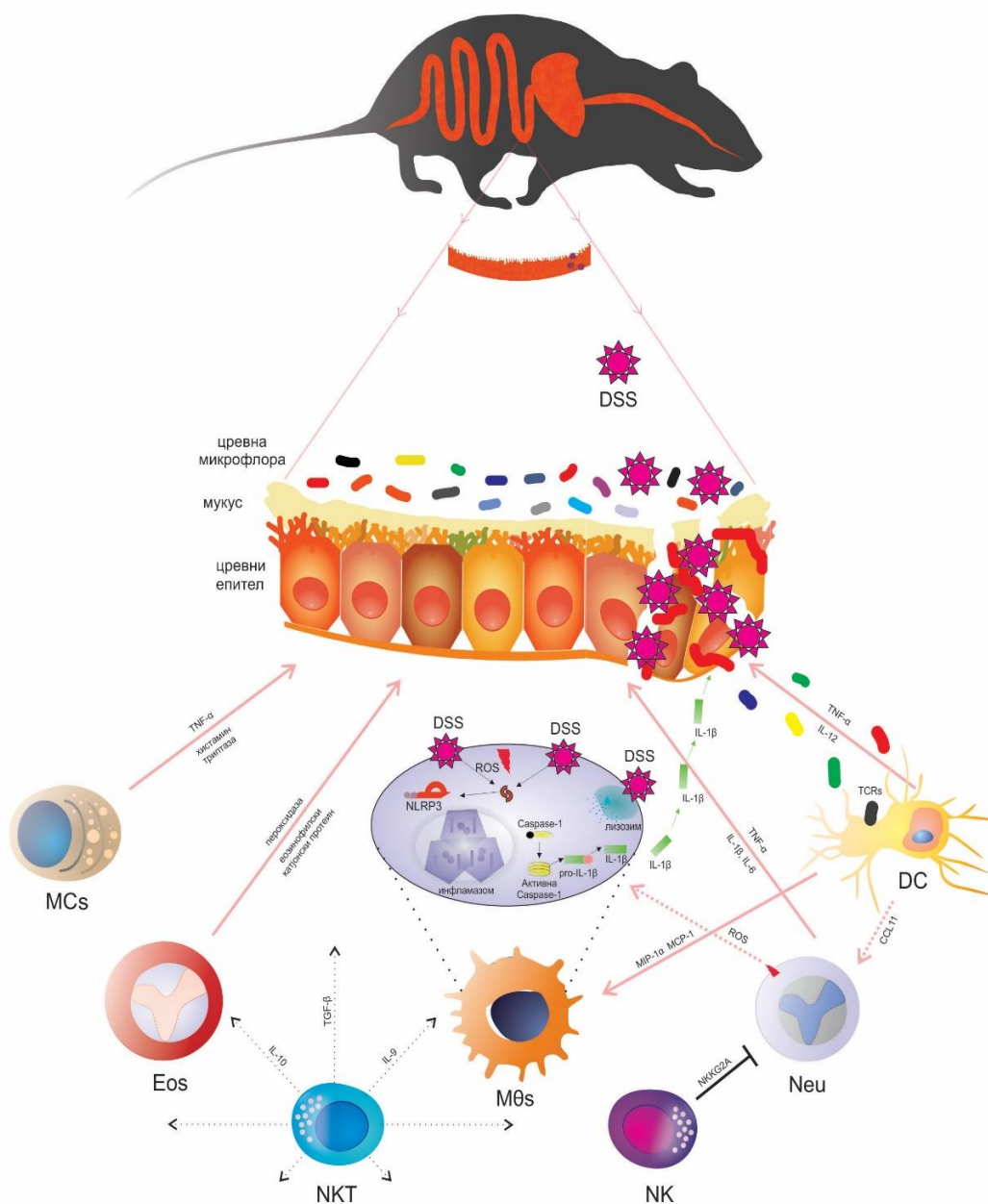
прошле оштећени епител, везују се за *Toll-like* рецепторе (TLRs) и тако активирају дендритске ћелије које потом ослобађају проинфламацијске цитокине (TNF- α , IL-12) и хемокине (енгл. *macrophage inflammatory protein*, MIP-1 α ; *monocyte chemotactic protein*, MCP-1; *keratinocyte-derived chemokine*, CXCL1/KC; CCL11), што индукује миграцију неутрофила, макрофага и еозинофила у ткиво дебелог црева (145-148). Неутрофили играју важну улогу у фагоцитози интестиналних бактерија које су прошле кроз оштећен епител дебелог црева (148). Активирани неутрофили представљају велики извор инфламацијских цитокина (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и кисеоничких радикала, који доприносе инфламацији и следственом оштећењу дебелог црева (149).

Студије *in vitro* и *in vivo* су показале да NK ћелије имају протективну улогу у колитису изазваном DSS-ом (150). NK ћелије смањују проинфламацијску улогу неутрофила, укључујући производњу кисеоничких радикала и продукцију цитокина, директним контактом ћелија-ћелија преко инхибиторног рецептора NKG2A (150).

На месту инфламације узроковане DSS-ом повећан је број мастоцита, као и количина протеаза (151). Мастоцити продукују инфламацијске медијаторе и цитокине, као што су TNF- α , хистамин и триптазе, који повећавају инфлукс неутрофила и других инфламацијских ћелија у ткиво дебелог црева (152).

Миграција еозинофила и њихови запаљенски медијатори, као што су еозинофилне пероксидазе и еозинофилни катјонски протеини, играју важну улогу у патогенези колитиса (153, 154).

Истовремена администрација DSS-а и активатора NKT ћелија α -галактоцерамида (α -GalCer) ублажава клинички ток и смањује оштећење ткива дебелог црева (155). Активирани NKT ћелије представљају потентни извор анти-инфламацијских цитокина (IL-10 и TGF- β). Показано је и да адоптивни трансфер активираних α -GalCer-ом NKT ћелија смањује тежину колитиса (155, 156).



Слика 4. Патогенеза колитиса изазваног применом декстран натријум сулфата. Декстран натријум сулфат цепа компоненте чврсте везе између епителних ћелија и на тај начин омогућава пролазак бактерија из лумена црева у ткиво дебелог црева. Различите ћелије урођене имуности реагују на присуство бактерија и продукују проинфламацијске цитокине и медијаторе, који оштећују ламину проприју. Макрофаги могу да фагоцитију декстран натријум сулфат и активирају инфламазом и продукцију IL-1β. NK и NKT ћелије имају протективну улогу у патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

1.2.4.2. Улога цитокина у патогенези колитиса изазваног DSS-ом

Примењене дозе DSS-а позитивно корелирају са експресијом IL-1 β , IL-12 и TNF- α и степеном инфламације (157). Повећана концентрација проинфламацијских цитокина IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF- α је запажена и у активној форми инфламацијске болести црева људи, што корелира са тежином инфламације (158-160). У колитису изазваном DSS-ом повећана је и експресија IFN- γ и IL-4 у запаљеном ткиву (161).

1.3. ГАЛЕКТИН 3

Главни циљ овог истраживања је испитивање улоге и значаја Gal-3 у патогенези акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом. Зато уводни део садржи и детаљна објашњења структуре, експресије, биолошких ефеката Gal-3 и опис његовог улоге у регулацији имунског одговора.

1.3.1. Класификација и структура галектинских молекула

Галектини су први пут изоловани 1976. године из мишића кокошке и ткива срца и плућа телета (162). За неколико протеинских фамилија које се везују за: глукане (лектине), укључујући С тип лектина (селектини, DC-SIGN, дектини и протеини који везују серумску манозу) (163-167), S тип лектина (галектини) (168-172) и сиглеке (173), је показано да учествују у различитим имунским функцијама. Ово се углавном односи на прву линију одбране против патогена, миграцију и диференцијацију ћелија, као и имунску регулацију. Присуство ових протеина од најједноставнијих облика живота па до људи, као и њихова експанзија током еволуције, сугерише на битне физиолошке улоге ове молекуларне фамилије у основним ћелијским функцијама (174).

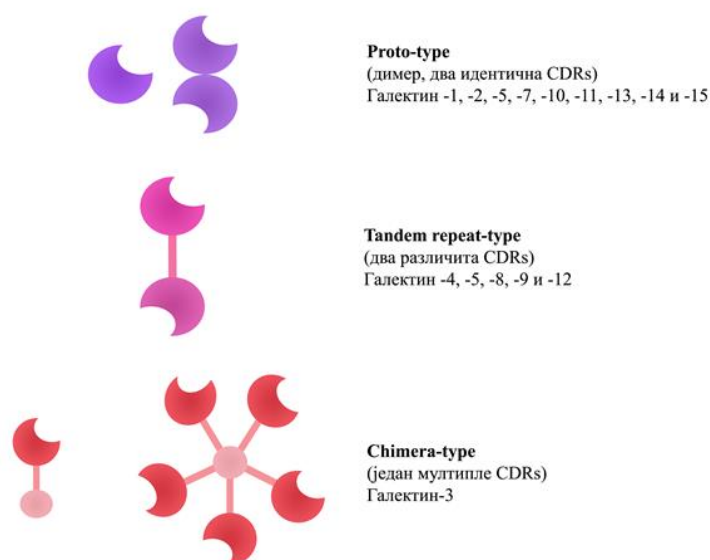
Галектинску фамилију чини 15 чланова (означених бројевима од 1 до 15), које карактеришу две кључне заједничке особине: способност да се везују за аминокиселинске јединице гликана и конзервирана структура домена којим препознају угљене хидрате (енгл. *carbohydrate recognition domains*, CRDs). У састав ових домена улази око 130 аминокиселинских остатака (175, 176), а кристалографија ових домена је показала високо конзервиране сендвич навоје,

које образују две антипаралелно постављене β набране плоче- једна плоча набрана је 5 пута, а друга 6 пута. Шестоструко набрана β плоча је место за везивање шећера (177-181).

Чланови фамилије галектина су подељени у три групе:

- Прототип (енгл. *Prototype*)
- Тандемско поновљени тип (енгл. *Tandem repeat type*)
- Химера тип (енгл. *Chimera type*) (182-184) (Слика 5).

Групи прототип галектина (Gal- 1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15) припадају нековалентно повезани хомодимери који садрже два домена за препознавање угљених хидрата. Галектини из групе тандемско поновљених (Gal- 4, -6, -8, -9, -12) поседују два различита домена за препознавање угљених хидрата спојених кратким пептидом, док трећој групи химера припада само галектин 3. Овај молекул поседује само један нелектински домен за препознавање угљених хидрата (који је богат пролином, глицином и тирозином) лоциран на N терминусу (174, 185).



Слика 5. Структура и класификација галектина. На основу структуре, као и броја и организације CRD региона, сви галектини су класификовани у три подгрупе: 1) *proto-* тип галектина: садрже по један CRD регион који може да димеризује, 2) *tandem-repeat-* тип галектина: садрже по два идентична међусобно удаљена CRD региона, 3) *chimeric-* тип галектина: ту спада само Gal-3 кога карактерише присуство не-лектинског сегмента спојеног са једним CRD регионом.

1.3.2. Експресија и функција галектина

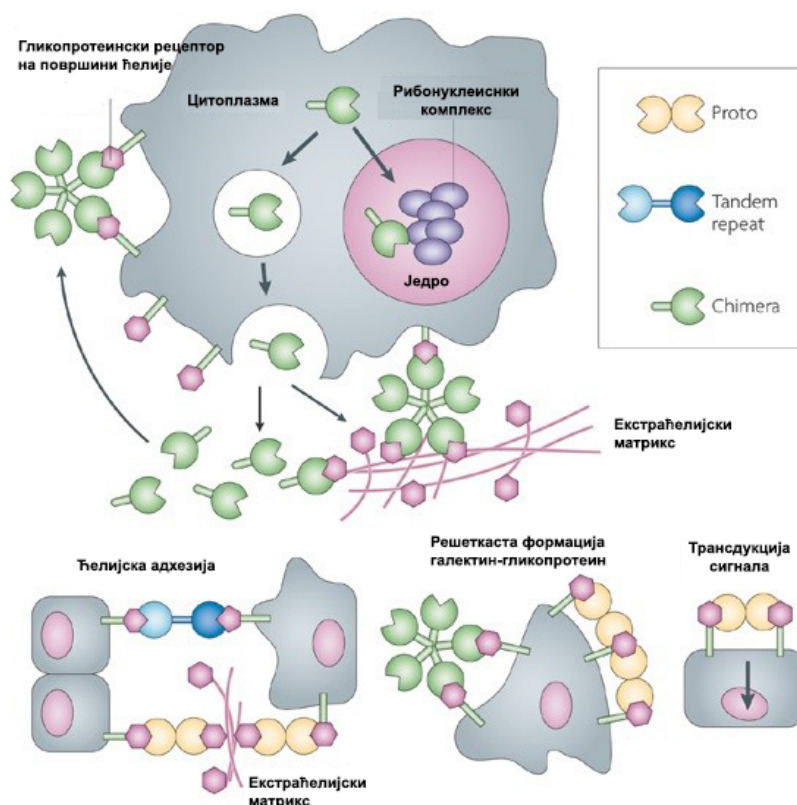
Неки галектини експримирани су у свим типовима ћелија и ткива док су други присутни само у појединим органима или ћелијама, при чему сваки члан фамилије галектина има јединствени образац дистрибуције. Тако су на пример галектин 1 и галектин 3 експримирани убиквитарно, док су други чланови галектинске фамилије углавном ткивно ограничени- галектин 2 само на дигестивни епител (186), а галектин 7 на епидермис (187).

Галектини су присутни и у већини ћелија урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, NK ћелије, $\gamma\delta$ T лимфоцити и B-1 лимфоцити), као и у ћелијама које припадају стеченој имуности (активирани B и T лимфоцити) (183, 188).

Галектини су присутни и у различитим ћелијским одељцима: једро, цитоплазма, ћелијска мембрана (везани за гликокоњугате). Солубилни облици галектина присутни су и у ткивним течностима (182).

Сви галектини имају афинитет према галактози, док су неки специфични и за различите олигосахариде повезане са галактозом (189, 190). Везујуће место галектинских молекула се прилагођава структури олигосахарида за које се везују (182, 189, 191). Галектини су способни да препознају различите комплексне структуре угљених хидрата, настале процесом елонгације. Мада галектини углавном повезују два гликопротеина, понекад групишу и велики број молекула формирајући мултивалентне гликокоњугате у форми решетке (Слика 6) (182). Тако галектини реагују са бројним гликоконјугатима на површини ћелија, укључујући и трансмембранске протеине, унакрсно их повезују и тако могу започети каскаду сигналних догађаја у различитим процесима (ћелијска пролиферација и диференцијација и продукција цитокина). Молекули галектина, иницијално повезани међусобно преко гликана у хомо- и хетеро- димере, играју важну улогу у ћелијској диференцијацији и организацији ткива. Ови молекули су важни и у регулацији имунске хомеостазе (176, 185). За функцију галектина важни су ензими гликозилтрансферазе, који се активирају у различитим фазама диференцијације и ћелијске активације (192), па тако појачана активност ових ензима повећава експресију гликокоњугата на

ћелијској мембрани што за последицу има везивање галектина за ове молекуле (183). Функција екстрацелуларног галектина такође директно зависи од активности гликозилтрансферазе (193). Насупрот томе функција интрацелуларних галектина не зависи од повезивања са угљеним хидратима јер се овај молекул директно везује за различите протеинске лиганде и регулише сигналне путеве важне за бројне ћелијске процесе (193). Недавно је показано да галектини, могу да се вежу за гликане на површини хелмината и на тај начин омогуће ефекторске функције урођене имуности (194). Гликани који садрже N-ацетиллактоаминске и полилактоаминске ланце $[(Gal\beta 1, 4GlcNAc)_n]$ (као што су ламинин, фибронектин, мембрански протеини лизозома и муцини) исказују повећан афинитет за хумане галектине, као и галектине птица и амфибије (179, 195-200). Биолошка функција одређених галектина може варирати од места до места, у зависности од расположивости погодних лиганата. Биолошке функције галектина у екстрацелуларној средини, у присуству кисеоника, зависе од афинитета везивања за лиганде што превенира оксидацију слободних цистеинских резидуа, као и осетљивост галектина на протеолизу (177, 201). Експресија галектина се мења током ембриогенезе и ћелијске диференцијације, а мења се и у различитим физиолошким и патолошким условима (202). Пилећи галектини учествују у фузији миобласта, док галектин 1 и галектин 3 глодара имају улогу у развоју нотохорде и развоју мишићног ткива, као и централног нервног система (203-206). У недавним студијама (207-209) је показано да галектини учествују у регулацији урођене и стечене имуности.



Слика 6. Галектини унакрсно повезују површинске гликопротеине и тако формирају решеткасту формацију на површини ћелије. Галектини реагују са бројним гликокоњугатима на површини ћелија, унакрсно их повезују и започињу каскаду сигналних догађаја у процесима ћелијске пролиферације, диференцијације, апоптозе, продукције цитокина. (кориговано према: Gerardo R. Vasta. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:6).

1.3.3. Структура галектина 3

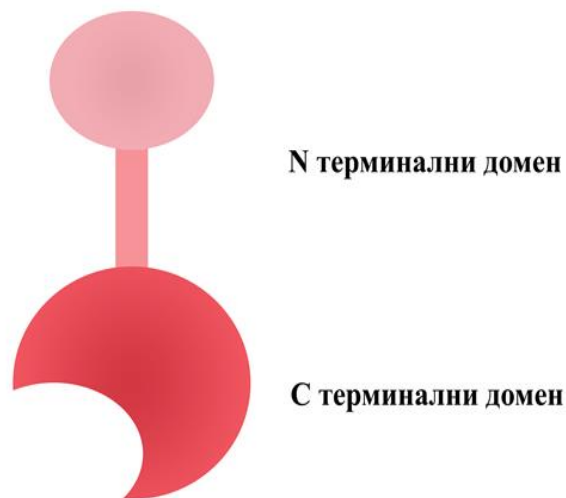
Gal-3 (29-35-kD) је убиквитарни лектин који је најпре идентификован као површински антиген Mac-2 исказан на перитонеалним макрофагима мишева након стимулације тиогликолатом (210). Молекул Gal-3 је јединствене структуре која га разликује од осталих чланова фамилије галектина у кичмењака (211). Овај лектин је углавном исказан на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система, са различитом дистрибуцијом: присутан је у једру, цитоплазми, митохондријама, на површини ћелија везан за гликокоњугате, док се у секретованом облику може наћи у ткивним течностима, што зависи од бројних фактора, као што су тип ћелије, пролиферативни статус (212) и малигна трансформација (213). Gal-3 конститутивно експримирају

моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, еозинофили и мијелоидне ћелије, док га В и Т лимфоцити експримирају тек након активације (214). Gal-3 се синтетише на слободним рибозомима у цитоплазми, без транслоцирања у ендоплазматски ретикулум (215). Иако се не помера у ендоплазматски ретикулум/Голџијев апарат, постоје многобројни докази да галектин 3 има екстрацелуларну локализацију. Овај молекул се очигледно секретује непознатим механизмом, највероватније ектоцитозом, независном од ендоплазматског ретикулума и Голџи апарата (196, 215-217). Један од могућих начина секреције галектина 3 је његово везивање за липиде мембране и пенетрација кроз фосфолипидни двослој (218), док друге студије (219) показују да галектин 3 најпре улази у везикуле богате гликопротеинима (за које се везује) које се фузионишу са ћелијском мембраном што омогућује доспевање Gal-3 у екстрацелуларни простор. Ген за галектин 3 чине шест егзона и пет интрона лоцираних на кратком краку хуманог 14. хромозома (220, 221).

Мономерни облик Gal-3 је полипептидни ланац са два јасно одвојена различита функционална домена (Слика 7) (221-224).

Овај протеин је јединствен у фамилији галектина, јер има један додатно дугачак и флексибилни N-терминални домен. Овај низ кога чини 100-150 аминокиселина богат је пролином, глицином, тирозином и глутамином (налик колагену- α) и завршава се кратком хидрофобном секвенцом (215, 220, 221, 224). На самом N-терминусу (првих 12 аминокиселина) лоцирано је место за фосфорилацију серина (225, 226). У овом домену постоје и друга везујућа места, на пример место које подстиче секрецију лектину, неklasичним механизмом (227-230). Овај домен, такође, обезбеђује стабилност и биолошку активност молекула (179). Тирозин на позицији 102 и суседне аминокиселине, учествује са CRD доменом у везивању олигосахарида (231). N терминални домен унакрсно повезује гликане на површини ћелије и формира пентамере што активира интрацелуларне сигнале и експресију различитих гена (182, 227, 232). Део домена сличан колагену- α садржи место за везивање протеаза као што су колагеназе и MMP-2 и MMP-9 (енгл. *matrix metalloproteinase*, MMP) које разграђују Gal-3 (233). Кидање везе између аланина (на позицији 62) и тирозина (на позицији 63) иако повећава афинитет домена за везивање угљених хидрата

истовремено смањује способност међусобног повезивања молекула Gal-3 чиме се ремете све оне биолошке функције које се заснивају на олигомеризацији молекула (233). N-терминални домен је важан и за секрецију Gal-3 (234), јер делеција првих 11 аминокиселина онемогућује секретовање оваквог молекула (230). N-терминални домен важан је и за регулацију апоптозе. Показано је да замена серина на позицији 6 (конзервирана позиција) ремети антиапоптотску активност галектина-3 (235).



Слика 7. Структура галектина 3. Галектин 3 се састоји од једног полипептидног ланца кога чине два структурно и функционално различита домена: атипични или N-терминални домен, који обезбеђује стабилну структуру и биолошку активност галектина 3 и C-терминални домен који служи за препознавање угљених хидрата.

C-терминални крај (CRD) Gal-3 чини, као и код осталих галектина, лектински домен за препознавање угљених хидрата. Састоји се од око 135 аминокиселинских остатака. Везивање овог домена са гликокоњугатима мења конформацију молекула (176) у близини везујућег места (236). Овај домен има важну улогу и у антиапоптотској активности галектина 3, јер се унутар њега налази високо конзервиран мотив NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg), структурно сличан VN1 домену Vcl-2 фамилије протеина, који се сматра кључним за ову активност (237).

Лиганди за Gal-3 поседују поли-N-ацетиллактозаминске секвенце за које се Gal-3 везује високим афинитетом (189, 215, 238). Лиганди Gal-3 у

екстрацелуларном матриксу и на ћелијској мембрани су: ламинин, витронектин, еластин, фибронектин, интегрини и протеин који везује Mac-2 (238-231), док су у цитоплазми и једру лиганди: Vcl-2, K-Ras и анексин VII (240). Gal-3 везан за екстрацелуларне домене једне или обе субјединице интегрина може да, позитивно или негативно, модулише активацију интегрина и тако мења њихов афинитет за екстрацелуларне лиганде (242). Потенцијални лиганди за Gal-3 су и мембрански протеини повезани са лизозомима- Lamp 1 и 2 (енгл. *lysosomal associated membrane proteins* 1 и 2, Lamp) (243). Ови протеини се углавном налазе на мембрани лизозома и ретко се могу наћи на спољној мембрани нормалних ћелија, док је њихова експресија повећана на површини малигних ћелија, посебно оних метастатских (243).

1.3.4. Физиолошка улога галектина 3

Gal-3 је плејотропан молекул који модулише ћелијску функцију везивањем за различите молекуле у једру, цитоплазми или на ћелијској мембрани.

У једру се Gal-3 везује за рибонуклеопротеине (244), *Gemin* 4 (енгл. *gem nuclear organelle associated protein* 4, Gemin 4) (245), транскрипцијске факторе CREB (енгл. *cAMP response element-binding*, CREB) и Sp1 (енгл. *specificity protein* 1, Sp1) (246) и β -катенин (247, 248). Gal-3 и Gal-1 се везују за рибонуклеопротеине и формирају сплајсејозом који прекраја пре-информациону РНК (249). Gal-3 модулише ћелијски циклус и пролиферацију регулацијом транскрипције гена (246). Gal-3 стабилизује везивање транскрипцијских фактора CREB и Sp1 за промотерски регион гена за циклин D1 и појачава његову експресију (246), а везујући се за β -катенин модулира Wnt сигнални пут (247, 248).

У цитоплазми Gal-3 подстиче пролиферацију, регулише ћелијску диференцијацију и инхибира апоптозу везујући се за K-Ras протеин што активира киназе Raf-1/MEK/ERK сигналног пута (250).

Gal-3 има и важну улогу у диференцијацији макрофага, В лимфоцита и дендритских ћелија (251-253). Током диференцијације макрофагима, *in vitro*, повећава се експресија Gal-3 у макрофагима (251). Сматра се да повећана

експресија Gal-3 негативно делује на диференцијацију В лимфоцита у плазмоците тако што везујући се за транскрипцијски фактор Blimp-1 (енгл. B lymphocyte-induced maturation protein 1) смањује његову активност (252). Насупрот томе, диференцијацију дендритских ћелија из њихових прекурсора прати смањена експресија Gal-3 (253).

Двојака је улога Gal-3 у регулацији апоптотске смрти, јер експримиран интрацелуларно инхибира, а екстрацелуларни Gal-3 подстиче апоптозу (240). Интрацелуларно Gal-3 остварује антиапоптотску улогу својим С терминусом који је структурно налик активном месту исказаном на антиапоптотским молекулима фамилије протеина Bcl-2 (237). Овај претпостављени механизам подразумева да се Gal-3, иначе присутан у цитоплазми и једру, под утицајем различитих апоптотичких стимулуса концентрише на митохондријалној мембрани и штити је од оштећења (254).

Екстрацелуларни Gal-3 има улогу у адхезији ћелија, хемотакси, сазревању тимоцита и ангиогенези. Овај лектин учествује у бројним адхезивним интеракцијама функционишући као мост који повезује ћелије међусобно или са различитим компонентама ванћелијског матрикса (240). Gal-3 као хемотактички молекул стимулише миграцију ћелија моноцитно/макрофагне линије (255). У тимусу, Gal-3 омогућује тимоцитима да напусте тимус тако што прекида њихову адхезију са тимусном микросредином (256). Екстрацелуларни Gal-3 стимулише и формирање капиларне тубе *in vitro* и *in vivo* и на тај начин подстиче ангиогенезу (257). Такође, овај лектин изазива апоптозу Т лимфоцита, што је најпре показано на ћелијској линији хумане Т лимфоцитне леукемије, а потом и на Т лимфоцитима изолованим из периферне крви људи као и на мишијим активираним Т лимфоцитима (258).

1.3.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора

Многе ћелије имунског система експримирају Gal-3 што указује да овај молекул може имати и важну улогу у регулацији инфламације (Слика 8). Конститутивно га експримирају моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, неутрофили, еозинофили, док га Т и В лимфоцити експримирају тек током активације (214).

Gal-3 утиче на адхезивност, хемотактичко кретање и активацију макрофага (255, 259). Овај протеин функционише као рецептор који препознаје молекулске обрасце (гликокоњугате) на површини патогена као што су *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* и *Trypanosoma cruzi* функционишући као опсонин (214, 260-264). Gal-3 повећава продукцију IL-1 β (214) као и кисеоничких радикала у макрофагима (251). Недавна студија (265) је показала да макрофаги Gal-3^{-/-} мишева исказују смањену фагоцитну активност.

Постоје је и опречни налази о улози Gal-3 у активацији макрофага. Тако је *in vitro* показана алтернативна активација макрофага под утицајем IL-4 и IL-13, која зависи од експресије Gal-3, јер додавање липополисахарида и IFN- γ није омогућило конверзију активације макрофага у Gal-3^{-/-} мишева (266). Ово је у истој студији додатно потврђено применом рекомбинантног Gal-3 што је стимулисало алтернативну активацију, док је инхибитор галектина 3 блокирао ову активацију (266). Такође је показано да макрофаги Gal-3^{-/-} мишева, под утицајем липополисахарида, продукују већу количину про-инфламацијских цитокина IL-6, IL-12 и TNF- α , него макрофаги Gal-3^{+/+} мишева, што јасно указује на анти-инфламацијску улогу Gal-3 (267). Супротно, показана је и проинфламацијска улога овог молекула исказаног у ћелијама микроглије где изазива фосфорилацију транскрипционих фактора JAK2, STAT1, STAT3 и STAT5 и активацију бројних JAK/STAT сигналних путева што је изазвало масивну продукцију проинфламацијских цитокина (TNF- α , IL-6, IL-1 β и IFN- γ) (268). Овај дуализам се може објаснити разликама у концентрацији цитокина како у микросредини запаљеног ткива тако и у серуму.

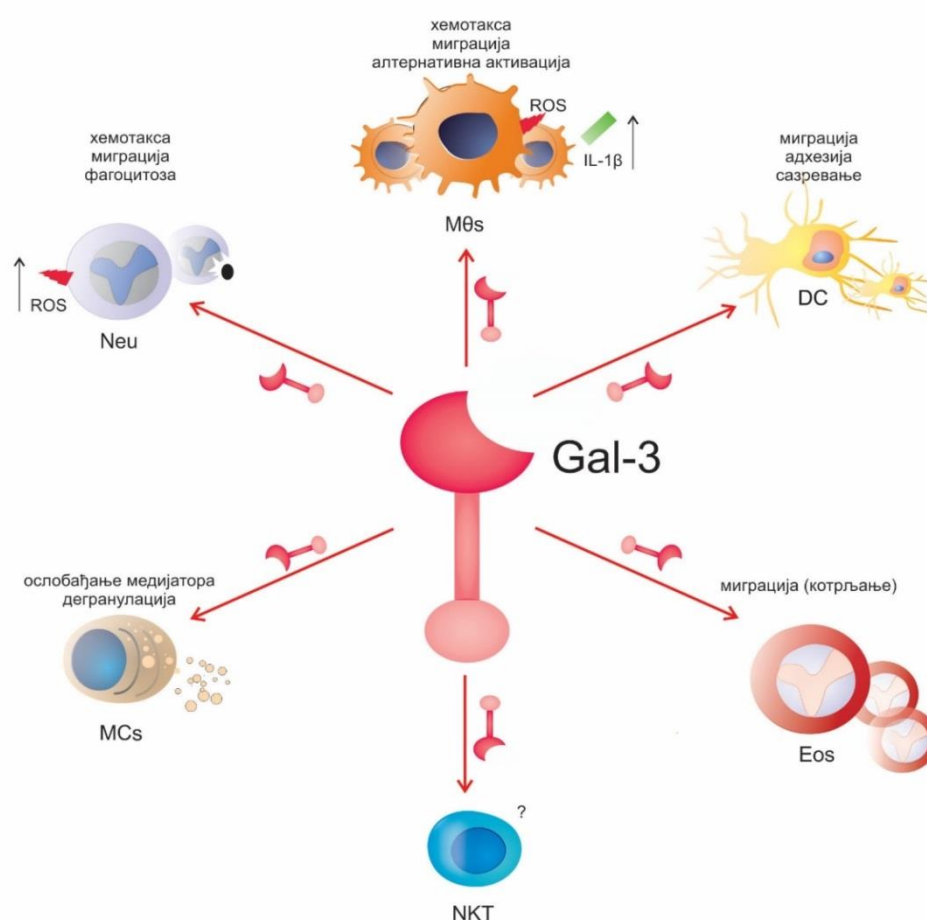
Активисани неутрофили представљају важан извор инфламацијских цитокина (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и ROS-а, који могу да узрокују инфламацију и оштете ткиво дебелог црева (149). Gal-3 служи као хемоатрактант за неутрофиле, а има и важну улогу у процесу фагоцитозе (269). Gal-3 повећава фагоцитну активност неутрофила процесом независним од CD66a и CD66b, тако што реагује са липополисахаридом исказаном на микроорганизмима.

Gal-3 игра важну улогу у котрљању и активацији еозинофила (269), а медијатори еозинофила (еозинофилна пероксидаза и еозинофилни катјонски протеин) су важни у патогенези акутног колитиса (153, 154).

Осим утицаја на неутрофиле, еозинофиле и макрофаге Gal-3 делује на миграцију и функцију дендритских ћелија јер осим што делује хемоатрактантно игра и кључну улогу у њиховој миграцији, адхезији и сазревању (147, 270).

На месту инфламације, која је изазвана декстран натријум сулфатом повећава се број мастоцита као и као и концентрација њихових протеаза (151). Мастоцити продукују инфламацијске медијаторе као што су TNF- α , хистамин и триптазе и на тај начин појачавају инфламацију, регрутују неутрофиле и друге инфламацијске ћелије у ткиво дебелог црева (152). Gal-3 је важан у ћелијској биологији мастоцита (271) јер мастоцити из коштане сржи Gal-3^{-/-} мишева након активације, преко Fc ϵ RI, продукују значајно мање количине хистамина и цитокина у поређењу са мастоцитима WT мишева (271).

Активација NKT ћелија α -GalCer-ом делује протективно у мишјем колитису (155). Овако активисане NKT ћелије представљају важан извор антиинфламацијских цитокина- IL-10 и TGF- β током колитиса изазваног DSS-ом (156). Пасивни трансфер NKT ћелија значајно ублажава симптоме колитиса у мишева (155). Показана је разлика у фенотипу NKT ћелија јетре у WT и Gal-3^{-/-} мишева, али прецизна улога Gal-3 у активацији и функцији NKT ћелија у ткиву дебелог црева још није позната (272).



Слика 8. Улога и значај Gal-3 у регулацији функције ћелија урођеног имунског одговора.

1.3.6. Експресија галектина 3 у ткиву колона

Подаци из литературе указују на улогу Gal-3 у патогенези канцера и аутоимунских болести (269, 272, 273). Једина до данас објављена студија о улози Gal-3 у акутном колитису изазваном декстран натријум сулфатом је указала на појачану експресију Gal-3 у ламини проприји и криптама епитела током прогресије болести (274). Експресија Gal-3 варира у зависности од врсте мишева и модела колитиса. Концентрација Gal-3 је повећана у пацијената са активном формом улцерозног колитиса и Кронове болести (275).

Док је експресија Gal-3 у свим ћелијама имунског система, које имају важну улогу у настанку акутног колитиса добро документована, улога и значај овог молекула у миграцији, активацији као и функционалном фенотипу ћелија одговорних за настанак и прогресију акутног колитиса није још увек разјашњен.

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај Gal-3 у патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

У складу са основним циљем постављени су и следећи експериментални задаци:

1. Праћењем клиничког скорa и патохистолошких промена утврдити утицај делеције гена за Gal-3 на оштећење ткива колона у акутном колитису изазваном декстран натријум сулфатом.
2. Испитати утицај делеције гена за Gal-3 на фенотип и функције ћелија имунског система у ткиву колона.
3. Испитати ефикасност примене новосинтетисаног антагонисте Gal-3 (GM-CT-01, *Davanat*) у моделу акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ

Ова студија је изведена на мишевима чистог соја C57BL/6 ("*wild type*") и на мишевима истог соја са циљаном делецијом гена за Gal-3 (*knock-out* или Gal-3^{-/-}C57BL/6). Gal-3^{-/-} мишеви су набављени из одгајалишта за мишеве Универзитета Калифорнија захваљујући проф. др Hsu-у (*Daniel K. Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA*). Сви мишеви (*wild type* односно Gal-3^{+/+} мишеви као и Gal-3^{-/-} мишеви) су одгајани у виваријуму Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Сprovedено истраживање је одобрила Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-10747 од 3.12.2012. године).

У појединачним експериментима коришћени су увек мишеви истог пола и врло блиске старости (разлика у старости није била већа од 7 дана). Такође, коришћени су мишеви приближне телесне масе (разлика у маси није била већа од 0.5 грама).

