



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Јелена М. Пантић

Галектин-3 у патогенези гојазности и
тип 2 *Diabetes mellitus*-а

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2014. године

*За велику помоћ у изради докторске дисертације и
указано поверење неизмерну захвалност дугујем
ментору проф. др Миодрагу Лукићу, проф. др Небојши
Арсенијевићу, проф. др Нади Пејновић и колегама из
Центра за молекулску медицину и истраживања
матичних ћелија Факултета медицинских наука у
Крагујевцу. Захваљујем се Милану Милојевићу на великој
помоћи у графичкој обради тезе.*

*Хвала мојој породици на огромној подршци, љубави и
разумевању.*

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. ГОЈАЗНОСТ	1
1.2. ИНСУЛИНСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА И ТИП 2 <i>DIABETES MELLITUS</i>	3
1.3. УЛОГА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ПАТОГЕНЕЗИ ГОЈАЗНОСТИ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ	4
1.3.1. Улога макрофага у настанку инсулинске резистенције у висцералном адипозном ткиву	5
1.3.2. Улога осталих ћелија имунског система у инсулинској резистенцији	7
1.3.3. Цитокински профил у инсулинској резистенцији	10
1.3.4. Инфламација индукована гојазношћу у другим ткивима и органима	11
1.4. МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 <i>DIABETES MELLITUS</i> -у	13
1.4.1. Улога NF- κ B и JNK сигналног пута	14
1.4.2. Улога AGE-RAGE интеракције	16
1.4.3. Улога активације NLRP3 инфламазома	17
1.5. ФАМИЛИЈА ГАЛЕКТИНА	19
1.6. СТРУКТУРНЕ ОСОБИНЕ ГАЛЕКТИНА-3	21
1.7. БИОЛОШКЕ ФУНКЦИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3	22
1.8. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ОНКОГЕНЕЗИ И ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА	24
1.9. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ИНФЕКЦИЈИ И АКУТНОЈ ИНФЛАМАЦИЈИ	26
1.10. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У АУТОИМУНСКИМ БОЛЕСТИМА	28
1.11. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ХРОНИЧНОЈ ИНФЛАМАЦИЈИ И ФИБРОГЕНЕЗИ	31
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	33
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	35

3.1.1. Методологија добијања LGALS3 ^{-/-} мишева	35
3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 <i>DIABETES MELLITUS</i> -A	37
3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА РАЗВОЈА БОЛЕСТИ.....	38
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ.....	39
3.5. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА, ПАНКРЕАСА И СЛЕЗИНЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ	40
3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива ..	40
3.5.2. Изолација мононуклеарних ћелија из ткива панкреаса	41
3.5.3. Изолација мононуклеарних ћелија из слезине	41
3.5.4. Обележавање ћелијских мембранских маркера	42
3.5.5. Бојење мембранских маркера	44
3.5.6. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина	44
3.6. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНОГ ИНФИЛТРАТА У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА	46
3.6.1. Бојење хематоксилином и еозином	46
3.6.2. Хистолошко скорирање мононуклеарног инфилтрата	47
3.7. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦА	47
3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА	48
3.9. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРОТЕИНА У ТКИВИМА <i>WESTERN BLOT</i> МЕТОДОМ	51
3.9.1. Припремање лизата ткива	51
3.9.2. Одређивање концентрације протеина методом по Лорију	52
3.9.3. Имуноблот	53
3.10. КУЛТУРА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА	54
3.11. КОЛОРИМЕТРИЈСКИ ТЕСТ ОДРЕЂИВАЊА АКТИВНОСТИ КАСПАЗЕ-1	54

3.12. ИСКЉУЧИВАЊЕ ГЕНА ЗА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМ МЕТОДОМ ТРАНСФЕКЦИЈЕ <i>siRNA</i>	55
3.13. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАКА	57
4. РЕЗУЛТАТИ	58
4.1. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 УБРЗАВА НАСТАНАК ГОЈАЗНОСТИ У МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	58
4.2. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 РЕМЕТИ ГЛИКОРЕГУЛАЦИЈУ И УБРЗАВА НАСТАНАК ТИП 2 <i>DIABETES MELLITUS</i> -А У МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	60
4.3. ПОВЕЋАН СИСТЕМСКИ НИВО МОКРАЋНЕ КИСЕЛИНЕ У <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА НА ДИЈЕТИ БОГАТОЈ МАСТИМА	65
4.4. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА ТИП 1 Т И НКТ И СНИЖЕНА ЗАСТУПЉЕНОСТ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	66
4.5. ПОВЕЋАНА ЗАСТУПЉЕНОСТ М1 И СНИЖЕНА ЗАСТУПЉЕНОСТ М2 МАКРОФАГА У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	69
4.6. ТЕЛЕСНА МАСА И ГЛИКЕМИЈА ПОЗИТИВНО КОРЕЛИРАЈУ СА ПРОЦЕНТОМ М1 МАКРОФАГА И НЕГАТИВНО СА ПРОЦЕНТОМ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА У <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА	70
4.7. ПОВЕЋАНА КОНЦЕНТРАЦИЈА ПРО-ИНФЛАМАТОРНИХ И СНИЖЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈА АНТИ-ИНФЛАМАТОРНИХ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	72
4.8. ИСХРАНА БОГАТА МАСТИМА ИНДУКУЈЕ ИЗРАЖЕНУ ИНФИЛТРАЦИЈУ МОНОНУКЛЕАРА У ПАНКРЕАСНА ОСТРВЦА <i>LGALS3^{-/-}</i> МИШЕВА	74

4.9. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА МАКРОФАГА И ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	77
4.10. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА КАСПАЗЕ-1 У ТКИВУ ПАНКРЕАСА LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	79
4.11. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА IL-1 β У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	79
4.12. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА И IL-1 β У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	83
4.13. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА AGE И RAGE У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	86
4.14. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА ИНДУКОВАНА ДИЈЕТОМ БОГАТОМ МАСТИМА	86
4.15. ПАЛМИТАТ СТИМУЛИШЕ КАСПАЗА-1 ЗАВИСНУ ПРОДУКЦИЈУ IL-1 β У LGALS3 ^{-/-} МАКРОФАГИМА	88
4.16. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ФОСФОРИЛИСАНОГ NF- κ B p65 У ПАНКРЕАСУ, ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ И ПЕРИТОНЕАЛНИМ МАКРОФАГИМА LGALS3 ^{-/-} МИШЕВА	93
5. ДИСКУСИЈА	96
5.1. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА РАЗВОЈ ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 <i>DIABETES MELLITUS</i> -А У МИШЈЕМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ ИНДУКОВАНЕ ДИЈЕТОМ	96
5.2. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА ИНФЛАМАЦИЈУ ИНДУКОВАНУ ДИЈЕТОМ У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ И СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ	99

5.3. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА ИНФЛАМАЦИЈУ У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА ИНДУКОВАНУ ДИЈЕТОМ	110
5.4. УТИЦАЈ ДЕЛЕЦИЈЕ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ИНФЛАМАЦИЈЕ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ ДИЈЕТОМ	112
6. ЗАКЉУЧАК	118
СКРАЋЕНИЦЕ	121
7. ЛИТЕРАТУРА	125
8. ПРИЛОГ	175
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	175
8.2. KEY WORD DOCUMENTATION	180
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА.....	185
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	186
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS	190
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	194

1. УВОД

1.1. ГОЈАЗНОСТ

Гојазност је хронично обољење праћено бројним компликацијама. Клинички се дефинише на основу вредности индекса телесне масе (енгл. *body mass index*, ВМІ) који представља однос између телесне масе (изражене у килограмима) и квадрата телесне висине (изражене у метрима) (1). Према важећим критеријумима се сматра да особе са ВМІ од 25 до 29 kg/m², имају прекомерну тежину, док се особе са ВМІ изнад 30 kg/m² сматрају гојазним (1,2). Гојазност је последица поремећеног односа између повећаног уноса нутријената и енергетске потрошње у дужем временском периоду (3). Основна карактеристика гојазности је депозиција масних наслага у организму са различитом дистрибуцијом и следственим ризиком за настанак компликација (4-7). Око 85% адипозног ткива у организму је локализовано у субкутаном ткиву, док преосталих 15% припада интра-абдоминалним масним депоима у које спада висцерално и ретроперитонеално адипозно ткиво (8). Иако висцералном адипозном ткиву припада само 10% укупних масних наслага у организму, управо експанзија овог ткива је главни узрок настанка метаболичког синдрома (синдром X) који дефинише присуство дислипидемије, хипертензије, инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а (7,9).

Један од важних разлога за овакву улогу висцералног адипозног ткива је његова анатомска локализација која подразумева дренажу метаболита и секретованих молекула директно у систем *venae portae* (10). Прекомерни унос нутријената праћен је прогресивним повећањем величине самих адипоцита (11). Када количина липида премаши капацитет адипоцита за њихово депоновање отворен је пут за инфлукс слободних масних киселина (енгл. *free fatty acids*, FFAs) у портну циркулацију (11). Додатно се повећава липолиза у експандирајућем висцералном адипозном ткиву и следствена доступност FFAs у портној циркулацији (12). Директна изложеност инсулин-сензитивних хепатоцита повећаном допремању FFAs, глицерола и лактата,

заједно са адипокинима и цитокинима из увећаног висцералног адипозног ткива, представља основ за појачану глуконеогенезу и синтезу липопротеина веома мале густине (енгл. *very low-density lipoprotein*, VLDL) (13,14). Хронична изложеност јетре повишеним концентрацијама FFAs промовише глуконеогенезу, смањује продукцију ензима укључених у њихову оксидацију, повећава складиштење и синтезу триглицерида и липопротеина и индукује инсулинску резистенцију (15).

Термин инсулинска резистенција се односи на дефектан биолошки одговор ткива на егзогено апликован или ендогено синтетисан инсулин (16). Инсулинска резистенција се манифестује смањењем транспорта и метаболизма глукозе пре свега у адипоцитима и скелетним мишићима, као и инсуфицијентном супресијом глуконеогенезе и гликогенолизе у јетри (16). Повећан флуks FFAs смањује везивање инсулина за хепатоците и његову деградацију (17). Као последица тога настаје системска хиперинсулинемија удружена са смањеном способношћу инсулина да супримира процес глуконеогенезе (хепатична инсулинска резистенција), док је FFAs додатно појачавају (18). Екскесивно допремање липида у јетру за последицу има ектопично нагомилавање масти и прогресивни ток инсулинске резистенције (19). Инсулинска резистенција даље амплификује овај процес индукцијом настанка дислипидемије (20). Насталу дислипидемију превасходно карактерише повећање системског нивоа FFAs, триглицерида, VLDL и LDL (енгл. *low-density lipoprotein*), уз редукован HDL (енгл. *high-density lipoprotein*) (21). За разлику од HDL липидних партикула, VLDL и LDL имају значајно снижен капацитет за повратни транспорт холестеролских естера натраг у јетру (22). Отуда VLDL и LDL показују значајан атерогени потенцијал праћен појачаним депоновањем холестерола, пре свега у зидовима артеријских крвних судова.

Са друге стране, постоје мишљења да висцерално адипозно ткиво није примарни иницијатор настанка метаболичке дисфункције. Према овим тумачењима главни извор FFAs у портну и системску циркулацију је субкутано адипозно ткиво, док се из висцералног адипозног ткива ослобађа тек 5-20% ових метаболита (23). Ови

подаци наводе на закључак да је неспорна снажна повезаност између висцералне гојазности и метаболичких дисфункција базирана на сплету бројних секреторних молекула синтетисаних у висцералном адипозном ткиву (24). Поред познате улоге висцералног адипозног ткива као енергетског депоа за складиштење липида у организму, новије студије су показале да адипоцити секретују бројне протеине који имају важне биолошке функције. Према актуелним тумачењима висцерално адипозно ткиво је ендокрини орган који активно секретује хормоне (лептин, резистин, адипонектин, висфатин, естрогене и др.), цитокине (интерлеукин-6 (енгл. *interleukin-6*, IL-6), фактор некрозе тумора- α (енгл. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α)), протеине екстраћелијског матрикса, факторе система комплемента, ензиме, протеине акутне фазе и друге (25).

1.2. ИНСУЛИНСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА И ТИП 2 *DIABETES MELLITUS*

Инсулинска резистенција је стање које прати прогресију болести из преддијабетеса у клинички манифестни тип 2 *Diabetes mellitus* (26). У одговору на резистенцију ткива на дејство инсулина настаје компензаторно увећање масе панкреасних острваца и пораст секреторног капацитета β -ћелија (27). У моменту када функционална експанзија β -ћелија више не може да компензује степен инсулинске резистенције, настаје прогресивна инсуфицијенција β -ћелија која се манифестује дефицијенцијом инсулина и следственом хипергликемијом. Клинички манифестни тип 2 *Diabetes mellitus* настаје у моменту губитка критичне масе β -ћелија панкреасних острваца и њихове немогућности да одговоре повећаним потребама за инсулином (27).