3.1.1. Поступак добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за Gal-3

Хомолога рекомбинација представља замену гена између пара хомологих секвенци два молекула DNA, који имају сличне или индентичне нуклеотиде (276). Овим поступком се замењује функционални ген неактивним геном, чиме се употпуности елимише, односно "искључује" функција постојећег гена (277). Методологија стварања "*knock-out*" мишева се заснива на замени само једног дела или комплетног циљног (нормалног) гена нефункционалним (мутираним) геном помоћу хомологе рекомбинације (277).

Процес добијања "*knock-out*" мишева се заснива на одабиру оних ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација. Пре свега врши се трансфекција вектора са страним, нефункционалним геном у ембрионалне матичне ћелије. Фрагмент DNA са мутираним геном (или фрагмент DNA са "искљученим" геном) се најпре угради у циљани вектор који садржи и два додатна гена којима

се контролише рекомбинација: ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) и ген за вирусну тимидин киназу (ТК ген) (278, 279). *Neo* ген се увек уграђује у геном ћелије, док се ТК ген губи само уколико се одиграла хомолога рекомбинација. Овај вектор се убацује у културу ћелија чији медијум садржи неомицин и *ganciklovir* или FIAU (енгл. 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil) који се под утицајем тимидин киназе метаболишу у токсични продукт. Уколико је фрагмент DNA са мутираним геном насумице интегрисан у ћелију, оваква ћелија биће резистентна на неомицин, али ће бити уништена помоћу *ganciklovir*-а или FIAU. Преживеће све ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација, јер ће бити резистентне и на неомицин и на *ganciklovir* или FIAU (278, 279).

Показано је да мишији ген за Gal-3 садржи шест егзона (280) при чему егзон 2 и 3 кодирају аминокиселински крај молекула Gal-3, док егзони 4, 5 и 6 кодирају карбокси-терминални крај са доменом којим препознаје угљенехидрате. У лабораторији проф. др *Hsu*-а у циљу добијања Gal-3^{-/-} мишева направљен је прекид гена за Gal-3 на нивоу ембрионалних матичних ћелија (281). При томе је коришћен вектор који је конструисан тако да садржи фрагмент клониране DNA за Gal-3, а стратегија за добијање Gal-3^{-/-} мишева се заснивала на прекиду оног генског региона који кодира домен за препознавање угљенехидрата. Другим речима, кратак сегмент (од 0.5 кило база) кога чине интрон-4 и егзон-5 је замењен геном за резистенцију на неомицин. Сегмент од егзона-4 до егзона-5 мишијег гена за Gal-3 је уграђен у рMC1*Neo Poly(A)* вектор (*Stratagene, La Jolla, CA*) и то на горњем крају у близини промотера за тимидин киназу-*Neo*. Други сегмент од егзона-5 до егзона-6 је уграђен нисходно од *Neo*, док је у вектору сегмент на споју интрона-4 и егзона-5 прекинут *Neo* геном (281). Циљани вектор је уграђен у мишије матичне ћелије, D3, а затим су трансфектоване ћелије селектоване уз помоћ G418, док је хомолога рекомбинација у G418-51 резистентним ћелијама детектована помоћу две технике: PCR (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) коришћењем прајмера специфичних за *Neo* ген, као и *Southern*- блот хибридизацијом. Скринингом 894 клонова ембрионалних матичних ћелија идентификована су само два клона 4A2 и 9A4 у којима је детектована хомолога рекомбинација помоћу пробе 4 (281).

Један клон ембрионалних матичних ћелија у коме се одиграла хомолога рекомбинација је најпре пропагиран а онда су овакве ћелије убризгане у три и по дана старе бластоцисте C57BL/6 мишева, а затим су овакве бластоцисте имплантиране у лажно гравидне CD1 женке (сурогат мајке). На тај начин су прво добијени химерични мишеви, а затим укрштањем химеричних мужјака са C57BL/6 женкама најпре су добијени хетерозиготни *knock-out* мишеви (Gal-3^{-/+} мишеви). Инбредним укрштањем оваквих хетерозиготних мишева након девет генерација добијени су хомозиготни *knock-out* мишеви који су генски дефицијентни у експресији молекула Gal-3 (Gal-3^{-/-} мишеви) (281).

У Gal-3^{-/-} мишева добијених на овакав начин изоловани су различити органи (надбубрежна жлезда, мозак, срце, јетра, плућа, лимфни чворови, слезина и тимус) у којима хистолошком анализом нису уочене било какве промене. Није било разлике у броју крвних ћелија између Gal-3^{-/-} и Gal-3^{+/+} мишева. Анализиране су субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини и лимфним чворовима. Показано је да је укупан број лимфоцита као и однос CD4⁺/CD8⁺ ћелија приближно исти у Gal-3^{-/-} и Gal-3^{+/+} мишева (281).

3.2. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ АКУТНОГ КОЛИТИСА ДЕКСТРАН НАТРИЈУМ СУЛФАТОМ

Експериментални модел колитиса изазван декстран натријум сулфатом, је један од најчешћих модела, коришћен је и у овој студији. Уколико је мишевима 7 дана доступан 3% DSS, растворен у пијаћој води животиње ће развити симптоме болести сличне улцерозном колитису људи (111). DSS (TdB Consultancy, Upssala Sweden; DB001-500g/ 40kDa) је био растворен у дестилованој води. Експерименталне групе WT и Gal-3^{-/-} мишева су пиле 3% DSS, док су контролне групе животиња имале приступ води без DSS током 7 дана. За процену тежине болести праћен је клинички скор у животиња, а степен оштећења ткива дебелог црева процењиван је патохистолошком анализом.

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ КЛИНИЧКОГ СКОРА

Клинички скор (енгл. *Disease Activity Index*, DAI) је обухватао праћење губитка телесне масе, конзистенције столице и присуства/одсуства ректалног крварења током 7 дана примене DSS-а (146) (Табела 2).

Табела 2. Клинички скор (*Disease Activity Index-DAI*)*

Скор	Губитак телесне масе	Конзистенција фецеса	Ректално крварење
0	нема губитка	нормална	нема крварења
1	1-5%	нормална	нема крварења
2	6-10%	ретка	слабо крварење
3	11-15%	ретка, слузава	видљиво крварење
4	>15%	дијареја	велико крварење

**DAI се рачуна као сума сва три параметра*

Губитак телесне масе и честе дијареје су клинички симптоми улцерозног колитиса. Мишеви су жртвовани 7 дана након примене DSS-а раствореног у пијаћој води (експерименталне групе), односно приступа обичној води (контролне групе) у атмосфери zasiћеној диетилетром (BETA NEM, Београд).

3.4. ПАТОХИСТОЛОШКЕ АНАЛИЗЕ

3.4.1. Фиксација и депарафинизација ткива колона

Након жртвовања животиња изоловано је дебело црево, које је потом лонгитудинално пресечено и уроловано у такозване "швајцарске ролнице", као што је приказано на Слици 9 (282). Овако добијени узорци фиксирани су у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци су дехидрисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласт. Попречни серијски пресеци, дебљине 4 μm , сечени су на микротому *Leica RM 2135, Austria*.



Слика 9. Швајцарска ролница.

3.4.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду концентрације алкохола, исечци су бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидрисани, просветљивани и постављани на плочице са *Canada balsam*. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом након 24- часовног сушења.

3.4.3. Одређивање хистолошког скорa

На хистолошким препаратима одређивано је оштећење епитела и инфилтрација инфламацијским ћелијама (Табела 3) према претходно описаном протоколу (283). Препарат су, након бојења хематоксилин-еозином, посматрани под светлосним микроскопом (увећање 100×) и фотографисани дигиталним апаратом (BX51, *Olympus, Japan*).

Табела 3. Хистолошки скор*

Скор	Инфилтрација	Епител
0	нема инфилтрације	нормална морфологија
1	инфилтрат око базе крипте	губитак пехарастих ћелија
2	инфилтрат досеже до <i>laminae muscularis mucosae</i>	губитак пехарастих ћелија на већој површини
3	екстензивни инфилтрат досеже до <i>laminae muscularis mucosae</i> , истањена мукоза и појава едема	губитак крипти
4	инфилтрација до <i>laminae submucosa-e</i>	губитак крипти на већој површини

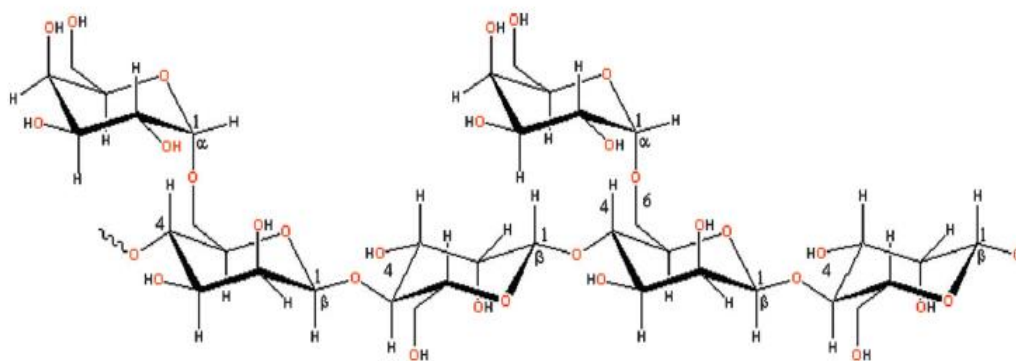
*Скор се рачуна тако што се сабирају оба параметра, са максималним скором 8.

3.5. АПЛИКАЦИЈА DAVANAT-а

У експериментима у којима је испитивано да ли интраперитонеална примена антагонисте Gal-3 (Gal-3INH, GM-CT-01) може да превенира колитис изазван DSS-ом, коришћени су WT мишеви. GM-CT-01 је линеарни полисахарид, оквирне молекулске тежине 54kDa, изолован из *Cyamopsis tetragonoloba guar bean/gum* (регистрован као патент US 7,893,252). Инхибитор Gal-3 (Davanat) је добијен од професора др *Anatole Klyosov* (*Galectin Therapeutics Inc, Norcross, Georgia, United States of America*).

Davanat® је угљенохидратни полимер, састављен од манозе и галактозе, молекулске тежине 59kDa (Слика 10). Просечна полимерна јединица α -галактоманана садржи 17 β -D-Man резидуа и 10 α -D-Gal резидуа градећи полимерни молекул од око 12 таквих јединица (284). У току је евалуација ефекта Davanat-а на метастазе колоректалног карцинома у II фази клиничког испитивања (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00110721>). Davanat делује као

антагониста како за секретовани Gal-3, тако и за експримиран на мембрани ћелија. Везујући се за Gal-3 нарушава многобројне функције овог молекула. Појединачна доза *Davanat*-а која је коришћена у експериментима је била 100 μ g/kg, интраперитонеално 0, 2, 4 и 6. дана експеримента (285).



Слика 10. Хемијска структура *Davanat*-а. *Davanat*[®] је угљенохидратни полимер, састављен од манозе и галактозе.

3.6. АПЛИКАЦИЈА α - ГАЛАКТОЦЕРАМИДА (α - GalCer)

α -GalCer је потентни активатор NKT ћелија. У експериментима у којима је испитивано да ли одсуство Gal-3 утиче на протективну улогу NKT ћелија у акутном колитису, мишевима је интраперитонеално апликован α -GalCer (100 μ g/kg телесне масе) свакодневно током седмодневне примене DSS-а (155).

3.7. АПЛИКАЦИЈА MSCs

Дванаест сати од почетка примене DSS-а, мишевима су интраперитонеално апликоване MSCs добијене из костне сржи WT мишева (0.5×10^6 ћелија) у 200 μ l PBS-а (286) као и MSCs култивисане у медијуму са додатим инхибитором Gal-3 (287).

3.8. ИЗОЛАЦИЈА ИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЋЕЛИЈА ИЗ *LAMINE PROPRIA*-е ТКИВА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА

Након жртвовања мишева издвојено је ткиво дебелог црева и изоловане ћелије из ламине проприје по већ утврђеном протоколу (288). Дебело црево је пресечено лонгитудинално и додатно уситњено на 3-4 секције, након тога је

испрано HBSS-ом (енгл. *Hank's balanced salt solution*, HBSS), који не садржи магнезијум и калцијум. Овако добијено ткиво припремљено је за дигестију у 20ml HBSS медијума са 10% FBS-ом, 15mM HEPES-ом, 5mM EDTA, 30 минута у воденом купатилу на 37°C. Фрагменти црева су након тога додатно испрани са HBSS-ом и потом уситњени. Садржај је третиран са 1ml 4000 Mandl јединица колагеназе D и 200µl Dnase (1mg/ml NaCl), на 37°C у воденом купатилу током једног сата. Добијени садржај је филтриран кроз серију ћелијских сита различитог промера (100µm и 40µm), а потом центрифугиран на 450g у трајању од 10 минута. Након одливања супернатанта, талог је ресуспендован 30% Percoll-ом, а затим низ зидове епрувете додаван 70% Percoll. Целокупни садржај је центрифугиран на 1100g 20 минута, чиме су издвојена три слоја: на дну су биле мртве ћелије и дебрис, преко њих мононуклеари док су површински слој чиниле епителне ћелије. Пипетом је извучен средњи слој и ресуспендован у комплетном медијуму за испитивања проточном цитометријом.

3.9. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА

Применом проточне цитометрије одређиван је релативни и апсолутни број инфламацијских ћелија: макрофага, дендритских ћелија, неутрофила, мастоцита, еозинофила, NK и NKT ћелија након 7 дана експеримента.

Анализа је рађена на свеже изолованим инфламацијским ћелијама из ткива дебелог црева. Након изолације, приликом бројања ћелија, одређивана је вијабилност ћелија помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У свим експериментима вијабилност ћелија је износила 90% до 95%.

3.9.1. Бојење мембранских маркера

У техници бојења мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа популације инфламацијских ћелија дебелог црева примењена су анти-мишија моноклонска антитела различите специфичности (Табела 4).

Табела 4. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији.

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT или REF
FcεRI	PerCp	MAR-1	Armenian Hamster IgG	BioLegend	134319
CD117	FITC	2B8	Rat IgG2b, κ	BioLegend	105806
ST2	PE	DIH9	Rat IgG2a, κ	BioLegend	145304
CD45	APC	30-F11	Rat (LOU) IgG2b, κ	BD Pharmingen	559864
IL-4	PE	BVD4-1D11	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554389
IL-6	PE	MP5-20F3	Rat IgG1	BD Pharmingen	554401
SiglecF	PE	E50-2440	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	552126
CD11c	PerCp	N418	Armenian Hamster IgG	Molecular probes	A14788
IL-13	FITC	eBio13A	Rat IgG1, κ	eBioscience	12-7133-82
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
CD11b	PerCp	M1/70	Rat IgG2b	Molecular probes	A14787
I-A	PE	AF6-120.1	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553552
CD206	APC		Goat IgG	RnDSystems	FAB2535

					A
IL-12 (p40/p70)	PE	C15.6	Rat IgG1	BD	554479
				Pharmingen	
IL-1	PE	166931	Rat IgG2b	RnDSystems	IC4013P
IL-10	PE	JES5-16E3	Rat	BD	554467
			IgG2b	Pharmingen	
CD3e	PerCp	145-2C11	Armenia	BD	553067
			Hamster	Pharmingen	
NK1.1.	FITC	PK136	Mouse	eBioscience	11-5941-81
			IgG2a, κ		
IFN-γ	PE	BM8	Rat	eBioscience	12-4801
			IgG2a, κ		
TNF-α	PE	MP6-XT22	Rat IgG1	BD	554419
			Pharmingen		
CD11c	PE	N418	Hamster	Molecular	MCD11c04
			IgG	probes	
CD8a	APC	53-6.7	Rat	BD	553035
			(LOU)	Pharmingen	
CD80	PE	16-10A1	Armenian	BD	553769
			Hamster	Pharmingen	
			IgG2, κ		

На 1×10^6 ћелија изолованих из дебелог црева ресуспендованих у $50 \mu\text{l}$ пуфера за бојење (енгл. Staining Buffer; BD) додата је одговарајућа количина примарно коњугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација ћелија из ламине проприје (Табела 4). Ћелије изоловане из ткива дебелог црева су инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 5). Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле коришћене су у таквим концентрацијама да њихова

финална разблажења у суспензији ћелија ($V \approx 80\mu\text{l}$) била 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута у мраку на температури $+4^\circ\text{C}$. По истеку инкубације, ћелије су опране додавањем 2ml хладног пуфера за бојење. Након тога, ћелије су центрифугиране 5 минута на 250g. После центрифугирања одливан је супренатант и талог ћелија ресуспендован у 250 μl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру FACSCalibur (BD) помоћу CELLQUEST софтвера (BD). Граничник (енгл. *gate*), је направљен у FSC/SSC плоту као регион вијабилних моноклеарних ћелија. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу CELLQUEST (BD) и *Flowing Software 2.5.1*.

Табела 5. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији

Назив антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT или REF
PE Rat IgG2a, κ Isotype Control	PE	R35-95	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	554689
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	PerCP	МОРС-21	Mouse IgG1, κ	BioLegend	400150
APC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl	APC	МОРС-173	Mouse IgG2a, κ	BioLegend	400220
FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control	FITC	G15-178	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen	53456

3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина

Интрацелуларно бојење цитокина је изведено по BD *Cytofix/Cytoperm*™ методи. У овој студији ћелије су стимулисане са форбол 12-миристанат 13-ацетатом (РМА, енгл. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, Sigma) и јономицином (енгл. *Ionomycin*, Sigma). Форбол 12-миристанат 13-ацетат и јономицин су веома моћни активатори протеин киназе С (PKC, енгл. *Protein Kinase C*) покрећу инфлукс јона калцијума у ћелију чиме се индукује експресија цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима (289). Инкубациони период у трајању 4-6 часова је довољан за индукцију већине цитокина.

Дужа инкубација изазива интензиван цитопатогени ефекат поменутих активатора. Препоручује се да се током *in vitro* стимулације ћелија користе инхибитори интрацелуларног транспорта протеина. BD *GolgyStop*™ (садржи моненсин) и BD *GolgyPlug*™ (садржи брефелдин А) су инхибитори које препоручује BD *Cytofix/Cytoperm*™ протокол. Поменути инхибитори блокирају интрацелуларни транспорт што доводи до акумулације већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу. Ово повећава могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Како и моненсин и брефелдин А имају дозно- и временски- зависан цитотоксични ефекат, излагање ћелија овим агенсима мора да се ограничи. Инкубације са поменутиим инхибиторима дуже од 12 часова су токсичне за ћелије. Управо зато, ради повећања могућности детекције ћелија које продукују цитокине коришћен је BD *GolgyStop*™ и BD *GolgyPlug*™ према BD *Cytofix/Cytoperm*™ протоколу.

Суспензије појединачних ћелија изолованих из ткива дебелог црева (1×10^6 /ml), припремљене у медијуму (медијум са 10% FBS-ом), су инкубирани на 37°C у атмосфери засићеној 5% CO₂. У суспензију ћелија је додат РМА (Sigma; 50ng/ml) и јонофор (*Ionomycin*, Sigma; 500ng/ml). Након 2 сата инкубације додат је BD *GolgyStop*™ (0,7µl/ml), чиме је блокирана секреција цитокина и повећана интрацелуларна акумулација цитокина. После 6 сати инкубације (2 сата деловања активатора, а затим 4 сата истовременог деловања и активатора и инхибитора транспорта цитокина), ћелије су опране и ресуспендоване у медијуму. Затим су ћелије пребачене у пластичне епрувете за

имунофлуоресцентно бојење (*Falcon round-bottom test tubes*, BD). Током бојења и чувања, ћелије су држане на +4°C у мраку.

Најпре је урађено бојење мембранских маркера према унапред описаној процедури. Површинско бојење је увек боље обавити пре фиксације ћелија, јер епитопи површинских маркера могу да се оштете током фиксације и пермеабилizације.

Након инкубације са примарно коњугованим антителима за површинске антигене, ћелије су опране са 2ml пуфера за бојење и центрифугиране (250g, 5 минута). Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (BD *Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на температури +4°C. Затим су ћелије опране са 1 ml *Perm/Wash*™ пуфера (BD *Pharmingen*) и центрифугиране (250g, 5 минута). После одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Ћелијски талог је ресуспендован у 50µl *Perm/Wash*™ пуфера. Додата су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине: анти-TNF, анти-IFN-γ, анти-IL-10, анти-IL-12, анти-IL-6, анти-IL-1 и анти-IL-4 (Табела 4). Након истека инкубације ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење и центрифугиране (250g, 5 минута).

Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Граничник је направљен у FSC/SSC дијаграму као регион вијабилних ћелија. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу FACSCalibur (BD Biosciences) и *Flowing Software 2.5.1*. програма.

3.10. ИЗОЛАЦИЈА И АКТИВАЦИЈА МАКРОФАГА *IN VITRO*

Након жртвовања мишевима је убризган хладан стерилан фосфатни пуфер (енгл. *Phosphate buffered saline*, PBS) у перитонеалну дупљу. Благом перитонеалном лаважом је масирана трбушна дупља и извучен садржај. У тако добијене суспензије додавано је по 200µl FBS-а, а узорци су центрифугирани 5 минута на 450g. По завршеном центрифугирању, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma *Aldrich*) са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100IU/ml пеницилина G и 100µg/ml

стрептомицина) и проверена је вијабилност и број ћелија. У припреми за проточну цитометрију ћелије су култивисане у микротитар плочама и стимулисане LPS-ом (10ng/ml) у трајању од 2 сата, а након тога инкубиране 24 сата у присуству 5% DSS-а на 37°C у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO₂ (290). ELISA техником одређена је концентрација цитокина у супернатанту (TNF- α и IL-1 β) у складу са препоруком произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.11. ДЕПЛЕЦИЈА МАКРОФАГА

Да би се показало да ли су макрофаги кључни у развоју инфламације током експерименталног акутног колитиса за њихову деплецију коришћени су липозоми (*Standard macrophage depletion kit*; Encapsula NanoSciences LLC). Мишеви су примили 200 μ l липозома интраперитонеално 5 пута у току експеримента: -4, 0, 2, 4 и 6-ог дана (291).

3.12. АДОПТИВНИ ТРАНСФЕР МАКРОФАГА

Макрофаги изоловани (1×10^6), свакодневно из перитонеума, здравих WT и Gal-3^{-/-} мишева интравенски су апликовани у Gal-3^{-/-} мишеве првог дана индукције болести (292).

3.13. ИЗОЛАЦИЈА И АДОПТИВНИ ТРАНСФЕР НЕУТРОФИЛА

Мишевима је 4 сата пре жртвовања, интраперитонеално убризган 1ml стерилног 3% тиогликолата (Природно-математички факултет, Катедра Института за хемију, Универзитет Крагујевац) (293). Благом перитонеалном лаважом је масирана трбушна дупља и из ње извучен садржај. Узорци су центрифугирани 10 минута на 300g, потом ресуспендовани у 10ml PBS-а и поново центрифугирани 10 минута на 300g. По завршеном центрифугирању, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму са 10% FBS-а, 2mM L-глутамин, 100IU/ml пеницилина G и 100 μ g/ml стрептомицина и проверена им је вијабилност и број ћелија.

За експерименте адоптивног трансфера неутрофили су изоловани из перитонеалне дупље здравих WT и Gal3^{-/-} мишева (2×10^6) и интраперитонеално апликовани четвртог дана експеримента у Gal3^{-/-} мишеве (294).

3.14. ИЗОЛАЦИЈА И АДОПТИВНИ ТРАНСФЕР ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА

Ћелијска суспензија, која је коришћена за добијање чисте популације дендритских ћелија на магнетним колонама, је изолована из слезине здравих WT и Gal3^{-/-} мишева. Спленоцити су издвојени на следећи начин: слезина је хомогенизована клипом шприца и материјал је пропуштен кроз ћелијско сито (енгл. *cell strainer*, BD *Pharmingen*, USA) у епрувету уз додавање 5ml комплетног медијума. Овако добијена суспензија ћелија је центрифугирана на 250g током 5 минута, а онда је одливен супернатант. Присутни еритроцити лизирани су, током инкубације ткивног материјала, у 5ml раствора за лизирање у трајању од 5 минута на +4°C. После тога додато је 5ml комплетног медијума да би се зауставило даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране, одливен супернатант и ћелије ресуспендоване у 1ml комплетног медијума. На тај начин је добијена суспензија појединачних спленоцита која је коришћена за даљу изолацију дендритских ћелија на колонама.

Издавање дендритских ћелија на магнетним колонама обавља се у две фазе. Најпре се ћелије обележавају магнетним куглицама на следећи начин: пребројане ћелије (10^8 ћелија), центрифугиране су на 200g током 10 минута. Талог је ресуспендован у 400µl пуфера (PBS pH 7.2, 0.5% BSA и 2mM EDTA). Додато је 100µl магнетних куглица (енгл. *MicroBeads*) обележених са CD11c. Суспензија је добро измешана и инкубирана током 15 минута у фрижидеру (2–8 °C). Након инкубације ћелије су опране у 1–2ml пуфера и центрифугиране на 200g током 10 минута. Талог је ресуспендован у 500µl пуфера. У другој фази обављено је магнетно издавање обележених ћелија (позитивна селекција). Колоне су постављене на MACS сепаратор (енгл. *Magnetic cell sorting*; *Miltenyi Biotec*, Немачка) и пошто су опране са 3ml пуфера на њих је постављена ћелијска суспензија. Необележене ћелије које су прошле кроз колоне су сакупљане, а колоне су опране још три пута са 3ml пуфера, а потом пренете са

сепаратора на епрувете. Додато је 5ml пуфера и снажним и брзим покретом је притиснут клип колоне. Овако сакупљене ћелије биле су CD11c⁺ дендритске ћелије.

За адоптивни трансфер дендритских ћелија експериментални мишевима је интраперитонеално убризгавано 200.000 дендритских ћелија ресуспендованих у 200 μ l PBS-а, једнократно петог дана експеримента (295).

3.15. КОКУЛТИВАЦИЈА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА И MSCs

Из здравих Gal-3^{-/-} мишева су по већ објашњеном протоколу (3.10.) изоловани перитонеални макрофаги и кокултивисани током 24 сата само са MSCs или са MSCs уз додатак инхибитора. Присуство цитокина (IL-10 и TGF- β) у супернатанту анализирано је ELISA техником у складу са препоруком произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), док је фенотип макрофага анализиран проточном цитометријом.

3.16. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 И TGF- β У СЕРУМУ, ИЗОЛАТУ ТКИВА КОЛОНА И СУПЕРНАТАНТУ

Концентрација Gal-3 и цитокина (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 и TGF- β) у серуму, изолату ткива црева и супернатанту макрофага активираних *in vitro* одређивана је комерцијалним индиректним ELISA китовима специфичним за мишије цитокине (*Mouse Gal-3 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-1 β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TGF- β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у (pH 7.2) тако да почетне концентрације буду 2000pg/mL за Gal-3, TNF- α , IL-10 и 1000pg/mL за TGF- β , IL-6 и IL-1 β .

Да би се добила стандардна крива са 8 тачака направљени су штокови серијских двоструких разблажења у растварачу (1% BSA у PBS). Непосредно

пре извођена теста сви узорци су разблажени 20 пута у дејонизованој води. Затим је 100 μ l радне концентрације "везујућег" антитела додато у микротитар плочу са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом и остављене на собној температури преко ноћи, након чега су бунарчићи мануелно испрани пуфером за испирање. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер у финалном волумену од 200 μ l и плоче су остављене један сат на собној температури.

Након тога плоче су испране пуфером за испирање. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у бунарчиће, а затим су плоче прекривене адхезивном фолијом и остављене на собној температури два сата. После инкубације и испирања плоча, у све бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације детекционог антитела, а онда су плоче поново обложене адхезивном фолијом и остављене још два сата на собној температури. По истеку инкубације плоче су испране, а онда је у бунарчиће сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin*-HRP (енгл. *Streptavidin HorseRadish Peroxidase*) и остављене 20 минута на собној температури без директног излагања светлости. Након инкубације уследило је испирање плоча, а онда је у бунарчиће сипано 100 μ l *Substrate Solution (Color reagent A и Color reagent B у односу 1:1)*. Плоче су остављене на собној температури заклоњене од директне светлости, а након 20 минута додато је 50 μ l раствора за прекидање реакције. После мешања у трајању од неколико минута измерена је оптичка густина узорака на *Microplate Reader*-у (*Zenyth, Anthos, UK*) на таласној дужини од 450nm. Измерене вредности су умањене за вредности апсорбанци слепе пробе (дејонизована вода), и тако направљена стандардна крива помоћу које су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.17. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Експресије IL-1 β , NALP3-а и Gal-3 молекула у ткиву дебелог црева испитиване су имунохистохемијски, коришћењем зечјег поликлонског анти-IL-1 антитела (енгл. *rabbit polyclonal anti- IL-1 antibody*; ABCAM; ab9722), зечјег поликлонског анти- NALP3 антитела (енгл. *rabbit polyclonal to CIAS1/NALP3* ;

АВСАМ; ab91525) и зеџег поликлонског анти- Gal-3 антитела (енгл. *rabbit polyclonal anti- Gal-3 antibody*; АВСАМ; ab53082).

Ткиво је током 24 часа фиксирано у 4%-тном неутралном, пуферизованом формалдехиду и калуљено у парафин. Резови дебљине 4-5 μ m су монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost*[®] и сушени на температури од 56°C у току једног сата. Исечци су депарафинизовани провлачењем кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Процес ослобађања антигена је обављен „кувањем“ у микроталасној пећи на 560W у цитратном пуферу прво два пута по 5 минута и једанпут 8 минута. После тога су плочице испираније текућом водом 5 минута. Овако припремљене плочице су остављене 5 минута у киветама са 3% раствором водоник-пероксида (H₂O₂). Након испирања плочице су пренете у кивете са фосфатним пуфером. Плочице су осушене брисањем и ткиво „овичено“ посебном оловком за ту намену, након чега су плочице постављене на носач у влажној комори. Нането је примарно антитело у запремини од 100 μ l и инкубирано 30-60 минута. По истеку инкубације, плочице су испираније у фосфатном пуферу, кроз три кивете, а затим је на њих нането секундарно антитело, дефинисано препорукама произвођача за свако примарно антитело. Секундарно антитело је такође инкубирано према протоколу произвођача. Како би се визуализовала реакција плочице су инкубиране 5-10 минута са нанетим АЕС (3-*Amino-9-EthylCarbazole*). После испирања узорци су обојени по *Mayer*-у и прекривени покровним стаклом применом глицерола. Позитивнима су се сматрала ћелије обојене црвено/браон.

3.18. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА (PCR)

3.18.1. Изолација RNA

Да би се из ткива дебелог црева изоловала RNA, ткиво је претходно уситњено и лизиранио RNA изолатором (*Invitrogen, Paisley, UK*). Уситњено ткиво је преливено са 250 μ l изолатора. Добијене смеше су скупљене у пластичне епрувете (1,5ml), а након 5 минута инкубације на собној температури додато им је по 50 μ l хлороформа. Након интензивног мешања узорци су инкубирани 10 минута на +4°C, а затим центрифугирани током 15 минута на 12000g на +4°C.

Центрифугирањем су се јасно издвојиле три фракције: горња (водена) фракција у којој је RNA, доња (хлороформска) фракције са протеинима и липидима и интермедијарна фракција у којој је DNA. Водена фракција је скупљена у пластичне епрувете, помешана са изопропропанололом *ana partes* и инкубирана 30 минута на собној температури. Уследило је центрифугирање током 15 минута на 12000g на +4°C, а после одливања супернатанта талог у којем се налази RNA је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500g у 1ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Узорци су потом растварани у 20μl дестиловане воде. Након изолације RNA, узорци су испирани литијум хлоридом, јер DSS инхибира полимеразу и реверзну транскриптазу.

3.18.2. Реверзна транскрипција

Након мерења концентрација на *Gene Quant* колориметру волумену раствора који садржи 1μg RNA додавано је 15μl воде и 0,2μg насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius, Литванија*). Након тога у раствору је додаван и dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат) (*Fermentas, Vilnius, Литванија*) тако да финална концентрација буде 1mM. Као контрола за евентуалну контаминацију служила је вода. Раствори су инкубирани 10 минута на 70°C, да би се прајмери (хексамери) насумично везивали за RNA, по истеку тог времена узорци су пренети на суви лед. Након пет минута у узорке је додавано по 4μl пуфера за реверзну транскрипцију (5 x *First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Литванија*) и 1μl M-MuLV реверзне транскриптазе (200 U/μl, *Fermentas, Vilnius, Литванија*). Уследила је инкубација у трајању од 10 минута на 25°C, а потом 60 минута на 42°C, да би се одиграла реакција реверзне транскрипције. Реакција је прекинута инкубацијом узорака на 70°C током 10 минута. На овај начин добијена је cDNA (комплеметарна DNA), која је у раствору стању чувана на +4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

3.18.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, *real time polymerase chain reaction*)

Реакција ланчаног умножавања у реалном времену је проведена на апарату *ABI Prism 7500 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

Реакције су припремане према стандардном протоколу за QuantiTectSYBR Green RT-PCR у једном кораку (*Applied Biosystems, Cheshire, Велика Британија*), уз употребу комерцијално доступних прајмера за NLRP3 и IL-1 β (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Прајмери за β -актин (*sens 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3'* и *antisens 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3'*) су дизајнирани користећи *Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems, Cheshire, Велика Британија)*. Иницијални корак RT-PCR је био 2 минута на 50°C, праћен задржавањем од 10 минута на 95°C. У реакцији је било 40 циклуса, који су се састојали од 15 подциклуса топљења на 95°C, за којом је следио један минут везивања прајмера за DNA и синтезе DNA ланца на 60°C. Све реакције су рађене у трипликату. Праг анализе циклуса (*Ct, cycle of threshold*) је био подешен на 0,1 релативних флуоросцентних јединица. Просечне *Ct* вредности контролних трипликаата (актин) су одузете од просечних *Ct* вредности трипликаата гена од интереса и на тај начин је добијен ΔCt , док је релативна експресија гена изражена као $2^{-\Delta Ct}$. Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, која је арбитрарно подешена на 1.

3.19. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 19. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов *t* тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев *U* тест. Резултати експеримента су изражени као вредност \pm стандардна грешка (енгл. *Standard error/Mean, SEM*). Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности $p < 0.05$, а статистички веома значајним означене су оне за које је $p < 0.01$. *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикана и табела.

4. РЕЗУЛТАТИ

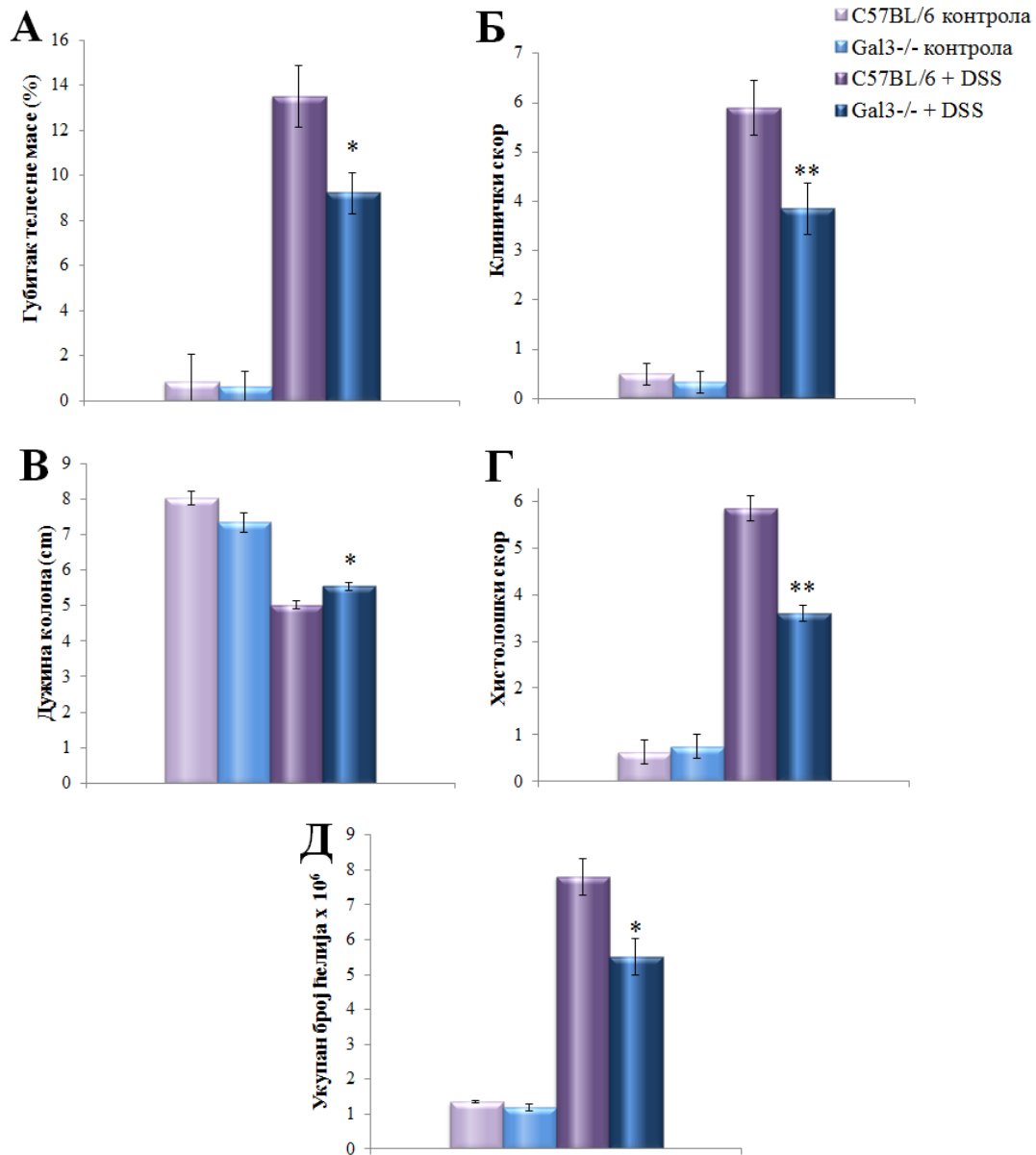
4.1. Делација гена за Gal-3 значајно смањује оштећење ткива дебелог црева изазвано DSS-ом

Тежина болести као и степен оштећења ткива дебелог црева процењивани су одређивањем клиничког скорa, мерењем дужине колона и анализом патохистолошких промена у исечцима ткива колона добијених након жртвовања животиња седмог дана примене DSS-а. Добијени резултати јасно указују да делација гена за Gal-3 значајно ублажава болест и смањује оштећење ткива дебелог црева.

Клинички скор је одређиван свакодневним праћењем следећих показатеља: телесна маса, ректално крварење и конзистенција фецеса како је детаљно описано у поглављу 3.3. Gal3^{-/-} мишеви су спорије губили телесну масу него C57BL/6 мишеви, ова разлика је статистички значајна (Фигура 1A). Видљиво крварење из дебелог црева је било израженије у C57BL/6 мишева (Слика 11). Gal3^{-/-} мишеви су током експеримента имали углавном нормално формиране столице, док се код C57BL/6 мишева појавила дијареја од петог дана експеримента. Тако је укупан клинички скор Gal3^{-/-} мишева био статистички значајно мањи него у C57BL/6 мишева.



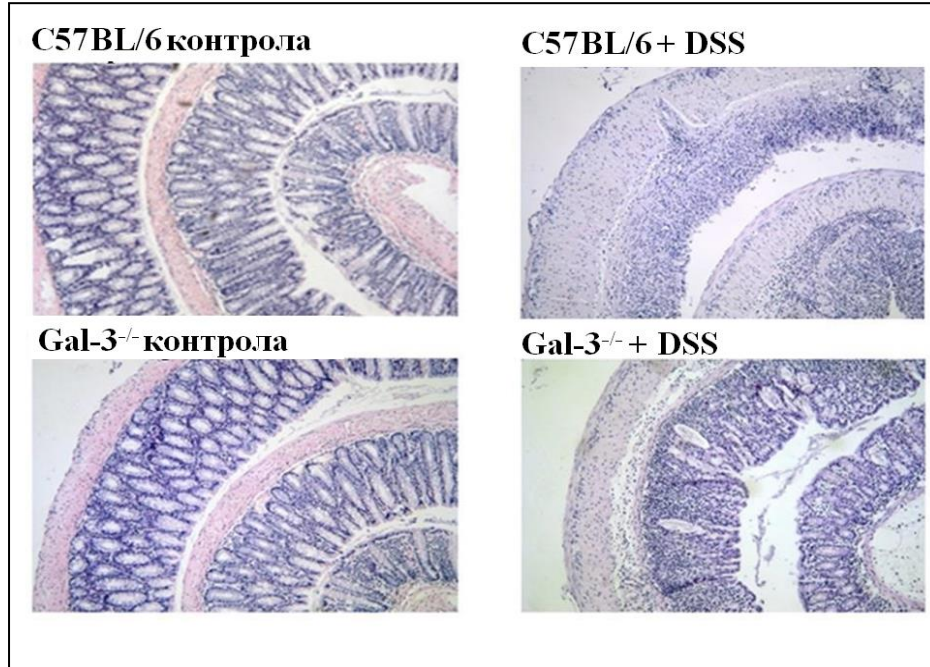
Слика 11. Крварење из дебелог црева у C57BL/6 након седмодневне примене DSS-а (означено стрелицом).



Фигура 1. Делеција гена за Gal-3 значајно смањује оштећење колона изазвано DSS-ом. **А.** Губитак телесне масе у процентима. **Б.** Клинички скор C57BL/6 и Gal3^{-/-} мишева након 7 дана примене DSS-а. Клинички скор је статистички значајно мањи у Gal3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 мишевима. **В.** Дужина колона C57BL/6 и Gal3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а. Дужина колона је статистички значајно мања у C57BL/6 мишева. **Г.** Хистолошки скор C57BL/6 и Gal3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а. **Д.** Укупни број инфламацијских ћелија је статистички значајно мањи у Gal3^{-/-} мишеваима. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност ± SE (експерименталне групе: 40 мишева по групи; контролне групе: 10 мишева по групи) (*p < 0.05, **p < 0.01).

Још један параметар оштећења дебелог црева је скраћење дужине колоне. Дужина колоне у $Gal-3^{-/-}$ мишева била је статистички значајно већа у поређењу са дужином овог органа у C57BL/6 мишева (Фигура 1В).

Патохистолошка анализа дебелог црева је обухватала следећа два параметра: оштећење и инфилтрација ткива имунским ћелијама. Ова анализа је показала значајно мање оштећење ткива колоне у $Gal-3^{-/-}$ мишева (Фигура 1 Г; Слика 12), праћено израженијом инфилтрацијом инфламацијских ћелијама. Такође је у ткиву колоне C57BL/6 мишева јасно видљива деструкција крипти, ерозија епитела и истањење ламине проприје, док су и ако присутне ове промене значајно мање изражене у $Gal-3^{-/-}$ мишева. За разлику од јасно видљивих, дифузних и изражених инфилтрата инфламацијских ћелија који захватају све слојеве зида колоне C57BL/6 мишева код $Gal-3^{-/-}$ мишева инфилтрата су мање целуларни и углавном ограничени (Слика 12). Проточном цитометријом је утврђено да је број инфламацијских ћелија у ламини проприји $Gal-3^{-/-}$ мишева статистички значајно мањи него код C57BL/6 мишева (Фигура 1Д).



Слика 12. Репрезентативни исечци ткива колоне након примене DSS-а. Репрезентативни исечци ткива колоне обојени стандарним патохистолошким бојењем (увећање 100х). На левој страни слике су приказани ткивни исечци контролних, а на десној страни експерименталних мишева.

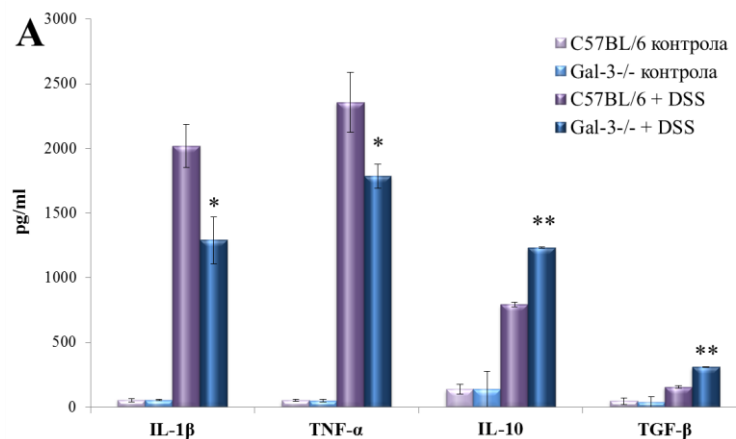
4.1.1. Концентрације антиинфламацијских TGF- β и IL-10 су веће док су концентрације проинфламацијских цитокина IL-1 β и TNF- α мање у Gal-3^{-/-} мишева након примене DSS-а

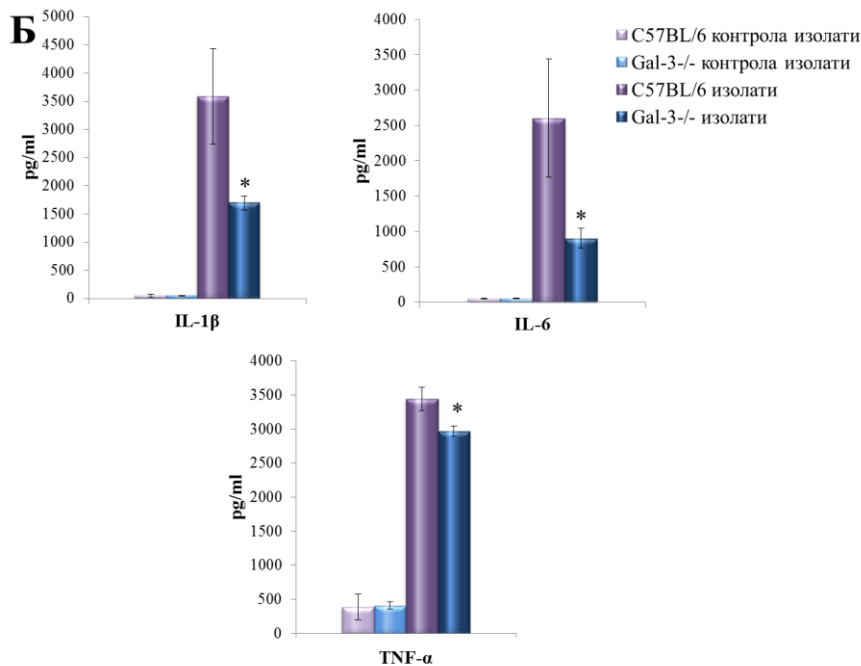
Како је код Gal-3^{-/-} мишева уочен мањи клинички скор, значајно слабије оштећење ткива колона и мањи број инфламацијских ћелија у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева испитано је да ли су ове разлике последица у разлике у продукцији проинфламацијских vs антиинфламацијских цитокина. Концентрације цитокина одређиване су у серуму мишева седмог дана експеримента ELISA методом.

Као што се јасно види на Фигури 2А концентрације антиинфламацијских цитокина (IL-10 и TGF- β) су биле статистички значајно веће у серумима Gal-3^{-/-} него у C57BL/6 мишевима. Истовремено, делеција гена за Gal-3 је узроковала и статистички значајно смањење концентрација IL-1 β и TNF- α у серуму оболелих мишева.

Ови налази корелирају са смањењим концентрацијама истих цитокина али и IL-6 измереним у изолатима ткива колона Gal-3^{-/-} мишева (разлике у концентрацијама IL-6 у серумима нису досезале ниво статистичке значајности) (Фигура 2Б).

Концентрације свих анализираних цитокина у серуму и изолатима ткива колона нетретираних Gal-3^{-/-} мишева нису се статистички значајно разликовале од концентрације испитиваних цитокина у нетретираних C57BL/6 мишева.



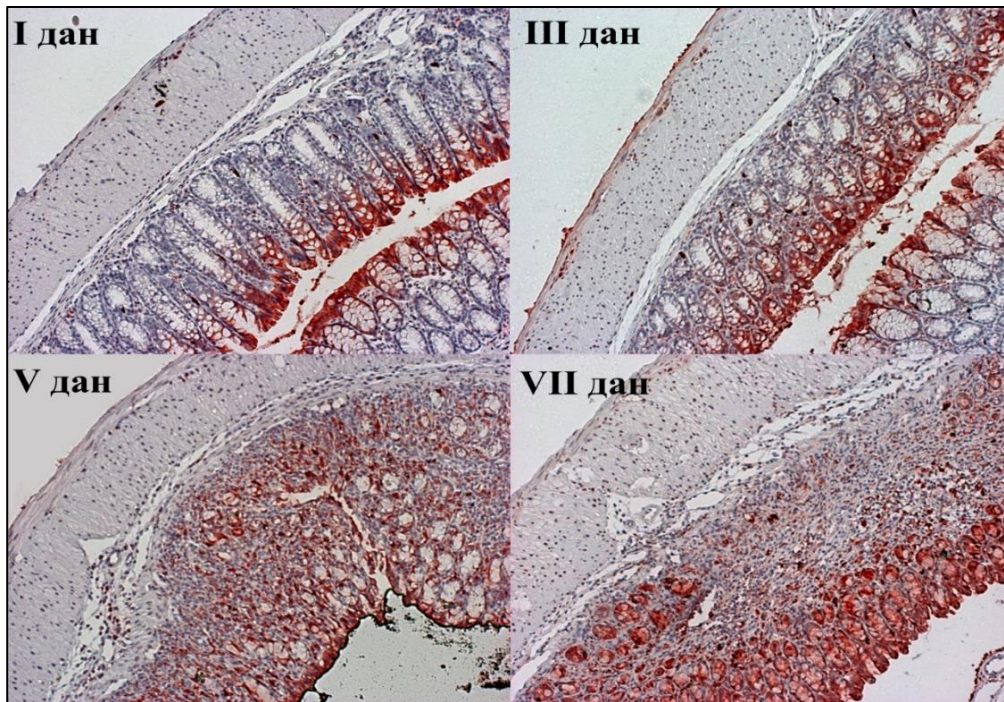


Фигура 2. Вредности концентрација цитокина у серуму и у изолатима ткива колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. А. Серуми: концентрација IL-1 β и TNF- α је статистички значајно мања у серуму Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а у поређењу са концентрацијом серумских цитокина у C57BL/6 мишева, док је концентрација TGF- β и IL-10 била статистички значајно повећана. Није било статистички значајне разлике у концентрацији серумских цитокина између контролних група. **Б. Изолати:** концентрација IL-1 β , TNF- α и IL-6 је статистички значајно мања у изолатима ткива колона Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а у поређењу са концентрацијама ових цитокина у C57BL/6 мишева. Није било статистички значајне разлике у концентрацији цитокина у ткиву црева између контролних група. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (експерименталне групе: 20 мишева по групи; контролне групе: 8 мишева по групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.2. Експресија Gal-3 молекула у ткиву дебелог црева

Након запажања да делеција гена за Gal-3 редукује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом, C57BL/6 мишеви су жртвовани у различитим временским интервалима (првог, трећег, петог и седмог дана) током примене DSS-а и анализирана је динамика експресије Gal-3. Имунохистохемијским бојењем је показано да у току прогресије болести континуално расте и експресија Gal-3 у ткиву колона (Слика 13).

Док се првог дана уочава релативно мали број епителних ћелија позитивних на Gal-3 у неизмењеним криптама трећег дана број оваквих ћелија расте да би се петог дана овом повећању експресије Gal-3 у цитоплазми и једру придружила ерозија крипти уз појаву јасно уочљивих инфилтрата инфламацијских ћелија. Завршног дана експеримента велика већина ћелија је позитивна на Gal-3, у свим слојевима до тунике мускуларис.

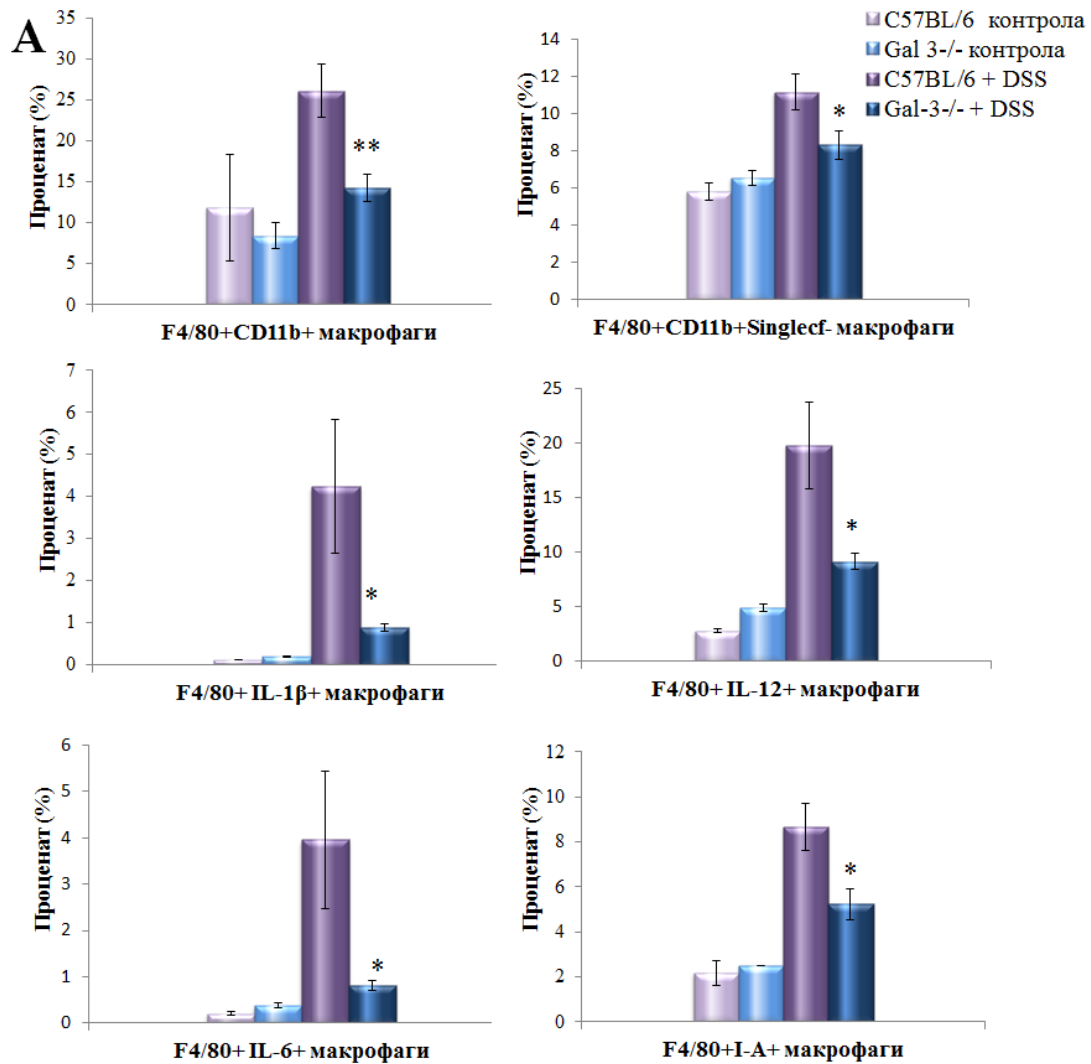


Слика 13. Експресија Gal-3 у ткиву колона C57BL/6 мишева у различитим временским интервалима.

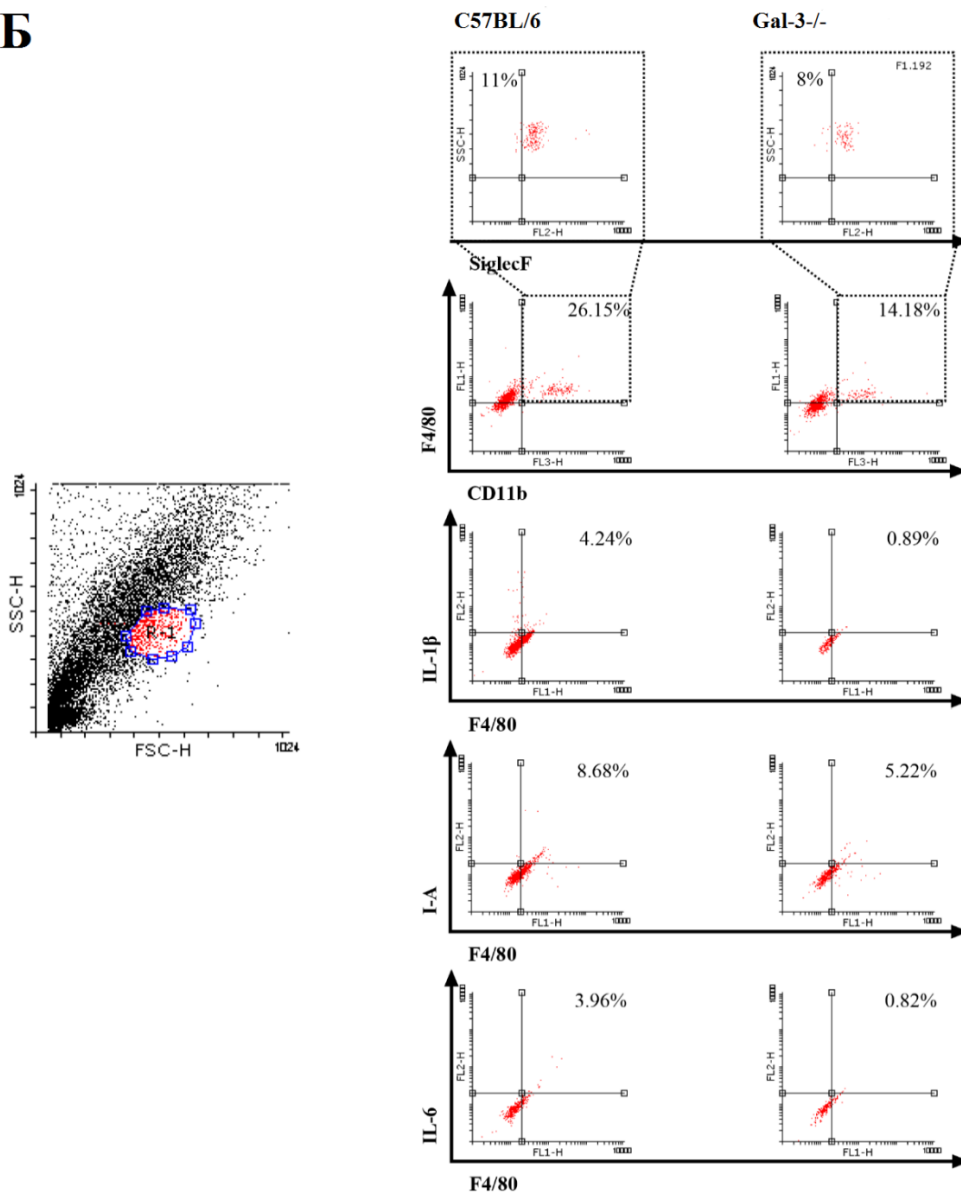
4.2. Укупан број и процентуална заступљеност M1 је значајно мања а M2 макрофага већа, у оболелих Gal-3^{-/-} мишева

Налаз значајно тежег оштећења ткива као и израженија инфилтрација инфламацијским ћелијама у C57BL/6 мишева имплицирали су претпоставку да би макрофаги, односно њихова биполарна активација, могли бити одговорни за уочене разлике. Зато су проточном цитометријом, одређивани како проценат и број инфилтрушићних макрофага тако и функционални фенотип ових ћелија у ламини проприји оболелих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева седмог дана експеримента.

У ламини проприји регистрован је статистички значајно мањи проценат F4/80+CD11b+ и F4/80+CD11b+SinglecF- (*colonic*) макрофага. Унутар популације F4/80+CD11b+ макрофага запажа се статистички значајна доминација ћелија које продукују IL-1 β , IL-6 и IL-12 и експримирају молекул II класе МНС у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 3).

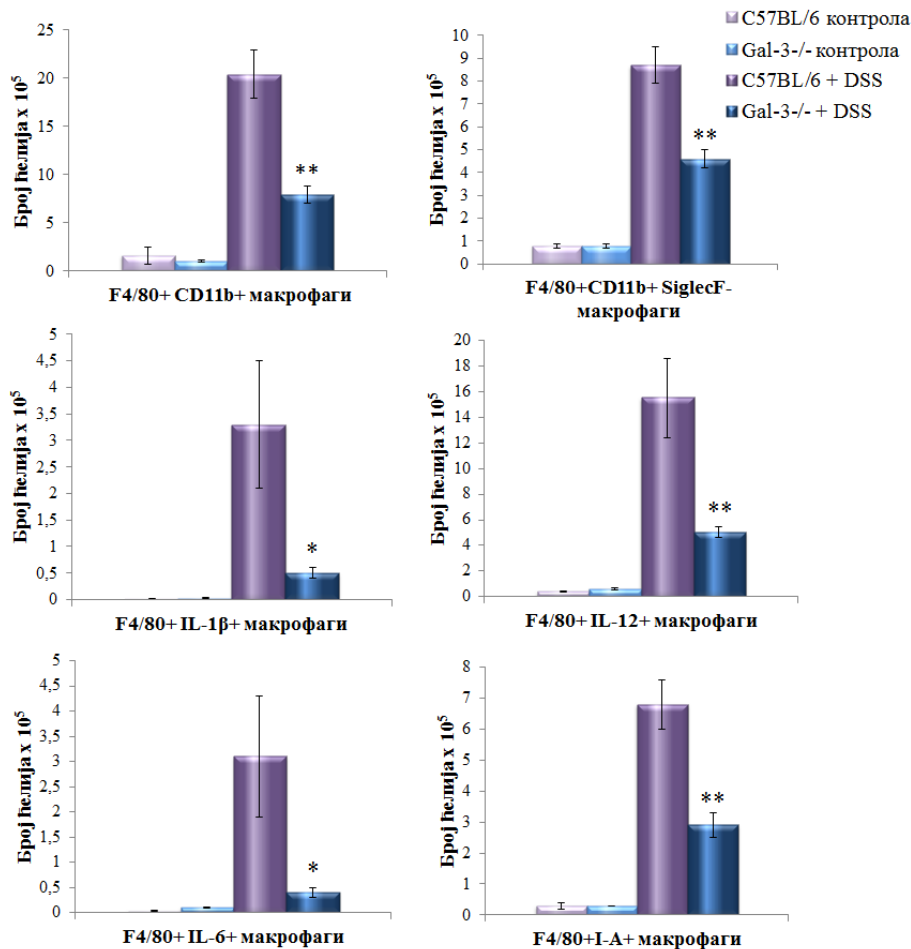


Б



Фигура 3. Процентуална заступљеност макрофага различитих функционалних фенотипа у ламини проприји колона. А. Запажен је статистички значајно мањи проценат F4/80+CD11b+ макрофага који продукују IL-1β и IL-6 као и број F4/80+CD11b+SiglecF- *colonic* макрофага у ламини проприји Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима 7 дана након примене DSS-а. Б. Репрезентативни *dot plots* добијени проточном цитометријом. Први *dot plot* показује *gate*-оване ћелије; други *dot plot* репрезентује проценат F4/80+CD11b+ макрофага колона, F4/80+CD11b+SiglecF- (*colonic*) макрофага, као и макрофага који експримирају IL-1β, IL-6 и молекула II класе МНС у ткивном изолату добијеном из ламине проприје оболелих C57BL/6 мишева; трећи *dot plot* показује респективне проценте истих ћелија изолованих из Gal-3^{-/-} миша. Измерене вредности су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Уочене разлике у процентуалној заступљености различитих популација макрофага запажене су и када је анализиран апсолутни број тих популација у узорцима, па је тако број макрофага у ламини проприји Gal-3^{-/-} статистички значајно мањи него у C57BL/6 мишева. Такође је у ламини проприји Gal-3^{-/-} мишева мањи и апсолутни број F4/80+CD11b+ и F4/80+CD11b+SiglecF- *colonic* макрофага, као и макрофага који продукују IL-1 β , IL-6, IL-12 и експримирају молекулу II класе МНС (Фигура 4).



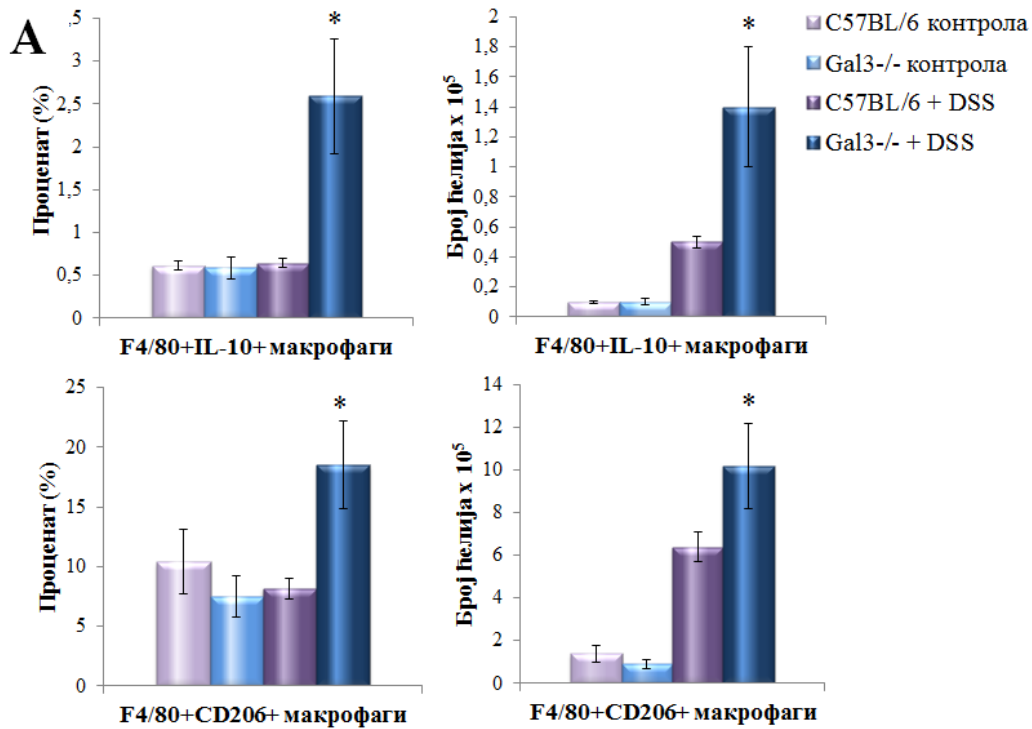
Фигура 4. Бројчана заступљеност популација макрофага у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Број F4/80+CD11b+ макрофага који продукују IL-1 β и IL-6 као и број F4/80+CD11b+SiglecF- *colonic* макрофага у ламини проприји ткива колона Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно мањи у поређењу са овим профилима макрофага у C57BL/6 мишева 7 дана након примене DSS-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2.1. Делеција гена за Gal-3 олакшава алтернативну активацију макрофага

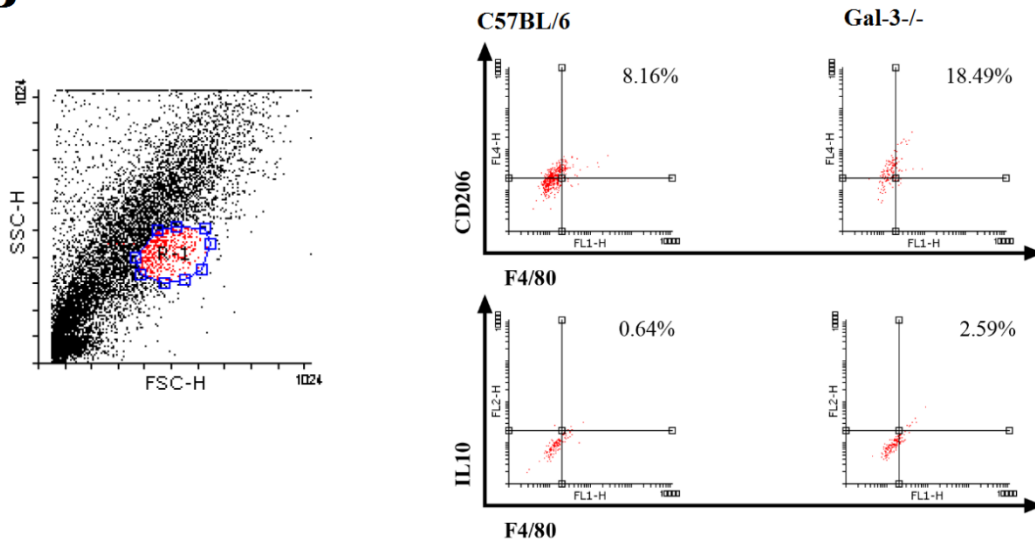
Уочено значајно смањење процента и броја M1 макрофага у ламини проприји Gal-3^{-/-} мишева имплицирало је претпоставку да делеција гена за Gal-3 утиче на активацију макрофага.

У том циљу, анализирана је релативна заступљеност и апсолутан број F4/80+CD206⁺ и F4/80+IL-10⁺ алтернативно активисаних макрофага у ламини проприји C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

Број и проценат макрофага који експримирају CD206 (рецептор за манозу) као и макрофага који продукују IL-10 статистички значајно је већи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 5А).



Б



Фигура 5. Процент и број M2 макрофага у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

А. Број и проценат макрофага који експримирају CD206 и макрофага који продукују IL-10 је био статистички значајно већи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 мишевима. Б. Репрезентативни *dot plots* проточне цитометријске анализе. Први *dot plot* показује *gate*-оване ћелије; други *dot plot* репрезентује проценат F4/80+CD206+ макрофага колона и макрофага који продукују IL-10, а који су изоловани из C57BL/6 мишева; трећи *dot plot* показује проценат ових макрофага, а који су изоловани из Gal-3^{-/-} миша. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

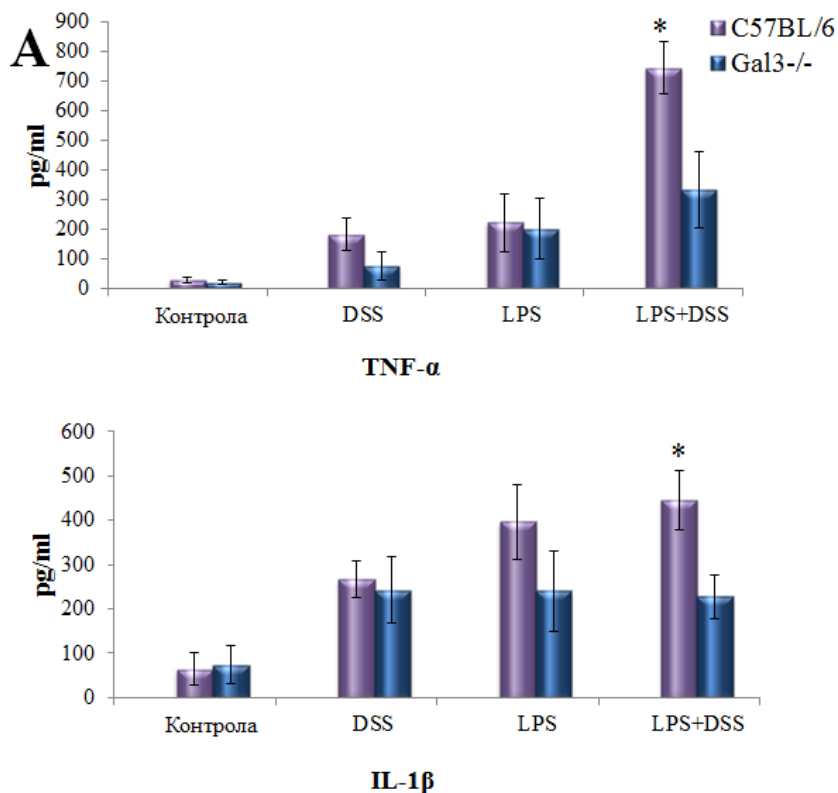
Значајна разлика у проценту M2 фенотипа макрофага у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева је приказана и репрезентативним дотпловима (Фигура 5Б). Није било статистички значајне разлике у проценту и броју анализираних ћелија између мишева контролних група.