У процес прогресивног опадања секреторне функције β -ћелија укључено је неколико патогенетских фактора који имају синергистичко дејство у овом процесу (28). Најпре је показано да хипергликемија смањује секрецију инсулина и индукује прогресивну деструкцију β -ћелија (29-31). Чак и мале промене у концентрацији глукозе у крви, годинама пре појаве клинички манифестне болести, показују

токсично дејство на β -ћелије (енгл. *glucotoxicity*) (32). Интересантан податак који говори у прилог овом тумачењу је да пацијенти оболели од тип 1 *Diabetes mellitus*-а након хроничне изложености хипергликемији развијају одређени степен инсулинске резистенције (33). Слично глукози, повећан ниво FFAs у циркулацији смањује секреторну функцију и индукује апоптозу β -ћелија (енгл. *lipotoxicity*) (34-36). Нарочито, токсично дејство испољавају засићене FFAs, док се сматра да моно-незасићене масне киселине имају протективни ефекат (37). Своје токсично дејство у прогресији тип 2 *Diabetes mellitus*-а липиди могу да испоље системски или депозицијом у ектопична ткива (38). Метаболички стресори, нарочито глукоза, имају способност да индукују стварање реактивних кисеоничних врста (39). У исто време, β -ћелије експримирају низак ниво анти-оксидативних ензима, што их чини веома осетљивим на оксидативни стрес. Постоје подаци да оксидативни стрес игра једну од кључних улога у настанку инсулинске резистенције (40,41). У одговору на инсулинску резистенцију β -ћелије реагују снажном продукцијом инсулина што повећава флуks протеина кроз ендоплазматски ретикулум и индукује настанак стреса ендоплазматског ретикулума што је доведено у везу са настанком инсулинске резистенције (42-44). Током прогресије тип 2 *Diabetes mellitus*-а у хуманим панкреасним острвцима се депонује амилоид, иако остаје нејасно да ли је то узрок или последица деструкције β -ћелија (45).

1.3. УЛОГА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ПАТОГЕНЕЗИ ГОЈАЗНОСТИ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Најновије студије истичу да је гојазношћу индукована инфламација основни узрок настанка инсулинске резистенције (46,47). Иако је идеја о повезаности између инфламације и настанка тип 2 *Diabetes mellitus*-а позната већ скоро један век, докази о томе проистичу из најновијих студија (48). *Feingold* и *Grunfeld* су, пре око двадесет година, први пут показали да егзогена администрација про-инфламаторног TNF- α индукује повећање серумске концентрације глукозе, на основу чега су

спекулисали да прогресија хипергликемије може бити повезана са повећаном продукцијом цитокина (49,50). *Hotamisligil* и сарадници су први говорили о инфламацији индукованој гојазношћу на основу доказа да гојазни мишеви имају повећан системски ниво TNF- α , чијом неутрализацијом се значајно смањује инсулинска резистенција (51). У прилог томе говори и чињеница да гојазни TNF- α дефицијентни мишеви имају бољу гликорегулацију и осетљивост на инсулин (52). На механизам настанка инфламације указала су истраживања која су документовала да је активација инхибитора κ B киназе- β (IKK- β) и нуклеарног фактора- κ B (NF- κ B) повећана у гојазности и корелира са степеном инсулинске резистенције (53,54). Активација IKK- β посредована цитокином TNF- α *in vitro* може бити блокирана администрацијом салицилата који испољавају анти-инфламаторно дејство (53). Инхибиција овог сигналног пута применом салицилата атенуира инсулинску резистенцију код експерименталних животиња и у хуманој популацији (54). Делеција гена за IKK- β штити мишеве на дијети богатој мастима од настанка инсулинске резистенције (55). Механизам настанка хроничне инфламације индуковане гојазношћу је базиран и на активацији других протеин киназа, као што су *c-Jun N*-терминалне киназе (JNKs). Аблација гена за JNK у мишева на дијети са високим садржајем масти има протективни ефекат на отпочињање инфламаторног процеса (56,57). Активација про-инфламаторних сигналних путева у патогенези системске инсулинске резистенције се дешава у свим инсулин-сензитивним ткивима као што су адипозно ткиво, јетра и скелетни мишићи (58-61).

1.3.1. Улога макрофага у настанку инсулинске резистенције у висцералном адипозном ткиву

Током развоја гојазности висцерално адипозно ткиво инфилтрише велики број макрофага који играју кључну улогу у патогенези инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а (58,62). У условима повећаног инфлуksа нутријената покренута је снажна активација про-инфламаторних сигналних путева у инфилтришућим макрофагима што за последицу има продукцију про-инфламаторних цитокина као

што су TNF- α , IL-6 и IL-1 β (63). Секретовани цитокини својим паракриним или ендокриним дејством директно смањују сензитивност на инсулин у циљним ћелијама као што су адипоцити, хепатоцити или миоцити.

Миграција макрофага у висцерално адипозно ткиво је иницијални догађај у инфламацији индукованој гојазношћу. Екседесивни унос нутријената стимулише адипоците да продукују хемокине као што су MCP-1 (енгл. *monocyte chemotactic protein-1*), LTB4 (енгл. *leukotriene B4*) и други, и стварају хемокински градијент одговоран за привлачење моноцита у висцерално адипозно ткиво где даље диферентују у ткивне макрофаге (64,65). Инфилтришући макрофаги настављају да продукују хемокине чиме се даље одржава инфламаторни процес (63). Један од најважнијих хемокина у миграцији макрофага у висцерално адипозно ткиво, MCP-1 се везује за хемокински рецептор CCR2 (енгл. *C-C chemokine receptor type 2*) на макрофагима (65-67). Показано је да делеција гена за MCP-1 или CCR2 смањује инфилтрацију макрофага у висцерално адипозно ткиво, редукује параметре инфламације и смањује степен инсулинске резистенције (68).

Макрофаги су веома хетерогена популација ћелија и у зависности од ткивне микросредине могу да испоље различите фенотипске и функционалне карактеристике. Класично активирани или M1 макрофаги, потакнути дејством интерферона- γ (енгл. *interferon- γ* , IFN- γ) и липополисахарида (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS) експримирају про-инфламаторни фенотип у одбрани од интрацелуларних патогена и продукцијом IL-12 учествују у поларизацији адаптивног имунског одговора у Th1 (енгл. *T helper*) правцу (69). Фенотип M1 макрофага карактерише продукција про-инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-23), хемокина, реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), азот-мооксида (енгл. *nitric oxid*, NO) и лизозомалних ензима, као и појачана експресија МНС (енгл. *major histocompatibility complex*) молекула и костимулатора (70). Са друге стране, алтернативно активирани или M2 макрофаги, у одговору на цитокине Th2 имунског одговора IL-4 и IL-13, секретују анти-инфламаторне

цитокине (IL-10, IL-1 рецептор антагонист (IL-1Ra), трансформишући фактор раста- β (енгл. *transforming growth factor*- β , TGF- β)), аргиназу-1 и друге факторе који учествују у процесима репарације ткива и фиброзе (70,71).

У одговору на промене у ткивној микросредини резидентни макрофаги у висцералном адипозном ткиву мењају свој поларизациони статус (72). И M1 и M2 макрофаги у висцералном адипозном ткиву експримирају маркере F4/80 и CD11b (енгл. *cluster of differentiation*, CD) док про-инфламаторни M1 експримирају и интегрин CD11c (73,74). Резидентни ткивни макрофаги у висцералном адипозном ткиву су CD11c⁻ и испољавају M2 фенотип који карактерише висока експресија рецептора за манозу CD206, аргиназе-1, IL-10 (73-75). Са развојем гојазности се повећава миграција и број CD11c⁺ M1 макрофага и продукција про-инфламаторних цитокина и хемокина као што су TNF- α , IL-1 β , IL-6 и MCP-1 у висцералном адипозном ткиву (76). M1 макрофаги имају и способност акумулирања липида у цитоплазми и на тај начин формирају тзв. пенасте ћелије (енгл. *foam cells*) (77). Многе студије су потврдиле да поларизациони статус макрофага у смеру про-инфламаторног M1 фенотипа корелира са настанком инсулинске резистенције.

1.3.2. Улога осталих ћелија имунског система у инсулинској резистенцији

Актуелна запажања у патогенези инсулинске резистенције истичу улогу бројних ћелија имунског система које у међусобној комуникацији креирају инфламаторни миље у инсулин сензитивним ткивима (78). Иако њихова улога у патогенези инсулинске резистенције још увек није прецизно дефинисана, верује се да своје главне ефекторске функције остварују у процесима контроле миграције, активације и поларизације макрофага у адипозном ткиву (78). Улога Т лимфоцита у гојазношћу индукованој инфламацији је превасходно регулација инфилтрације и активационог статуса макрофага (79-81). Кључну улогу у томе имају CD4⁺ помагачки Т лимфоцити (енгл. *T helper*, Th) у основи подељени на Th1 субпопулацију која продукује про-инфламаторне цитокине, пре свега IFN- γ , и Th2 субпопулацију одговорну за продукцију IL-4 и IL-13 (82). Регулаторни CD4⁺FoxP3⁺ Т лимфоцити

(енгл. *forkhead box P3*, FoxP3) секретују анти-инфламаторне цитокине који инхибирају миграцију макрофага и утичу на њихову поларизацију у смеру M2 фенотипа (79). Број резидентних Т регулаторних лимфоцита у адипозном ткиву опада са развојем гојазности. У складу са тим *Rag-1* (енгл. *recombination activating gene 1*) дефицијентни мишеви, који немају Т лимфоците, на дијети са високим садржајем масти развијају тежи облик инсулинске резистенције (80). Такође, CD8⁺ цитотоксички Т лимфоцити инфилтришу адипозно ткиво у гојазности, продукују про-инфламаторне цитокине и тако промовишу миграцију и активацију макрофага (81). Анти-инфламаторна својства регулаторних Т и Th2 лимфоцита и про-инфламаторна својства Th1 и CD8⁺ лимфоцита потврђена су адоптивним трансфером ових ћелија у *Rag-1* дефицијентне мишеве (80). Висцерално адипозно ткиво мишева на дијети са високим садржајем масти додатно инфилтришу В лимфоцити (83). В лимфоцити промовишу активацију Т лимфоцита и поларизацију макрофага у смеру про-инфламаторног M1 фенотипа чиме доприносе настанку инсулинске резистенције. Додатно, продукцијом патогених IgG антитела, В лимфоцити могу изазвати ситемске ефекте (83).

Интересантно је да висцерално адипозно ткиво гојазних мишева са хипергликемијом појачано инфилтришу и мастоцити, што је потврђено и у хуманом адипозном ткиву (84,85). Деплеција или фармаколошка стабилизација мастоцита значајно редукују добитак у телесној маси код мишева, атенуирају инфламацију и поправљају гликорегулацију (85).

Резидентни еозинофили у висцералном адипозном ткиву су основни извор IL-4 и IL-13 чиме учествују у одржавању M2 поларизационог статуса макрофага (86). Тако у одсуству еозинофила значајно опада број M2 макрофага. Током развоја гојазности број еозинофила у висцералном адипозном ткиву се значајно смањује (86). Ови подаци указују на то да еозинофили помажу у контроли инфламације у висцералном адипозном ткиву и одражавању хомеостазе гликорегулације.

У физиолошким условима у висцералном адипозном ткиву преобладају Th2 и регулаторни Т лимфоцити, еозинофили и M2 макрофаги. Продукцијом IL-10 од стране регулаторних Т лимфоцита и IL-4 и IL-13 од стране еозинофила и Th2 лимфоцита одржава се анти-инфламаторни M2 статус макрофага. У инфламацији индукованој гојазношћу, ћелије имунског система инфилтришу висцерално адипозно ткиво. Моноцити реагују на продукцију хемокина, инфилтришу адипозно ткиво где диферентују у M1 макрофаге и луче про-инфламаторне цитокине. Број еозинофила и Т регулаторних лимфоцита у ткиву опада, док се повећава заступљеност Th1, цитотоксичких CD8⁺ и В лимфоцита. Тако се стичу услови за одржавање M1 статуса макрофага. Цитокини и хемокини из масног ткива улазе у циркулацију и ендокриним дејством индукују инфламацију у инсулин-сензитивним и другим ткивима и органима (Схема 1).