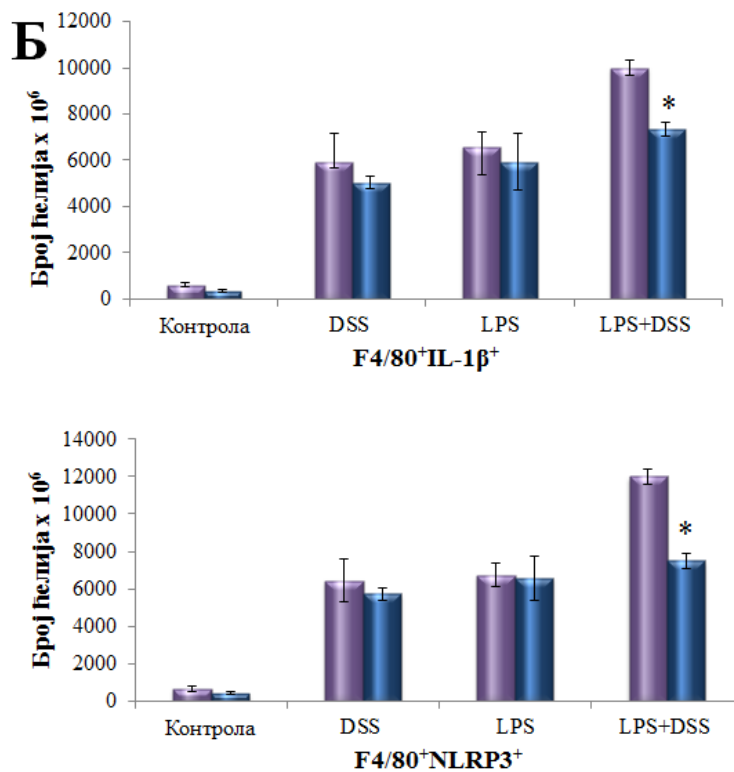
Добијени подаци показују да делеција гена за Gal-3 олакшава алтернативну активацију макрофага у колитису изазваном DSS-ом.

4.2.2. Перитонеални макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева активисани *in vitro* липополисахаридом и DSS-ом продукују мање TNF- α и IL-1 β

Пошто је показана разлика у броју и проценту макрофага у ламини проприји C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева, испитано је да ли се ова разлика може успоставити и *in vitro*. Макрофаги изоловани из перитонеума здравих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева стимулирани су липополисахаридом и DSS-ом. Концентрације TNF- α и IL-1 β су мерене у супернатантима 48 сати инкубације ELISA техником. Измерене концентрације цитокина у супернатантима перитонеалних макрофага Gal-3^{-/-} мишева су биле статистички значајно мање него у C57BL/6 (Фигура 6А).

Проточном цитометријом показано је да су макрофаги изоловани из перитонеума здравих Gal-3^{-/-} мишева а потом стимулирани и LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање IL-1 β и експримирали статистички значајно мање NLRP3 у поређењу са C57BL/6 макрофагима (Фигура 6Б).





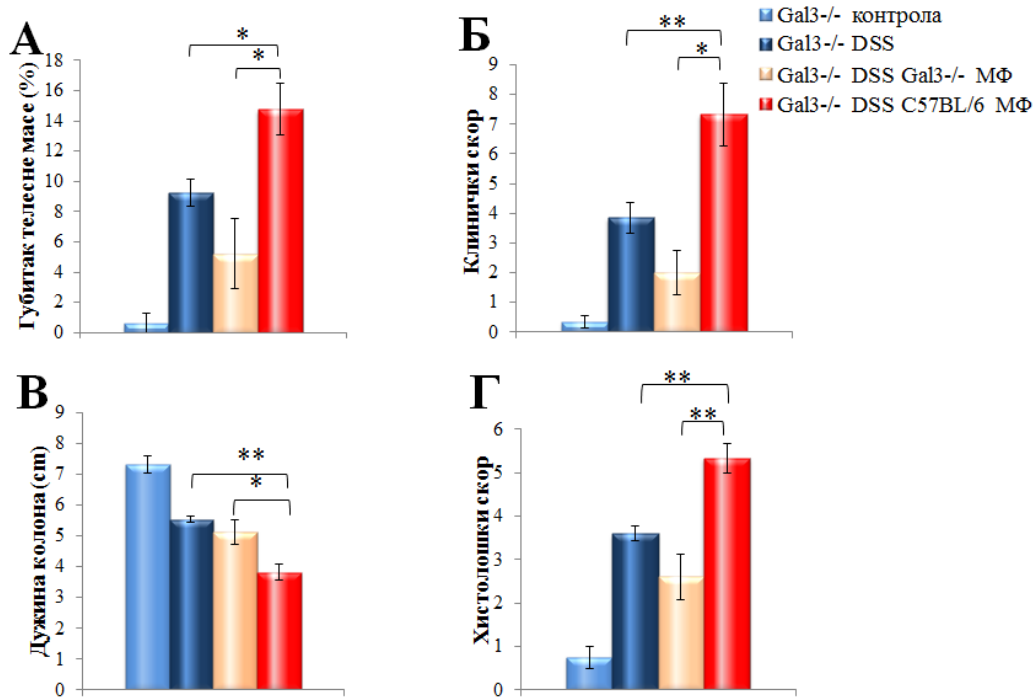
Фигура 6. *In vitro* стимулирани макрофаги изоловани из перитонеума здравих мишева. **А.** Макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева стимулирани LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање TNF-α и IL-1β. **Б.** Макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева стимулирани LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање IL-1β и експримирали статистички значајно мање NLRP3. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (10 мишева по групи) (*p<0.05, **p<0.01).

4.2.3. Адоптивни трансфер перитонеалних макрофага

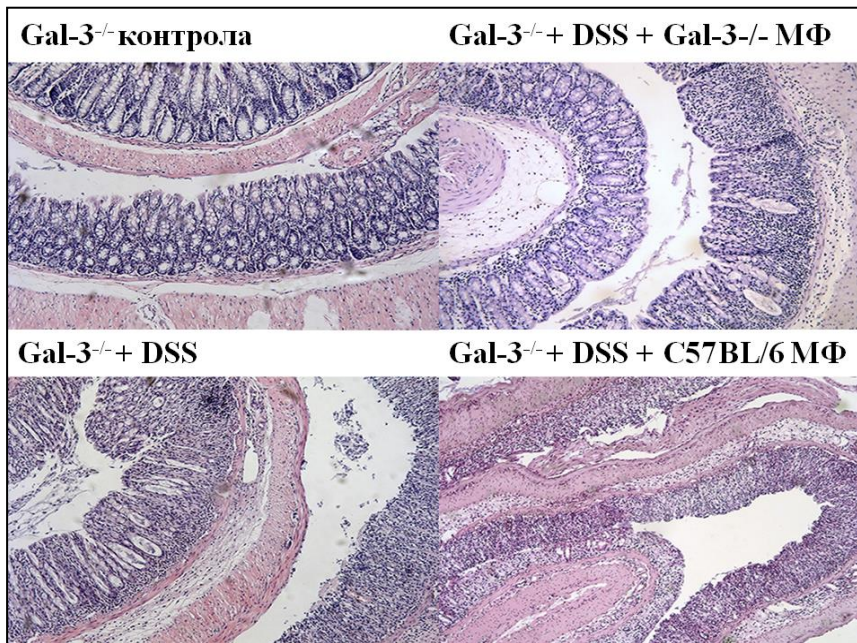
Свакодневни адоптивни трансфер перитонеалних макрофага (10⁶ ћелија), изолованих из здравих C57BL/6 животиња, у Gal-3^{-/-} мишеве на седмодневном третману DSS-ом значајно је погоршао клиничке манифестације болести праћене израженијим оштећењима ткива колона (Фигура 7). Тако је губитак телесне масе, као и укупни клинички скор, био статистички значајно већи у Gal-3^{-/-} мишева који су примили перитонеалне макрофаге C57BL/6 мишева (Фигура 7А, Б).

Gal-3^{-/-} мишеви који су примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња имали су статистички значајно краћи колон (Фигура 7В) и израженија оштећења ткива колона (Слика 14). Забележено је екстензивно

оштећење мукозе и дубљих структура зида колона, као и појачано присуство инфламацијских ћелија у субмукози колона овако третираних животиња. Хистолошки скор Gal-3^{-/-} мишевима који су адоптивним трансфером примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња је био значајно већи него скор Gal-3^{-/-} мишева којима нису трансферисане ћелије.

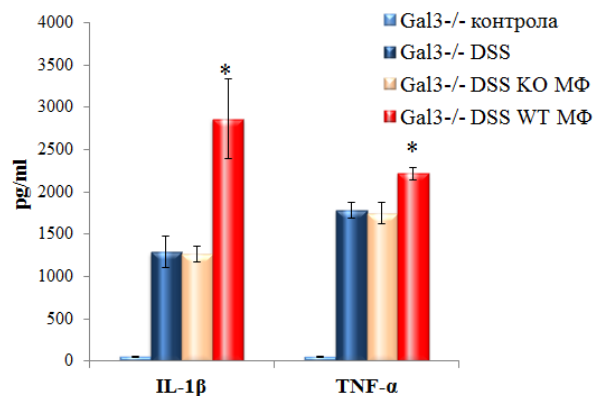


Фигура 7. Адоптивни трансфер перитонеалних макрофага. Адоптивни трансфер перитонеалних макрофага изолованих из здравих C57BL/6 животиња значајно је погоршао оштећење ткива колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. **А.** Процент губитка телесне масе након адоптивног трансфера макрофага. **Б.** Клинички скор. **В.** Скраћење дужине колона након адоптивног трансфера макрофага. **Г.** Хистолошки скор. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p < 0.05, **p < 0.01).



Слика 14. Репрезентативни патохистолошки препарати након адаптивног трансфера перитонеални макрофага (100x). На десној страни слике приказани су ткивни исечци $Gal-3^{-/-}$ мишева након адаптивног трансфера C57BL/6 и $Gal-3^{-/-}$ макрофага.

Концентрације IL-1 β и TNF- α у серуму $Gal-3^{-/-}$ мишева, који су примили макрофаге изоловане из здравих C57BL/6 мишева су биле статистички значајно веће него концентрације истих цитокина у мишева којима нису трансферисани макрофаги (Графикон 1).

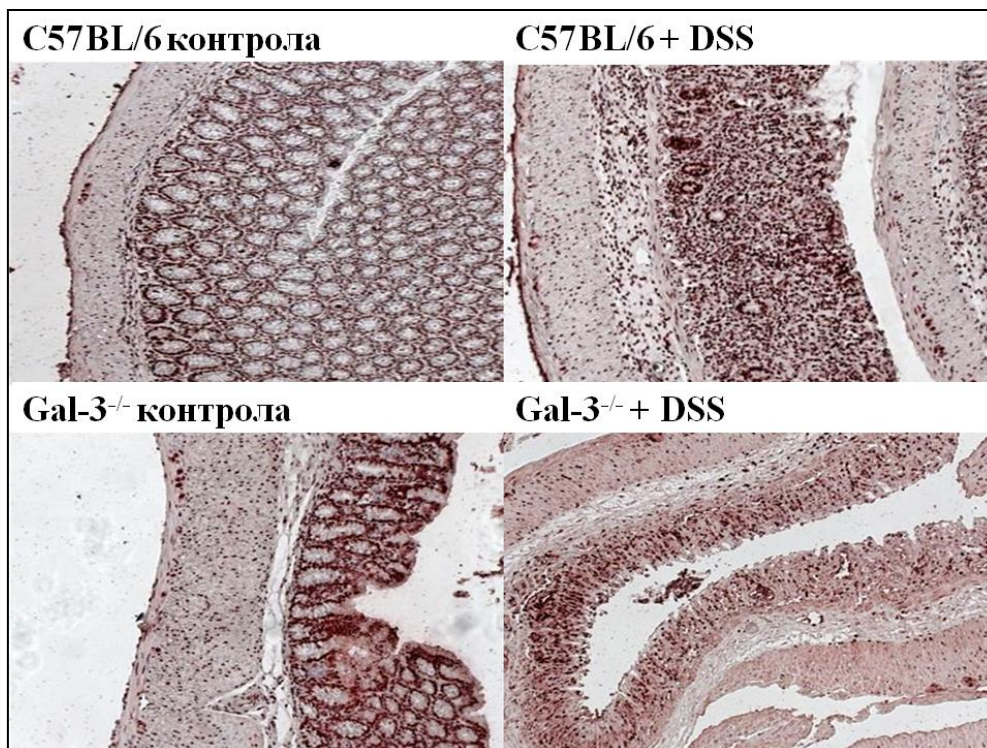


Графикон 1. Промене концентрације цитокина у $Gal-3^{-/-}$ мишева након адаптивног трансфера макрофага. Адаптивни трансфер перитонеалних макрофага здравих C57BL/6 животиња значајно је повећао продукцију IL-1 β и TNF- α у $Gal-3^{-/-}$ мишева третираних само DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

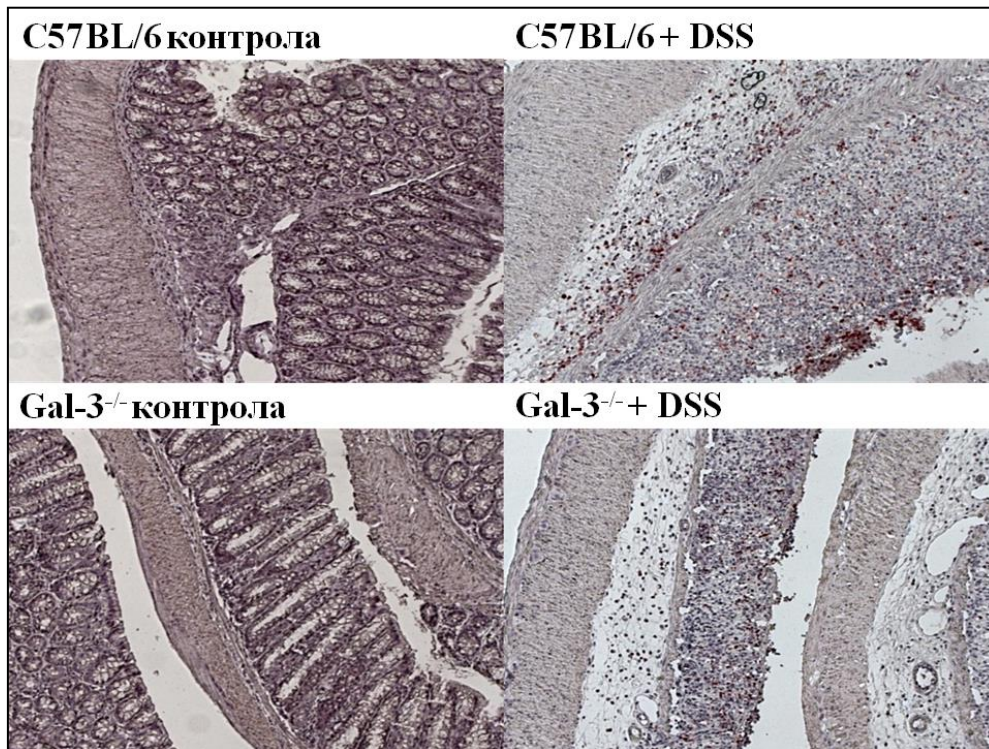
4.2.4. Делеција гена за Gal-3 смањује експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона

У ткиву колона одређивана је експресија NALP-а и IL-1 β имунохистохемијском и PCR методом.

У експерименталном колитису изазваном DSS-ом делеција гена за Gal-3 узрокује мању експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона (Слика 15а и б). На ткивним препаратима C57BL/6 мишева се уочава значајно већа дифузна инфилтрација која досеже до субмукозе у поређењу са ткивним препаратима Gal-3^{-/-} мишева. У Gal-3^{-/-} мишева уочава се мања инфилтрација инфламацијским ћелијама уз очувану морфологију крипти. Цитоплазматска експресија NALP-а и IL-1 β је била значајно већа у инфилтратима C57BL/6 мишева у поређењу са ткивним препаратима Gal-3^{-/-} мишева.

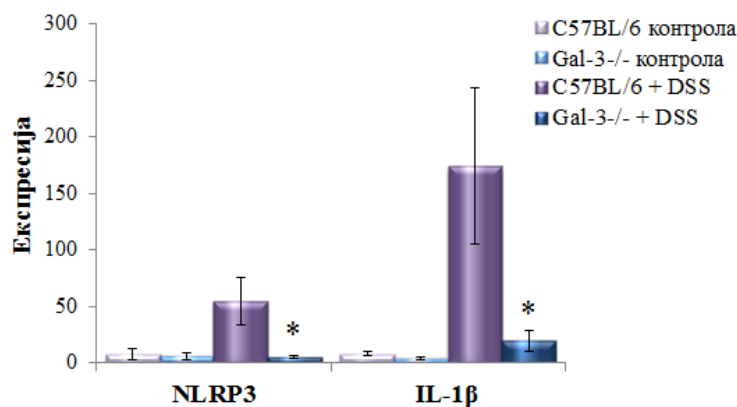


Слика 14а. Експресија NALP-а у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом.



Слика 146. Експресија IL-1 β у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом.

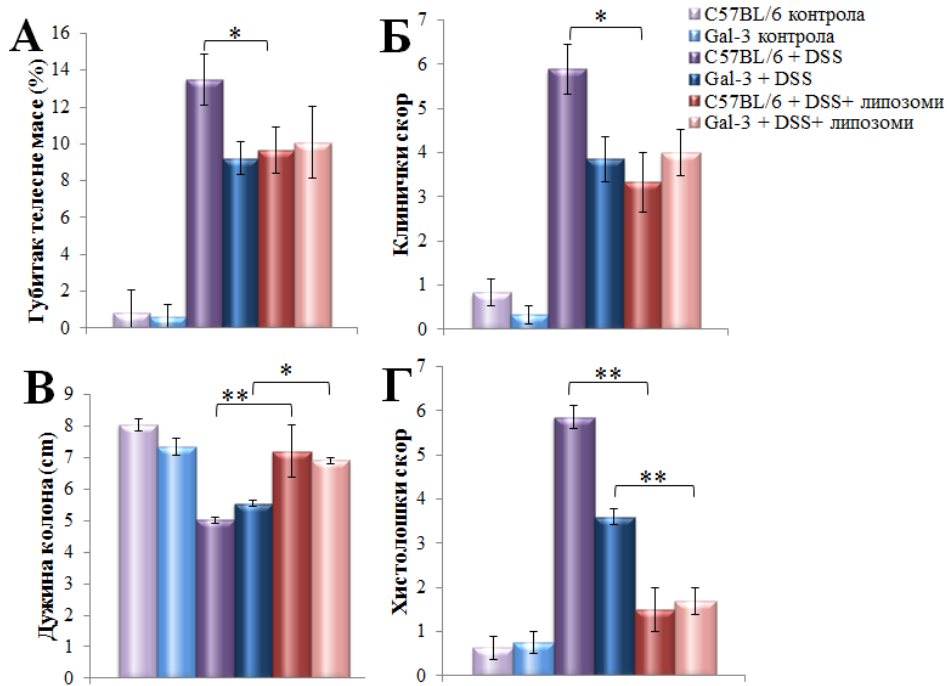
Експресија гена за NLRP3 и IL-1 β је одређивана у ткиву колона методом PCR. Експресија ових гена у ткиву колона је била статистички значајно мања у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са експресијом ових гена у C57BL/6 мишева (Графикон 2).



Графикон 2. Смањена експресија гена за NALP и IL-1 β у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. У ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом била је смањена експресија гена за NALP и IL-1 β . Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

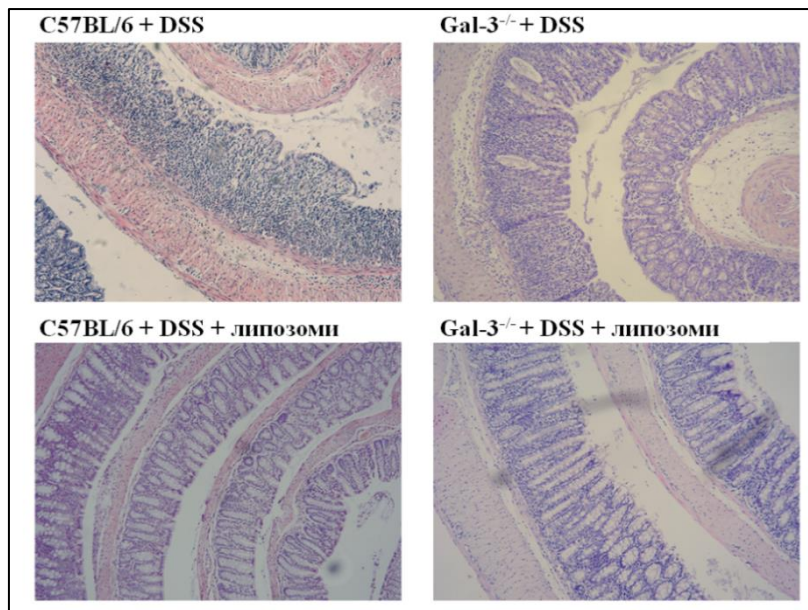
4.2.5. Деплеција макрофага укида разлике у тежини болести и степену оштећења ткива између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева

Да би се утврдио утицај макрофага у овом моделу акутног колитиса, ове ћелије су деплетирале липозомима (-4, 0, 2, 4 и 6-ог дана експеримента). Деплеција макрофага је значајно ублажила болест у обе експерименталне групе (Фигура 8). Није било значајне разлике у губитку телесне масе, у клиничком скору, као ни у скраћењу дужине колоне након примене липозома између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 8А, Б и В). Патохистолошким анализом је потврђено да није било статистички значајне разлике у нарушавању морфологије ткива колоне у групама животиња које су примиле липозоме (Фигура 8Г; Слика 16). У групама мишева које су примиле липозоме не уочава се инфилтрација инфламацијским ћелијама, као ни деструкција крипти. Хистолошки скор C57BL/6 мишева који су примиле липозоме је био статистички значајно мањи у поређењу са хистолошким скором C57BL/6 мишева који су примали само DSS. На ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су примали DSS уочавају се збрисане структуре крипти и инфилтрација инфламацијским ћелијама дуж свих слојева колоне, као и истаљена ламина проприја. Насупрот томе, C57BL/6 мишеви који су примиле липозоме имају очувану морфологију крипти са минималним инфилтрацијом инфламацијским ћелијама око бази крипти. Оштећење ткива колоне Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом је било статистички значајно веће у поређењу са оштећењем ткива колоне Gal-3^{-/-} мишева који су примиле липозоме. На ткивним препаратима Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом уочава се изражен крипитис са местимичним криптим апцесима и највећим делом очуваним структурама крипти, док је инфилтрација ограничена на мукозу. Патохистолошким анализом препарата Gal-3^{-/-} мишева који су примиле липозоме уочава се очувана ламина проприја колоне, прожета ретком инфилтрацијом.



Фигура 8. Деpleција макрофага у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. А, Б, В, Г.

Није било значајне разлике у губитку телесне масе, у клиничком скору, као ни у скраћењу дужине колона након примене липозома између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Није било значајне разлике у хистолошком скору између група које се примиле липозоме. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).



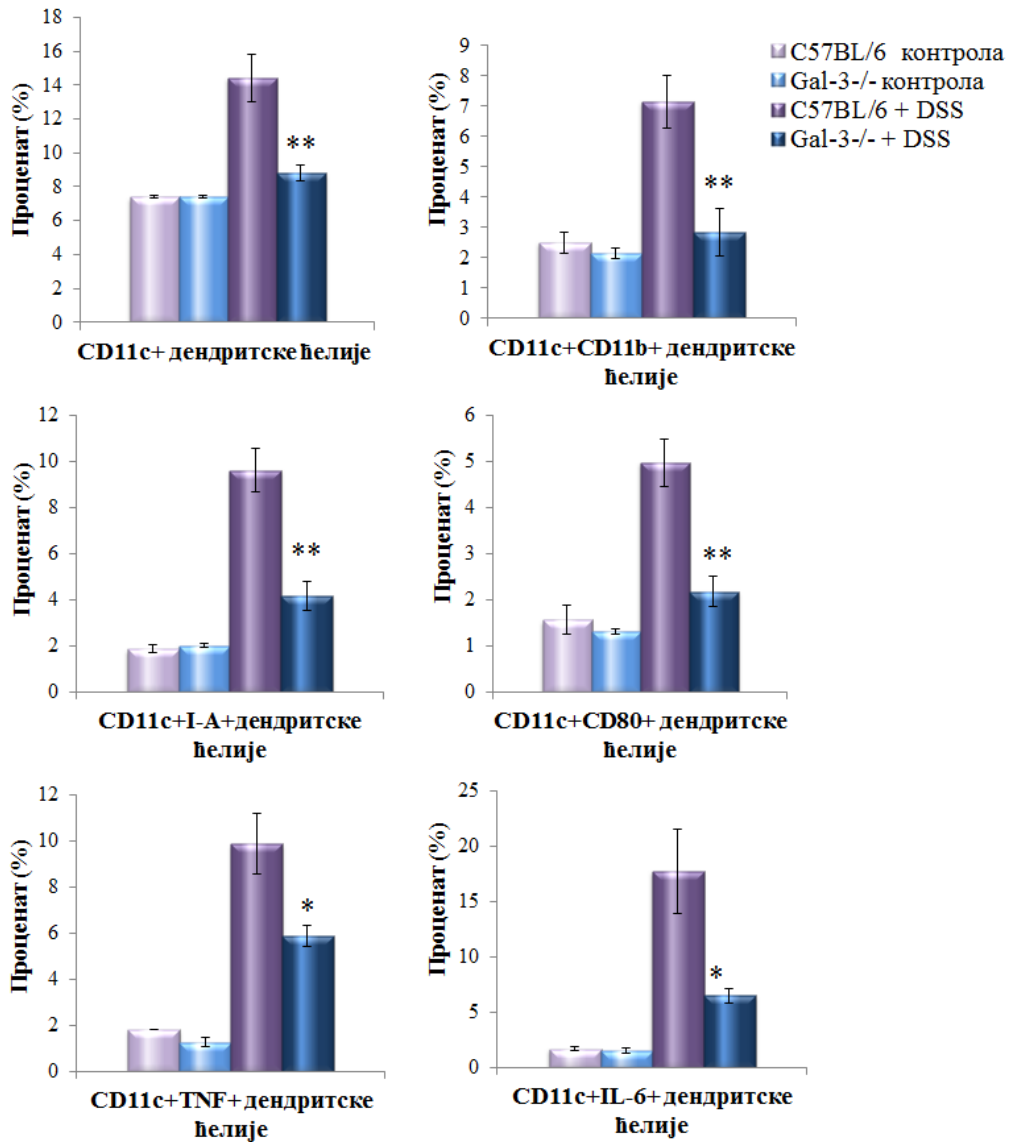
Слика 16. Репрезентативни патохистолошки препарати C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након примене липозома (100x).

4.3. У ламини проприји оболелих Gal-3^{-/-} мишева присутно је мање инфламацијских а више регулаторних дендритских ћелија

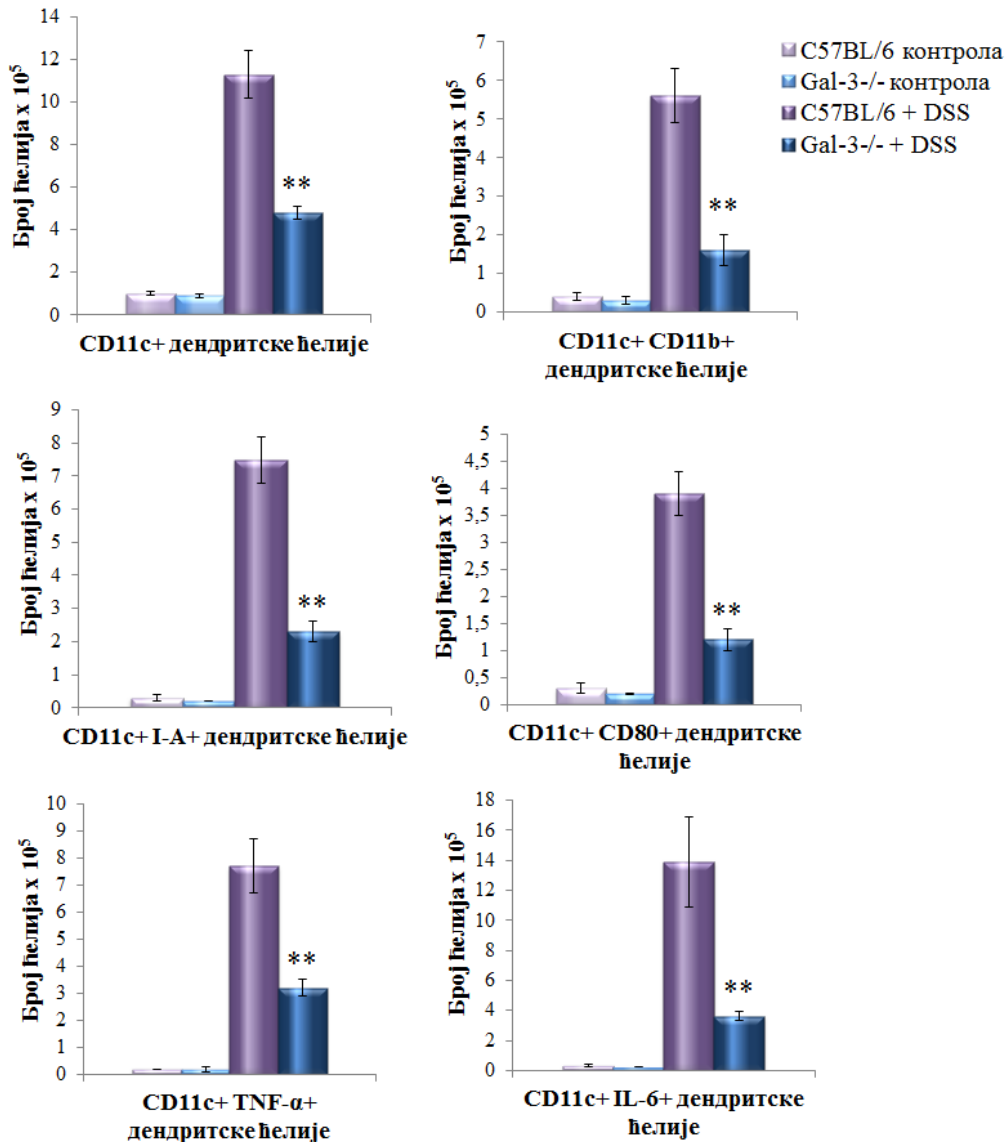
Након испитивања улоге макрофага у колитису изазваном DSS-ом, наметнуло се испитивање популација дендритских ћелија. Тако је у изолатима ламине проприје одређиван проценат и број CD11c⁺ дендритских ћелија, а унутар те популације одређиван проценат ћелија које експримирају II класу МНС (I-A), CD80, CD11b⁺ као и ћелија које продукују TNF α и IL-6.

У ламини проприји Gal-3^{-/-} мишева забележен је статистички значајно мањи проценат како укупних CD11c⁺ ћелија тако и њихових субпопулација: CD11b⁺, TNF α ⁺ и IL-6⁺, МНС II⁺ и CD80⁺ (Фигура 9). Није постојала статистички значајна разлика у проценту дендритских ћелија између контролних група (Фигура 9).

Разлике у процентуалној заступљености су се одразиле и на укупне бројеве ћелијских субпопулација издвојених из ламине проприје, па је тако број дендритских (CD11c⁺) као и инфламацијских дендритских ћелија (CD11c⁺ CD11b⁺) је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима (Фигура 10). Дендритске ћелије које експримирају молекул II класе МНС као и CD80 су статистички мање заступљене у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Број дендритских ћелија које продукују TNF- α и IL-6 је такође био статистички значајно мањи у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 10).



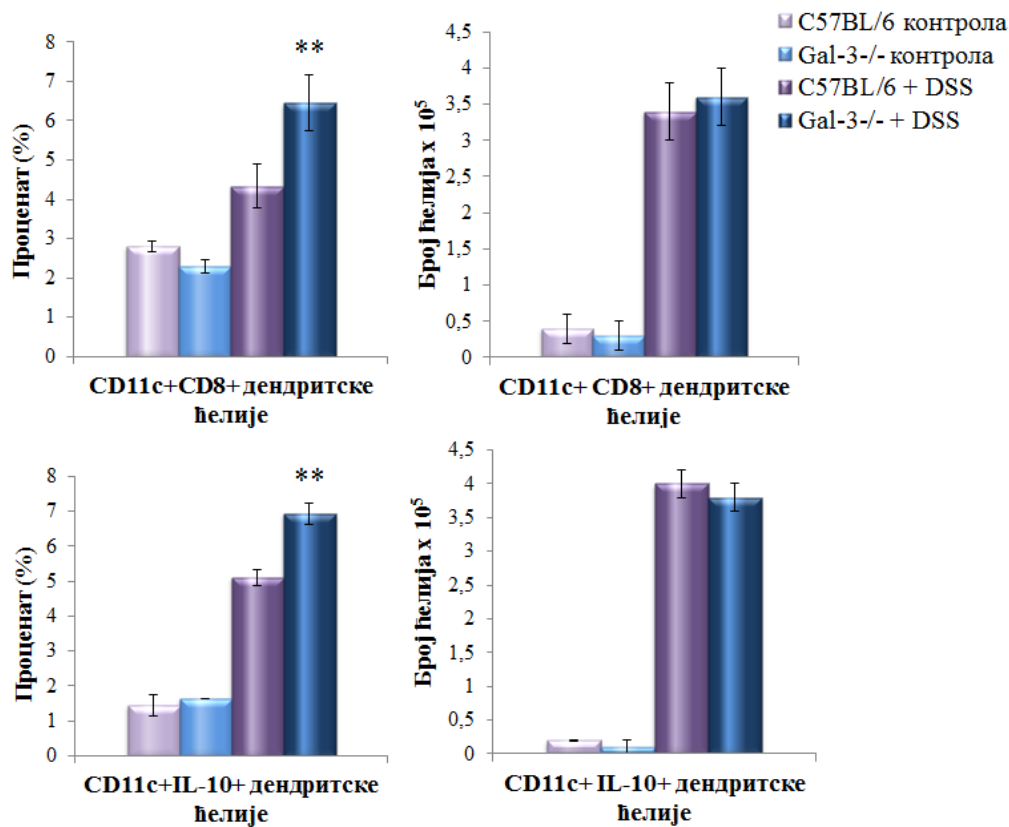
Фигура 9. Процент дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент CD1c+, CD11c+CD11b+, CD11c+I-A+, CD11c+CD80+, као и оних које продукују TNF- α и IL-6 је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 мишевима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).



Фигура 10. Укупни бројеви за популације дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Број CD11c+, CD11c+CD11b+, CD11c+I-A+, CD11c+CD80+, као и оних које продукују TNF-α и IL-6 је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Одређивани су и процентуални и нумерички односи субпопулација регулаторних дендритских ћелија CD11c+CD8+ као и дендритских ћелија које продукују IL-10 у ламини проприји.

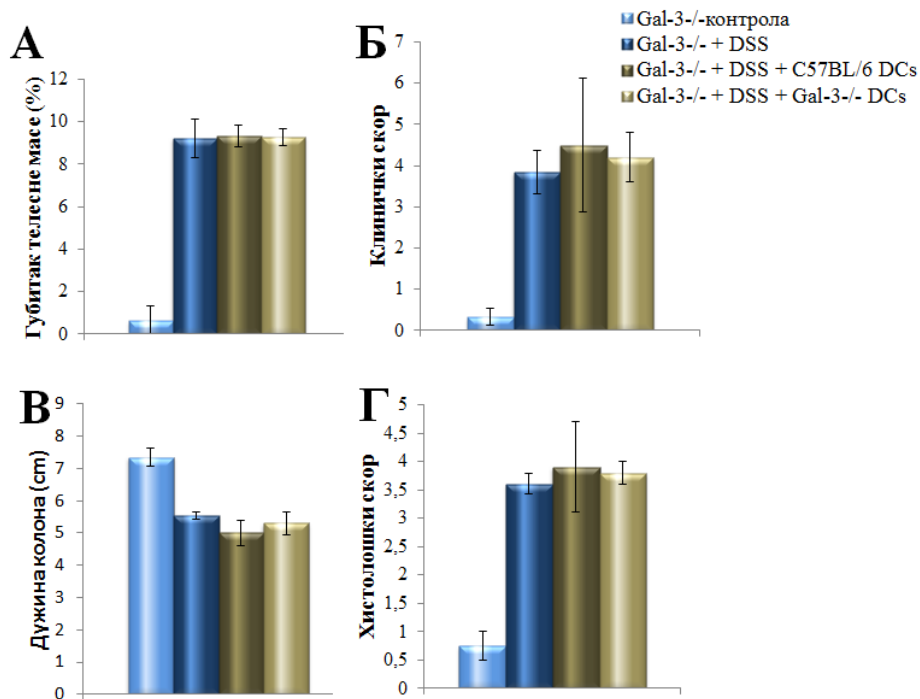
Процентуална заступљеност CD11c+CD8⁺ као и дендритских ћелија које продукују IL-10 је била статистички значајно већа у Gal-3^{-/-} мишева, иако значајне разлике у апсолутним бројевима нису забележене (Фигура 11).



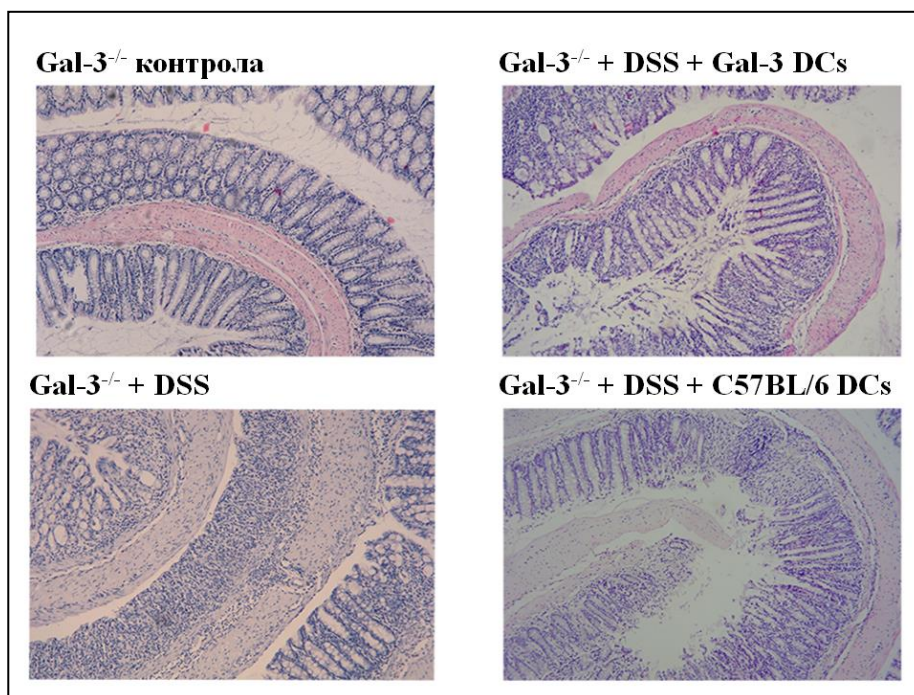
Фигура 11. Процент и укупан број регулаторних дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент CD11c+CD8⁺ је био статистички значајно већи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима ($p < 0.01$). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3.1. Адоптивни трансфер дендритских ћелија

Адоптивни трансфер дендритских ћелија изолованих из слезина нетретираних C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева у Gal-3^{-/-} реципијенте није изазвао значајно веће оштећење колона. Није било статистички значајне разлике између експерименталних група у свим параметрима како клиничког тако и хистолошког скорa (Фигура 12; Слика 17).



Фигура 12. Адоптивни трансфер дендритских ћелија. А, Б, В, Г. Адоптивни трансфер C57BL/6 и Gal-3^{-/-} дендритских ћелија у Gal-3^{-/-} реципијенте није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE.

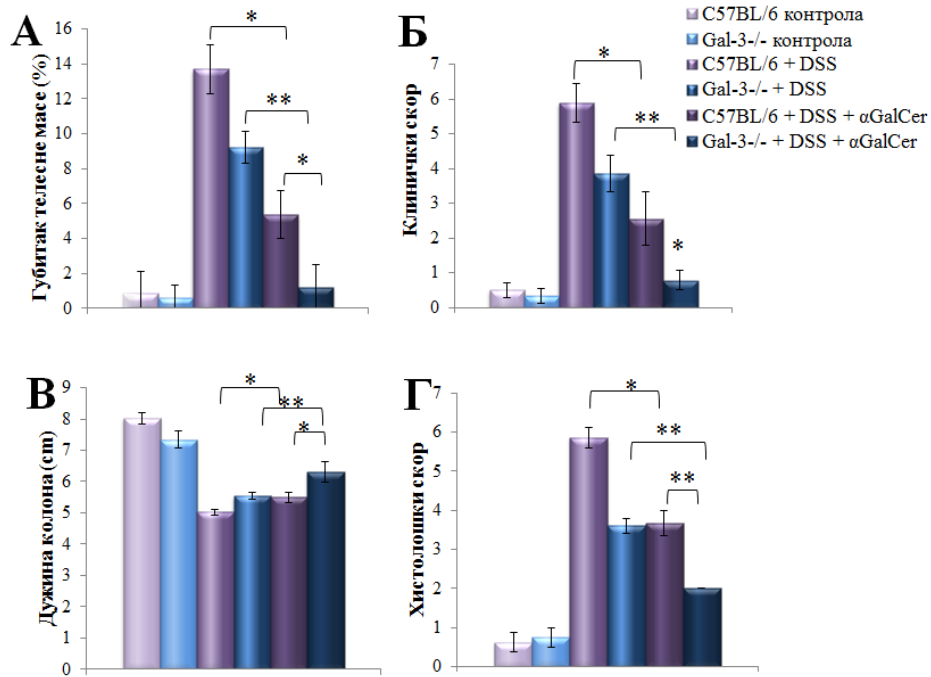


Слика 17. Репрезентативни патохистолошки препарати Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом након трансфера C57BL/6 и Gal-3^{-/-} дендритских ћелија (десна страна слике, 100x).

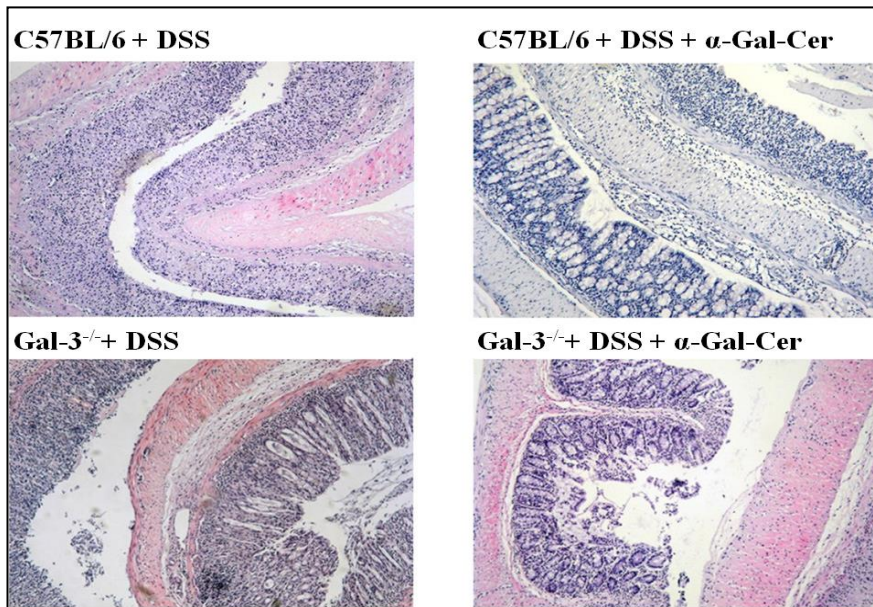
4.4. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом

Будући да су проточно цитометријске анализе показале статистички значајно повећање укупног броја CD3+NK1.1+NKT ћелија у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом наметнула се идеја да се детаљније испита евентуална улога ових ћелија у колитису изазваном DSS-ом. У ту сврху коришћен је потентни активатор NKT ћелија: α -GalCer. Експерименти у којима је испитивано да ли одсуство Gal-3 утиче на протективну улогу NKT ћелија у акутном колитису дизајнирани су тако да се мишевима интраперитонеално убризгава α -GalCer (100 μ g/kg телесне масе) свакодневно током примене DSS-а. Примена α -GalCer ублажила је клиничку слику и смањила оштећење ткива у обе испитиване групе мишева, али су статистички значајне разлике забележене у претходним експериментима остале. Па су тако C57BL/6 мишеви третирани DSS-ом и α -GalCer-ом имали статистички значајно већи и клинички и хистолошки скор у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима на истом третману иако је болест и код једних и других болест ублажена (Фигура 13; Слика 18). Такође, примена α -GalCer-а повећава и проценат NKT ћелија које продукују IL-10 у ткиву колона у обе експерименталне групе (Фигура 14).

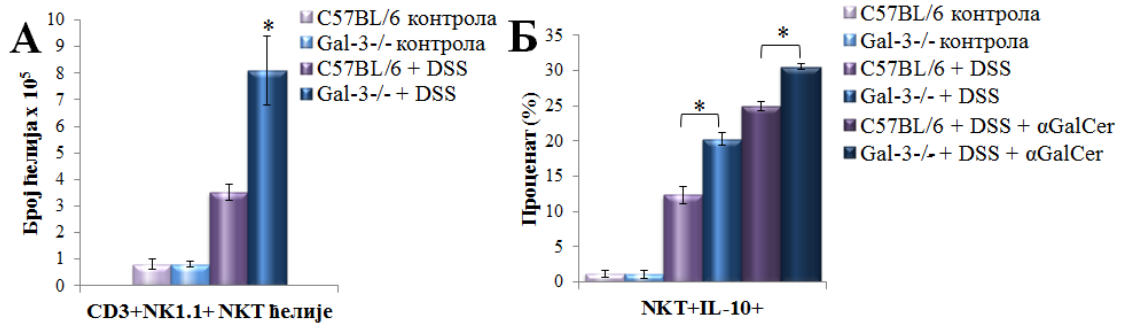
Иако је апликација α -GalCer-а и последична активација NKT ћелија значајно смањила оштећење ткива колона, није се мењала разлика између експерименталних група (Фигура 13) што указује да активност NKT ћелија у овом моделу болести не зависи од експресије Gal-3 молекула.



Фигура 13. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом не зависи од присуства молекула Gal-3. А, Б, В. Губитак телесне масе, клинички скор, као и скраћење колона је било статистички значајно мање у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима након примене αGalCer-а. Г. Хистолошки скор након примене αGalCer-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).



Слика 18. Репрезентативни хистолошки препарати C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након примене αGalCer-а (на десној страни слике, 100x).

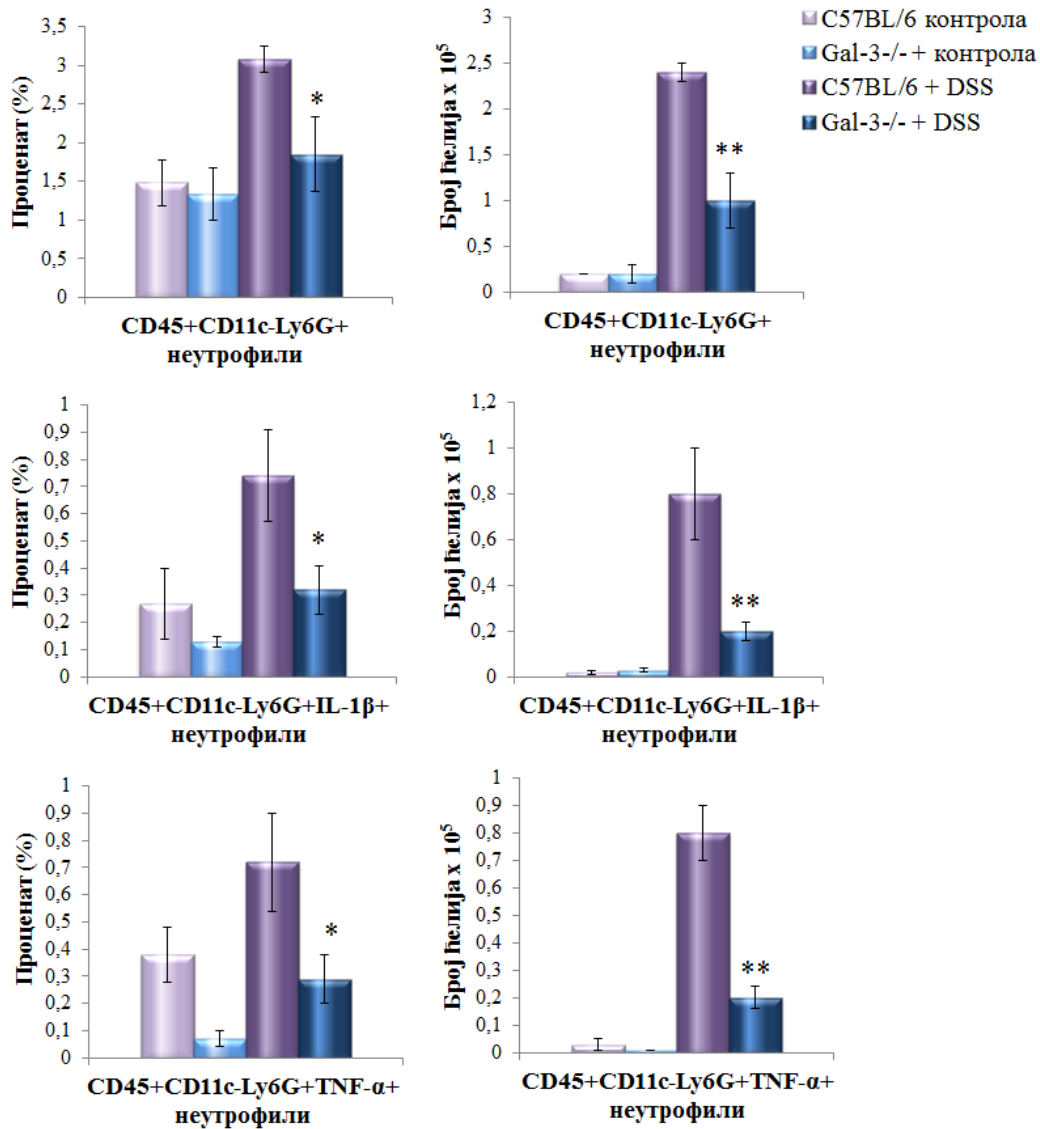


Фигура 14. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом.

А. Број NKT ћелија је био статистички значајно већи у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. **Б.** Процентуална заступљеност NKT ћелија које продукују IL-10 је била статистички значајно већа у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева само на DSS-у, као и Gal-3^{-/-} мишева који су примили α-GalCer у поређењу са C57BL/6 мишевима само на DSS-у, али и који су примили α-GalCer. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

4.5. Делација гена за Gal-3 смањује број неутрофила у ткиву колона

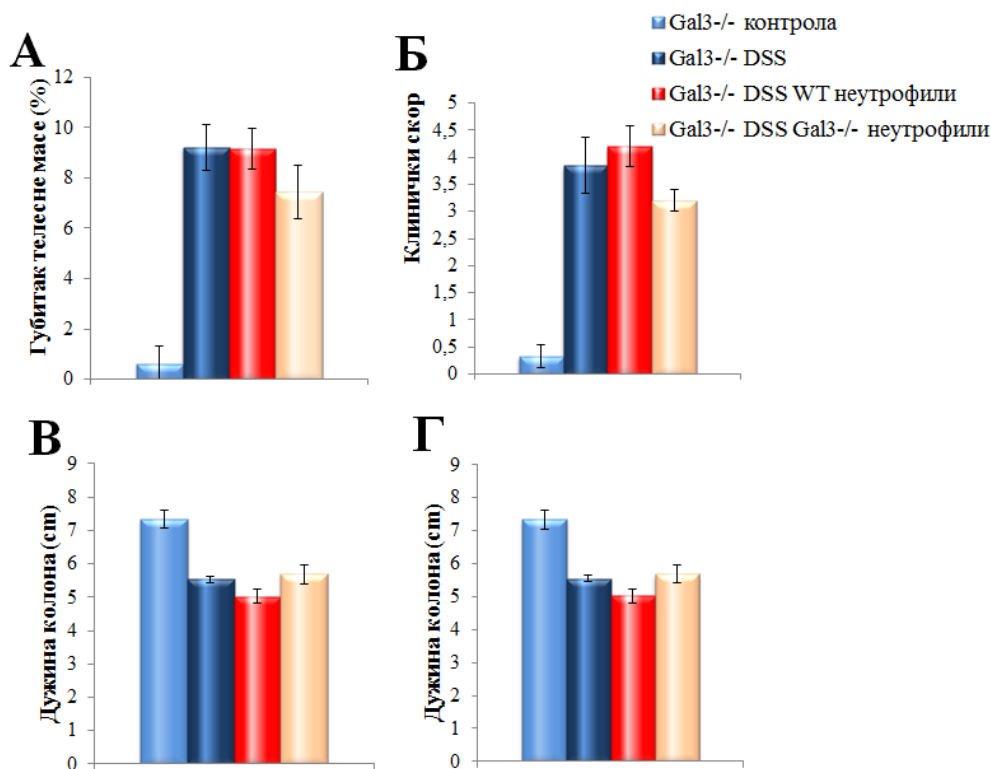
С обзиром на студије које указују на значајну улогу полиморфонуклеарних леукоцита у патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом (137) испитана је и улога Gal-3 у активацији полиморфонуклеарних леукоцита у овом моделу болести. Добијени резултати јасно указују на мању заступљеност неутрофила, као и неутрофила који продукују IL-1β и TNF-α у ламини проприји Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Број CD45⁺CD11c⁻Ly6G⁺ неутрофила и неутрофила CD45⁺CD11c⁻Ly6G⁺ који продукују IL-1β и TNF-α, је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (Фигура 15).



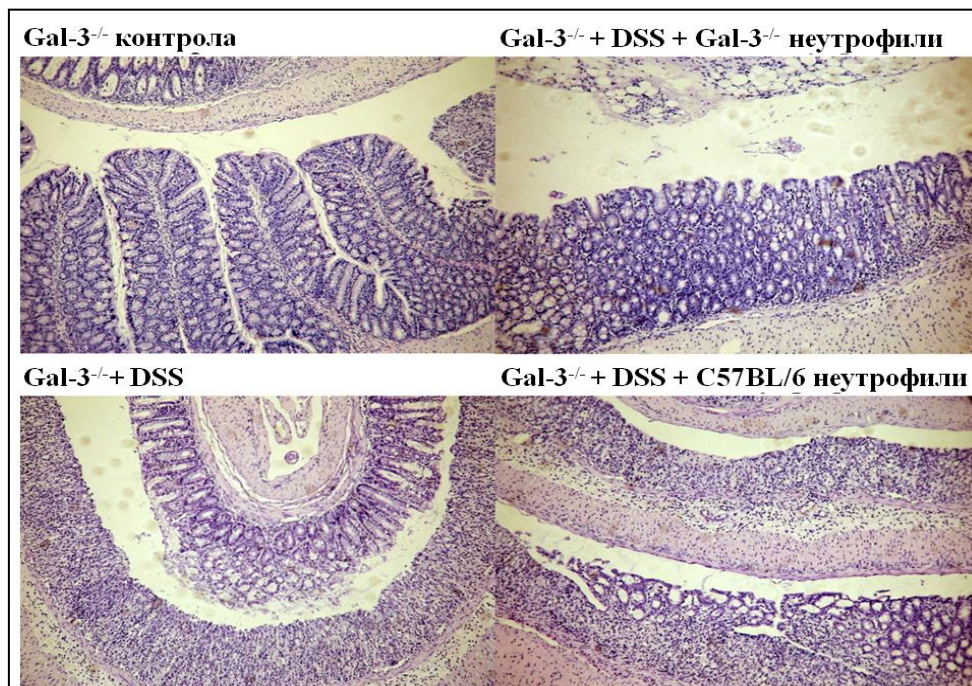
Фигура 15. Процент и укупни број неутрофила у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент и број CD45+CD11c-Ly6G⁺ неутрофила, као и број CD45+CD11c-Ly6G⁺ неутрофила који продукују IL-1β и TNF-α је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом ($p < 0.001$). Измерене вредности из два поновљена експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Међутим, иако је била значајно већа заступљеност ове ћелијске популације у ткиву колона C57BL/6 мишева, адаптивни трансфер неутрофила изолованих из перитонеума здравих C57BL/6 мишева у Gal-3^{-/-} реципијенте није

изазвао статистички значајно веће оштећење колона. Адоптивни трансфер неутрофила (2×10^6 , интраперитонеално) није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група у губитку телесне масе, клиничком и хистолошком скору, нити скраћењу колона (Фигура 16). На хистолошким препаратима такође се не уочава значајна разлика у оштећењу ткива колона (Слика 19), што указује да неутрофили нису директно одговорни за разлике у патогенези колитиса између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.



Фигура 16. Адоптивни трансфер неутрофила. А, Б, В, Г. Адоптивни трансфер неутрофила није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група у клиничкој манифестацији колитиса. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE.

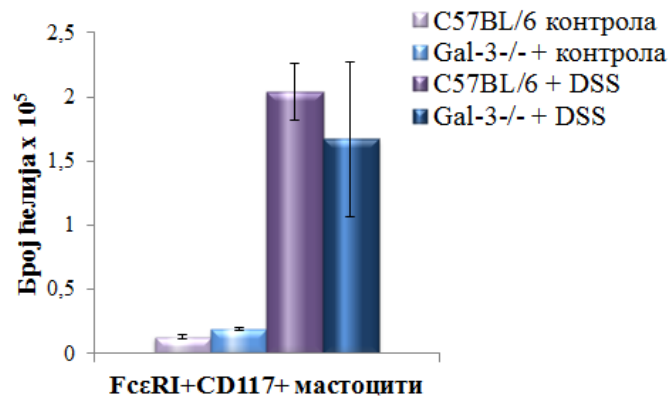


Слика 19. Репрезентативни патохистолошки препарати $Gal-3^{-/-}$ мишева након адоптивни трансфера $C57BL/6$ и $Gal-3^{-/-}$ неутрофила (десна страна слике, 100x).

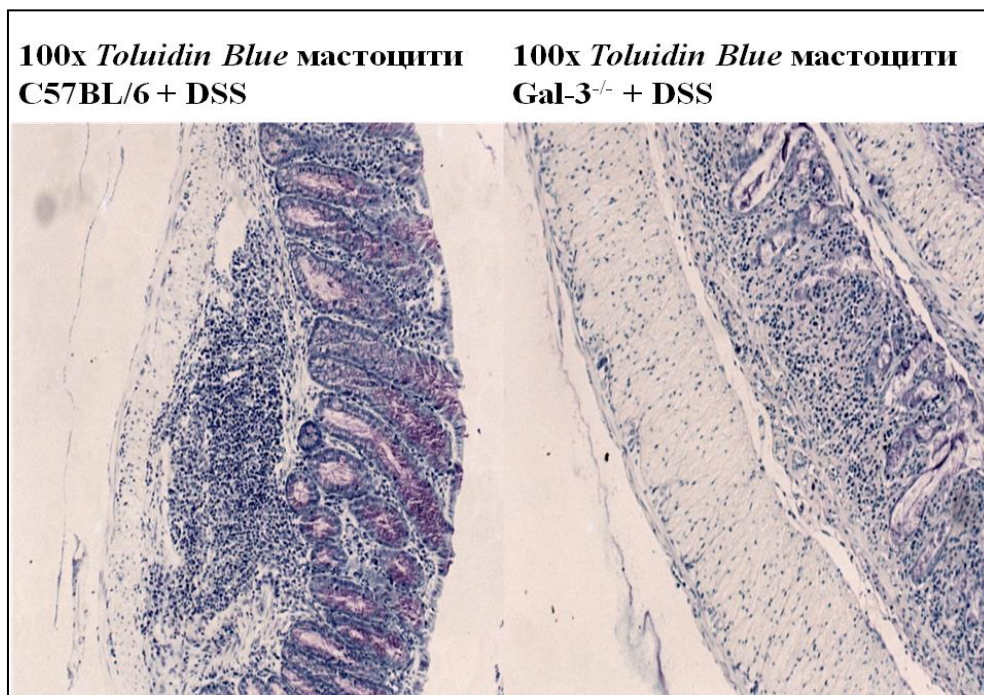
4.6. Делација гена за Gal-3 не мења заступљеност мастоцита, еозинофила и NK ћелија у ткиву колона мишева третираних DSS-ом

Проточном цитрометријом су анализиране остале популације ћелија у ткиву колона.

Мастоцити: Није било статистичке значајне разлике у броју мастоцита у ткиву колона $Gal-3^{-/-}$ мишева у поређењу са бројем мастоцита у ткиву колона $C57BL/6$ мишевима (Графикон 3). Ови налази потврђени су и специфичним бојењем *Toluidin Blue*-ом (Слика 20). Тамно љубичасто пребојени мастоцити су били заступљени у инфилтратима инфламацијских ћелија у ткиву колона.



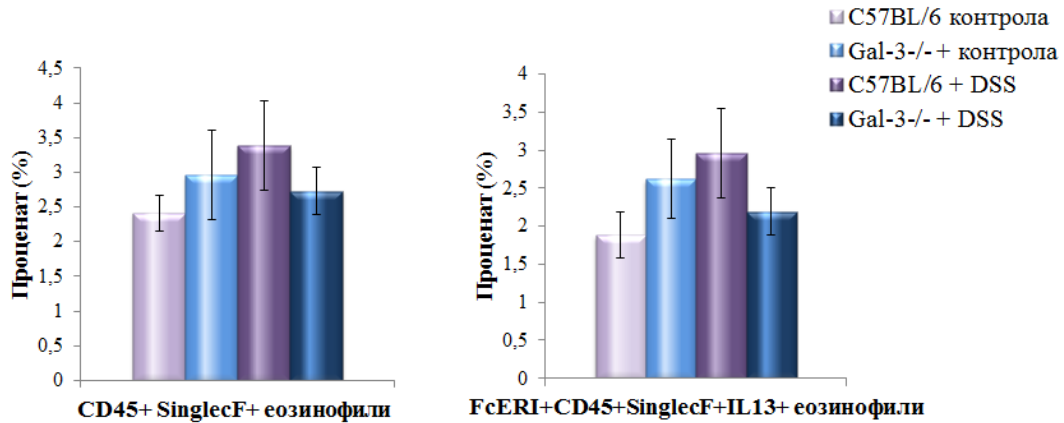
Графикон 3. Укупни број мастоцита у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Није било статистички значајне разлике у броју FcεRI+CD117+ мастоцита у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи).



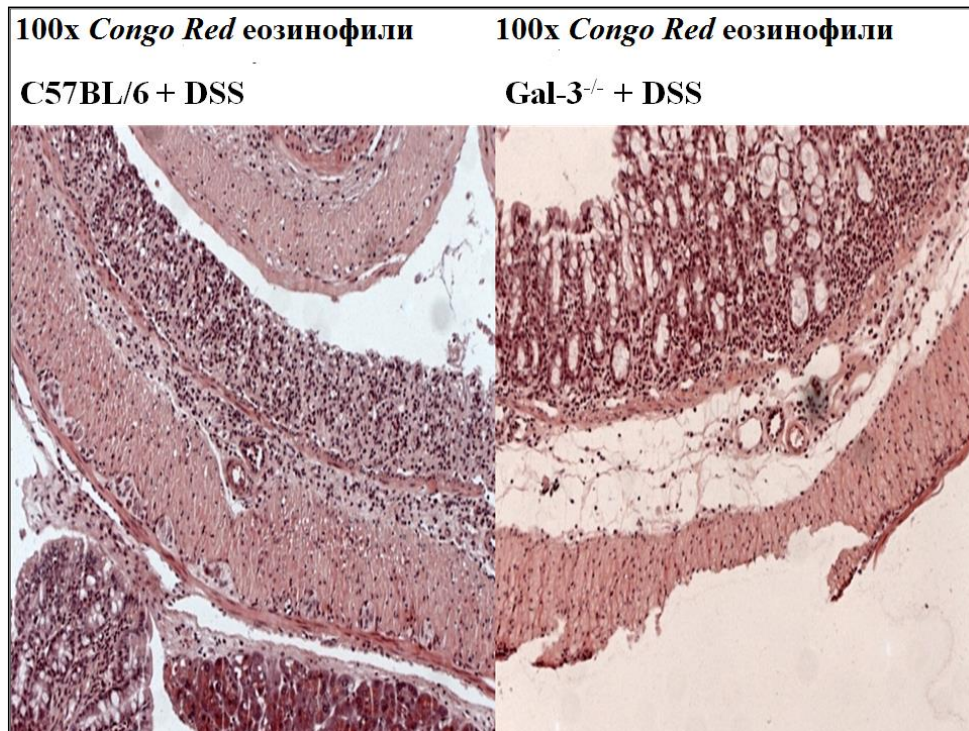
Слика 20. Специфично бојење мастоцита у ткивним исечцима C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

Еозинофили: У колитису изазваном DSS-ом није било статистички значајне разлике у процентуалној заступљености CD45+SiglecF+ еозинофила, као и еозинофила CD45+SiglecF+ који продукују IL-13 у ткиву колона Gal-3^{-/-} и C57BL/6 мишева (Фигура 17). Специфичним *Congo red* бојењем ове ћелијске

популације показано је да није било статистички значајне разлике у присутности еозинофила у ткиву колона између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Слика 21). Тамно црвено пребојени еозинофили су присутни у инфилтрату инфламацијских ћелија.

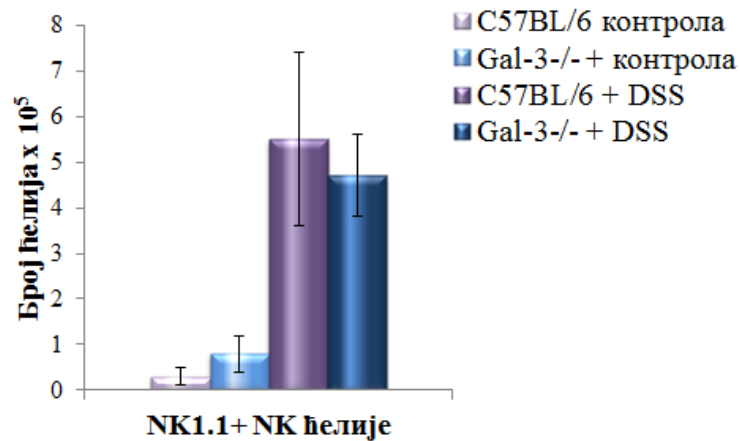


Фигура 17. Присуство еозинофила у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Није било статистички значајне разлике у проценту CD45+SiglecF+ еозинофила, као и еозинофила CD45+SiglecF+ који продукују IL-13 између Gal-3^{-/-} мишева и C57BL/6 мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи).



Слика 21. Специфично бојење мастоцита у ткивним исечцима C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

NK ћелије: Нису уочене разлике у укупном броју NK ћелија у ткиву колона између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Графикон 4).



Графикон 4. Укупни број NK ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-}. Није било статистички значајне разлике у броју NK ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-}. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи).

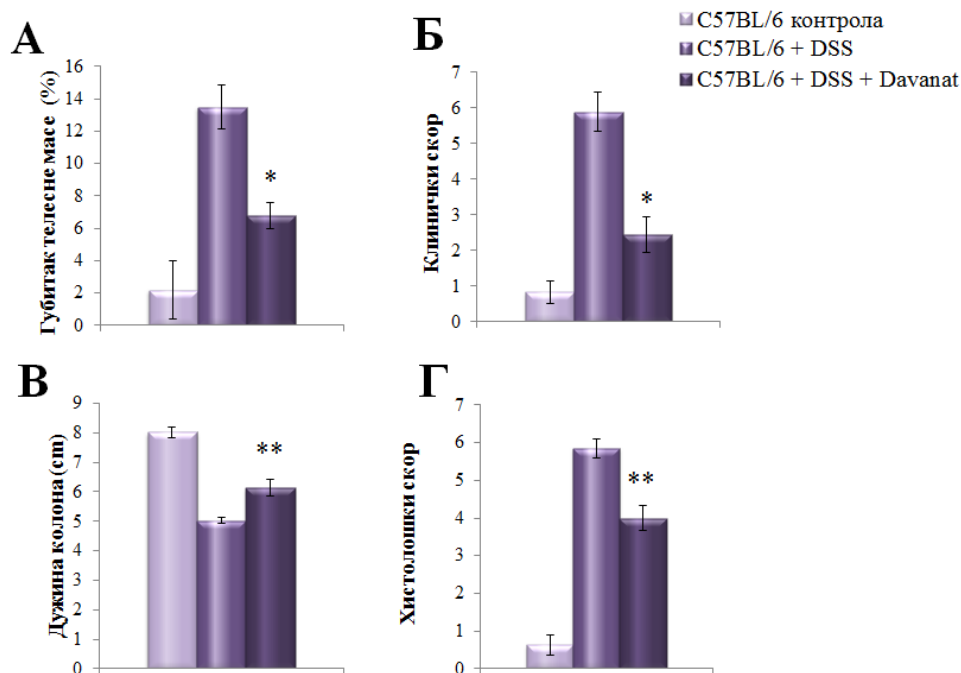
4.7. Примена *Davanat*-а значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом

Након што је запажено да делеција гена за Gal-3 гена значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом, услед смањеног присуства инфламацијских ћелија које продукују цитокине у ламини проприји, слабије продукције цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и подстицања алтернативне активације макрофага, испитан је ефекат примене новосинтетисаног антагонисте Gal-3 (*Davanat*) на тежину болести и степен оштећења ткива колона у колитису изазваног DSS-ом код C57BL/6 мишева.