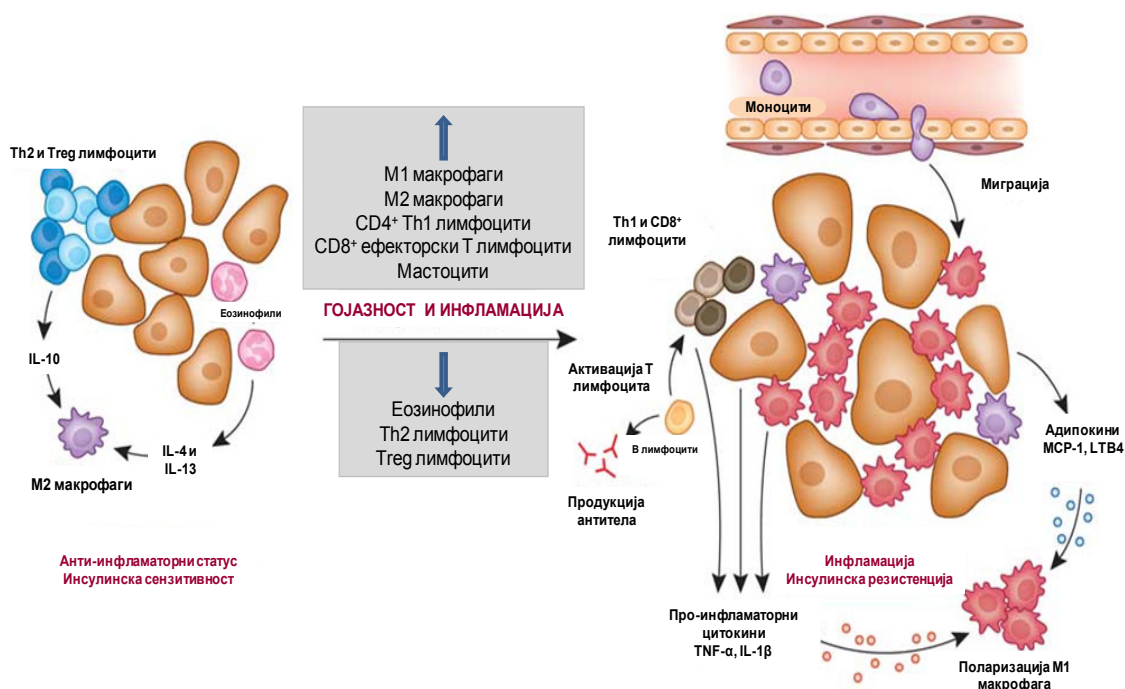


Схема 1. Инфламаторни миље у висцералном адипозном ткиву у физиолошким условима и инфламацији индукованој гојазношћу (кориговано према: *Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. Nature Medicine 2012; 18(3): 363-374.*)

1.3.3. Цитокински профил у инсулинској резистенцији

Про-инфламаторни цитокини на различите начине утичу на настанак инсулинске резистенције. TNF- α , као најбоље проучен међу њима, стимулише серин киназе као што су IKK, JNK, S6 киназа (S6K) и mTOR (енгл. *mammalian target of rapamycin*) које даље фосфорилишу серин на инсулин рецептор супстрату-1 (енгл. *insulin receptor substrate-1*, IRS-1) и тако смањују нисходну пропaгацију сигнала активираних инсулином (87-90). У култури адипоцита, TNF- α смањује сигнализацију са рецептора за инсулин тако што повећава експресију протеина који супримирају сигнализацију цитокина (енгл. *suppressor of cytokine signaling*, SOCS) (91-93). SOCS протеини се везују за инсулински рецептор и на тај начин смањују његову способност да фосфорилише IRS протеине.

Пораст концентрације IL-6 позитивно корелира са настанком инсулинске резистенције индуковане гојазношћу и многе студије су потврдиле његову про-инфламаторну улогу у патогенези ових поремећаја (94,95). Како постоје и подаци који су показали анти-инфламаторни ефекат IL-6, његова улога у настанку инсулинске резистенције је контроверзна (96,97). Различити резултати би делом могли бити објашњени чињеницом да IL-6 у различитим ткивима испољава различите ефекте (98). Док у адипозном ткиву индукује прогресију инсулинске резистенције, у скелетним мишићима IL-6 показује протективни ефекат.

Про-инфламаторни цитокини индукују промене у генској експресији које имају директан ефекат на метаболичке процесе. Под дејством TNF- α , адипоцити смањују експресију транспортера за глукозу GLUT4 (енгл. *glucose transporter type 4*) и PPAR- γ (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) (99,100). PPAR- γ је транскрипциони фактор који поседује анти-инфламаторно дејство и стимулише инсулинску сензитивност (101). Његовом делацијом настаје индукција про-инфламаторних сигнала у макрофагима, смањена алтернативна активација макрофага и следствена прогресија инсулинске резистенције (102). Интересантно је да тип 2 *Diabetes mellitus* утиче на карактеристике лезија у исхемичном инфаркту

мозга који је директно зависан од глутатион зависних анти-оксидативних ензима као и од про-инфламаторних цитокина (103). Про-инфламаторни цитокини и FFAs повећавају експресију гена важних за биосинтезу церамида, који даље промовише дефосфорилацију протеин киназе В посредовану фосфолипазом 2А и смањену сигнализацију инсулина (104-106).

Упоредо са про-инфламаторним цитокинима током развоја инсулинске резистенције расте продукција анти-инфламаторних и имуномодулаторних цитокина. IL-1 рецептор антагонист (IL-1Ra) блокира дејство про-инфламаторног IL-1 β (107). IL-10 инхибира негативне ефекте про-инфламаторних цитокина на сигнализацију инсулина (108). *In vivo* администрација IL-10 превенира настанак инсулинске резистенције коју индукују IL-6 или липиди (109). Баланс између про-инфламаторних и анти-инфламаторних цитокина дефинише профил и интензитет инфламације и последични ефекат на инсулинску сензитивност и хомеостазу гликорегулације.

1.3.4. Инфламација индукована гојазношћу у другим ткивима и органима

Слично адипозном ткиву гојазност у јетри индукује повећану експресију про-инфламаторних гена (59). У Купферовим ћелијама су активирани про-инфламаторни сигнални путеви, иако се њихов број током развоја гојазности не мења (59). Купферове ћелије могу да мењају свој активациони статус из про-инфламаторног у алтернативно активирани анти-инфламаторни статус. Тако у одговору на IL-4, транскрипциони фактор PPAR- δ усмерава Купферове ћелије да експримирају M2 фенотип што смањује инсулинску резистенцију индуковану гојазношћу (110). Поред Купферових ћелија, током развоја гојазности јетру инфилтришу моноцити из циркулације слично адипозном ткиву, продукују про-инфламаторне цитокине и покрећу инфламаторни процес у самим хепатоцитима одговоран за настанак хепатичне инсулинске резистенције (111). Активација ИКК- β у хепатоцитима индукује системску инсулинску резистенцију (59). Експерименти са

деплецијом Купферових ћелија и инфилтришућих макрофага указују на кључну улогу ових ћелија у настанку хепатичне инсулинске резистенције (112,113).

Узимајући у обзир да скелетни мишићи преузимају 70-80% постпрандијалне глукозе, њихова улога у настанку системске инсулинске резистенције је веома важна (114). У простору између мишићних влакана се налазе интрамускулатни масни депои који могу бити инфилтровани макрофагима у условима инфламације индуковане гојазношћу (115). Про-инфламаторне цитокине који учествују у прогресији локалне инсулинске резистенције, TNF- α , IL-6 и IL-1 β , могу да продукују макрофаги и миоцити (116,117).

Инфламација индукована гојазношћу детектована је и у централном нервном систему, укључујући хипоталамус (118). Резидентни макрофаги у централном нервном систему или микроглија, деле сличне особине са макрофагима у другим периферним ткивима, као што су фагоцитоза или продукција TNF- α , IL-6 и IL-1 β (119). Центар за контролу апетита и енергетске хомеостазе организма се налази у хипоталамусу и под директном је контролом инсулина и лептина (118,120). Инфламација индукована гојазношћу у хипоталамусу има важну улогу у настанку централне резистенције на лептин. Про-инфламаторни цитокини инхибирају транскрипциони фактор STAT3 (енгл. *signal transducer and activator of transcription-3*) који игра кључну улогу у сигнализацији лептина. Активатори IKK- β и NF- κ B у хипоталамусу индукују настанак резистенције на лептин (121). Атенуација централних ефеката лептина ремети контролу апетита и енергетски баланс организма што се манифестује даљом прогресијом гојазности.

Повећана инфилтрација макрофага је документована у панкреасним острвцима мишева на дијети са високим садржајем масти, као и испитаника оболелих од тип 2 *Diabetes mellitus-a* (122). Инфламацију у панкреасним острвцима прати секреција IL-1 β који испољава директан ефекат на секрецију инсулина и апоптозу β -ћелија (123).

У новијим истраживањима се све чешће говори о интеракцији исхране, нормалне микрофлоре гастроинтестиналног тракта и активационог статуса ћелија имунског система у контексту настанка инфламације индуковане гојазношћу и инсулинске резистенције (124,125). У гојазности се повећава пропустљивост епитела гастроинтестиналног тракта за продукте микрофлоре који продиру у системску циркулацију. Тако у гојазности расте серумски ниво липополисахарида *Gram*⁻ бактерија који представља снажан агонист рецептора TLR4 (енгл. *toll-like receptor 4*) (126). Састав бактеријске микрофлоре се током развоја гојазности мења. Постоје подаци да антибиотска терапија у гојазних мишева смањује експресију маркера инфламације у адипозном ткиву и побољшава гликорегулацију (127).

1.4. МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 DIABETES MELLITUS-У

У онкологији познато је да брзу експанзију ткива често не прати адекватно формирање васкулатуре која је неопходна за снабдевање ткива кисеоником и нутритивним материјама. У условима смањеног допремања кисеоника у ткиво, настаје хипоксија и компензаторна ангиогенеза индукована продукцијом различитих фактора (128). Тако је присуство хипоксије и неоваскуларизације документовано у експандирајућем адипозном ткиву животиња на дијети са високим садржајем масти и у хуманом адипозном ткиву, и доприноси дисфункцији самог ткива (129,130). Последица је акумулација макрофага на месту хипоксије и исхемије, што би делом могло да објасни везу између експанзије адипозног ткива и индукције инфламације. Хипоксија индукује експресију бројних про-ангиогенетских и про-инфламаторних гена у макрофагима што вероватно импликује њихову улогу у процесу репарације оштећеног ткива (131).

Експанзија адипоцита у условима смањеног допремања кисеоника и нутријената индукује ћелијску смрт. За разлику од мишева на нормалној исхрани, присуство

мртвих адипоцита је документовано у адипозном ткиву мишева на исхрани богатој мастима (132,133). Показано је да су мртви адипоцити у масним депоима присутни појединачно и спорадично и да их окружују макрофаги формирајући карактеристичне структуре (енгл. *crown-like structures*) (132,133). Ове структуре су превасходно локализоване у перигонадалним масним депоима миша, док су знатно ређе присутне у субкутаном масном ткиву. Већи број макрофага присутан у овим структурама импликује да би њихова основна улога могла бити уклањање ћелијског дебриса.

Насупрот адипозном ткиву, макрофаги који инфилтришу панкреасна острвца нису примећени у близини некротичних или апоптотичних ћелија (122). Тачније, инфламација у панкреасним острвцима је рани догађај у развоју тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Код мишева се детектује након 8 недеља дијете са високим садржајем масти, у тренутку када функција β -ћелија опада али се маса ових ћелија повећава и још увек нема њиховог пропадања (122). Тако се може тумачити да инфилтрација макрофага у панкреасна острвца није директна последица ћелијске смрти, већ се дешава као резултат продукције хемокина у одговору на метаболичке стресоре (28).

1.4.1. Улога NF- κ B и JNK сигналног пута

Многи метаболички стресори који промовишу инсулинску резистенцију и тип 2 *Diabetes mellitus* могу да активирају протеин киназе ИКК- β и JNK указујући на њихову потенцијално важну улогу у патогенези ових болести (134) (59). У гојазности деградација ИКК- β омогућава активацију транскрипционог фактора NF- κ B који индукује повећану експресију циљних гена за про-инфламаторне цитокине у адипозном ткиву и јетри (59,134). Ови цитокини, као што су TNF- α , IL-6 и IL-1 β , промовишу инсулинску резистенцију у адипозном ткиву у јетри. Такође, могу бити транспортовани системском циркулацијом и у удаљена ткива као што су крвни судови, срчани и скелетни мишићи и бубрези, где испољавају своје ефекте. Друга потенцијално важна протеин киназа, JNK, активира транскрипционе факторе ELK1,

ATF2 (енгл. *activating transcription factor 2*) и JUN, чија улога у развоју гојазности и инсулинске резистенције није до краја испитана (135).

Многи про-инфламаторни цитокини продуковани у одговору на активацију NF-κB (TNF-α и IL-1β), могу повратном спрегом да активирају JNK и NF-κB сигналне путеве везујући се за специфичне рецепторе. Познати стимулуси који промовишу настанак инсулинске резистенције, као што су FFAs и крајњи продукти гликозилације протеина (енгл. *advanced glycation end-products*, AGE), могу да активирају IKK-β-NF-κB и JNK сигналне путеве везујући се за специфичне мембранске рецепторе (126). У ове рецепторе спадају рецептори за молекулске образце (TLRs) и рецептор за AGE (енгл. *receptor for advanced glycation end-products*, RAGE) (126,136).

Главна места активације IKK-β-NF-κB и JNK сигналних путева су адипозно ткиво и јетра. У јетри се активација ових сигналних путева дешава како у мијелоидним ћелијама, као што су макрофаги, тако и у самим хепатоцитима (137-139). Иако могу бити активирани и у хематопоезним и не-хематопоезним ћелијама, вероватно је да су леукоцити главно место њихове активације и следствене продукције про-инфламаторних TNF-α, IL-6 и IL-1β. Интересантно је да у мишићним ћелијама NF-κB путем активације Е3 убиквитин лигазе TRIM63, индукује губитак мишићне масе и кахексију (140). Са друге стране, активација сигналног пута IKK-β-NF-κB у хипоталамусу негативно утиче на регулацију апетита посредовану дејством лептина (141). Вероватно је да активација NF-κB у овим ткивима промовише инсулинску резистенцију индиректним деловањем, за разлику од адипозног ткива и јетре где испољава директно дејство у прогресији болести.

У β-ћелијама панкреасних острваца активација NF-κB се дешава посредством деловања глукозе и IL-1β. Показано је да инхибиција NF-κB сигналног пута има протективни ефекат на оштећење β-ћелија индуковано токсичним ефектима глукозе или малим дозама стрептозотоцина у мишјем моделу тип 1 *Diabetes mellitus*-а (123,142). Сви ови подаци импликују да активација NF-κB сигналног пута у бројним

ткивима у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у заузима значајно место у патогенези болести.

1.4.2. Улога AGE-RAGE интеракције

Протеини изложени високим концентрацијама глукозе подлежу постранслацијским модификацијама када се формирају протеини модификовани глукозом названи крајњи продукти гликозилације (енгл. *advanced glycation end products*, AGE) (143). У тип 2 *Diabetes mellitus*-у, AGE метаболити нису само продукти метаболичких дисфункција, већ активни учесници у трансдукцији сигнала и следственом оштећењу циљних ћелија (143). Поред глукозе, на формирање и акумулацију AGE метаболита у организму утичу реактивне кисеоничне врсте, повећан унос храном, хипоксија и процес старења (144-146).

AGE препознаје специфичан рецептор на ћелијској мембрани назван рецептор за AGE (RAGE) (143). Данас се зна да RAGE препознаје бројне лиганде као што су чланови фамилије S100/калгранулин, HMGB-1 (енгл. *high mobility group box-1*), Mac-1 (енгл. *macrophage 1 antigen*), амилоид- β пептид и β -sheet фибриле карактеристичне за амилоид (143,147). Податак да RAGE препознаје S100/калгранулине и HMGB-1, указује на фундаменталну улогу овог рецептора у инфламаторном одговору. RAGE је експримиран на ћелијама моноцитно-макрофагне лозе и након везивања лиганда учествује у кључним догађајима у биологији ових ћелија као што су миграција, активација и одложена апоптоза у присуству лиганда (148,149). Најновији подаци показују да RAGE експримирају Т и В лимфоцити и дендритске ћелије, што упућује на важну улогу интеракције лиганд-RAGE у адаптивном имунском одговору (150,151). Показано је да апликација анти-RAGE антитела смањује пролиферацију Т лимфоцита у култури (151). Експресија гена за RAGE је значајно повећана у клоновима Т лимфоцита који диферентују у правцу Th1 имунског одговора, што упућује на могућност да је активација RAGE кључна за рану фазу поларизације имунског одговора у Th1 правцу (152).

Везивање метаболита AGE за RAGE рецептор, путем активације NF-κB индукује оксидативни стрес у ћелији и повећану експресију про-инфламаторних и про-тромботичних медијатора у процесу атеросклерозе у крвним судовима (153). У *Diabetes mellitus*-у, хипергликемија индукује повећано стварање и акумулацију AGE који преко рецептора RAGE промовишу оксидативни стрес, васкуларну инфламацију и прогресију макроваскуларних компликација (136).

1.4.3. Улога активације NLRP3 инфламазома

Рецептори на ћелијама урођене имуности врше стални мониторинг екстрацелуларног и интрацелуларног простора детектујући продор микроорганизама или знаке оштећења ћелије. Могу да препознају како молекулске обрасце микроорганизама (енгл. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), тако и молекуле који се ослобађају из оштећених или некротичних ћелија (енгл. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). Могу бити експримирани у различитим ћелијским одељцима. Главну улогу у надзору цитоплазматског простора имају структуре које се називају инфламазоми и представљају мултимолекуларне комплексе који контролишу активацију протеолитичког ензима каспаза-1 (154,155). Каспаза-1 даље регулише матурацију про-инфламаторних цитокина IL-1β и IL-18 или брзу форму смрти ћелије изазвану инфламацијом која се назива пироптоза (154,155).

Хумани и мишји геном кодирају 23, односно 34 цитоплазматска рецептора NLRs (енгл. *nucleotide binding and oligomerization domain*, NOD-like receptors) рецептора, а неколико њих има способност да формира инфламазома (156). У NLR фамилију молекула који формирају инфламазома спадају NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 и NLRP12, од којих је до данас најбоље проучен NLRP3 или криопирин (157). NLRP3 има трокомпонентну структуру и састоји се из централног *Nod* (или NACHT) домена, понављајућег карбокси-терминалног домена богатог леуцином (енгл. *leucine-rich repeat*, LRR) и ефекторског аминокиселинског терминалног домена који садржи пирин (енгл. *pyrin-containing domain 3*, PYD) (157). Сматра се да карбокси-

терминални домен богат леуцином служи као сензорни део молекула и везује лиганд. Након активације NLRs олигомеризују преко својих NACHT домена. NLR инфламазоми, укључујући NLRP3, садрже адапторски протеин ASC (енгл. *apoptotic speck protein*), у чијем саставу се налазе PYD и CARD (енгл. *caspase recruitment and activation domain*) (158). ASC служи као платформа за међупротеинске интеракције током активације и олигомеризације инфламазома (158). Након активације NLRP3, PYD домен NLRP3 инфламазома реагује са PYD доменом протеина ASC. Последица је интеракција између CARD домена протеина ASC са молекулом прокаспазе-1 што индукује њену протеолитичку разградњу. Иницијално прокаспаза-1 се цепа на фрагмент p35 који садржи CARD и субјединицу p10. Након исецања CARD домена настаје фрагмент p20. Два фрагмента p20 хетеродимеризују са два фрагмента p10 и формирају активну каспазу-1. Каспаза-1 је аспартат-специфична цистеин протеаза која исеца молекуле про-IL-1 β и про-IL-18 и преводи их у активну форму (157).

NLRP3 инфламазом може да активира велики број различитих сензора патогеног, ендогеног или егзогеног порекла. Тако се зна да NLRP3 инфламазом активирају *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* и *influenza A* вирус (159-164). Активација NLRP3 инфламазома може бити последица продукције различитих молекула у процесу ткивног оштећења, као што су екстрацелуларни АТФ, хијалуронан, амилоид- β фибрили и кристали мокраћне киселине (165-167). Иако механизми који индукују активацију NLRP3 инфламазома нису до краја познати, верује се да важну улогу у томе имају ефлукс калијума, продукција реактивних кисеоничних врста или дестабилизација фаголизозома (157).

Молекулски механизми којима нутријенти, глукоза и FFAs, индукују продукцију IL-1 β у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у су веома комплексни. Најновија истраживања истичу да би активација NLRP3 инфламазома могла бити централни механизам. Делеција NLRP3 инфламазома или ASC протеина, као и фармаколошка инхибиција каспазе-1, имају протективно дејство на настанак инсулинске

резистенције што потврђује ове тврдње (168). Најновији резултати указују на појачану активацију NLRP3 инфламазома у мијелоидним ћелијама пацијената са тип 2 *Diabetes mellitus*-ом, док податак да примена метформина значајно модулише активацију NLRP3 инфламазома импликује могуће терапијске апликације (169).

1.5. ФАМИЛИЈА ГАЛЕКТИНА

Лектини су фамилија еволуционо конзервираних протеина који имају способност да везују угљене хидрате и показују афинитет за специфичне олигосахариде (170). Класификовани су у четири групе: лектини *C* типа, лектини *P* типа, пентраксини и галектини (171). За све чланове фамилије галектина је заједничко присуство најмање једног домена за препознавање угљених хидрата (CRD, енгл. *Carbohydrate recognition domain*) дужине око 135 аминокиселина са високим афинитетом за везивање β -галактозида (170). Галектини припадају фамилији протеина која данас броји 15 познатих чланова и класификовани су у три групе (172,173):

- „*proto*“ - тип галектина који садржи по један CRD регион. Могу да функционишу као мономери (галектин-5, -7 и -10) или као димери (галектин-1, -2, -8, -11, -13, -14, -15);
- „*tandem-repeat*“ – тип галектини који поседују два различита CRD региона повезана пептидним ланцем различите дужине. У ову групу спадају галектин-4, -6, -8, -9, -12);
- „*chimera*“ – тип галектина чији је јединствени члан галектин-3. Садржи један CRD регион спојен са не-лектинским аминокиселинским ланцем дужине од око 120 аминокиселина са кратким понављајућим секвенцама богатим пролином и глицином.

Свих 15 чланова фамилије галектина је пронађено не само код сисара, већ и код птица, водоземаца, риба, нематода, *Drosophila*-е, сунђера и гљива (170,173). Њихова широка распрострањеност у природи упућује на потенцијално важну улогу ових

молекула у основним ћелијским процесима везаним за преживљавање организама (172,174).

Већина галектина је широко распрострањена у различитим типовима ћелија и органа и превасходно представљају цитоплазматске протеине. Међутим, већ дуго је познато да могу бити секретовани из цитосола или транспортовани у једро и друге ћелијске одељке (175,176). Тако се могу наћи у једру, цитоплазми, на површини ћелије везани за гликокоњугате или као солубилни молекули у телесним течностима (177). Осим поменутог афинитета да се вежу за галактозу, неки од галектина имају способност прилагођавања CRD региона за везивање различитих олигосахарида који улазе у састав гликопротеина на ћелијској мембрани или у екстрацелуларном матриксу (178-181). Упркос слабијем афинитету CRD региона за успостављање стабилне интеракције са њиховим лигандима, галектини испољавају мултивалентност у везивању мултиплих лиганада, што повећава њихов авидитет (180,182). Висок авидитет солубилни галектини постижу олигомеризацијом молекула што је од суштинског значаја за њихову активност (183). Везивањем за гликокоњугате присутне на површини ћелије и њиховим унакрсним повезивањем, могу да започну каскаду различитих сигналних путева у ћелији (177,184). Са друге стране, функције интрацелуларно локализованих галектина нису посредоване везивањем за угљено-хидратне молекуле, већ за различите интрацелуларне протеинске лиганде. На овај начин галектини се укључују у бројне сигналне путеве у ћелији (185).

Функционално су укључени у различите биолошке процесе, као што су ембриогенеза, адхезија и пролиферација ћелија, апоптоза, пост-транскрипциона обрада информационе рибонуклеинске киселине (енгл. *ribonucleic acid*, RNA), бактеријска колонизација и модулација имунског одговора (185-188). Многобројни су докази да галектини играју кључну улогу у различитим патолошким стањима, укључујући аутоимунске болести, алергијске реакције, инфламацију, раст и метастазирање тумора, атеросклерозу и компликације тип 2 *Diabetes mellitus*-а (189).

1.6. СТРУКТУРНЕ ОСОБИНЕ ГАЛЕКТИНА-3

Молекул галектина-3 је првобитно идентификован као Mac-2, површински ћелијски маркер експримиран на мишићим перитонеалним макрофагима стимулираних тиогликолатом (190). Касније је описиван као CBP-35 (енгл. *carbohydrate-binding protein* величине 35-kDa) мишићних фибробласта, εBP (енгл. *ε-binding protein from rat basophilic leukemia cells*), RL-29 (енгл. *29-kDa lectin in rat lung tissue*), HL-29 (енгл. *29-kDa lectin in human lung tissue*), L-34 (лектин од 34-kDa) и LBP (енгл. *non-integrin laminin binding protein*) у макрофагима (191-196). Узимајући у обзир висок степен хомологије овог молекула између различитих врста, номенклатуром из 1994. године је означен као галектин-3 (197).

Галектин-3 је протеин величине 29-35-kDa и по својој структури је јединствен међу члановима фамилије лектина (174). Састоји се од кратких понављајућих аминокиселинских низова (од око 120 аминокиселина) богатих пролином, глицином и тирозином на N терминалном крају који су везани за један C терминални CRD регион одговоран за везивање угљених хидрата (197,198). У присуству мултивалентних лиганата, молекули галектина-3 се, захваљујући својим N терминалним доменима, удружују у пентамере и на тај начин унакрсно повезују површинске гликокоњугате формирајући решеткасту структуру. Поред структурних, два описана домена галектина-3 су одговорна за испољавање различитих функција овог молекула (182,199,200).

Иако нема способност за везивање угљених хидрата N терминални крај галектина-3 је есенцијалан за његове пуне биолошке функције (201). N терминални крај галектина-3, величине 110-130 аминокиселина, преко аминокиселине тирозин на позицији 102 и суседних аминокиселина партиципира у везивању угљенохидратних лиганата (202). Такође је одговоран за формирање пентамера молекула галектина-3 чиме доприноси унакрсном повезивању лиганата (177,203,204). Овај процес је вероватно биолошки регулисан што је базирано на чињеници да је N терминални домен подложен протеолитичкој разградњи од стране

матриксних металопротеиназа (ММП-2 и ММП-9) (205). Исецање ланца рекомбинантног хуманог галектина-3 на позицији аланин 62-тирозин 63 повећава афинитет за везивање угљених хидрата, али смањује способност олигомеризације галектина-3 чиме мења његове функције зависне од формирања пентамера (205). N терминални домен игра важну улогу у секрецији галектина-3 (206). Почетни N терминални пептид, величине 12 аминокиселина је високо козервиран код сисара. Показано је да делеција првих 11 аминокиселина овог пептида блокира секрецију, док мутација на позицији серин 6 блокира анти-апоптотску активност галектина-3 (207,208).

C терминални домен галектина-3 се састоји из 130 аминокиселина које формирају глобуларну структуру. Она се састоји из две анти-паралелне β -плоче са по 5-6 β -ланаца који формирају удубљење за везивање угљених хидрата (201). У склопу овог домена се налази конзервирана NWGR секвенца која показује висок степен структурне хомологије са ВН1 доменом фамилије анти-апоптотских Bcl-2 протеина одговорна и за анти-апоптотску активност галектина-3 (209).

1.7. БИОЛОШКЕ ФУНКЦИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3

Галектин-3 је углавном локализован у цитоплазми, али може бити присутан и унутар нуклеуса, на површини ћелије или у екстрацелуларном простору (210,211). Транслокација галектина-3 из цитоплазме у једро је посредована N-терминалним доменом, док транслокација из једра у цитоплазму захтева циљану секвенцу у оквиру CRD домена и одвија се кроз нуклеопорин NP98 (212,213). Секреција галектина-3 у екстраћелијски простор се такође одвија преко N -терминалног домена (206).