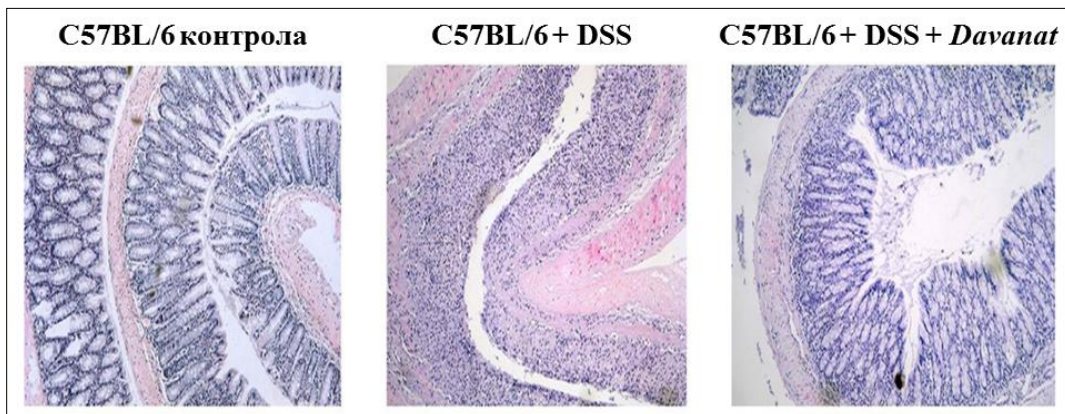
Клинички скор је показао да интраперитонеална примена *Davanat*-а (100 μ g 0, 2, 4 и 6. дана током 7 дана примене DSS-а) превенира тешко оштећење ткива колона изазвано DSS-ом. Као што је приказано на Фигури 18, клинички скор је статистички значајно мањи у мишева који су превентивно примили *Davanat*, у поређењу са мишевима који су примили само DSS-ом. Дужина

колона је била статистички значајно већа у C57BL/6 мишева који су примили *Davanat*.

Патохистолошка анализа колона је потврдила клиничка и макроскопска запажања (Слика 22). Значајно мање оштећење колона уочено је у C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat*. У C57BL/6 мишева третираних само DSS-ом запажена је масовна инфилтрација инфламацијским ћелијама праћена губитком нормалне грађе ткива колона са истањеном ламином пропријом док су у мишева третираних и *Davanat*-ом запажени само фокални инфилтрати инфламацијским ћелијама уз очувану структуру крипти. Као што показује Слика 22, колон мишева, који су имали приступ само пијаћој води, је био очуван и непромењене грађе што је у сагласности са клиничким скором.



Фигура 18. Ефекат *Davanat*-а на експериментални колитис. А, Б, В, Г. Губитак телесне масе, клинички скор скраћење колона и хистолошки скор су били умеренији после примене *Davanat*-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

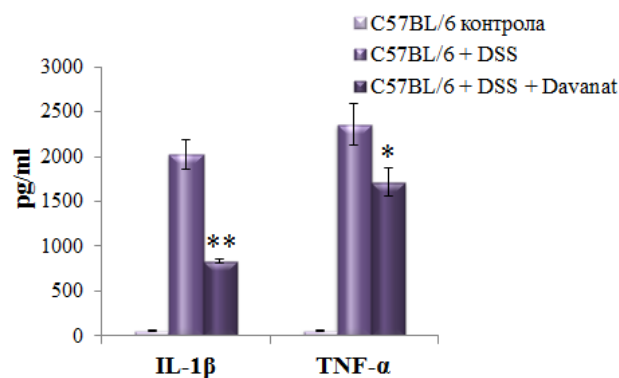


Слика 22. Репрезентативни препарати колона C57BL/6 мишева након примене *Davanat*. Стандарно патохистолошко бојење (увећање x100).

4.7.1. *Davanat* значајно смањује концентрације IL-1 β и TNF- α у серуму

Како су клинички показатељи и патохистолошка испитивања показали да примена *Davanat*-а ублажава болест и смањује оштећења ткива колона код C57BL/6 мишева и да ови подаци корелирају са налазима у Gal-3^{-/-} мишева, испитан је и утицај *Davanat*-а на концентрације релевантних цитокина у серуму као и експресија NALP-а и IL-1 β *in situ*.

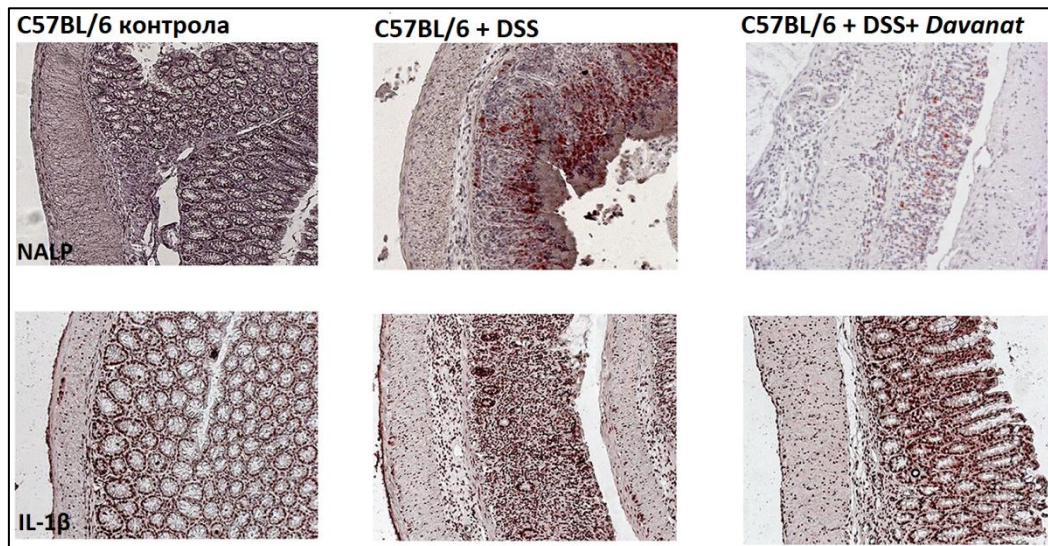
Концентрација IL-1 β и TNF- α је била статистички значајно мања у серуму мишева којима је дат *Davanat* у поређењу са мишевима којима је дат само DSS (Графикон 5).



Графикон 5. Промена концентрације цитокина у серуму након примене *Davanat*-а. Концентрација IL-1 β и TNF- α у серуму је статистички значајно мања у C57BL/6 мишева са колитисом након примене *Davanat*-а у поређењу са концентрацијама измереним у C57BL/6 мишева који нису претретирани *Davanat*-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

4.7.2. Примена *Davanat*-а смањује експресију NALP-а и IL-1 β

Имунохистохемијска анализа експресије NALP-а и IL-1 β у ткиву колона C57BL/6 мишева, 7 дана након примене DSS-а показала је да *Davanat* значајно смањује експресију IL-1 β и NALP-а у ткиву колона (Слика 23). На ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat*, се уочава значајно мања експресија NALP-а у цитоплазми инфламацијских ћелија у поређењу са ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су примили само DSS. Ћелије које експримирају NALP у C57BL/6 мишева који су примили само DSS су присутне и у мукози и у субмукози. Насупрот томе, присуство ћелија које експримирају NALP у ткиву колона C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat* је била ограничена само на мукозу. Укупан број оваквих ћелија је био значајно већи у мишева који нису примиле *Davanat* (Слика 23).



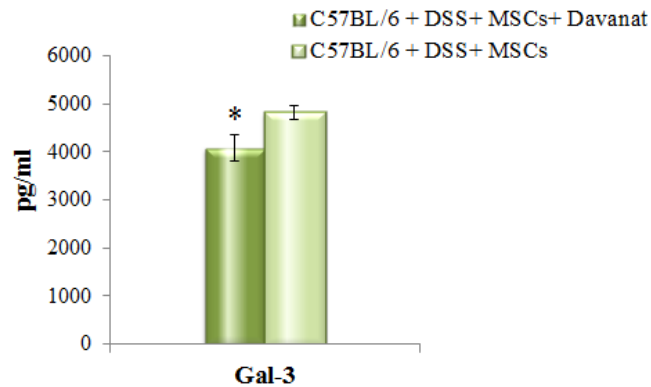
Слика 23. Експресија IL-1 β и NALP-а у ткиву колона C57BL/6 мишева након примене *Davanat*-а.

4.8. Фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага у ткиву колона

4.8.1. Превентивна примена MSCs значајно смањује колитис мишева третираних DSS-ом

Примена MSCs, претходно третираних *Davanat*-ом, током развоја колитиса значајно смањује концентрацију Gal-3 у серуму оболелих мишева што

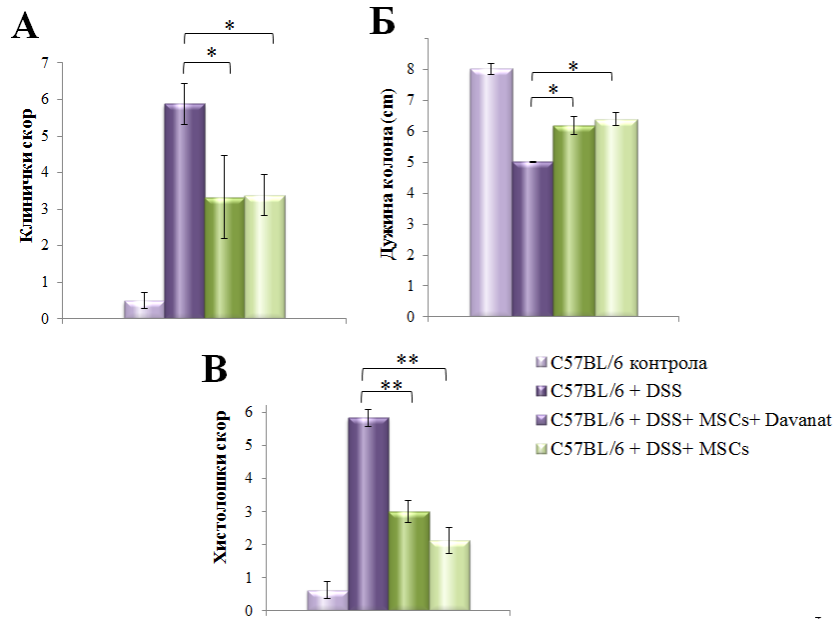
би могло указати да и MSCs секретују Gal-3 у овом моделу болести (Графикон б).



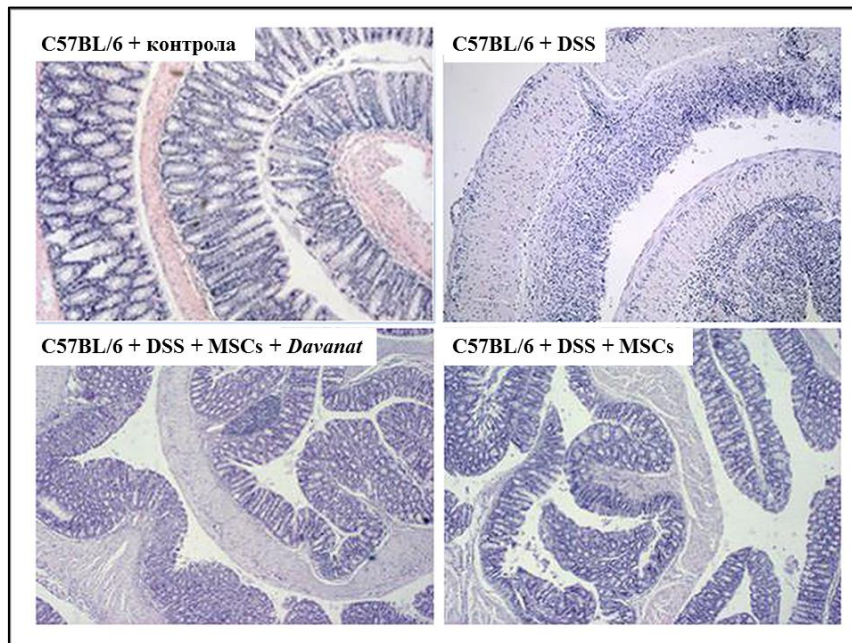
Графикон 6. Примена MSCs претходно третираних *Davanat*-ом смањује концентрацију Gal-3 у серуму оболелих мишева. У серуму мишева, који су примили MSCs са фармаколошки инактивираним Gal-3, концентрација овог молекула је била значајно смањена. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Иако је инактивација Gal-3 у MSCs смањила концентрације овог молекула у серумима оболелих мишева то није утицало на укупни потенцијал ових ћелија у ублажавању развоја акутног колитиса. Нису забележене разлике ни у опсервираним клиничким ни у патохистолошким параметрима (Фигура 19) између две експерименталне групе мишева .

Патохистолошка анализа колона је потврдила клиничка запажања о ублажавању болести. Значајно мање оштећење колона уочено је у експерименталним групама мишева који су превентивно примили MSCs као и MSCs претретиране *Davanat*-ом. У обе експерименталне групе мишева третираних MSCs запажа се значајно смањена инфилтрација инфламацијским ћелијама (Слика 24).



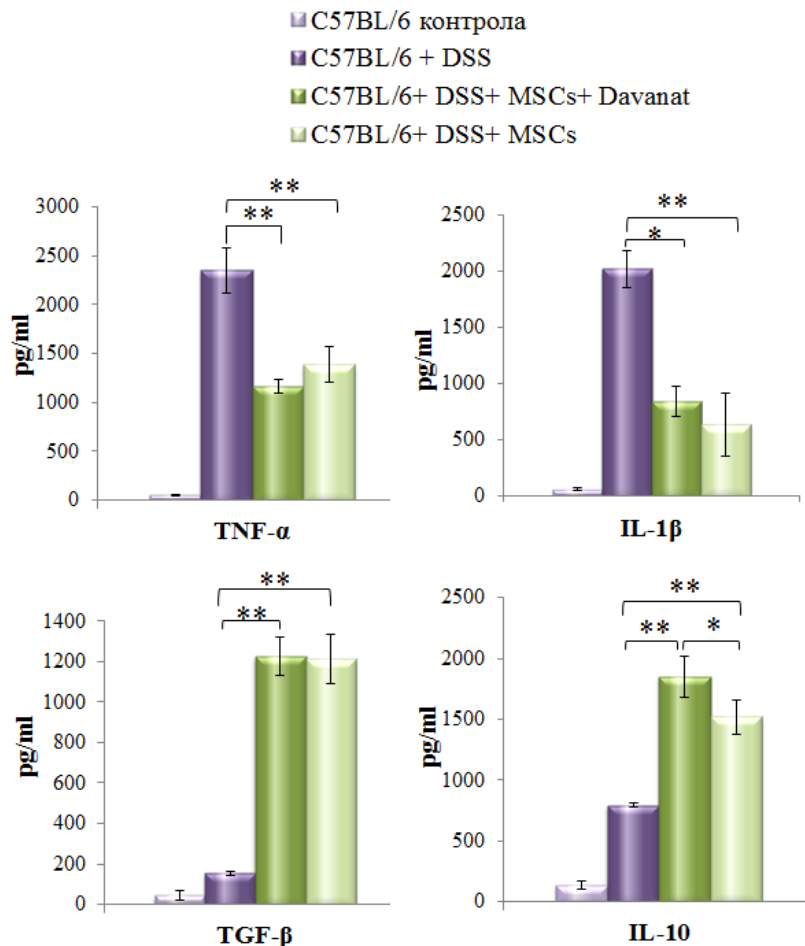
Фигура 19. MSCs ублажавају клинички ток и смањују оштећење колона у експерименталном колитису. Клинички скор и скраћење колона су били значајно мањи после примене MSCs. Хистолошки скор потврђује смањено оштећење након превентивне примене само MSCs и MSCs са претретиране *Davanat*-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



Слика 24. Репрезентативни препарати колона након превентивне примене MSCs. Стандарно патохистолошко бојење (увећање $\times 100$).

4.8.2. Фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом

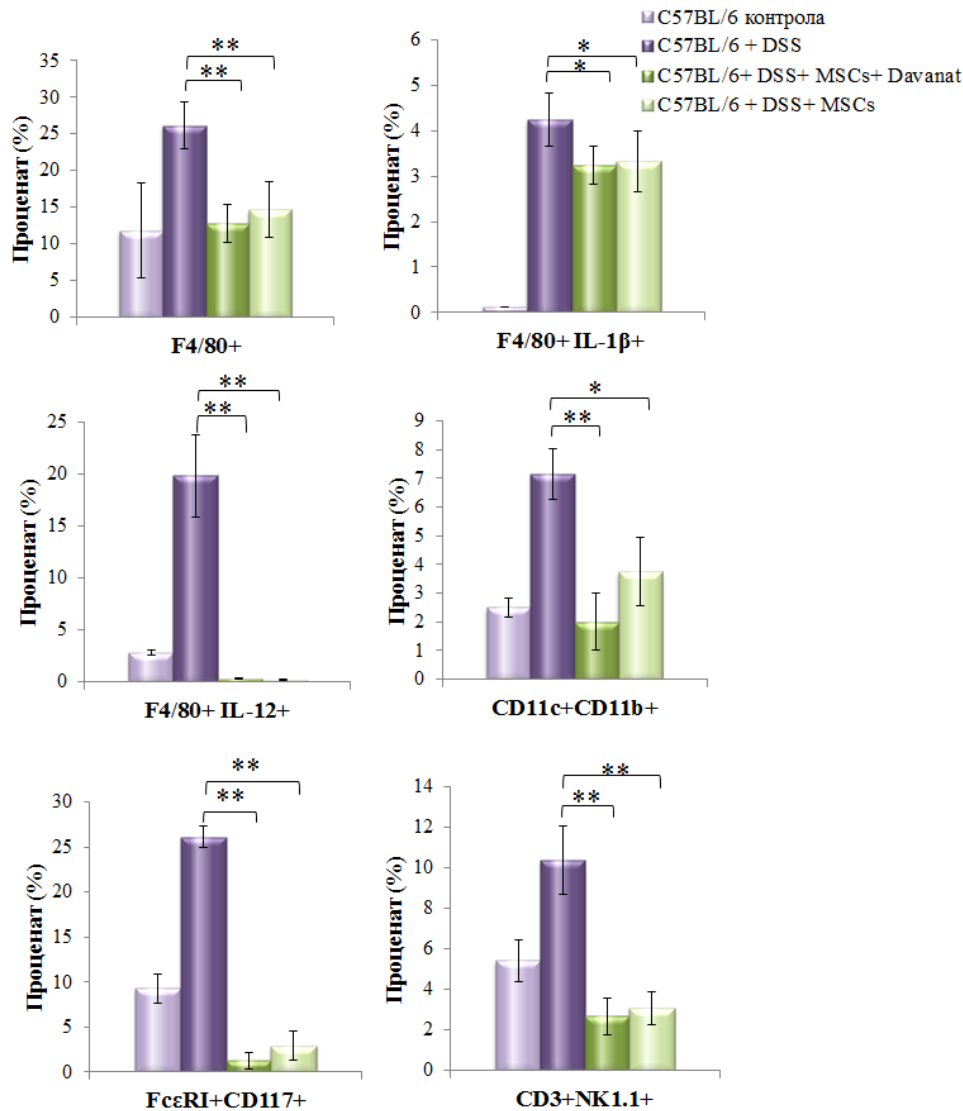
Концентрације TNF- α , IL-1 β и TGF- β су биле значајно мање у групама мишева, које су примале или само MSCs или MSCs претходно култивисане у присуству *Davanat*-а у поређењу са групом која је третирана само DSS-ом (Фигура 20). Основна разлика између ове две експерименталне групе садржана је у различитим концентрацијама IL-10 које су биле статистички значајно веће у групи која је превентивно примила MSCs претретиран *Davanat*-ом (Фигура 20). Овакав исход експеримента је указао на улогу Gal-3 у продукцији анти-инфламацијског цитокина IL-10.



Фигура 20. Фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом. Концентрација TNF- α , IL-1 β , TGF- β и IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

4.8.3. Примена MSCs значајно смањује инфилтрацију инфламацијских ћелија у ткиво колона мишева третираних DSS-ом

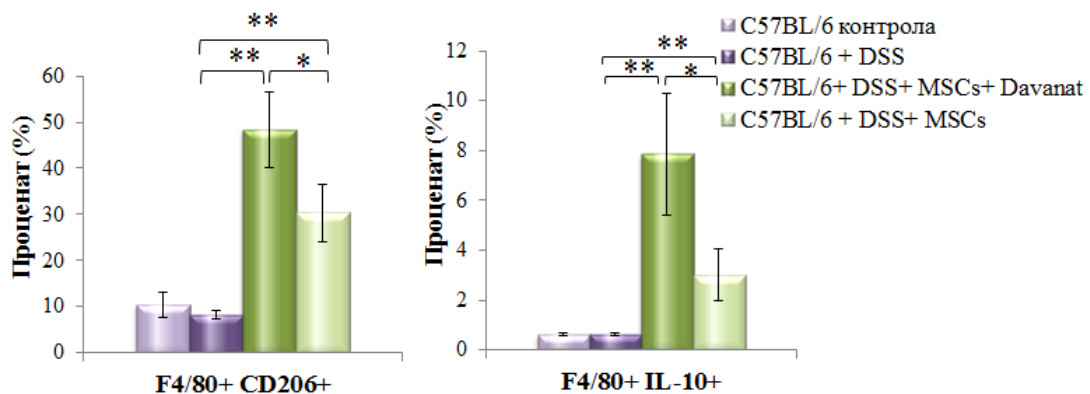
Као што је приказано на Фигури 21 статистички значајно већи проценат F4/80+ макрофага, као и оних макрофага који продукују инфламацијске цитокине: IL-1 β и IL-12 је био у групи мишева који су примили само DSS у поређењу са групама које су примиле комбинацију DSS-а и MSC-а. Такође, уочена је статистички значајно мања процентуална заступљеност инфламацијских дендритских ћелија (CD11c+CD11b+), мастоцита (Fc ϵ RI+CD117+), као и NKT ћелија (CD3+NK1.1+) у групама мишева са колитисом које су примиле MSCs у поређењу са мишевима који су примили само DSS.



Фигура 21. Процент имунских ћелија у ткиву колона након примене MSCs. Статистички мања процентуална заступљеност F4/80+, F4/80+ IL-1 β , F4/80+ IL-12, CD11c+CD11b+, Fc ϵ RI+CD117+ као и NKT ћелија у групама које су примиле MSCs и MSCs са инхибитором у поређењу са C57BL/6 мишевима након 7 дана примене DSS-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

4.8.4. Фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага

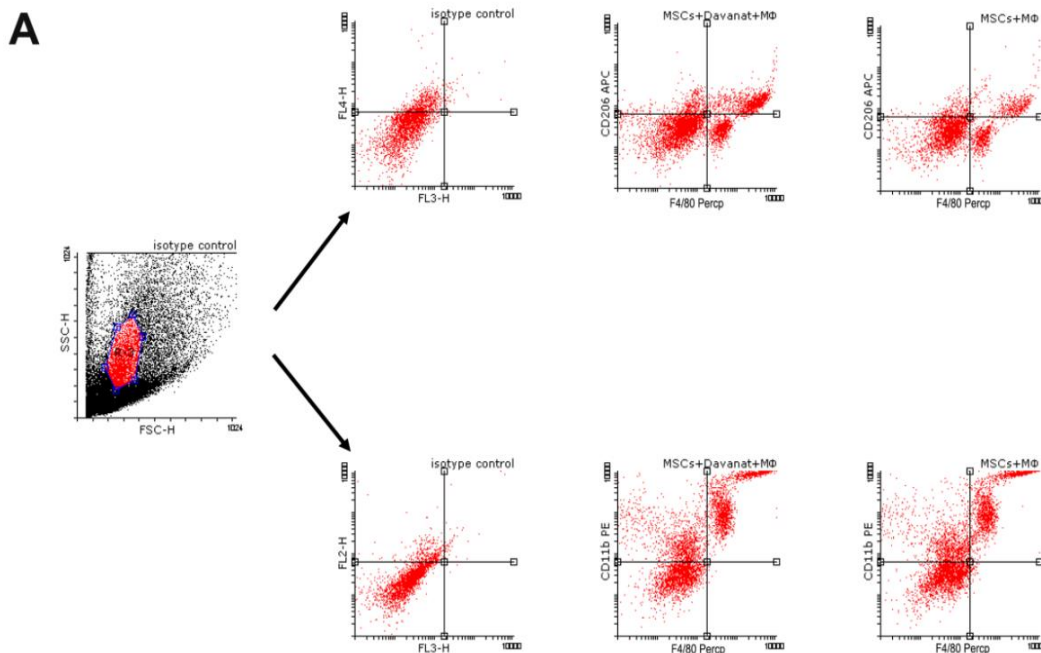
Процент алтернативно активисаних макрофага (F4/80+ CD206+) као и макрофага који продукују IL-10 је био значајно већи у ткиву колона мишева који су примиле MSCs. Присуство *Davanat*-а у медијуму за култивисање MSCs још више продубила ову разлику, па су тако забележене вредности (процент алтернативно активисаних макрофага и макрофага позитивних на IL-10) значајно веће код таквих мишева него код мишева који су примиле немодулисане MSCs што указује да инактивација Gal-3 у MSCs значајно повећава њихов капацитет за индукцију алтернативне активације макрофага (Фигура 22).

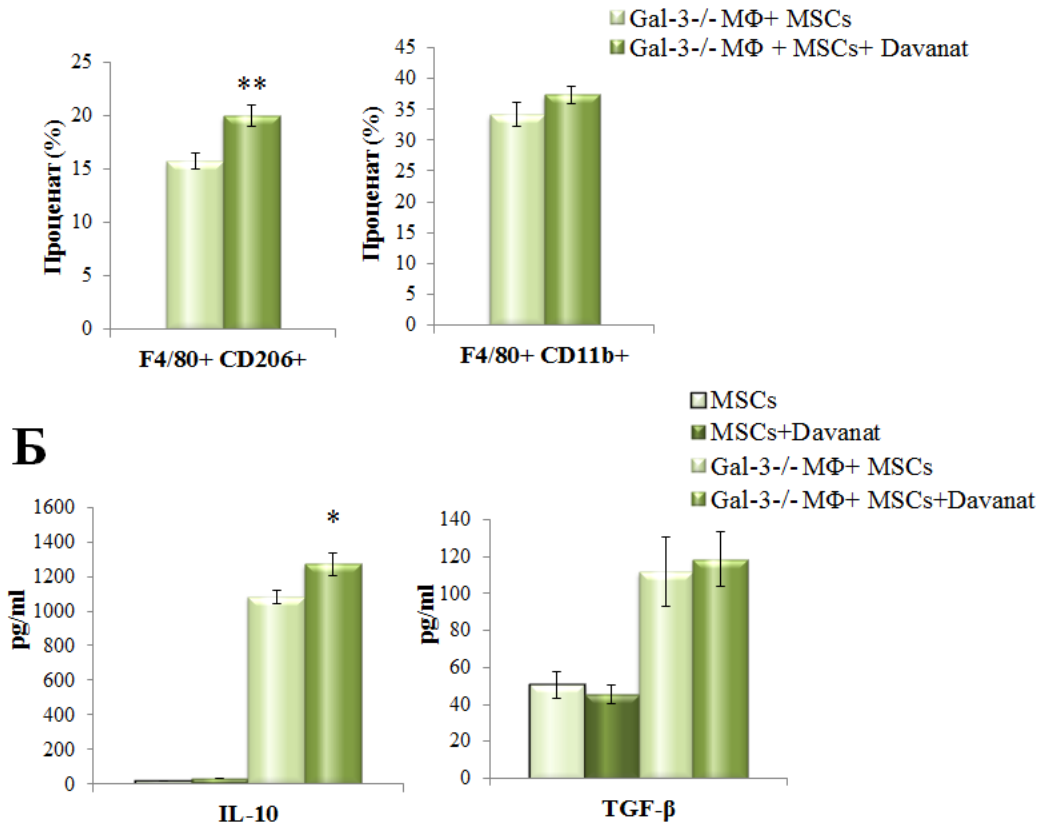


Фигура 22. Процент M2 макрофага у ткиву колона након примене MSCs. Статистички већа процентуална заступљеност F4/80+CD206+ и F4/80+ IL-10+ алтернативно активисаних макрофага у групама које су примиле MSCs са инхибитором у поређењу са групом мишевима, који су примиле само MSCs. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

Да би се додатно потврдила улога Gal-3, пореклом из MSCs у алтернативној активацији макрофага, током развоја експерименталног колитиса, перитонеални макрофаги изоловани из здравих Gal-3^{-/-} мишева су кокултивисани са MSCs односно са MSCs претходно третираних *Davanat*-ом.

Излагање перитонеалних макрофага мезенхималним матичним ћелијама, претретираним *Davanat*-ом значајно је поларизовало њихову активацију у правцу M2 (Фигура 23А). Није постојала статистичка значајност у проценту M1 макрофага између експерименталних група. Такође, показана је значајно већа концентрација IL-10, али не и TGF- β у супернатантима макрофага кокултивисаних са MSCs и инактиватором (Фигура 23Б).





Фигура 23. *In vitro* кокултивација перитонеалних макрофага и MSCs. **А.** Репрезентативни *dotplots* проточне цитометријске анализе. Први *dotplot* показује *gate*-оване ћелије, другим *dotplot* су приказане одговарајуће изотипске контроле; трећи *dotplot* репрезентује проценат F4/80+CD206+ перитонеалне макрофаге кокултивисане са MSCs и инхибитором; четврти „дот плот“ показује проценат F4/80+CD206+ перитонеалне макрофаге кокултивисане само са MSCs. Статистички значајно већи проценат F4/80+CD206+ перитонеалних макрофага је био у кокултивацији са MSCs и инхибитором. **Б.** Повећана концентрација IL-10 у супернатантима перитонеалних макрофага у кокултивацији са MSCs и инхибитором. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује да делеција гена за Gal-3 смањује инфламацију у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом.

5.1. Делеција гена за Gal-3 редукује оштећење ткива колона у колитису изазваном DSS-ом

Gal-3 је члан фамилије лектина, који се везују за β -галактозиде, експримиране на бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје локализације (цитоплазматска, једарна, мембранска или екстраћелијска) овај молекул игра различите улоге у процесима инфламације, апоптозе и канцерогенезе (240).

Иако је Gal-3 експримиран на свим ћелијама имунског система које имају важну улогу у настанку колитиса изазваног DSS-ом (204), до сада није објашњена његова улога у патогенези овог модела акутног колитиса. Ова студија је по први пут показала да делеција гена за Gal-3 ублажава клинички ток, редукује оштећење ткива, смањује број инфламацијских ћелија у ткиву колона и продукцију проинфламацијских цитокина.

Клиничке манифестације улцерозног колитиса налик су акутној фази колитиса изазваног DSS-ом: тешка дијареја, ректално крварење и губитак телесне масе (111, 138).

Да би се утврдиле разлике у тежини болести и опсежности оштећења ткива колона код експерименталног колитиса изазваног у Gal3^{-/-} и C57BL/6 мишева, одређивани су клинички и патохистолошки скор. Ова студија је, по први пут, показала да делеција гена за Gal-3 значајно ублажава болест и смањује оштећење ткива изазвано DSS-ом: 7 дана након примене DSS-а, клинички скор Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно нижи ($p < 0.05$) у поређењу са C57BL/6 мишевима (Фигура 1). Анализирајући хистолошке препарате колона животиња третираних DSS-ом уочена је масовна инфилтрација инфламацијских ћелија у ткиву колона C57BL/6 мишева за разлику од Gal-3^{-/-} мишева код којих се видело ограничено присуство инфламацијских ћелија, што нам је указало да је делеција гена за Gal-3 значајно смањила присуство инфламацијских ћелија у ламини проприји. Модел акутног колитиса изазван DSS-ом је повезан и са

значајним скраћењем колона које често корелира како са клиничком сликом тако и са степеном инфламације у ткиву (296, 297). У овој студији је показано да су Gal-3^{-/-} мишеви третирани DSS-ом имали дужи колон него на исти начин третирани C57BL/6 мишеви.

Одређивања концентрација цитокина у серуму (ELISA техником) као и анализе функционалних фенотипа инфламацијских ћелија проточном цитометријом су потврдила да делеција гена за Gal-3 значајно се смањује број инфламацијских ћелија у ткиву колона и следствено томе концентрације проинфламацијских цитокина у серуму животиња третираних DSS-ом. У овој студији је показано да током прогресије болести у ткиву колона код животиња које експримирају Gal-3 (C57BL/6) расте експресија овог молекула, што директно указује да Gal-3 значајно доприноси прогресији болести. *Mathieu* и сарадници су такође показали повећану експресију Gal-3 у ламини проприји и епителу крипти током акутног колитиса C57BL/6 и BALB/c мишева третираних DSS-ом (274). Постоји неслагање око улоге Gal-3 у различитим моделима инфламацијских болести. Док дефицијенција Gal-3 редукује инфламацију у моделима пнеумококне пнеумоније (298) и атеросклерозе (299), аблација гена за Gal-3 подстиче инфламацијски одговор у моделу пнеумоније изазване *Toxoplasma gondii* (300). Овакви налази снажно сугеришу да би улога молекула Gal-3 у инфламацији могла бити орган специфична и различита од модела до модела.

5.2. Делеција гена за Gal-3 смањује присуство M1 макрофага у ткиву колона у колитису изазваном DSS-ом

Основна карактеристика улцерозног колитиса је хронична инфламација ткива колона у којој учествују многе популације и субпопулације инфламацијских ћелија (25, 39, 52, 64).

Анализом експресије мембранских маркера исказаних на или у инфилтришућим инфламацијским ћелијама добијених из ламине проприје колона оболелих Gal3^{-/-} мишева уочено је да делеција гена за Gal-3 смањује заступљеност проинфламацијских макрофага M1. Забележен статистички значајно мањи број мононуклеарних ћелија у ткиву колона оболелих Gal3^{-/-} мишева може бити директна последица утицаја Gal-3 на миграцију леукоцита.

Gal-3 подстиче хемотаксу моноцита и *in vitro* и *in vivo* (255). Естрацелуларни Gal-3 својом олигомеризацијом омогућава појачано везивање леукоцита за ендотелне ћелије што олакшава екстравазацију и акумулацију леукоцита у ткиву (301). Осим тога, естрацелуларни Gal-3 омогућује адхезију мононуклеара за ламинин екстраћелијског матрикса па се они тако дуже задржавају у запаљеном ткиву (302). Јасно је да одсуство Gal-3 смањује хемотаксу и значајно редукује број мононуклеара у ткиву.

Значајан допринос разумевању настанка инфламације изазване DSS-ом дала су истраживања улоге ћелија урођене имуности у прогресији експерименталног акутног колитиса (137). Иницијално је указано на кључни значај функције макрофага у иницијацији и развоју инфламације у експерименталном колитису (138). Резултати добијени у овој студији показују да одсуство Gal-3 поларизује имунски одговор тако што фаворизује алтернативну активацију макрофага. Регистровано значајно повећање броја и процента макрофага који продукују IL-10 и који експримирају CD206 у оболелих Gal-3^{-/-} мишева је очигледно последица одсуства овог молекула. До сада објављена истраживања која се баве значајем Gal-3 за активацију макрофага у различитим болестима су контрадикторна, па је тако показано да Gal-3 подстиче алтернативну активацију макрофага у моделима експерименталног колитиса и миокардитиса (266, 303). Недавно објављена студија експерименталног стеатохепатитиса изазваног дијетом показала је да делеција гена за Gal-3 смањује инфламацију јетре индукујући алтернативну активацију макрофага (304). Тако је и смањена експресија Gal-3, добијена применом инхибитора овог молекула, индуковала алтернативну активацију макрофага у моделу хепатитиса изазваног конкавалином А (272).