Галектин-3 има мултипле и комплексне функције у ћелији. У цитоплазми се везује за анти-апоптотски Bcl-2 протеин и инхибира апоптозу ћелије. Може да оствари интеракцију са активираним K-Ras транскрипционим фактором (K-Ras-GTP) и на тај начин утиче на Ras-Akt сигнални пут (207,214,215). Галектин-3

учествује у пост-транслацијској обради информационе RNA (енгл. mRNA *splicing*) и гради комплексе са протеином *Gemin4* у циљу формирања *spliceosome*-а (216,217). У једру, галектин-3 регулише експресију гена тако што олакшава везивање транскрипционих фактора за Sp1 and CRE секвенце генских промотера (210). Најновија истраживања показују да се галектин-3 у једру везује за β -катенин који улази у састав *Wnt* сигналног пута (218).

Са друге стране, екстрацелуларни галектин-3 посредује у адхезији и активацији ћелија (210). Пентамери галектина-3 унакрсно повезују лиганде на површини ћелије формирајући решеткасту структуру, што покреће каскаду сигналних путева у ћелији (210). Такође, може да се веже за гликозиловане компоненте екстраћелијског матрикса, као и површинске адхезивне молекуле као што су интегрини (219). Про-апоптотска активност екстрацелуларног галектина-3 је запажена у бројном типовима ћелија, као што су линија хумане Т лимфоцитне леукемије, мононуклеарне ћелије изоловане из хумане периферне крви и активирани мишићи Т лимфоцити (220).

Галектин-3 је убиквитаран молекул експримиран у бројним ћелијама и ткивима. Превасходно је присутан у епителним и ендотелним ћелијама различитих ткива и органа, сензорним неуронима, као и у ћелијама имунског система и то моноцитима и макрофагима, дендритским ћелијама, неутрофилима, еозинофилима, базофилима и мастоцитима (210). Иако је експресија галектина-3 у лимфоцитима ниска, она може бити стимулирана различитим сигнаlima. Генерално гледано, галектин-3 је моћан про-инфламаторни сензор што је показано у бројним студијама *in vitro* и *in vivo* (183,210). Екстрацелуларни галектин-3 учествује у активацији и вијабилности ћелија имунског система. Међутим, галектин-3 може имати имunosупресивне ефекте тако што индукује апоптозу моноцита и Т лимфоцита, супримира продукцију IL-15 и инхибира диференцијацију В лимфоцита (221,222). Ефекти галектина-3 на преживљавање Т лимфоцита зависе од његове локализације. Тако

ендогени галектин-3 показује анти-апоптотске ефекте, док екстрацелуларни промовише апоптозу Т лимфоцита (183,221).

1.8. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ОНКОГЕНЕЗИ И ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА

Туморске ћелије експримирају галектин-3 и верује се да овај лектин игра важну улогу у процесима онкогенезе и прогресије тумора, као што су малигна трансформација, инвазија и метастазирање (177,181). Након инхибиције галектина-3, ћелије хуманог карцинома дојке губе свој малигни потенцијал (223,224). Показано је и да се инхибицијом галектина-3 смањује раст тумора *in vivo* (223).

Постоје докази да је галектин-3 укључен у процес малигне трансформације ћелије путем интеракције са Ras протеином (225). Везивање галектина-3 за K-Ras индукује активацију фосфатидилинозитол 3-киназе (PI3K) и Raf1 што за последицу има модулацију генске експресије на транскрипционом нивоу (225,226). Галектин-3 утиче на онкогенезу и на тај начин што је укључен у регулацију ћелијског циклуса (177,218). Он смањује експресију циклина Е и А и повећава експресију инхибитора ћелијског циклуса p21 и p27 (227). Интеракција галектина-3 са β -катенином појачава експресију циклина D и *c-myc* протеина што додатно промовише ћелијски циклус (218,228).

Познато је да мембрански галектин-3 између осталог функционише и као адхезивни молекул у међућелијским интеракцијама или у интеракцијама између ћелије и екстраћелијског матрикса (229-231). Сматра да је галектин-3 укључен у процесе формирања туморских емболуса и адхезије туморских ћелија за ендотел током метастазирања (232,233). Галектин-3 експримиран на ендотелним ћелијама, путем интеракција са бројним угљенохидратним лигандима исказаним на туморским ћелијама, посредује у њиховој адхезији и метастазирању (231,232,234). Интеракција између солубилног галектина-3 и тумор-асоцираног трансмембранског муцинског протеина (MUC1) промовише агрегацију туморских ћелија, формирање емболуса и преживљавање дисеминованих туморских ћелија у циркулацији (235). У

метастатском моделу мишјег малигног меланома је показано да су галектин-3 дефицијентни мишеви значајно резистентнији на успостављање метастаза у плућима што се манифестује мањим бројем и величином метастатских колонија у плућима (236).

Галектин-3 је укључен у процес метастазирања и на тај начин што утиче на мотилитет туморских ћелија и инвазију тумора. Појачана експресија галектина-3 у ћелијама тумора плућа кореспондира са повећаним мотилитетом и инвазивношћу туморских ћелија *in vitro* (237). Тумачи се да галектин-3 регулише миграцију и инвазију туморских ћелија тако што регулише активацију и експресију адхезивних молекула интегрина, који играју кључну улогу у овим процесима (177,238). Новија истраживања истичу да галектин-3 промовише метастазирање карцинома желуца тако што повећава експресију PAR-1 (енгл. *protease-activated receptor-1*) и MMP-1 (239).

Процес ангиогенезе је есенцијалан за раст и прогресију тумора. Галектин-3 поспешује ангиогенезу тако што индукује миграцију ендотелних ћелија *in vitro* (240). Повећана експресија галектина-3 у трансфектованим клоновима ћелија хуманог карцинома простате и дојке промовише формирање нових капилара и убрзава раст тумора *in vivo* (240,241).

Узимајући у обзир чињеницу да галектин-3 експримирају бројне ћелије имунског система, његова улога у антитуморском имунском одговору није занемарљива. Показано је да галектин-3, експримиран у туморима, смањује функцију тумор инфилтришућих Т лимфоцита, док његови лиганди промовишу антитуморску имуност *in vivo* (242). Интеракција између галектина-3 и N-гликана индукује анергију тумор специфичних цитотоксичких Т лимфоцита, тако што узрокује дисоцијацију CD8 молекула од Т ћелијског рецептора (TCR) (242). Са друге стране, експресија галектина-3 корелира са апоптозом тумор инфилтришућих лимфоцита, чиме доприноси избегавању имунског одговора од стране тумора (243). Показано је да галектин-3 дефицијентни мишеви којима су апликоване ћелије малигног

меланома, имају значајно веће серумске нивое IFN- γ и IL-17 у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (236). Такође, значајно већа цитотоксичка активност урођено убилачких (енгл. *natural killer*, NK) ћелија уз снижен број регулаторних Т лимфоцита у галектин-3 дефицијентних мишева са малигним меланомом, указују на важну улогу галектина-3 у регулацији антитуморског имунског одговора (236).

1.9. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ИНФЕКЦИЈИ И АКУТНОЈ ИНФЛАМАЦИЈИ

Познато је да галектин-3 партиципира у више фаза акутног инфламаторног одговора као што су активација и адхезија неутрофила, хемотакса моноцита и макрофага, опсонизација апоптотичних неутрофила и активација мастоцита (244-247). За разлику од макрофага који интензивно експримирају и секретују галектин-3, мишји неутрофили не експримирају галектин-3 (248,249). Ипак, секретовани галектин-3 путем унакрсног повезивања мембранских гликопротеина, може да стимулише различите сигнале у ћелијама урођене имуности као што су оксидативни прасак у неутрофилима и дегранулација мастоцита (247,250). Галектин-3 је импликован у процесе апоптозе ћелија урођене имуности. Тако су макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева склонији апоптози у поређењу са макрофагима галектин-3 позитивних животиња (251).

Показано је да галектин-3 испољава антимикробну активност против *Candida-e albicans* (252). Инфекција плућа бактеријом *Streptococcus pneumoniae*, индукује акумулацију галектина-3 у алвеоларном простору што корелира са екстравазацијом неутрофила (249). Галектин-3 дефицијентни мишеви испољавају тежи облик пнеумоније изазване *S. pneumoniae* која је праћена интензивнијом бактеријемом и оштећењем плућног ткива (253). Разлог за то је директан ефекат галектина-3 на активацију неутрофила, појачавање њихове фагоцитне способности и смањене апоптозе. Акумулација неутрофила у интрестицијални простор плућа код галектин-3 дефицијентних мишева је очувана, али је њихова миграција у алвеоларни простор

значајно редукована у ових животиња након инфекције (253). Фагоцитоза апоптотичних неутрофила од стране макрофага у галектин-3 дефицијентних мишева је знатно мање ефикасна у поређењу са контролним животињама, што за последицу има нагомилавање апоптотичних неутрофила и следствено оштећење ткива (253). Додатно је показано да галектин-3 има бактериостатско дејство на *S. pneumoniae in vitro* (253). Галектин-3 промовише респираторни прасак у неутрофилима тако што стимулише мембранску експресију молекула CD66 одговорног за активацију NADPH оксидазе (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) у неутрофилима (250,254,255,256). Такође, галектин-3 повећава адхезију неутрофила за ламинин (244).

Постоје подаци који говоре у прилог томе да чланови фамилије лектинских молекула могу бити рецептори за препознавање молекулских образаца микроорганизама (257,258). Тако галектин-3 везује гликане експримиране на патогенима као што су *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Shistosoma mansoni* и *Trypanosoma cruzi* и демонстрира проинфламаторну улогу у овим инфекцијама (259-262). Инфекција коју изазива *Toxoplasma gondii* је код галектин-3 дефицијентних мишева праћена сниженим инфламаторним одговором у интестинуму, јетри и мозгу, али не и у плућима, у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (263). Са друге стране, показано је да у овим инфекцијама галектин-3 супримира Th1 имунски одговор (263). Након инфекције чији је изазивач *S. pneumoniae* код галектин-3 дефицијентних мишева је уочен знатно јачи Th1 имунски одговор, праћен повећаном продукцијом TNF- α и IL-6, који додатно утиче на оштећење ткива и ширење патогена (253). *Paracoccidioides brasiliensis* код осетљивих галектин-3 дефицијентних мишева индукује поларизацију стеченог имунског одговора у Th2 правцу, док њихови макрофаги изложени антигенима овог патогена појачано продукују IL-10 (264). Насупрот томе, инфекција коју изазива *Shistosoma mansoni* у галектин-3 дефицијентних мишева је праћена сниженим бројем Т и В лимфоцита у слезини, као и смањеним формирањем гранулома у јетри (265). На основу ових резултата се може рећи да је различит утицај галектина-3 на

поларизацију стеченог имунског одговора, вероватно последица типа инфективног агенса који је изазвао болест (222).

Неколико студија је показало да галектин-3 активира дендритске ћелије и макрофаге, игра улогу хемоатрактанта за ове ћелије и учествује у пролиферацији активираних Т лимфоцита (265-267). У мишјем моделу фулминантног хепатитиса индукованог применом конканавалина А је документована про-инфламаторна улога галектина-3 која се огледа у појачаној активацији Т и НКТ лимфоцита (енгл. *natural killer T cells*) и дендритских ћелија, повећаној секрецији цитокина, смањеној поларизацији макрофага у смеру М2 фенотипа и апоптози мононуклеарних ћелија (268).

1.10. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У АУТОИМУНСКИМ БОЛЕСТИМА

Постоје бројни подаци да је галектин-3 широко импликован у биологију Т лимфоцита и адаптивног имунског одговора. Иако је експресија галектина-3 у наивним и неактивираним Т лимфоцитима конститутивно ниска, она значајно расте у присуству стимулуса који активирају ове ћелије као што су анти-CD3 антитело, конканавалин А (*Con A*) и калцијум (266,269). Експресија галектина-3 је испитивана у различитим субпопулацијама Т лимфоцита. Тако регулаторни Т лимфоцити појачано експримирају галектин-3 што је доведено у везу са интензитетом експресије транскрипционог фактора FoxP3 (270). За разлику од CD8⁺ αβ Т лимфоцита који у одсуству инфекције садрже низак ниво галектина-3, експресија у γδ Т лимфоцитима је значајно већа што је у корелацији са њиховим активационим статусом (271). Такође, хумани меморијски CD4⁺ лимфоцити експримирају значајно више галектина-3 у поређењу са наивним лимфоцитима, што указује на чињеницу да експресија расте у процесу диференцијације наивних у ефекторске и меморијске ћелије (272).

Екстрацелуларни галектин-3 индукује апоптозу Т лимфоцита, и то ћелија хумане Т лимфоцитне леукемије, мононуклеарних ћелија из периферне крви и активираних

мишјих Т лимфоцита (220,273). Секретовани галектин-3 се везује за CD7 и CD29 молекуле чиме активира митохондријални сигнални пут, ослобађање цитохрома *c* и активацију каспазе-3 (220). Додатно је показано да везивање галектина-3 за CD45 молекул појачава сензитивност ћелија на апоптозу (273).

Показано је да галектин-3 регулише сигнализацију преко Т ћелијског рецептора (TCR). Тако галектин-3 инхибира активацију Т лимфоцита формирајући комплексе са TCR гликанима што онемогућава груписање рецептора неопходно за започињање трансдукције сигнала (274). Након препознавања антигена од стране TCR-а у галектин-3 дефицијентним лимфоцитима настаје повећана фосфорилација тирозинских остатака укључујући фосфорилацију LAT (енгл. *linker of activated T cells*) и Zap70 (енгл. *ζ-chain-associated-protein kinase 70*) (275). Транслокација галектина-3 у имунску синапсу након активације TCR-а инхибира продукцију цитокина од стране CD4⁺ ћелија (275). Насупрот томе, постоје подаци да солубилни галектин-3 учествује у активацији Т лимфоцита. Тачније, у присуству галектина-3 Т лимфоцити постају значајно осетљивији на дејство стимулуса (276). Тако тумор реактивни Т лимфоцити у присуству високих концентрација галектина-3 продукују веће количине IFN-γ (276).

У складу са претходним резултатима, улога галектина-3 је испитивана у бројним експерименталним моделима аутоимунских болести посредованих аутореактивним клоновима Т лимфоцита. У моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (EAE) је показано да галектин-3 дефицијентни мишеви развијају знатно блажи облик болести у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима, што је праћено мањом инфилтрацијом моноцита и макрофага у централни нервни систем и повећаном апоптозом ћелија у инфилтрату (277). Ова студија је показала да галектин-3 смањује апоптозу инфилтришућих ћелија у централни нервни систем, повећава продукцију IL-17 и IFN-γ и смањује продукцију IL-10. Ови резултати су поткрепљени запажањем да галектин-3 промовише про-инфламаторну каскаду сигналних путева у мозгу (278). Додатно је документовано

да галектин-3 активира про-инфламаторне сигналне путеве путем активације транскрипционих фактора STAT1, STAT3, STAT5 и JAK2 (278). Слично претходним резултатима галектин-3 у патогенези реуматоидног артритиса испољава про-инфламаторну улогу (279). Галектин-3 дефицијентни мишеви испољавају блажи облик артритиса у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима што је праћено нижим системским нивоима TNF- α и IL-6 и смањеном заступљеношћу IL-17 продукујућих Т лимфоцита (279).

У експерименталном моделу аутоимунског *Diabetes mellitus*-а индукованог апликацијом малих поновљених доза стрептозотоцина је показано да су галектин-3 дефицијентни мишеви резистентнији на индукцију *Diabetes mellitus*-а што је праћено смањеном инфилтрацијом мононуклеарних ћелија у панкреасна острвца (280). Акцесорске ћелије галектин-3 дефицијентних мишева продукују мање количине про-инфламаторних цитокина у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (280). Новија студија је показала да дефицијенција галектина-3 има протективни ефекат на апоптозу β -ћелија изложеним дејству про-инфламаторних цитокина *in vitro* (281). β -ћелије панкреасних острваца изложене дејству TNF- α , IFN- γ и IL-1 β у условима аблације галектина-3 експримирају мање проапоптотских, уз повећану експресију антиапоптотских протеина (281). Насупрот овим резултатима су запажања да је галектин-3 протеин са највећом експресијом у панкреасним острвцима BB (енгл. *biobreeding*) пацова након њиховог излагања цитотоксичном дејству IL-1 β *in vitro* (282). Показано је да повећана експресија галектина-3 има протективни ефекат на деструкцију β -ћелија што је посредовано блокадом фосфорилације JNK која игра есенцијалну улогу у апоптози индукованој апликацијом IL-1 β (282).

1.11. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ХРОНИЧНОЈ ИНФЛАМАЦИЈИ И ФИБРОГЕНЕЗИ

Галектин-3 представља моћан митоген у култури фибробласта. Најпре је показано да апликација рекомбинантног галектина-3 у културу хуманих фибробласта пореклом из плућног ткива, дозно-зависно стимулише синтезу DNA и ћелијску пролиферацију (283). У каснијим студијама документована је улога галектина-3 у пролиферацији и активацији фибробласта пореклом из различитих ткива и органа. Галектин-3 стимулише пролиферацију стелатних ћелија јетре, које представљају миофибробласте јетре, активацијом различитих сигналних путева (284). Инхибиција експресије галектина-3 методом трансфекције siRNA (енгл. *small interfering RNA*) у мишијим стелатним ћелијама јетре блокира активацију миофибробласта (285). Апликација галектина-3 у култури мезангијалних ћелија пацова повећава синтезу колагена тип IV и делује синергистички са TGF- β на синтезу екстрацелуларног матрикса (286). Рекомбинантни галектин-3 индукује пролиферацију срчаних фибробласта, експресију циклина D1 и продукцију колагена (287).

Важну карику у оркестрацији имунског одговора од стране галектина-3 представља његова улога у дефинисању фенотипа и функције макрофага (288). Макрофаги интензивно експримирају и секретују галектин-3 (248). Експресија галектина-3 се значајно повећава у процесу диференцијације моноцита у макрофаге и појачава интеракцију између моноцита у процесу формирања мултиједарних циновских ћелија (289). Ове ћелије имају фенотип удружен са алтернативном активацијом макрофага у смеру M2 фенотипа, а представљају одлику хроничне инфламације и фиброзе ткива (290).

Сходно предходним резултатима, повећана експресија галектина-3 је документована у хроничним инфламаторним болестима праћеним фиброзом ткива као што су цироза јетре, хронични панкреатитис, идиопатска плућна фиброза, експериментални гломерулонефритис (285,286,291,292). Документовано је да са

прогресијом срчане инсуфицијенције експресија галектина-3 у срчаном мишићу значајно расте. Експримирају га активирани макрофаги, перицити, миофибробласти и фибробласти у процесу ћелијске пролиферације и секреције проколагена I. Као резултат настаје појачана синтеза колагена, следствена фиброза срчаног мишића и инсуфицијенција срца (293-295). Најновијим истраживањима је документовано да је појачана експресија галектина-3 важан фактор у лептином индукованој фибрози срчаног мишића у пацова на исхрани богатој мастима (296).

Насупрот улози галектина-3 као профиброгеног фактора у прогресији хроничног инфламаторног процеса, постоје докази који упућују на његову протективну улогу у условима дуготрајне изложености ткива штетним ноксама. Првобитно је показано да галектин-3 дефицијентни мишеви код којих је индукован *Diabetes mellitus* применом стрептозотоцина убрзано развијају гломерулопатију која се манифестује повећаном протеинуријом, експресијом гена који кодирају компоненте екстраћелијског матрикса и експанзијом мезангијума (297). Показано је да детектоване промене корелирају са акумулацијом метаболита AGE у бубрежним гломерулима у одсуству галектина-3 који игра улогу рецептора чистача (енгл. *scavenger receptor, SR*) за ове метаболите (298). Новије студије су потврдиле да галектин-3 учествује у преузимању и уклањању модификованих липопротеина чиме супримира про-инфламаторну каскаду (299). Галектин-3 дефицијентни мишеви убрзано развијају атеросклерозу праћену појачаном акумулацијом оксидованих LDL и модификованих липопротеина. У одсуству галектина-3 расте експресија других рецептора за ове метаболите као што је RAGE који покреће каскаду про-инфламаторних догађаја (299). Аналогно процесу старења, галектин-3 дефицијентни мишеви након 6 месеци спонтано развијају неалкохолни стеатохепатитис праћен повећаном експресијом AGE, RAGE и транскрипционог фактора PPAR- γ (300).

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Главни циљ ове студије је да испита улогу галектина-3 у патогенези гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а у мишјем моделу гојазности индуковане применом дијете са високим садржајем масти.

У складу са овим циљем испитивани су:

1. Улога адаптивног имунског одговора у патогенези гојазности и инсулинске резистенције у присуству или одсуству галектина-3
2. Улога целуларних елемената урођене имуности у патогенези гојазности и инсулинске резистенције у присуству или одсуству галектина-3
3. Механизми настанка инфламације ниског степена, како у циљним ткивима, тако и на системском нивоу, у зависности од присуства или одсуства галектина-3

Експериментални задаци студије:

- Испитати утицај галектина-3 на развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести
- Испитати утицај галектина-3 на развој инсулинске резистенције одређивањем параметара гликорегулације: гликемије и концентрације инсулина у крви, гликозилираног хемоглобина (HbA1c), НОМА-IR (енгл. *homeostasis model assessment of insulin resistance*) индекса
- Испитати системске маркере инфламације и имунорегулације одређивањем концентрације CRP-а (C реактивни протеин), IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 у серуму
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које учествују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву
- Испитати присуство и степен инфламације, као и фенотипске и функционалне карактеристике ћелија инфилтрованих у панкреасна острвца

- Утврдити везу између галектина-3 и експресије крајњих продуката метаболизма глукозе (AGE) и рецептора RAGE у острвцима ендокриног панкреаса
- Утврдити везу између галектина-3 и активације NLRP3 инфлазома и следствене продукције IL-1 β , као могућег механизма настанка инфламације у ткивима *in vivo*, као и у перитонеалним макрофагима *in vitro*
- Утврдити везу између галектина-3 и активације NF- κ B као могућег механизма настанка инфламације, мерењем експресије укупног и фосфорилисаног NF- κ B у ткивима *in vivo*, као и у перитонеалним макрофагима *in vitro*

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживање је спроведено на 6 недеља старим мужјацима, чистог соја C57BL/6 (енгл. *wild type*) мишева и мишева којима је циљано уклоњен ген за галектин-3 (LGALS3^{-/-}) соја C57BL/6. LGALS3^{-/-} мишеви добијени су љубазношћу Проф. др Hsu-a (*Daniel K. Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, CA, USA*). У студију су укључене животиње усклађене старости и телесне масе између експерименталних група. Мишеви су одгајани у стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Током трајања експеримента животиње су имале слободан приступ храни и води.

Спроведено истраживање одобрено је од стране Етичке комисије за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-4382 од 15.06.2012. године.

3.1.1. Методологија добијања LGALS3^{-/-} мишева

Појам хомологе рекомбинације односи се на замену гена између пара хомологих секвенци два молекула дезоксирибонуклеинске киселине (енгл. *Deoxyribonucleic acid, DNA*) које имају сличне или идентичне нуклеотиде (301). Овим поступком могуће је заменити функционални ген неактивним, некодирајућим геном чиме се у потпуности елиминише, односно "искључује" функција постојећег гена (302). Управо на методи хомологе рекомбинације је базиран и поступак стварања *knock-out* мишева, укључујући мишеве којима је циљано уклоњен функционални ген за галектин-3 (302).

Технологија добијања *knock-out* мишева базирана је на селекцији ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација. Фрагмент DNA са мутираним геном (или

фрагмент DNA са "искљученим" геном) се најпре уграђује у циљни вектор који садржи додатне гене за контролу рекомбинације: ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) и ген за вирусну тимидин киназу (ТК ген) (303,304). *Neo* ген увек уграђује у геном ћелије, док се ТК ген губи у случају хомологе рекомбинације. Овако добијени вектор се убацује у културу ћелија чији медијум садржи неомицин, као и ганцикловир 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 жељени клонирани ген насумице интегрисан у ћелију, оваква ћелија биће резистентна на неомицин, али ће бити уништена помоћу ганцикловира или FIAU. Насупрот томе, ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација биће резистентне и на неомицин и на ганцикловир или FIAU (303,304).

Показано је да мишији ген за галектин-3 садржи шест егзона при чему егзон 2 и 3 кодирају аминокиселински крај молекула галектина-3, док егзони од 4 до 6 кодирају карбокси-терминални крај са доменом којим препознаје угљенохидрате (305). У циљу добијања LGALS3^{-/-} мишева направљен је прекид гена за галектин-3 на нивоу ембрионалних матичних ћелија (251). При томе је коришћен вектор који је конструисан тако да садржи фрагмент клониране DNA за галектин 3. Стратегија за добијање LGALS3^{-/-} мишева се заснива на прекиду оног генског региона који кодира домен за препознавање угљенохидрата. 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 галектин-3 је уграђен у *pMC1Neo Poly(A)* вектор (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) на горњем крају у близини промотера за тимидин киназу-*Neo* касете. Други сегмент од егзона-5 до егзона-6 је уграђен низводно од *Neo* касете, док је у вектору сегмент на споју интрона-4 и егзона-5 прекинут *Neo* геном (251).

Циљни вектор је уграђен у мишије матичне ћелије, D3. Трансфектоване ћелије су 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 и *Southern blot* хибридизацијом. Скринингом 894 клонова ембрионалних матичних ћелија идентификована су само два клона 4А 4А2 и 9А4 у којима је детектована хомолога рекомбинација помоћу пробе 4 (251).

Један клон ембрионалних матичних ћелија у коме се одиграла хомолога рекомбинација је најпре пропагиран. Добијене ћелије су убризгане у 3.5 дана старе бластоцисте C57BL/6 мишева, које су затим имплантиране у лажно гравидне CD1 женке (сурогат мајке). Укрштањем овако добијених химеричних мужјака са C57BL/6 женкама добијени су хетерозиготни LGALS3^{-/+} мишеви. Инбредним укрштањем LGALS3^{-/+} мишева након девет генерација добијени су хомозиготни *knock-out* мишеви, генски дефицијентни у експресији молекула галектина-3 (LGALS3^{-/-} мишеви) (251).

Хистолошком анализом различитих органа изолованих из добијених LGALS3^{-/-} мишева нису уочене било какве видљиве промене. Није детектована разлика у броју ћелија крви између LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева. Укупан број лимфоцита као и однос CD4⁺/CD8⁺ ћелија у тимусу, слезини и лимфним чворовима био је приближно исти код LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева (251).

3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 *DIABETES MELLITUS-A*

Гојазност и тип 2 *Diabetes mellitus* су идуковани применом специјалне врсте дијете са високим процентом масти (енгл. *high-fat diet*, HFD, 60% масти, *Mucedola, Milano, Italy*) у трајању од 11 и 18 недеља, почев од шесте недеље старости. Контролне групе животиња су стављене на исхрану са ниским процентом масти (енгл. *low-fat diet*, LFD, 3% масти, *Mucedola, Milano, Italy*). Све време трајања експеримента мишеви су имали слободан приступ храни и води. Животиње су жртвоване у два термина, и то након завршених 11, односно 18 недеља специјалног режима исхране.

Након жртвовања животиња у атмосфери засићеној диетилетром (*БЕТАНЕМ*, Београд, Србија) изоловани су висцерално адипозно ткиво из перигонадалних депоа, слезина и панкреас за даљу анализу. Крв је сакупљена након жртвовања, пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнут на -20°C за даљу анализу.

3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА РАЗВОЈА БОЛЕСТИ

Динамика увећања телесне масе праћена је сваке друге недеље појединачним мерењем мишева. Ниво глукозе у пуној крви наше мерен је сваке друге недеље током трајања експеримента. Крв за анализу је добијена пункцијом репне вене након 4h гладовања. Кап крви је наносена на траку за мерење гликемије (*Accu-Chek Performa test strips, Roche, Germany*). Вредност гликемије је очитавана на глукометру (*Accu-Chek Performa, Roche*) за сваког миша појединачно.

Концентрација секретованог инсулина наше је одређивана у серуму након 4h гладовања уз помоћ ELISA теста (*Millipore Corporation, Billerica, MA, USA*) према упутству произвођача. На основу измерених вредности гликемије наше и инсулинемије у време жртвовања животиња, израчунате су вредности НОМА-IR индекса инсулинске резистенције за сваког миша појединачно према формули: концентрација инсулина наше (mU/ml) x гликемија наше (mmol/l) / 22.5 (306).

Серумске концентрације липида (триглицериди, укупни холестерол, HDL, LDL и мокраћна киселина), као и проценат гликозилираног хемоглобина (HbA1c) су мерени за сваког миша појединачно употребом *Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan)*.

3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ

Системски нивои IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ и C реактивног протеина (CRP) мерени су у серуму мишева комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишје цитокине (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) и то: *Mouse IL-1 β DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-4 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit, Mouse IL-13 DuoSet ELISA Development kit, Mouse IFN- γ DuoSet ELISA Development kit, Mouse CRP DuoSet ELISA Development kit.*

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Saline*) (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000 pg/ml за CRP, IL-10, IL-13 и IFN- γ и 1000 pg/ml за IL-1 β , IL-4 и IL-6. У циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити прерачунате концентрације мерених цитокина, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Reagent Diluent* (PBS са 1%-тним BSA)).

По 100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) сипано је у бунарчиће микротитар плоча (енгл. *microtiter plate*) са 96 бунарчића са равним дном (*Sarstedt*). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање микротитар плоча. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA (енгл. *Bovine serum albumin*) у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и микротитар плоче су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плоче, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања микротитар плоча, у све бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*).

Плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране и у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем микротитар плоча. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у размери 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50 μ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution: 2N H₂SO₄*) и очитана је оптичка густина на таласној дужини 450 nm, на *Microplate reader-у* (*Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor, Anthos, Austria*).

Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.5. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА, ПАНКРЕАСА И СЛЕЗИНЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ

Мононуклеарне ћелије су изоловане из висцералног адипозног ткива, панкреаса и слезине и анализиране методом проточне цитометрије. Анализирана је процентуална заступљеност, фенотипске и функционалне карактеристике различитих популација мононуклеарних ћелија.

3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива

Тотално висцерално адипозно ткиво је изоловано из перитонеалне шупљине ексцизијом из пери-епидидималних, као и пери-реналних депоа. Ткиво је уситњено маказицама у Петри шољама у 3 ml PBS-а и додатно опрано у истом волумену. Након испирања, ткиво је пребачено у епрувете од 50 ml и додато је 4 ml раствора за

дигестију по ткиву и то: 1 mg/ml колагеназе тип 2 (*Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA*) у RPMI-1640 медијуму са 2% BSA (*Sigma Aldrich*). Ткиво је дигестирано 1 h на 37°C у воденом купатилу уз константно мешање у шејкеру на 100 rpm, а затим пропуштено кроз ћелијско сито величине 40 µm (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Добијена ћелијска суспензија је центрифугирана на 1800 rpm 5 минута. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера за лизирање еритроцита и инкубиране 3 минута на 37°C. Пуфер за лизирање је неутрализован са 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*) и ћелије су центрифугиране 10 минута на 1400 rpm. Након додатног испирања у истом медијуму 10 минута на 1400 rpm обртаја, ћелије су ресуспендоване у 500 µl RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

3.5.2. Изолација мононуклераних ћелија из ткива панкреаса

Ткиво панкреаса је уситњено у 5ml HBSS-а (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich*) са 10%FBS-а у Петри шољи и додатно испрано у истом медијуму. Пуловано ткиво две животиње је дигестирано у 5 ml раствора HBSS са 10%FBS-а и 2 mg/ml колагеназе тип V (*Sigma Aldrich*) 15 минута на 37°C у шејкеру на 100 rpm у епруветама од 50 ml (307). Након дигестије ткиво је механички пропуштено кроз 40 µm-ско ћелијско сито (*BD Biosciences*) у епрувету од 10 ml и два пута опрано у HBSS-у са 10% FBS-а, 10 минута на 1200 rpm. Добијени пелет је ресуспендован у 2 ml дилуције лизинг пуфера. Након 3 мин на 37°C додат је медијум (HBSS са 10% FBS-а) и ћелије су центрифугиране 10 минута на 1200 rpm. Добијена ћелијска суспензија је додатно пропуштена кроз ћелијско сито (40 µm) и испрана у истом медијуму. Пелет је ресуспендован у 0.5 ml HBSS-а са 10% FBS-а и ћелије су избројане у разблажењу 10x.

3.5.3. Изолација мононуклеарних ћелија из слезине

Изоловано ткиво слезине је благим притиском клипом шприца хомогенизовано и пропуштено кроз ћелијско сито (40 µm) (*BD Biosciences*) уз константно спирање

ћелијским медијумом RPMI-1640 са додатком 10% FBS-а у епрувету од 50 ml до финалног волумена од 7 ml. Добијени садржај је пребачен у епрувету од 12 ml и центрифугиран на 1400 грм 10 минута. Супернатант је одливен, а пелет је ресуспендован у 5 ml лизинг пуфера у циљу лизирања еритроцита и инкубиран 5 минута на +4°C. Након истека инкубације, даље лизирање је заустављено додавањем 5 ml RPMI-1640 медијума са додатком 10% FBS-а. Добијена суспензија је поново центрифугирана на 1400 грм 10 минута, супернатант одливен, а пелет ресуспендован у 7 ml RPMI-1640 медијума са додатком 10% FBS-а. Да би се избегла контаминација спленоцита хистиоцитима слезине, ћелије су још једном пропуштене кроз ћелијско сито. На овај начин је добијена једноћелијска суспензија спленоцита, која је коришћена у даљим испитивањима.

3.5.4. Обележавање ћелијских мембранских маркера

У циљу дефинисања фенотипских и функционалних карактеристика различитих субпопулација мононуклеарних ћелија изолованих из висцералног адипозног ткива, панкреаса и слезине, коришћена су анти-мишја моноклонска антитела специфична за различите мембранске и интрацелуларне молекуле. За сваку од анализа коришћено је 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; *BD Biosciences*). Ћелијама је додата одговарајућа количина примарно обележених моноклонских антитела или необележених антитела у комбинацији са флуорохромом коњугованим секундарним антителом тражене специфичности (Табела 1). Испитиване мононуклеарне суспензије су такође инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 2).

ДИРЕКТНО КОЊУГОВАНА АНТИТЕЛА		
НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
<i>Alexa Fluor[®]488 Hamster Anti-Mouse CD3e</i>	145-2C11	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PerCP/Cy 5.5 Anti-mouse NK 1.1</i>	PK136	<i>BioLegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti-mouse F4/80</i>	CI:A3-1	<i>BioLegend, San Diego, CA,</i>

Галектин-3 у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a

		USA
PE Anti-mouse CD11c (p150/90)	N418	eBioscience, San Diego, CA, USA
PerCP-Cy TM 5.5 Rat Anti-mouse CD11b	M1/70	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Alexa Fluor [®] 647 Anti-mouse CD206 (MMR)	MR5D3	BioLegend, San Diego, CA, USA
APC Rat Anti-Mouse IFN- γ	XMG1.2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Rat Anti-Mouse CD4	H129.19	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PerCP/Cy5.5 Anti-mouse CD25	PC61	BioLegend, San Diego, CA, USA
PE Rat Anti-Mouse FoxP3	MF23	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PE Hamster Anti-Mouse CD279 (PD-1)	J43	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ПРИМАРНА АНТИТЕЛА		ПРОИЗВОЂАЧ
Rabbit polyclonal to CIAS1 / NALP3	Immunogen: 16 amino acid peptide from near the amino terminus of Human CIAS1 / NALP3 (GenBank accession no. NP_899632); Reacts with mouse antigen	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit polyclonal to IL-1 β	Immunogen: Highly pure (>98%) recombinant mIL-1 β (mouse Interleukin-1 β)	Abcam, Cambridge, UK
Cryopyrin Antibody (N-14)	Goat polyclonal IgG; Reacts with mouse antigen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Rabbit polyclonal to NF κ B p65 (phospho S536)	Immunogen: Synthetic peptide conjugated to KLH, surrounding the phosphorylation site of serine 536 (F-S-S(p)-I-A) derived from Human NF κ B p65 (NP_001138610.1); Reacts with mouse antigen	Abcam, Cambridge, UK
СЕКУНДАРНА АНТИТЕЛА		ПРОИЗВОЂАЧ
Goat Anti-Rb IgG (H+L), PE-Cy [®] 5.5 Conjugated		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Donkey Anti-Goat IgG H&L (PE) Secondary Antibody		Abcam, Cambridge, UK

Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
<i>Alexa Fluor® 488 Hamster Isotype Control</i>	A19-3	<i>BD Biosciences</i>
<i>PE Hamster Isotype Control</i>	B81-3	<i>BD Biosciences</i>
<i>Alexa Fluor® 647 Rat Isotype Control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences</i>
<i>FITC Rat Isotype Control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences</i>
<i>APC Rat Isotype Control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences</i>
<i>PerCP-Cy™5.5 Rat Isotype Control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences</i>

Табела 2. Изотипске контроле коришћене у проточној цитометрији

3.5.5. Бојење мембранских маркера

Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле, коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији буду 1:100. У сваку од епрувета стављено је 5×10^5 ћелија у 50 μ l хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*) заједно са истим волуменом претходно растворених антитела. Након краткотрајног вортексовања узорци су инкубирани у мраку на температури од +4°C у трајању 20 минута. По истеку инкубације, ћелије су "опране" додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*) и центрифугирањем 5 минута на 1400 rpm. Потом је одливен супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur (BD Biosciences)*. За све цитометријске анализе коришћен је регион (енгл. *Gate*) мононуклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo (Tree Star)* софтвера.

3.5.6. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних цитокина изведено је по *BD Cytofix/Cytoperm™* методи. У овом истраживању ћелије су стимулисане са форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma Aldrich*) и јономицином (енгл.

Ionomycin; Sigma Aldrich), који покрећу активност протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C*, PKC) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији претходно активираној физиолошким стимулусима (308). Трајање инкубације од 4 до 6 часова је оптимално за већину цитокина, јер је дужа инкубација удружена са појавом цитотоксичних ефеката поменутих активатора.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStopTM* (садржи моненсин) и *BD GolgyPlugTM* (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта поменутих инхибиторима резултира акумулацијом већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, па је тако повећана могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксични ефекат, па излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, инкубације дуже од 12 часова су токсичне за ћелије.

Након истека времена предвиђеног за активацију, ћелије су центрифугиране 5 минута на 1400 rpm и ресуспендоване у пуферу за бојење (енгл. *Staining Buffer*, *BD Biosciences*). Најпре је урађено бојење мембранских маркера према унапред описаној процедури. После истека инкубације ћелије су опране у 2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 1400 rpm. Ћелије су затим фиксиране и пермеабелизоване коришћењем 250 µl раствора за фиксацију и пермеабелизацију (*Fixation/Permeabilisation solution*, *BD Biosciences*) у трајању од 20 минута на +4°C. Пре и после додавања раствора за фиксацију и пермеабелизацију, сви узорци су добро вортексовани. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (*Perm/WashTM*, *BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm. После одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Примарно коњугована анти-мишћа антитела примењена су у финалном разблажењу 1:100. Примарна анти-зечја антитела за NLRP3, IL-1β и NF-κB и анти-козје *Cryopyrin* антитело примењена су у финалној концентрацији 1 µg/ml. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml

10%-ног пуфера за пермеабилizацију (*Perm/WashTM*, *BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm. Узорци у којима су примењена необележена примарна антитета су додатно инкубирани са PE-Cy5.5 коњугованим козјим анти-зечјим IgG антителом или PE коњугованим анти-козјим IgG антителом, у финалном разблажењу 1:400, 30 минута на +4°C. Након испирања у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабилizацију (*Perm/WashTM*, *BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm, ћелије су ресуспендоване у 350 µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, *BD Biosciences*). Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализиране на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences*).

3.6. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА МОНОНУКЛЕАРНОГ ИНФИЛТРАТА У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА

3.6.1. Бојење хематоксилином и еозином

Бојење криостатских исечака ткива панкреаса урађено је методом хематоксилин-еозин (*hematoxylin-eosin*) по *Heidenhain*-у (309) и сагласно препорукама *Gurr*-а (310). Плочице са ткивним пресецима пуферисане су у пуферу формалдехида 10 секунди, онда опране у текућој води а затим потопљене 2 минута у *Mayer*-ов хематоксилин (*Merck, Whitehouse Station, NJ, USA*). Након испирања 1 минут у текућој води ткивни исечци су бојени алкохолним еозином (*Merck*) у трајању 1 минут. У циљу уклањања воде урађена је дехидратација исечака потапањем у серију растућих концентрација алкохола следећим редоследом: најпре 1 минут у 85% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 50 секунди у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног

сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (BX51, *Olympus, Japan*).

3.6.2. Хистолошко скорирање мононуклеарног инфилтрата

Дистрибуција инфилтришућих инфламаторних ћелија у циљним ткивима је праћена микроскопирањем исечака одговарајућих ткива обојених *haematoxylin*-ом и *eosin*-ом, употребом светлосног микроскопа (BX51, *Olympus, Japan*) са припадајућом дигиталном камером. Степен мононуклеарне инфилтрације подељен је у пет скорова и то:

- скор 1=без инфилтрације
- скор 2=периваскуларна/перидуктална инфилтрација
- скор 3=пери-инсулитис
- скор 4= благи инсулитис (мање од 25% острвца захваћено инфилтратом)
- скор 5=изражен инсулитис (више од 25% острвца захваћено инфилтратом)

Анализа степена мононуклеарног инфилтрата урађена је према претходно описаном протоколу (311).

3.7. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦА

За бојење техником имунофлуоресценце коришћени су крио-исечци ткива панкреаса дебљине 5 μm . Након отапања препарата 5 минута на собној температури, ткиво је пермеабелизовано употребом ледено хладног ацетона у трајању од 5 минута на $+4^{\circ}\text{C}$. После испирања препарата 3 пута по 5 минута у PBS-у, могуће неспецифично везивање антитела је блокирано уз помоћ 200 μl 10% нормалног козјег серума у PBS-у. Препарати су поново испрани у PBS-у и апликована су примарна зечја анти-мишја NLRP3, AGE, RAGE и IL-1 β антитела (*Abcam, Cambridge, MA, USA*) (Табела 3). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA у разблажењу 1:200 за NLRP3, AGE и IL-1 β и 1:400 за RAGE и додата у

волумену 200µl по препарату. Након инкубације 1h на собној температури у влажној комори, препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим је апликовано одговарајуће секундарно козје анти-зечје IgG антитело PE-Cy 5.5 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) у разблажењу 1:400 у волумену 200 µl и инкубирано 45 минута у влажној комори. Препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у, а затим је апликовано FITC коњуговано антитело на мишји инсулин (*Abcam*) и то у волумену 200 µl са разблажењем 1:400. Након испирања у PBS-у, на обојене пресеке ткива је апликован медијум који садржи DAPI за визуелизацију нуклеуса (енгл. *mounting medium, ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Анализа имунофлуоресценце је урађена уз помоћ инвертног микроскопа *Nikon eclipse Ti-E* са припадајућим софтвером (*Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA*).

3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Двоструко имунохистохемијско бојење крио-исечака ткива панкреаса урађено је коришћењем *Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam)* и *Expose Rb specific HRP/AEC detection IHC Kit-a (Abcam)* према препорученом протоколу. Крио-исечци ткива панкреаса, дебљине 5 µm су отопљени на собној температури у трајању од 5 минута. У циљу пермеабилитације ткивних исечака, уроњени су у ледено хладан ацетон и инкубирани 5 минута на +4°C. Затим су испрани 3 пута по 5 минута урањањем плочица у PBS. На ткивне исечке је стављено 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block-a* и након инкубације 10 минута на собној температури, препарати су 2 пута испрани у PBS-у. Затим је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block-a* који је после 5 минута инкубације на собној температури испран једном у PBS-у. На ткивне исечке је апликовано 200 µl биотинисаног анти-мишјег F4/80 антитела (*Abcam*) (Табела 3) у концентрацији 1:200, претходно раствореног у PBS-у са 1% BSA.

ПРИМАРНА АНТИТЕЛА		ПРОИЗВОЂАЧ
<i>Rabbit polyclonal to CIASI / NALP3</i>	<i>Immunogen: 16 amino acid peptide from near the amino terminus of Human CIASI / NALP3 (GenBank accession no. NP_899632); Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to IL-1β</i>	<i>Immunogen: Highly pure (>98%) recombinant mL-1β (mouse Interleukin-1β)</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to RAGE</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide (C)WRKRQPR(R/L) EERKAPESQED(NH₂), corresponding to amino acids 362-380 of Rat RAGE WRKRQPR(R/L)EERKAPESQED; Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to AGE</i>	<i>Immunogen: Advanced Glycation End Products (BSA-AGE and HSA-AGE); Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Mouse monoclonal to Insulin+Proinsulin (D6C4) FITC conjugated</i>	<i>Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to TMS-1</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide, corresponding to internal sequence amino acids 1-40 of Human TMS1; Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to Caspase-1</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide from the second quarter of human Caspase 1 protein; Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to NFκB p65</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide conjugated to KLH derived from within residues 500 to the C-terminus of Human NFκB p65; Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Rabbit polyclonal to NFκB p65 (phospho S536)</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide conjugated to KLH, surrounding the phosphorylation site of serine 536 (F-S-S(p)-I-A) derived from Human NFκB p65 (NP_001138610.1); Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Mouse F4/80 Biotin Conjugate</i>	<i>Reacts with mouse antigen</i>	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>Rabbit polyclonal to Galectin-3</i>	<i>Immunogen: Synthetic peptide, corresponding to amino acids 161-200 of Human Galectin 3; Reacts with mouse antigen</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse</i>	<i>Reacts with mouse antigen; Clone AC-15</i>	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</i>

СЕКУНДАРНА АНТИТЕЛА	ПРОИЗВОЂАЧ
<i>Rabbit Specific HRP Conjugate + AEC Single Solution (Expose Rabbit Specific HRP-AEC detection IHC kit)</i>	<i>Abcam, Cambridge, UK</i>
<i>Goat Anti-Rb IgG (H+L), PE-Cy[®]5.5 Conjugated</i>	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>Peroxidase Labeled Anti-rabbit Antibody, part of "ECLTM Western Blotting Analysis System"; Component number NIF824</i>	<i>GE Healthcare, Buckinghamshire England</i>
<i>Mouse IgG, HRP-linked Whole Antibody, Sheep</i>	<i>GE Healthcare, Buckinghamshire England</i>

Табела 3. Антитела коришћена за имунофлуоресценцу, имунохистохемију и *Western blot*

Након инкубације антитела у влажној комори 1h на собној температури, препарати су 3 пута по 5 минута испирани у PBS-у. Затим је на ткивне исечке апликована *Streptavidin Peroxidase*-а која је инкубирана 10 минута на собној температури. Након испирања 3 пута по 5 минута у PBS-у, апликовано је 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20 μ l DAB *Chromogen*-а у 1 ml DAB *Substrate*-а. После истека 10 минута на собној температури, препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у.

У циљу двоструког имунохистохемијског бојења даљи поступак бојења је започет додавањем 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block*-а који је инкубиран 10 минута на собној температури. Након двоструког испирања у PBS-у у циљу блокирања неспецифичног бојења, исечци ткива су прекривени *Ultra V Block*-ом и инкубирани 10 минута на собној температури. Након испирања у PBS-у, апликовано је по 200 μ l зечјих анти-мишјих NLRP3, IL-1 β , AGE, RAGE и галектин-3 антитела (Abcam) за свако бојење (Табела 3). Примењена разблажења примарних антитела су била 1:200 за NLRP3, IL-1 β , AGE и галектин-3 и 1:400 за RAGE. Сва антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. После инкубације у влажној комори, 1h на собној температури,

антитела су 3 пута по 5 минута испирана у PBS-у. Уследила је апликација секундарног HRP коњугованог анти-зечјег антитела (*Rabbit Specific HRP Conjugate*) које је инкубирано 30 минута на собној температури. Након троструког испирања у PBS-у, ткивни исечци су прекривени субстратом AEC *Single Solution*. После троструког испирања у PBS-у, ткивни исечци су обојени хематоксилином у трајању од 2 минута и интензивно испрани текућом водом 3 пута. Обојени исечци су прекривени једном капи глицерола и покровном љуспицом. Након сушења у трајању од 48h, интензитет и дистрибуција бојења су анализирани под светлосним микроскопом (BX51, *Olympus*) (312).

3.9. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ПРОТЕИНА У ТКИВИМА *WESTERN BLOT* МЕТОДОМ

3.9.1. Припремање лизата ткива

Одређивање релативне количине протеина (ASC, NLRP3, прокаспаза-1, каспаза-1, NF-κB p65, NF-κB p65 (фосфо-S536)) урађено је *Western blot* методом према претходно описаном протоколу (313). Лизати ткива панкреаса су припремани у хладном раствору (62.5 mM *Tris*-HCl pH 6.8, 2% w/v *sodium dodecyl sulfate* (SDS), 10% глицерола и 50 mM дитиотреитола (DTT) у дестилованој води) који је непосредно пред употребу обогаћен инхибиторима протеаза (1 μg/ml аprotинина, 2 mM EDTA и 1 mM фенил-метил-сулфонил флуорида (PMSF)). У моменту започињања лизирања ћелија почињу и процеси као што су дефосфорилација, денатурација и протеолиза, који су успорени држањем узорака на леду. Лизати су кувани 5 минута на 100°C. Интензивним пипетирањем наставаком пипете је разбијена ослобођена DNA и смањена вискозност узорака. Након центрифугирања 20 минута на 20000 g на 4°C, супернатанти са раствореним протеинима су пребачени у нове мале конусне епрувете и чувани на -20°C накнадну анализу.

Висцерално масно ткиво хомогенизовано је уз помоћ 500 μ l раствора за изолацију RNA, DNA и протеина (*TRI Reagent[®] Solution, Applied Biosystems, CA, USA*). Узорци лизираних ћелија скупљени су у мале конусне епрувете, допуњени са по 100 μ l хлороформа, ресуспендовани и остављани 2 минута на собној температури. Након центрифугирања на 12000 g у трајању од 20 минута на 4°C у малим конусним епруветама су се јасно издвојила три слоја: горња водена фаза у којој се налазила RNA, интермедијарна фаза са DNA, и доња фаза у којој су протеини и липиди. Доња, фенолна фаза пребачена је у нове епрувете, а остатак је одбачен. Затим је урађена преципитација протеина додавањем 600 μ l ацетона по узорку. Након инкубације 10 минута на собној температури узорци су центрифугирани 10 минута на 12000 g на 4°C. Талог протеина је растворен у 1 ml 0.3 M гуанидин хидрохлорида (*Sigma Aldrich*) у 95% етанолу са 2.5% глицерола и сонификован 2 пута по 10 секунди. Након инкубације 10 минута на собној температури узорци су центрифугирани на 8000 g, 5 минута, на 4°C. Затим су уследила још 2 прања талог протеина истим раствором. Након тога талог протеина је опран додавањем 1 ml 95% етанола са 2.5% глицерола у трајању од 10 минута на собној температури и центрифугиран на 8000 g, 5 минута, на 4°C. Након одливања етанола, талог протеина је сушен 5 до 15 минута док није испарио сав етанол. Добијени узорци су финално растворени у 100 ml раствора за лизирање (62.5 mM *Tris*-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерола и 50 mM дитиотреитола (DTT) у дестилованој води), а узорци су чувани на -20 °C за даљу анализу.

3.9.2. Одређивање концентрације протеина методом по Лорију

Концентрација протеина у узорцима лизираних ткива мерена је методом по Лорију (314). По 20 μ l узорака разблажених 10 пута у дестилованој води је интензивно мешано (уз снажно вортексовање) са 300 μ l раствора 2 % Na₂CO₃ и 0.1 M NaOH, 1 % CuSO₄ x 5 H₂O и 2 % K-Na-гартарат у H₂O, помешаних у размери 98:1:1. Након инкубације од 15 минута на собној температури, узорцима је додавано по 60 μ l *Folin & Ciocalteu* реагенса (*Sigma Aldrich*) који је претходно 5 пута

разблажен у дестилованој води. Наредних 30 минута, колико је потребно за развијање плаве боје, узорци су инкубирани на собној температури уз повремено вортексовање. Апсорбанца узорака мерена је на 670 nm аутоматским читачем за микротитарске плоче. За конструисање стандардне криве, на основу које су одређиване концентрације протеина у узорцима, коришћен је раствор BSA (0.1-1 mg/ml) у дестилованој води.

3.9.3. Имуноблот

30 μ g протеина по узорку је у односу 4:1 помешано са стандардним пуфером за наливање на гел за електрофорезу (4x *Laemmli* пуфер: 1 M *Tris*-HCl pH 6.8, 20 % SDS, 0.2M β -меркаптоетанола