Постоје и опречни подаци да ли експресија Gal-3 у макрофагима делује проинфламацијски или антиинфламацијски (267, 268). *Li* и сарадници су показали да макрофаги Gal-3^{-/-} мишева, у одговору на LPS *in vitro*, повећавају продукцију проинфламацијских IL-6, IL-12 и TNF- α цитокина што упућује на антиинфламацијске ефекте Gal-3 у макрофагима (267). Међутим, студија *Jeon*-а и сарадника указују на проинфламацијску улогу Gal-3 у микроглији јер је експресија Gal-3 изазвала појачану фосфорилацију транскрипционих фактора

(JAK2, STAT1, STAT3 и STAT5) са активацијом JAK/STAT сигналних путева што је за резултата имало масивну продукцију проинфламацијских цитокина: TNF- α , IL-6, IL-1 β и IFN- γ (268). Овде приказани резултати добијени у моделу експерименталног колитиса указују да експресија Gal-3 у макрофагима подстиче инфламацију појачаном продукцијом IL-1 β , IL-6 и IL-12 док супримира продукцију IL-10 (Фигуре 3 и 5).

Осим што је Gal-3 је присутан у/и макрофагима ове ћелије су и снажни извор екстраћелијског Gal-3 (305). Изложени дејству великих концентрација IFN- γ макрофаги масивно секретују Gal-3 (267).

Велике концентрације IFN- γ и IL-12 активирају поларизацију макрофага у M1 (305, 306). Дејство IL-4 и IL-13 на макрофаге C57BL/6 мишева *in vitro*, поларизује ове ћелије у M2 док одсуство Gal-3 (макрофаге Gal-3^{-/-} мишева) укида ову поларизацију немењајући степен класичне активације макрофага под утицајем LPS-а и IFN- γ (266).

Неколико проинфламацијских цитокина, а пре свих IL-1 β , су укључени у иницијацију колитиса и прогресивну деструкцију ткива колона (140, 143). Клиничка студија праћења концентрација проинфламацијских цитокина током активне фазе инфламацијске болести црева је добро документовала њихово повећање (307). Повећане концентрације IL-1 β , IL-6, IL-8 и GMCSF (енгл. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, GMCSF) у активним фазама улцерозног колитиса и Кронове болести корелирају са тежином болести (159, 161). Повећана продукција IL-1 β је детектована како у људи са инфламацијском болести црева (308) тако и у колитису изазваном DSS-ом (309, 310). IL-1 β је проинфламацијски цитокин кога превасходно продукују класично активисани моноцити и макрофаги, као и фибробласти, ћелије глатких мишића и ендотел (311). Недавно објављена студија је јасно указала да активација каспазе 1 у раном стадијуму имунског одговора узрокује продукцију IL-1 β што за последицу има инфламацију карактеристичну за експериментални колитис (312).

Овде приказаном студијом је показано да адоптивни трансфер перитонеалних макрофага, изолованих из здравих C57BL/6 у Gal-3^{-/-} мишеве, значајно погоршава клиничке манифестације колитиса и повећава серумске

концентрације IL-1 β (Фигура 7 и Графикон 1). Ови резултати би посредно могли указати да перитонеални макрофаги Gal-3^{-/-} мишева смањено продукују IL-1 β и да би то могао бити основни разлог регистрованих сојних разлика у оштећењу ткива и клиничком току колитиса. Деплеција макрофага *in vivo* осим што је ублажила болест и смањила степен оштећења ткива, укинула је и разлике у свим манифестацијама колитиса између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 8; Слика 16), што је недвосмислено указало на кључне улоге макрофага и експресије Gal-3 у њима у развоју болести. Перитонеални макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева стимулирани LPS-ом и DSS-ом, *in vitro*, продуковали су значајно мање TNF- α и IL-1 β и експримирали знатно мање NLRP3 него перитонеални макрофаги C57BL/6 (Фигура 6). Показано је да DSS активира инфламазом што за последицу има повећану продукцију IL-1 β (290) и да активација овог цитокина као и IL-18 у макрофагима зависи од аутокаталитичке разградње про-каспазе-1 у ензимски активан хетеродимер каспазе-1 (313-315). Активирана каспаза-1 даље разграђује молекуле про-IL-1 β и про-IL-18 и индукује ослобађање њихове биоактивне форме (316, 317). За конформациону промену и пуну активацију каспазе-1 неопходна је активација цитоплазматског протеинског комплекса названог инфламазом. Инфламазом NLRP3 је један од најбоље проучених чланова фамилије NLR рецептора, а састоји се из NLRP3 компоненте, адапторског протеина ASC (енгл. *apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain*, PYCARD) и молекула прокаспазе-1 (318, 319). Документовано је и да NLRP3 интерреагује са стресорима DAMPs (енгл. *Damage-associated molecular pattern molecules*, DAMPs) као што су екстрацелуларни АТФ, уратни кристали, амилоид и др. (320-322). На активацију NLRP3 у макрофагама такође утичу и слободни радикали кисеоника који настају у одговору на различите стимулусе (141, 142) па тако и на DSS (143, 323, 324).

У процесу испитивања могућег механизма настанка инфламације у ткиву колона C57BL/6 мишева је показана повећана експресија NLRP3 инфламазома и IL-1 β у поређењу са експресијом у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Такође, потврђена је и повећана експресија гена за NLRP3 и IL-1 β у ткиву колона C57BL/6 мишева (Слика 14а и б; Графикон 2). Добијени резултати су у

складу са студијом која је документовала да делеције гена за каспазу-1, NLRP3, ASC, катепсин В и катепсин L смањују све манифестације колитиса изазваног DSS-ом (290).

5.3. Делеција гена за Gal-3 смањују присуство инфламацијских ћелија у ткиву колона

Анализа експресије мембранских маркера инфламацијских ћелија у ткиву колона оболелих Gal3^{-/-} мишева указала је да одсуство овог молекула смањује присуство дендритских ћелија и неутрофила (Фигуре 9 и 15).

Добро је познато да Gal-3 има важну улогу у миграцији дендритских ћелија (270, 325), а да активације TLRs у овим ћелијама узрокује ослобађање проинфламацијских цитокина и хемокина што доприноси инфилтрацији полиморфонуклеарима као и активацији других ћелија урођене имуности (145, 326, 327). Миграцију дендритских ћелија регулише Gal-3 локализован у гликолипопротеинским микродоменима плазма мембране. Gal-3 је дифузно расејан у цитоплазми неактивних дендритских ћелија, а стимулација ових ћелија полимеризацијом нових микрофиламената актина омогућује концентрисање Gal-3 у поменутим доменима ћелијске мембране. Gal-3 се такође концентрише и у деловима ћелијске мембране укључене у кретање, као што су ламелиподије. Показано је да су микродомени плазма мембране мање сложени код дендритских ћелија Gal3^{-/-} него код истих ћелија C57BL/6 мишева, а да је Gal-3 нужан за њихово комплетно формирање, што утиче на спорије кретање незрелих дендритских ћелија Gal3^{-/-} мишева у дренажне лимфне чворове (270).

Показано је да интрацелуларни Gal-3 супримира продукцију IL-12 у дендритским ћелијама и на тај начин смањује Th1 имунски одговор (301, 328). Овде приказани резултати су показали да делеција гена за Gal-3 смањује број инфламацијских, а повећава број регулаторних дендритских ћелија у ткиву колона (Фигуре 10 и 11). Недавно објављена студија је показала да делеција гена за Gal-3 или селективна инхибиција Gal-3 смањује број инфламацијских дендритских ћелија (CD11c+CD11b+) у ткиву јетре и поспешује толерогени фенотип дендритских ћелија, као и оних које продукују IL-10 (329).

Антиинфламацијски цитокин IL-10 има кључну улогу у одржавању хомеостазе у гастроинтестиналном тракту. Животиње са делецијом гена за IL-10

или његов рецептор спонтано развијају колитис, а дефицијенција IL-10 погоршава клинички ток у неколико модела колитиса (330-334). Апликовање IL-10 ублажава колитис у мишева, тако што инхибира интестиналну инфламацију и супримира продукцију проинфламацијских цитокина (335-337). Дендритске ћелије, макрофаги, Т и В лимфоцити продукују IL-10, који везивањем за свој рецептор смањује продукцију TNF- α преко различитих механизма, укључујући индукцију SOCS3, као и других антиинфламацијских протеина (338-340).

Gal-3 олакшава ослобађање медијатора из мастоцита активацијом Fc ϵ RI и/или Fc ϵ RI-IgE комплекса (240, 341). Мастоцити пореклом из костне сржи Gal-3^{-/-} мишева имају значајно мањи ниво протеина JNK1 у поређењу са мастоцитима изолованим из костне сржи C57BL/6 мишева, што је највероватније узрок мање продукције IL-4 (271). У ламини проприји колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом није запажена значајна разлика у броју укупних мастоцита.

Показано је да током инфекције мишева са *T. Gondii*, Gal-3 подстиче стварање реактивних кисеоничких врста у перитонеалним неутрофилима (342). Интезитет болести у акутној фази улцерозног колитиса је повезан са повећаним инфлуksom неутрофила у мукозу и лумен црева, што за последицу има формирање криптних апцеса (343). Активисани неутрофили који циркулишу, представљају велики извор проинфламацијских цитокина и њихова улога је повећана у активној фази улцерозног колитиса. IL-6 и IL-1 β , као и слободни радикали кисеоника су потентни активатори неутрофила, тако да повећана продукција ових медијатора може да узрокује тешко оштећење епитела (148). Резултати приказани у овој студији показују да делеција гена за Gal-3 смањује укупан број неутрофила и продукцију IL-1 β и TNF- α . На основу ових резултата, закључено је да су дендритске ћелије и неутрофили одговорни за продукцију проинфламацијских цитокина (TNF- α , IL-6 и IL-1 β).

Показано је да је продукција IL-6 повећана у колитису изазваном DSS-ом (344–351), што је у складу са овде приказаним резултатима. Познато је да IL-6 активира STAT3 што повећава концентрацију S100A9 (352). S100A9 је ефекторски молекул који појачава трансдукцију сигнала са TLRs (353) и може

да регрутује гранулоците (354-358). Блокирање овог молекула ублажава експериментални колитис (352).

TNF- α је један од најранијих биомаркера у иницијалној фази колитиса. Овај цитокин поспешује секрецију других проинфламацијских цитокина и потенцијално умањује ефекте IL-10 (359).

Да је улога NKT ћелија у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом протективна указало је неколико студија у којима је документовано да NKT ћелије, након стимулације, продукују значајне количине IL-4 и IFN- γ , а да је повећана и цитолитичка активност ових ћелија (360-365). Показано је да NKT ћелије које продукују IL-9 превенирају развој акутног колитиса изазваног DSS-ом тако што супримирају продукцију IFN- γ и IL-17A истовремено повећавајући продукцију IL-10 и TGF- β (156). Могући утицај Gal-3 на функцију NKT ћелија је и даље нерасветљен иако неки подаци указују на то да Gal-3 игра важну проинфламацијску улогу у хепатитису изазваном конканавалином А тако што, између осталог, повећава инфилтрацију и активацију NKT ћелија (272). Активација NKT ћелија α -GalCer-ом је значајно смањила оштећење ткива колоне у обе врсте животиња али није укинуло разлике у клиничком току и хистолошком скору (Фигура 13; Слика 18). Насупрот овим налазима у болести добијеној применом оксазолоне документована је проинфламацијска улога NKT ћелија посредована повећаном продукцијом IL-13 који има токсично дејство на епителне ћелије (366).

5.4. Примена антагонисте Gal-3 је смањила оштећење ткива колоне и инфламацију изазвану DSS-ом

Примена *Davanat*-а је значајно ($p < 0.05$) смањила клинички и патохистолошки скор у C57BL/6 мишева третираних DSS-ом. Ткиво колоне C57BL/6 мишева којима је даван *Davanat* било је очуване грађе са местимично присутним инфламацијским ћелијама. Примена *Davanat*-а је значајно смањила и концентрације IL-1 β и TNF- α у серуму као и експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колоне. Фармаколошка инактивација Gal-3 је значајно смањила болест, редукујући активацију инфлазома и продукцију IL-1 β .

Traber и сарадници су показали да *Davanat* значајно смањује експресију Gal-3 у макрофагима (285). У моделу болести неалкохолне масне јетре фармаколошка инактивација Gal-3 *Davanat*-ом је смањила оштећење хепатоцита, инфламацију и фиброзу, што је било повезано за редукованом експресијом Gal-3 на макрофагима (367).

5.5. Фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs поспешила је алтернативну активацију макрофага у ткиву колона

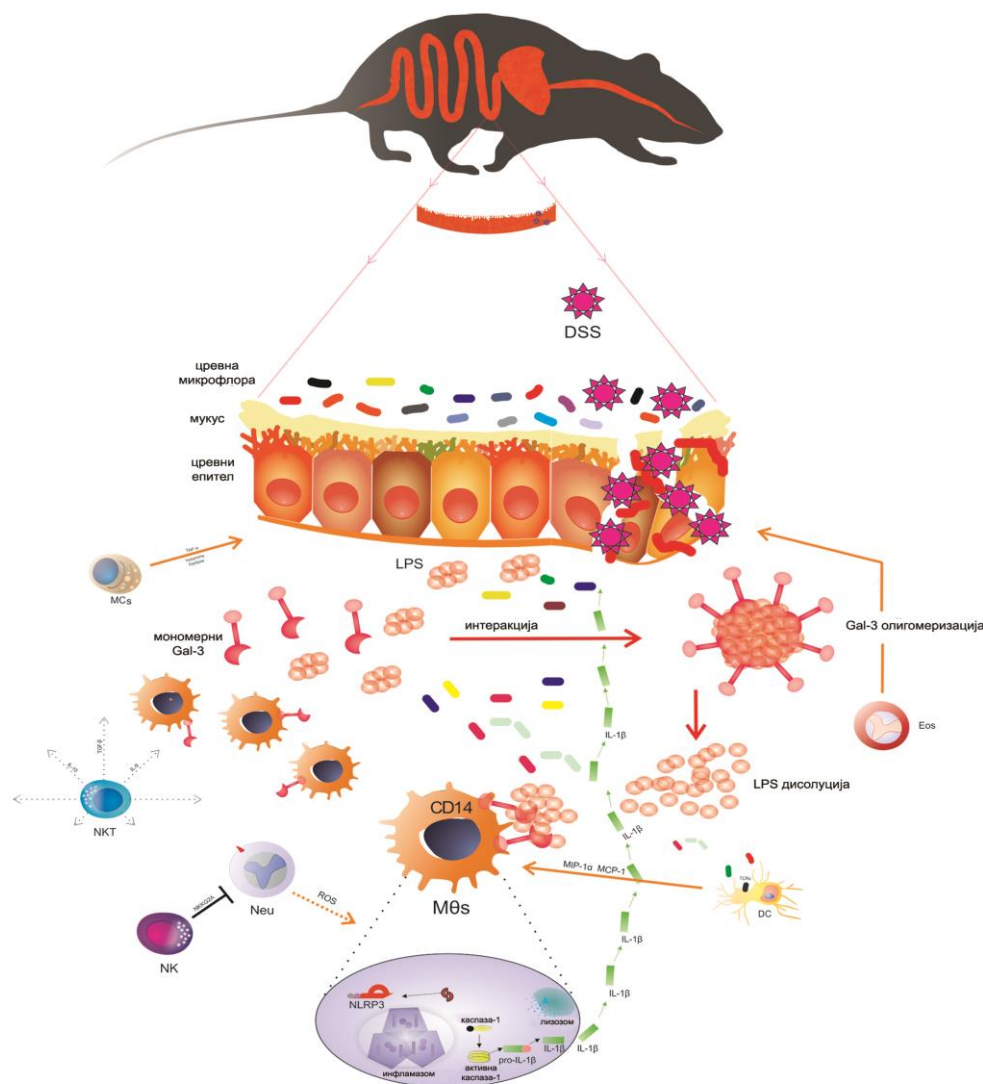
Имунорегулаторне карактеристике MSCs отварају потпуно нове терапијске могућности. Показано је да MSCs могу да делују инхибиторно не само на ћелије стечене имуности, него и на ћелије урођене имуности (92). Макрофаги представљају једне од кључних ћелија у патогенези акутног улцерозног колитиса у људи, као и у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом (138, 290). Недавно су *Liu* и сарадници показали да апликација MSCs, у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом, регрутује макрофаге и подстиче продукцију антиинфламацијских цитокина и тако ублажава клинички ток болести (100). Резултати добијени у овом истраживању су показали да су клинички ток и оштећење ткива колона били значајно мањи након апликације MSCs. Серумска концентрација IL-10 је била повећана, као и проценат алтернативно активисаних макрофага у ткиву колона након превентивне примене MSCs (Фигуре 20 и 22). *Kim* и *Hematti* су први показали да MSCs изоловане из костне сржи људи могу да подстакну алтернативну активацију макрофага (368). Друга студија је показала да моноцити изоловани из периферне крви повећано експримирају CD206, а смањено експримирају HLA-DR и редукују способност алореактивног одговора Т лимфоцита након кокултивисања са MSCs изолованих из пупчане врпце (369). *Zhang* и сарадници су показали MSCs изоловане из гингиве људи могу да индукују поларизацију макрофага у M2 фенотип (370). У овој студији је показано да фармаколошка инактивација Gal-3 у MSCs за резултат има повећано присуство алтернативно активисаних макрофага (F4/80+CD206+) као и макрофага који продукују IL-10 у ткиву колона животиња третираних DSS-ом. Ово је указало на важну улогу Gal-3, који продукују MSCs за поларизацију макрофага у M2 фенотип. Gal-3 игра

важну улогу у поларизацији макрофага, као и њиховој функцији (267, 268, 272, 371). Показано је да у моделу фулминатног хепатитиса изазваног са конкавалином А делеција гена за Gal-3, као и фармаколошка инхибиција (TD139) овог молекула подстичу алтернативну активацију макрофага у ткиву јетре (272).

Подаци из овог истраживања као и подаци из литературе указују на важну улогу Gal-3 у патогенези колитиса, а модел иницијаторске улоге Gal-3 у патогенези акутног колитиса, претпостављен и на основу овде показаних резултата, приказана је на слици 25.

У почетној фази акутног колитиса Gal-3 олигомеризује агрегате LPS-а ослобођене из бактерија продрлих у субмукозу тако што мономерни Gal-3 својим С-терминалним доменом реагује са гликанима из агрегата LPS-а. Следствена стабилизација мономера LPS-а олакшава растварање агрегисаних форми. Тако ослобођени мономерни LPS сада може да се веже за CD14, што активира фагоцитозу јер омогућује груписање CD14 на површини макрофага. Груписани CD14 заједно са TLR-4 и мономерним LPS (CD14/TLR-4:LPS) активира NLRP3 што повећава продукцију IL-1 β у макрофагима и отпочиње даљу ланчану реакцију.

Убрзана и појачана инфламација у ткиву колона у C57BL/6 мишева указује на важну проинфламацијску улогу Gal-3 у моделу акутног колитиса, што би могло да има и терапијске импликације.



Слика 25. Улога и значај Gal-3 у патогенези акутног колитиса. Мономерни Gal-3 реагује са гликанима из агрегата LPS-а. Интеракција Gal-3: LPS подстиче процес олигомеризације Gal-3, која пак поспешује растварање агрегата LPS-а, стабилизацију мономера LPS-а, као и повећану реакцију LPS-а са CD14, што води повећаној активацији фагоцитозе. Током почетне фазе акутног колитиса LPS се ослобађа из бактерија лумена колона, изазивајући олигомеризацију Gal-3, "накупљање" CD14 на макрофагима и повећање активације NLRP3 инфламазома која је зависна од CD14/TLR-4:LPS, узрокујући тако продукцију IL-1 β у макрофагима.

6. ЗАКЉУЧАК

Делеција гена за Gal-3, као и примена *Davanat*-а, ублажава симптоме и редукује оштећење ткива у моделу мишјег акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом. Делеција гена за Gal-3 значајно смањује активацију инфлазома NLRP3 и продукцију IL-1 β у макрофагима колона током иницијалне фазе колитиса. Недостатак Gal-3 повећава присуство антиинфламацијских (M2) макрофага у ламини проприји оболелих мишева што смањује инфлукс инфламацијских дендритских ћелија и неутрофила у ткиво колона и манифестује се значајно слабијим колитисом.

Закључак је изведен на основу следећих резултата добијених током третмана Gal-3^{-/-} и C57BL/6 мишева DSS-ом:

1. Gal-3^{-/-} мишеви спорије развијају колитис што се манифестује очуваном дужином колона, мањим хистолошким и клиничким скором
2. Делеција гена за Gal-3 инхибира секрецију проинфламацијских цитокина и смањује присуство запаљењских ћелија у ламини проприји колона
3. Смањење параметара системске инфламације регистровано у Gal-3^{-/-} мишева, последица је повећане заступљености антиинфламацијских (M2) макрофага и регулаторних дендритских ћелија као и смањеног присуства проинфламацијских (M1) макрофага, инфламацијских дендритских ћелија и неутрофила у ламини проприји инфламираног колона
4. Одсуство Gal-3 узрок је смањене активације инфлазома NLRP3 и и следствене продукције IL-1 β у F4/80+ макрофагима запаљеног ткива и перитонеума што је потврђено и *in vitro* симултаном стимулацијом перитонеалних макрофага, здравих Gal3^{-/-} мишева, LPS-ом и DSS-ом
5. Одговор перитонеалних макрофага здравих Gal3^{-/-} мишева на симултану стимулацију LPS-ом и DSS-ом одликује се смањеном експресијом инфлазома NLRP3 и последично смањеном продукцијом IL-1 β
6. Применена *Davanat*-а смањује секрецију проинфламацијских цитокина и експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона оболелих C57BL/6 мишева што смањује оштећење колона и ублажава болест.

СКРАЋЕНИЦЕ

IL	интерлеукин (<i>interleukin</i>)
ROS	реактивни медијатори кисеоника (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCID	озбиљна комбинована имунодефицијенција (<i>severe combined immunodeficient</i>)
RNA	рибонуклеинска киселина (<i>ribonucleic acid</i>)
LTB4	<i>lipid-derived mediators leukotriene B4</i>
PAF	фактор активације тромбоцита (<i>platelet-activating factor</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
IFN- γ	интерферон- γ (<i>interferon-γ</i>)
NKG2A	инхибиторни рецептор урођено убилачких ћелија (<i>The inhibitory NK cell receptor</i>)
NKT ћелије	урођено убилачке Т ћелије (<i>natural killer T cells</i>)
NK ћелије	урођено убилачке ћелије (<i>natural killer cells</i>)
TLR	рецептор сличан Toll-у (<i>Toll-like receptor</i>)
MDC8	маркер за хумане леукоците
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
MHC	молекул II класе главни комплекс ткивне подударности (<i>major histocompatibility complex</i>)
CX3CR1	хемокински рецептор 1
NF κ B	транскрипциони фактор (<i>nuclear factor κB</i>)
5-ASA	(<i>5-aminosalicylic acid</i>)
DSS	декстран натријум сулфат (<i>Dextran Sulphate Sodium</i>)
TNBS	тринитро бензен сулфонска киселина (<i>2,4,6 Trinitrobenzene sulfonic acid</i>)
DNBS	динитро бензен сулфонска киселина (<i>Dinitrobenzene sulfonic acid</i>)
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein</i>
CXCL1/	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>

КС	
CCL11	хемокин 11 (<i>chemokine 11</i>)
α -GalCer	α -галактоцерамид
NLRP3	<i>NOD-like receptor family; pyrin-containing domain 3</i>
NLRs	рецептори слични NOD-у (<i>nucleotide binding and oligomerization domain, NOD-like receptors</i>)
NO	азот монооксида
iNOS	азот монооксид синтазе
Gal-3	галектина 3
CRD	домен за препознавање угљених хидрата (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
MMPs	матриксна металопроотеиназа (<i>matrix metalloproteinase</i>)
Lamp	<i>the lysosomal associated membrane proteins</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
WT	<i>wild type</i>
Gal-3 ^{-/-}	<i>galectin 3 knockout</i>
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
Gal-	синтетски инхибитор галектина 3
3INH	
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EDTA	етилен диамин тетра сирћетна киселина (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HRP	<i>Streptavidin HorseRadish Peroxidase</i>
SE	стандардна грешка (<i>Standard Error</i>)

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:521-533.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-429.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434.
4. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143:895-904.
5. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.
6. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-536.
7. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3:394-400.
8. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:321-335.
9. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; 234:29-40.
10. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126:1620-1633.
11. Loftus Ev Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504–1517.
12. Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14:1553–1559.

13. Burisch J. Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population-based inception cohort. *Dan Med J* 2014; 61:B4778.
14. Folwaczny C, Noehl N, Tschop K, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 1997; 113:101–106.
15. Khoo UY, Bjarnason I, Donaghy A, Williams R, Macpherson A. Antibodies to colonic epithelial cells from the serum and colonic mucosal washings in ulcerative colitis. *Gut* 1995; 37:63–70.
16. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51:2–9.
17. Onuma EK, Amenta PS, Ramaswamy K, Lin JJ, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): a predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:466–471.
18. Das KM. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease: new insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1–13.
19. Merger M, Croitoru K. Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 1998; 10:69–78.
20. Olives JP, Breton A, Hugot JP, Oksman F, Johannet C, Ghisolfi J, Navarro J, Cezard JP. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25:142–148.
21. Roozendaal C, Pogany K, Hummel EJ, Horst G, Dijkstra G, Nelis GF, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg CG. Titres of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease are not related to disease activity. *Q J Med* 1999; 92:651–658.
22. Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, Sato Y, Kasuga N, Nakamura T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1438-1443.

23. Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992; 103:1587-1595.
24. Anezaki K, Asakura H, Honma T, Ishizuka K, Funakoshi K, Tsukada Y, Narisawa R. Correlations between interleukin-8, and myeloperoxidase or luminol-dependent chemiluminescence in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Intern Med* 1998; 37:253-258.
25. Nixon JB, Riddell RH. Histopathology of ulcerative colitis. In: Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Hawkins CF, eds. *Inflammatory bowel diseases*, 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990; 247-262.
26. Thompson H. Histopathology of Crohn's disease. In: Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Hawkins CF, eds. *Inflammatory bowel diseases*, 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990; 263-285.
27. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980; 286:264-265.
28. Snyder F, Lee TC, Blank ML. Platelet-activating factor and related ether lipid mediators. Biological activities, metabolism, and regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 568:35-43.
29. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, Hugli TE. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol* 1978; 120:109-115.
30. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9233-9237.
31. Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 1987; 139:3474-3483.
32. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ. Molecular cloning of a human

- monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988; 167:1883-1893.
33. Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M. Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol* 1991; 96:690-694.
 34. Thomsen MK, Larsen CG, Thomsen HK, Kirstein D, Skak-Nielsen T, Ahnfelt-Rønne I, Thestrup-Pedersen K. Recombinant human interleukin-8 is a potent activator of canine neutrophil aggregation, migration, and leukotriene B4 biosynthesis. *J Invest Dermatol* 1991; 96:260-266.
 35. Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Säfsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54:1714-1720.
 36. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998; 42:470-476.
 37. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 2001; 159:2001-2009.
 38. Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, Hahn EG. Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:174-179.
 39. Stasikowska-Kanicka O1, Danilewicz M, Głowacka A, Wągrowaska-Danilewicz M. Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. *Adv Med Sci* 2012; 57:230-236.
 40. Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, Robinson ZD, Furuta GT. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52:650-661.

41. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* 2009; 21:1303-1309.
42. Peterson CG, Eklund E, Taha Y, Raab Y, Carlson M. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1755-1762.
43. Xue FM, Zhang HP, Hao HJ, Shi ZY, Zhou C, Feng B, Yang PC. CD98 positive eosinophils contribute to T helper 1 pattern inflammation. *PLoS One* 2012; 7:e51830.
44. Yan Y, Vasudevan S, Nguyen HT, Merlin D. Intestinal epithelial CD98: an oligomeric and multifunctional protein. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:1087-1092.
45. Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2012; 7:e44113.
46. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113:1490-1497.
47. Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:115-126.
48. Shimamoto M, Ueno Y, Tanaka S, Onitake T, Hanaoka R, Yoshioka K, Hatakeyama T, Chayama K. Selective decrease in colonic CD56(+) T and CD161(+) T cells in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:5995-6002.
49. Manzano L, Alvarez-Mon M, Abreu L, Antonio Vargas J, de la Morena E, Corugedo F, Duràntez A. Functional impairment of natural killer cells in active ulcerative colitis: reversion of the defective natural killer activity by interleukin 2. *Gut* 1992; 33:246-251.

50. Voedisch S, Koenecke C, David S, Herbrand H, Förster R, Rhen M, Pabst O. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* 2009; 77:3170-3180.
51. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303:1662-1665.
52. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006; 203:519-527.
53. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129:50–65.
54. Verstege MI, ten Kate FJ, Reinartz SM, van Drunen CM, Slors FJ, Bemelman WA, Vyth-Dreese FA, te Velde AA. Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2008; 56:233–241.
55. Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005; 206:132–148.
56. de Baey A, Mende I, Riethmueller G, Baeuerle PA. Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31:1646-1655.
57. de Baey A, Mende I, Baretton G, Greiner A, Hartl WH, Baeuerle PA, Diepolder HM. A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J Immunol* 2003; 170:5089-5094.
58. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:841-850.
59. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigenpresenting dendritic cells and induces

- inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:504-510.
60. Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut* 2000; 47:215-227.
 61. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1: S53-S60.
 62. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:1-22.
 63. Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 2008; 119:22-31.
 64. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011; 34:237-246.
 65. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Williams M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 2013; 6:498-510.
 66. Rugtveit J, Haraldsen G, Høgasen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, Scott H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995; 37:367-373.
 67. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112:1493-1505.
 68. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16:144-150.

69. David JR. Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56:72-77.
70. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity. Science 1966; 153:80-82.
71. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 1994; 179:1895-1902.
72. Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. Mol Med Toda 1997; 3:502-507.
73. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. Eur J Clin Invest 2001; 31:337-343.
74. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. Gastroenterology 1998; 115:357-369.
75. Jobin C, Sartor RB. The IkappaB/NF-kappaB system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. Am J Physiol Cell Physiol 2000; 278:C451-462.
76. Kirsner JB (Ed): Inflammatory bowel disease, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders; 2000.
77. Jess T, Loftus EV Jr, Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Schleck CD, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Munkholm P, Sandborn WJ. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. Gastroenterology 2006; 130:1039-1046.
78. Vucelić B i saradnici. Gastroenterologija i hepatologija. I edicija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
79. Jung SA. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: what is the role of colonoscopy? Clin Endosc 2012; 45:254-62.

80. Yang SK, Byeon JS. *Diagnosis and Treatment of Colonoscopy*. Seoul: Koonja; 2009.
81. Choi KY. Endoscopic manifestation of inflammatory bowel disease: ulcerative colitis. In: *Proceedings of the 19th Seminar of Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy*; 1998 Aug 30-Sep 3; Seoul, Korea. Seoul: Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy; 1998. p. 47-54.
82. Yang SK. Endoscopic diagnosis of ulcerative colitis. In: *Proceedings of the 22nd Seminar of Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy*; 2003 Mar 26; Seoul, Korea. Seoul: Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy; 2000. p. 201-218.
83. Kim YH. Common errors in the diagnosis process. *Intest Res* 2003; 1:106-110.
84. Tedesco FJ, Hardin RD, Harper RN, Edwards BH. Infectious colitis endoscopically simulating inflammatory bowel disease: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 1983; 29:195-197.
85. Fochios SE, Korelitz BI. The role of sigmoidoscopy and rectal biopsy in diagnosis and management of inflammatory bowel disease: personal experience. *Am J Gastroenterol* 1988; 83:114–119.
86. Matsumoto T, Iida M, Kimura Y, Fujishima M. Culture of colonoscopically obtained biopsy specimens in acute infectious colitis. *Gastrointest Endosc* 1994; 40:184–187.
87. Surawicz CM, Belic L. Rectal biopsy helps to distinguish acute self-limited colitis from idiopathic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86:104–113.
88. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005; 201:1205-15.
89. Bryant RV, Brain O, Travis SP. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50:90-112.
90. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83–92.

91. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143–147.
92. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity* 2010; 43:255–263.
93. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Nakamura T, Eguchi H, Kawano S. The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. *Pharmacology* 2007; 80:193-199.
94. Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *J Gastroenterol* 2011; 46:143-152.
95. Tanaka F, Tominaga K, Ochi M, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Ohta K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci* 2008; 83:771-779.
96. Wang C, Chen J, Sun L, Liu Y. Tgf-beta signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Biol Rep* 2014; 41:4977-4983.
97. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 2013; 62:1131-1341.
98. Abdel Salam AG, Ata HM, Salman TM, Rashed LA, Sabry D, Schaalán MF. Potential therapeutic utility of mesenchymal stem cells in inflammatory bowel disease in mice. *Int Immunopharmacol* 2014; 22:515-521.
99. He XW, He XS, Lian L, Wu XJ, Lan P. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2012; 57:3136-3144.

100. Liu W, Zhang S, Gu S, Sang L, Dai C. Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF β 1. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35:858-865.
101. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scan J Immunol* 2010; 71:267–274.
102. Liu GY, Xu Y, Li Y, Wang LH, Liu YJ, Zhu D. Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2013; 15:1208-1017.
103. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000; 19:51-62.
104. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:1073-1083.
105. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007; 2:541-546.
106. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology* 2014; 22:219-233.
107. Bailey RW, Bourne EJ. Intracellular glycosidases of dextran-producing bacteria. *Nature* 1961; 191:277-278.
108. Marcus R, Watt J. Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. *Lancet* 1969; 2:489-490.
109. Marcus R, Watt J. Colonic ulceration in young rats fed degraded carrageenan. *Lancet* 1971; 2:765-766.
110. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1985; 82:1327-1336.
111. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702.
112. Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 1992; 33:1521-1527.

113. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci* 1999; 61:67-70.
114. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 2000; 49:9-15.
115. Hirono I, Kuhara K, Yamaji T, Hosaka S, Golberg L. Carcinogenicity of dextran sulfate sodium in relation to its molecular weight. *Cancer Lett* 1983; 18:29-34.
116. Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol* 1994; 29:430-438.
117. Breider MA, Eppinger M, Gough A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Vet Pathol* 1997; 34:598-604.
118. Mallon PT, Mckenna M, Kirk SJ, Gardiner KR (2006) Dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis reduces mucosal barrier function in Sprague-Dawley rats. *Canadian Digestive Diseases Week (CDDW)*, 2006 ed. Banff, Alberta, Canadian Association of Gastroenterology.
119. Chiba T. Cell kinetics of carcinoma originating from rat colitis induced by dextran sulphate sodium. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1993; 90:774–781.
120. Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1458-1475.
121. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000; 21:757-768.
122. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69:238-249.

123. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:G1328-1338.
124. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:253048.
125. Laprise P. Emerging role for epithelial polarity proteins of the Crumbs family as potential tumor suppressors. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:868217.
126. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* 2007; 140:12-19.
127. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 2009; 4:e6073.
128. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* 1999; 48:137-143.
129. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39:234-241.
130. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14338-14343.
131. Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:267-273.
132. Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Exp Anim* 2001; 50:387-395.
133. Verdù EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E, Blum AL, Corthésy-Theulaz I, Tlaskalova-Hogenova H, Michetti P. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the

- severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:46-50.
134. Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol* 2001; 1:3.
135. Axelsson LG, Landström E, Goldschmidt TJ, Grönberg A, Bylund-Fellenius AC. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res* 1996; 45:181-191.
136. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107:1643-1652.
137. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:718617.
138. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:495-549.
139. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13249-13254.
140. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337:647-654.
141. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009; 30:556-565.
142. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320:674-677.

143. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci* 2007; 81:362-371.
144. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194:1207-1218.
145. Nolan KF, Strong V, Soler D et al. IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol* 2004; 172:2201-2209.
146. Berndt BE, Zhang M, Chen GH, Huffnagle GB, Kao JY. The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J Immunol* 2007; 179:6255-6262.
147. Boxer LA. Role of neutrophils in genetic disorders of phagocyte function leading to IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46 Suppl 1:E17.
148. D'Odorico, A., D'Inca, R., Mestriner, C., Di Leo, V., Ferronato, A. & Sturniolo, G.C. Influence of disease site and activity on peripheral neutrophil function in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45:1594–1600.
149. Steinbeck MJ, Roth JA, Kaeberle ML. Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon-gamma. *Cell Immunol* 1986; 98:137–144.
150. Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, Melgar S. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol* 2013; 6:1016-1026.
151. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24:15-18.
152. Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* 2009; 31:185-205.

153. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP: Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 2004; 172:5664–5675.
154. Shichijo K, Makiyama K, Wen CY, Matsuo M, Nakayama T, Nakashima M, Ihara M, Sekine I: Antibody to eosinophil cationic protein suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4505–4510.
155. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 2000; 119:119-128.
156. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol* 2013; 6:347-357.
157. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inghin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62:240-248.
158. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999; 34:66-74.
159. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzo F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163:143-147.
160. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106:533-539.
161. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:385-391.
162. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA, Chiriva-Internati M. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med* 2014; 2:88.

163. Uchimura K, Rosen SD. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:559-565.
164. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 2007; 26:605-616.
165. Cunningham AL, Harman AN, Donaghy H. DC-SIGN 'AIDS' HIV immune evasion and infection. *Nat Immunol* 2007; 8:556-558.
166. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, Simmons A. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 2007; 8:569-577.
167. van Vliet SJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol* 2006; 7:1200-1208.
168. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995; 378:736-739.
169. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; 409:733-739.
170. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6:1245-1252.
171. Toscano MA, Bianco GA, Parregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8:825-834.
172. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008; 9:593-601.
173. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:255-266.

174. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9:979–984.
175. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269:20807–20810.
176. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19:433–440.
177. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem* 1993; 268:27034–27038.
178. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* 1995; 3:1379–1393.
179. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 1998; 273:13047–13052.
180. Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P, Acharya KR. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 1998; 37:13930–13940.
181. Varela PF, Solis D, Diaz-Maurino T, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. The 2.15 Å crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *J Mol Biol* 1999; 294:537–549.
182. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29–41.
183. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol* 2007; 66:143–158.
184. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1679–1700.

185. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e17.
186. Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai K, Wada Y, Futai M. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361:195-201.
187. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 1998; 63:159-168.
188. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 2008; 180:3091-3102.
189. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:232–254.
190. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem* 2008; 283:10109-10123.
191. Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9:578–584.
192. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23:313-320.
193. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:263-273.
194. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing “danger”: Galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004; 19:583-591.
195. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside - binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262:7383-7390.

196. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a ga-lactoside –binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269:4424-4430.
197. Ahmed H, Bianchet MA, Amzel LM, Hirabayashi J, Kasai KI, Giga-Hama Y, Tohda H, Vasta GR. Novel carbohydrate specificity of the 16-kDa galectin from *Caenorhabditis elegans*: binding to blood group precursor oligosaccharides (type 1, type 2, Talpha, and Tbeta) and gangliosides. *Glycobiology* 2002; 12:451-461.
198. Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Nakamura T. Characterization of the *Xenopus* ga-lectin family. Three structurally different types as in mammals and regulated expression during embryogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278:12285-12293.
199. Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 281:27-35.
200. Fang R, Mantle M, Ceri H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J* 1993; 293:867-872.
201. Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside -binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:1428-1432.
202. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2002; 19:441–449.
203. Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* 1991; 115:1437-1448.
204. Watt DJ, Jones GE, Goldring K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J* 2004; 19:615-619.
205. Georgiadis V, Stewart HJS, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, Deltour L, Goldring K, Poirier F, Lawrence-Watt DJ. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236:1014-1024.
206. Fowlis D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn* 1995; 203:241-251.

207. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:424-438.
208. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:274-284.
209. van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* 2010; 20:2-12.
210. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32.000 Mr mouse macrofage subpopulation-specific antigen defined BZ monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128:1221-1228.
211. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol* 2004; 21:1177-1187.
212. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2000; 255:278-290.
213. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 212:233-239.
214. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; 20:455-460.
215. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydratebinding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:172-185.
216. Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res* 1993; 207:8-18.
217. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 2003; 270:2109-2119.
218. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1031-1036.

219. Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 2006; 16:408–414.
220. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Transact* 1997; 25:1194–1198.
221. Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology* 1994; 4:5–12.
222. Jia S, Wang JL. Carbohydrate binding protein 35. Complementary DNA sequence reveals homology with proteins of the heterogeneous nuclear RNP. *J Biol Chem* 1988; 263:6009–6011.
223. Wang JL, Laing JG, Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* 1991; 3:243–252.
224. Birdsall B, Feeney J, Burdett IDJ, Bawumia S, Barboni EAM, Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry* 2001; 40:4859–4866.
225. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem* 1993; 268:26712–26718.
226. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the β -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 2000; 275:36311–36315.
227. Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum–Golgi complex. *Eur J Biochem* 1999; 264:569–576.
228. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K. Galectins: a family of animal beta-galactosidebinding lectins. *Cell* 1994; 76:597–598.
229. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-

- collagenous praline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacteria and tissue collagenase. *J Biol Chem* 1993; 268:26704–26711.
230. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, Raz A. The NH₂ terminus of galectin-3 governs cellular compartmentization and functions in cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59:6239-6245.
231. Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, Hughes RC. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 2000; 10:1201-1208.
232. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19:527-535.
233. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19:575-581.
234. Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379:97-106.
235. Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2002; 277:6852-6857.
236. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:198–208.
237. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6737-6742.
238. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Letters* 2004; 9:305-328.
239. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* 1990; 265:7097-7099.
240. Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616-635.

241. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosilated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem* 1992; 267:6983-6990.
242. Hughes, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
243. Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, Letesson JJ, Van den Brule F, Castronovo V, Wattiaux R, Coninck SW. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer* 1998; 75:105–111.
244. Laing JG, Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry* 1988; 27:5329-5334.
245. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucl Acids Res* 2001; 29:3595-3602.
246. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21:8001–8010.
247. Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells. *Cancer Res* 1999; 59:4148–4154.
248. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res* 2004; 64:6363-6367.
249. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in premRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1213–1217.
250. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:7292-7300.
251. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr.. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 1995; 147:1016-1028.

252. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications during *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* 2004; 172:493-502.
253. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasić R, Vuk-Pavlović S. Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Studied by Microarray Hybridization. *Bioch Biophys Res Commun* 2000; 275:731-738.
254. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002; 277:15819-15827.
255. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165:2156-2164.
256. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 2002; 32:1434-1444.
257. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156:899-909.
258. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63:8302-8311.
259. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1183:158-182.
260. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD, Rabinovich GA. Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *J Clin Immunol* 2011; 31:10-21.
261. van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, Deelder AM, Cummings RD, Hokke CH, van Die I. LacdiNAc-glycans

- constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol* 2004; 173:1902-1907.
262. John CM, Jarvis GA, Swanson KV, Leffler H, Cooper MD, Huflejt ME, Griffiss JM. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cell Microbiol* 2002; 4:649-662.
263. Pelletier I, Sato S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem* 2002; 277:17663–17670.
264. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2007; 170:546–556.
265. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* 2003; 112:389–397.
266. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 2008; 180:2650–2658.
267. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, Xu D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181:2781–2789.
268. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokinelike regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010; 185:7037-7046.
269. Volarevic V, Lukic ML. Chapter 21. Autoimmune Disorders in Galectin-3 Deficient Mice. In Klyosov A, Traber P. Galectins and Disease implications in Targeted therapeutics. 2012. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC. pp 359–376.

270. Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129:573-583.
271. Chen HY, Sharma BB, Yu L, Zuberi R, Weng IC, Kawakami Y, Kawakami T, Hsu DK, Liu FT. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. *J Immunol* 2006; 177:4991-4997.
272. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 Deficiency Prevents Concanavalin A- Induced Hepatitis in Mice. *Hepatology* 2012; 55:1954-1964.
273. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52:100-110.
274. Mathieu A, Nagy N, Decaestecker C, Ferdinande L, Vandenbroucke K, Rottiers P, Cuvelier CA, Salmon I, Demetter P. Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice. *Int J Exp Pathol* 2008; 89:438-446.
275. Frol'ová L, Smetana K Jr, Borovská D, Kitanovicová A, Klimesová K, Janatková I, Malícková K, Lukás M, Drastich P, Benes Z, Tucková L, Manning JC, André S, Gabius HJ, Tlaskalová-Hogenová H. Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD? *Inflamm Res* 2009; 58:503-512.
276. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; pp263-328.
277. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; pp501-578.
278. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14(15):32.
279. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.

280. Gritzmacher CA, Mehl VS, Liu FT. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 59 untranslated regions. *Biochemistry* 1992; 31:9533–9538.
281. Hsu DK, Yang RY, Pan Z. et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073–1083.
282. Caitlyn G. Whittam, Amanda D. Williams, and Christopher S. Williams. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium. *J Vis Exp* 2010; (35): 1652.
283. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:238-245.
284. Platt D, Klyosov AA, Zomer E. In: *Carbohydrate Drug Design*. Klyosov AA, Witczak ZJ, Platt D, editors. 2006. ACS Symposium Series 932. American Chemical Society, Washington, DC. p. 49–66.
285. Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI, Friedman SL. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liverdisease. *PLoS One* 2013; 8:e75361.
286. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, Bosse T, Vos AC, de Jonge-Muller ES, Roelofs H, van der Weerd L, Verspaget HW, Fibbe WE, te Velde AA, van den Brink GR, Hommes DW. Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells* 2011; 29:1549-58.
287. Demotte N, Bigirimana R, Wieërs G, Stroobant V, Squifflet JL, Carrasco J, Thielemans K, Baurain JF, Van Der Smissen P, Courtoy PJ, van der Bruggen P. A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2014; 20:1823-1833.
288. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology* 2002; 49:15.19:15.19.1–15.19.14.
289. Pala P, Hessel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243:107-124.

290. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, Tschopp J, Endres S, Latz E, Schnurr M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010; 59:1192-1199.
291. Weisser SB, van Rooijen N, Sly LM. Depletion and reconstitution of macrophages in mice. *J Vis Exp* 2012; (66):4105.
292. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:4787-4795.
293. Call DR, Nemzek JA, Ebong SJ, Bolgos GL, Newcomb DE, Remick DG. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *Am J Pathol* 2001; 158:715-721.
294. Zindl CL, Lai JF, Lee YK, Maynard CL, Harbour SN, Ouyang W, Chaplin DD, Weaver CT. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:12768-12773.
295. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, Mo JH, Shen C, Shenouda S, Corr M, Jung S, Lee J, Eckmann L, Raz E. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 23; 104:17022-17027.
296. Araki Y, Sugihara H, Hattori T. The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 2006; 17:331-334.
297. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:79-94.
298. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2008; 180:2466-2473.
299. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008; 172:247-255.

300. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, et al. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006; 168:1910-1920.
301. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol* 2002; 168:1813–1822.
302. Kuwabara I. and Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156:3939–3944.
303. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; 230:160–171.
304. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, Delucchi F, Serino M, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: A major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol* 2011; 54:975-983.
305. Hölscher C, Atkinson RA, Arendse B, Brown N, Myburgh E, Alber G, Brombacher F. A protective and agonistic function of IL-12 p40 in mycobacterial infection. *J Immunol* 2001; 167:6957–6966.
306. Louis J, Himmelrich H, Parra-Lopez C, Tacchini-Cottier F, Launois P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:459–464.
307. Brynskov J, Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Bendtzen K. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27:897–906.
308. Cappello M, Keshav S, Prince C, Jewell DP, Gordon S. Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation. *Gut* 1992; 33:1214–1219.
309. Savendahl L, Underwood LE, Haldeman KM, Ulshen MH, Lund PK. Fasting prevents experimental murine colitis produced by dextran sulfate sodium and decreases interleukin-1 beta and insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1997; 138:734–740.

310. Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology* 2003; 125:775–785.
311. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt GVP, Gillis S. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; 315:641–647.
312. Cominelli F, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis of and protection from inflammatory bowel disease. *Biotherapy* 1989; 1:369–375.
313. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:519–550.
314. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 β convertase activity. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:5227–5231.
315. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995; 267:2000–2003.
316. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227:95–105.
317. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10:241–247.
318. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:372–379.
319. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140:821–832.
320. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440:228–232.
321. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NLRP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid β . *Nat Immunol* 2008; 9:857–865.

322. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NLRP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440:237–241.
323. Korkina, L., Suprun, M., Petrova, A., Mikhal'chik, E., Luci, A., De Luca, C. The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and Aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *Biofactors* 2003; 18:255–264.
324. Moslen, M.T. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1994; 366:17–27.
325. Vray B, Camby I, Vercauysse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 2004; 14:647–657.
326. Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol* 2004; 25:650–654.
327. Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci* 2011; 64:85-91.
328. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Gosset P, Trottein F. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun* 2007; 75:5148–57.
329. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45:531-543.
330. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1246:102–107.
331. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U,

- Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361:2033–2045.
332. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263–274.
333. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:571–578.
334. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16:219–230.
335. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994; 1:553–562.
336. Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, Toyonaga A, Tanikawa K. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:435–440.
337. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:71–109.
338. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin 10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.
339. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226:205–218.
340. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:170–181.
341. Frigeri L, Zuberi R, Liu FT, Epsilon BP, a beta-galactoside binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* 1993; 32:7644–7649.
342. Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM, Roque-Barreira MC, Mineo JR. Galectin-3 is essential for reactive oxygen

- species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 2013;140:210-219.
343. Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, Sato Y, Kasuga N, Nakamura T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1438-1443.
344. Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J, Kishimoto T, Tamura Y, Yoshida S. Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci* 1990; 47:2193–2197.
345. Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13:1016– 1023.
346. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94:174–181.
347. Umehara Y, Kudo M, Nakaoka R, Kawasaki T, Shiomi M. Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis. *Hepatology* 2006; 53:879–882.
348. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, Scheller J, Rose-John S, Kado S, Takada T. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol* 2010; 184:1543–1551.
349. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, Laghi L, Barberis MC, Sessa F, Noonan DM, Albin A. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med* 2010; 8:112.
350. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA,

- Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6:583–588.
351. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15:103–113.
352. Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, Lee KH, Cho IH, Chung MH, Kim HR, Ye SK. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. *PLoS One*. 2012; 7:e38801.
353. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; 13:1042–1049.
354. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81:28–37.
355. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 2009; 58:859–868.
356. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170:3233–3242.
357. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112:935–945.
358. Fang Y, Shen J, Yao M, Beagley KW, Hambly BD, Bao S. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor enhances wound healing in diabetes via upregulation of proinflammatory cytokines. *Br J Dermatol* 2010; 162:478–486.

359. Dharmani P, Leung P, Chadee K. Tumor necrosis factor-alpha and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One* 2011; 6:e25058.
360. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997; 275:977–979.
361. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Van Kaer L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997; 6:469–477.
362. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1 T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995; 270:1845–1847.
363. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M. CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998; 188:1521–1528.
364. Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1 CD41 T cells produce large amounts of IL-4 and IFN- γ upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997; 159:2240–2249.
365. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for Va14 NK T cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278:1623–1626.
366. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a TH2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17:629–638.
367. Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS One*. 2013 18;8:e83481.
368. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009; 37:1445-1453.
369. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol* 2010; 185:6617-6623.

370. Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW, Le AD. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells* 2010; 28:1856-1868.
371. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005; 175:342-349.

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

Монографска публикација

ТД

Тип записа:

Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада:

Докторска дисертација

ВР

Аутор:

Бојана Ј Симовић Марковић

АУ

Ментор/коментор

Доц. др Владислав Б Воларевић

МН

Наслов рада:

Галектин-3 у експерименталном моделу
акутног колитиса

НР

Језик публикације:

Српски (ћирилица)

ЛП

Језик извода:

Српски/енглески

ЛИ

Земља публикавања:

Србија

ЗП

Уже географско подручје:

Србија

УГП

Година:

2016.

ГО

Издавач:	Ауторски репринт
ИЗ	
Место и адреса:	34000 Крагујевац, Србија, Светозара
МС	Марковића 69
Физички опис рада:	Дисертација има 170 страна, садржи 8
ФО	поглавља, 23 фигуре, 6 графикона, 5
	табеле, 25 слика и 371 референцу
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина:	Имунологија
ДИ	
Предметна одредница/кључне	
речи:	декстран натријум сулфат, колитис,
ПО	галектин 3
УДК	
Чува се:	У Библиотеци Факултета медицинских
ЧУ	наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац,
	Србија, Светозара Марковића 69
Важна напомена:	
МН	
Извод:	
ИД	

Галектин 3 (енгл. *Galectin-3*, Gal-3) је лектин који има важну улогу у инфламацији и малигним болестима, али је његов значај у патогенези улцерозног колитиса непознат. У овом истраживању испитиван је утицај делеције гена за Gal-3 и фармаколошке инхибиције Gal-3 на патогенезу акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом (енгл. *Dextran sulphate sodium*, DSS).

У истраживању су коришћени C57BL/6 *wild type* (WT) и *knockout* мишеви (Gal-3^{-/-} на C57BL/6 подлози). Акутни колитис је изазван седмодневном применом 3% воденог раствора DSS-а (молекулска тежина 40kDa, *per os*).

Davanat (100 μ g), антагонист Gal-3 је даван WT мишевима интраперитонеално сваког другог дана. Анализиран је клинички ток болести, патохистолошке промене, одређивана је концентрација цитокина у серумима и изолатима ткива колона као и фенотип инфламацијских ћелија у ткиву колона.

Делеција гена за Gal-3 као и примена *Davanat*-а је значајно смањила оштећење колона DSS-третираних животиња. У поређењу са WT мишевима, у ткиву колона DSS-третираних Gal-3^{-/-} животиња била је нижа концентрација инфламацијских цитокина (IL-1 β , TNF- α и IL-6) уз мање присуство инфламацијских ћелија. Број F4/80+CD11b+ макрофага који продукују IL-1 β и IL-6 као и број F4/80+CD11b+SinglecF- *colonic* макрофага, CD11c+ инфламацијских дендритских ћелија које експримирају CD80 и I-A и продукују инфламацијске цитокине (TNF- α и IL-6), CD45+CD11c-Ly6G+ неутрофила који продукују TNF- α и IL-1 β је био значајно мањи у ткиву колона DSS-третираних Gal-3^{-/-} мишева. Уз то, број алтернативно активираних F4/80+CD206+ макрофага и CD11c+CD8+ дендритских ћелија које продукују IL-10 је био значајно већи у ткиву колона DSS-третираних Gal-3^{-/-} животиња. *In vitro* липополисахаридом и DSS-ом активисани макрофаги, изоловани из перитонеума здравих Gal-3^{-/-} мишева, продуковали су значајно мање TNF- α и IL-1 β у поређењу са WT макрофагима. Адоптивни трансфер перитонеалних макрофага изолованих из здравих WT животиња значајно је погоршао оштећење колона DSS-третираних Gal-3^{-/-} мишева.

Најважнији закључак ове дисертације је да Gal-3 има проинфламацијску улогу у патогенези акутног колитиса, јер активацијом инфламазома у макрофагима узрокује снажан инфламацијски одговор, миграцију и активацију макрофага, неутрофила и дендритских ћелија.

Кључне речи: декстран натријум сулфат, колитис, галектин 3

Датум прихватања теме од стране

ННВ:

ДП

29.10.2014.

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник:

Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор
емеритус Универзитета у Крагујевцу

Ментор:

Доц. др Владислав Воларевић, доцент
Факултета медицинских наука,
Универзитета у Крагујевцу за уже научне
области Микробиологија и имунологија

Члан:

Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни
професор Факултета медицинских наука,
Универзитета у Крагујевцу за уже научне
области Микробиологија и имунологија и
Онкологија

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERCITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

Monographic publication

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

PhD thesis

CC

Author:

Bojana J Simovic Markovic

AU

Menthor/co-mentor:

Ass prof Vladislav Volarevic

MN

Title:

Galectin-3 in experimental model of acute colitis

TI

Language of text:

Serbian (Cyrillic)

LT

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

Serbia

CP

Locality of publication:

Serbia

LP

Publication year:

2016.

PY

Publisher:

Author reprint

PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara
 PP Markovica 69
 Physical description: Thesis contains 170 pages, 8 chapters, 23
 PD figures, 6 graphs, 5 tables, 25 pictures, and
 371 citations
 Scientific field: Medicine
 SF
 Scientific discipline: Immunology
 SD
 Subject/key words: DSS, colitis, Gal-3
 SKW
 UDC
 Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences,
 Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia,
 Svetozara Markovica 69

Note:

N

Abstract:

AB

Galectin-3 (Gal-3) is an endogenous lectin with a broad spectrum of immunoregulatory effects: it plays an important role in autoimmune/inflammatory and malignant diseases, but the precise role of Gal-3 in pathogenesis of ulcerative colitis is still unknown.

We used a model of *Dextran Sulphate Sodium* (DSS)-induced colitis, that has a high degree of uniformity and reproducibility to human colitis, to test susceptibility of wild-type C57BL/6 and Gal-3-deficient mice (Gal-3^{-/-}) to this disease. DSS (3%, molecular weight 40kDa) was dissolved in water and given to C57Bl/6 and Gal-3^{-/-} mice in place of normal drinking water (*ad libitum*) for 7 days. Disease Activity Index (DAI: weight loss, stool consistency, visible blood in feces), was used to assess the clinical signs of colitis. The cellular make up of colon and phenotype of colon-infiltrated immune cells were determined by flow cytometry.

Genetic deletion of Gal-3 significantly reduces the damage of colon tissue of DSS-treated mice. Level of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α и IL-6) was significantly lower in sera and colons of DSS-treated Gal-3^{-/-} mice when compared to WT DSS-treated mice. The total number of CD11c⁺ inflammatory dendritic cells (DC) which expressed CD80 and I-A and produce pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) as well as TNF- α and IL-1 β producing CD45⁺CD11c⁺Ly6G⁺ neutrophils were significantly lower in colons of Gal-3^{-/-} DSS-treated mice. In addition, the total number of inflammatory colonic (F4/80⁺CD11b⁺SiglecF⁻, F4/80⁺CD11b⁺I-A⁺, IL-1, IL-6 and IL-12 producing) macrophages were significantly lower in Gal-3^{-/-} mice compared with WT DSS-treated mice. On contrary, there was significantly higher number of IL-10 producing regulatory DCs and alternatively activated M2 macrophages in colon tissue of Gal3^{-/-} DSS-treated mice. *In vitro* lipopolysaccharide (LPS) and DSS-stimulated peritoneal macrophages isolated from untreated Gal-3^{-/-} mice produce lower amounts of TNF- α and IL-1 β when compared to WT cells. Adoptive transfer of WT macrophages managed to significantly enhance the severity of DSS-induced colitis of Gal-3^{-/-} mice.

Gal-3 expression promotes acute DSS-induced colitis and plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of colitis by promoting the activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β in macrophages.

Keywords. DSS, colitis, Gal-3

Accepted by the Scientific Board on: 29.10.2014.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President:

Prof. dr Miodrag L. Lukić, Professor Emeritus
of University of Kragujevac

Menthor: Ass. Prof. Vladislav Volarevic, Assistant professor of Microbiology and Immunology, Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Nebojša Arsenijević, Professor of Microbiology and Immunology and Basic Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Vladimir Trajkovic, Associate Professor of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, University of Belgrade

8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Бојана (Јован) Симовић Марковић је рођена у Краљеву 26.01.1984. године. Основну школу и Гимназију (природно-математички смер) завршила је у Краљеву. Уписала је Медицински факултет у Крагујевцу 2003. године, где је и дипломирала 2009. Обавила је обавезни лекарски стаж и положила стручни испит. Након завршених основних студија уписала је академске докторске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу у октобру 2010. године, изборно подручје Молекулска медицина – подподручје: Имунологија, инфламација и инфекција. Усмени докторски испит је положила у октобру 2012. године са оценом 10 (десет). Током 2013. године (април-мај) усавршавала се у лабораторији професора *Ranieri Cancedda*, Ђенова, Италија. Такође, током 2009. године је провела неколико месеци у лабораторији професора *Konstantin Kappas*-а, Лариса, Грчка.

Кандидат Бојана Симовић Марковић активно се бави научно истраживачким радом у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Учесник је

међународног *European Chron's and Colitis Organisation*- ЕССО пројекта. Континуирани научно-истраживачки рад се огледа у учешћу на пројектима које финансира Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Учесник је Макро-пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

МП 01/12 „Имунопатологија инфламаторних, аутоимунских и малигних обољења: целуларни и молекуларни аспекти“.

Поред тога, учесник је два Јуниор-пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу под називом:

- Потенцијал матичних ћелија из ексфолираних млечних зуба да диференцирају у ћелије са нервним карактеристикама у *in vitro* условима (ЈП04-12)
- Утицај сигналног пута IL-33/ST2 на неоангиогенезу у карциному дојке (ЈП04-13).

Кроз истраживачке програме Факултета медицинских наука у Крагујевцу 2012. године прошла је обуку категорије В (надлежна лица – истраживачи) у трајању од 80 часова и на тај начин је оспособљена за рад са експерименталним животињама. Такође, похађала је курс за добробит лабораторијских животиња одржан на Медицинском факултету, Универзитета у Београду новембра 2012. године.

Бојана Симовић Марковић је остварила 62.5 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- девет радова у целини публикована у научним часописима међународног значаја;
- три рада у целини публикована у националним часописима;
- већи број сажетака на међународним научним скуповима.

8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Mitrovic S, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β in macrophages. **J Crohns Colitis** 2016; doi:10.1093/ecco-jcc/jjw013

IF 6.234 M21- 8 бодова

2. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, Volarevic V. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. **Stem Cells Int** 2016; 2016: 2640746

IF 2.813 M22- 3 бода

3. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, **Simovic Markovic B**, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, Trajkovic V. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. **ACS Nano** 2014; 8:12098-109.

IF 12.881 M21- 8 бодова

4. Volarevic V, **Markovic BS**, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. **Eur J Immunol** 2015; 45:531-43.

IF 4.034 M21- 8 бодова

5. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, **Simovic Markovic B**, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. **Arch Toxicol** 2015; 89:437-50.

IF 5.98 M21- 8 бодова

6. Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Simovic-Markovic BJ**, Stojanovic SP, Stefanovic SM, Pejnovic NN, Arsenijevic NN. Clinical significance of Cyclin D1, FGF3 and p21 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **J BUON** 2014; 19:944-52.

IF 0.741 M23- 3 бода

7. Potočňák I, Vranec P, Farkasová V, Sabolová D, Vataščinová M, Kudláčová J, Radojević ID, Čomić LR, **Markovic BS**, Volarevic V, Arsenijevic N, Trifunović SR. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part VI: Synthesis, structures, in vitro DNA binding, antimicrobial and anticancer properties of first row transition metal complexes with 5-chloro-quinolin-8-ol. **J Inorg Biochem** 2016; 154:67-77.

IF 3.444 M21- 8 бодова

8. Ratković Z, Muškinja J, Burmudžija A, Ranković B, Kosanić M, Bogdanović G, **Simović Marković B**, Nikolić A, Arsenijević N, Đorđević S, Vukićević R. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: synthesis, characterization and anticancer activity. **J Mol Struct** doi: 10.1016/j.molstruc.2015.12.079.

IF 1.602 M22- 5 бодова

9. Mijajlovic M, Nikolic M, Jevtic V, Ratkovic Z, **Simovic Markovic B**, Volarevic V, Arsenijevic N, Novakovic S, Bogdanovic G, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal

structure of the bis(S-butyl-thiosalicylate) palladium (II) complex, [Pd(S-butiosal)2]. **Polyhedron** 2015; 90:34-40.

IF 2.011 M22- 5 бодова

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:

1. **Bojana Simovic Markovic**, Ljubica Vucicevic, Sanja Bojic, Vladislav Volarevic. The role of autophagy in immunity and autoimmune diseases. **Ser J of Exp Clin Res**. 2014; 15:223-229.

M52 1,5 бод

2. Ana Volarevic, **Bojana Simovic Markovic**, Nikola Jankovic, Sanja Bojic, Nebojsa Zdravkovic. Orthodox Catechism affects gender differences in adolescents' needs for affiliation and achievement altering their sense of purpose in life. **Ser J of Exp Clin Res** 2014; 15: 33-38.

M52 1,5 бод

3. Sanja Bojic, **Bojana Simovic Markovic**, Ana Volarevic, Miodrag Stojkovic. Intestinal stem cells. **Med Čas** 2013; 47:192-195.

M53 1 бод

Зборници међународних научних скупова:

1. V. Volarevic, M. Milovanovic, **B. Simovic Markovic**, S. Bojic, M. Stojanovic, N. Arsenijevic, M.L. Lukic. The Pro-inflammatory role of Galectin-3 in acute liver injure. Netherlands, Amsterdam 2013. Abstract Book. DOI: 10.1016/S0168-8278(13)60365-7.

M34 – 0,5 бодова

2. **Simovic Markovic B**, Gazdic M, Nikolic A, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic M, Volarevic V. Genetic deletion of Galectin-3 attenuate dextran sodium sulphate colitis in mice. 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation;

Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, 2015; pp. 44.

M34 – 0,5 бодова

3. Volarevic V, Gazdic M, **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic M. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury mediated by NKT cells. 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation; Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, 2015; pp. 45.

M34 – 0,5 бодова

4. Volarevic V, Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Djordjevic I, Dasic M, Arsenijevic N, Lukic ML. Mesenchymal stem cells protect from acute dextran sulphate sodium-induced colitis by attenuating function of antigen presenting cells. Journal of Crohns & Colitis, 2015; 9: S97-S98

M34 – 0,5 бодова

5. Potočňák I, Farkasová V, Sayed A. Drweesh, Sabolová D, Radojevic ID, **Simovic Markovic B**, Fecko S, Paulíková H. cis-Pd(II) complexes with quinolin-8-ol derivatives and dimethylammonium, K⁺, Cs⁺ or quinolinium-8-ol cations as materials for pharmacological research. 25th Joint seminar, Kezmarske Zlaby – Slovakia, Avg 31-Sep 4, 2015; Book of Abstracts, p39.

M34 – 0,5 бодова

8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper *in extenso* in international journals:

1. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Mitrovic S, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β in macrophages. **J Crohns Colitis** 2016; doi:10.1093/ecco-jcc/jjw013

IF 6.234 M21- 8 points

2. **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, Volarevic V. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. **Stem Cells Int** 2016; 2016: 2640746

IF 2.813 M22- 3 points

3. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, **Simovic Markovic B**, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, Trajkovic V. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. **ACS Nano** 2014; 8:12098-109.

IF 12.881 M21- 8 бодова

4. Volarevic V, **Markovic BS**, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. **Eur J Immunol** 2015; 45:531-43.

IF 4.034 M21- 8 points

5. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, **Simovic Markovic B**, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. **Arch Toxicol** 2015; 89:437-50.

IF 5.98 M21- 8 points

6. Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Simovic-Markovic BJ**, Stojanovic SP, Stefanovic SM, Pejnovic NN, Arsenijevic NN. Clinical significance of Cyclin D1, FGF3 and p21 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **J BUON** 2014; 19:944-52.

IF 0.741 M23- 3 points

7. Potočňák I, Vranec P, Farkasová V, Sabolová D, Vataščinová M, Kudláčová J, Radojević ID, Čomić LR, **Markovic BS**, Volarevic V, Arsenijevic N, Trifunović SR. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part VI: Synthesis, structures, in vitro DNA binding, antimicrobial and anticancer properties of first row transition metal complexes with 5-chloro-quinolin-8-ol. **J Inorg Biochem** 2016; 154:67-77.

IF 3.444 M21- 8 points

8. Ratković Z, Muškinja J, Burmudžija A, Ranković B, Kosanić M, Bogdanović G, **Simović Marković B**, Nikolić A, Arsenijević N, Đorđević S, Vukićević R. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: synthesis, characterization and anticancer activity. **J Mol Struct** doi: 10.1016/j.molstruc.2015.12.079.

IF 1.602 M22- 5 points

9. Mijajlović M, Nikolić M, Jevtić V, Ratković Z, **Simović Marković B**, Volarevic V, Arsenijevic N, Novakovic S, Bogdanovic G, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the bis(S-butyl-thiosalicylate) palladium (II) complex, [Pd(S-butylthiosal)2]. **Polyhedron** 2015; 90:34-40.

IF 2.011 M22- 5 points

The published paper *in extenso* in national journals:

1. **Bojana Simovic Markovic**, Ljubica Vucicevic, Sanja Bojic, Vladislav Volarevic. The role of autophagy in immunity and autoimmune diseases. **Ser J of Exp Clin Res**. 2014; 15:223-229.

M52 1.5 points

2. Ana Volarevic, **Bojana Simovic Markovic**, Nikola Jankovic, Sanja Bojic, Nebojsa Zdravkovic. Orthodox Catechism affects gender differences in adolescents' needs for affiliation and achievement altering their sense of purpose in life. **Ser J of Exp Clin Res** 2014; 15: 33-38.

M52 1.5 points

3. Sanja Bojic, **Bojana Simovic Markovic**, Ana Volarevic, Miodrag Stojkovic. Intestinal stem cells. *Med Čas* 2013; 47:192-195.

M53 1 point**The international congress presentations published as abstracts:**

1. V. Volarevic, M. Milovanovic, **B. Simovic Markovic**, S. Bojic, M. Stojanovic, N. Arsenijevic, M.L. Lukic. The Pro-inflammatory role of Galectin-3 in acute liver injure. Netherlands, Amsterdam 2013. Abstract Book. DOI: 10.1016/S0168-8278(13)60365-7.

M34 – 0.5 point

2. **Simovic Markovic B**, Gazdic M, Nikolic A, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic M, Volarevic V. Genetic deletion of Galectin-3 attenuate dextran sodium sulphate colitis in mice. 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation; Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, 2015; pp. 44.

M34 – 0.5 point

3. Volarevic V, Gazdic M, **Simovic Markovic B**, Nikolic A, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic M. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury mediated by NKT cells. 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation; Immunity, Infection, Autoimmunity and Aging, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, 2015; pp. 45.

M34 – 0.5 point

4. Volarevic V, Nikolic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Djordjevic I, Dasic M, Arsenijevic N, Lukic ML. Mesenchymal stem cells protect from acute dextran sulphate sodium-induced colitis by attenuating function of antigen presenting cells. *Journal of Crohns & Colitis*, 2015; 9: S97-S98

M34 – 0.5 point

5. Potočňák I, Farkasová V, Sayed A. Drweesh, Sabolová D, Radojevic ID, **Simovic Markovic B**, Fecko S, Paulíková H. cis-Pd(II) complexes with quinolin-8-ol derivatives and dimethylammonium, K⁺, Cs⁺ or quinolinium-8-ol cations as materials for pharmacological research. 25th Joint seminar, Kezmarske Zlaby – Slovakia, Avg 31-Sep 4, 2015; Book of Abstracts, p39.

M34 – 0.5 point

8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Бојана Ј. Симовић Марковић
Датум и место рођења: 26.01.1984. године, Краљево
Садашње запослење:
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Галектин-3 у експерименталном моделу акутног колитиса
Број страница: 170
Број слика: 25
Број библиографских података: 371
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Имунологија
Ментор: Доц. др Владислав Б. Воларевић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 29.10.2014.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 24.02. 2016.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
1. Проф. др Миодраг Ј. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

3. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Комисија за оцену докторске дисертације: . Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник

2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

3. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Комисија за одбрану докторске дисертације:

. Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник

2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

3. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

Датум одбране дисертације: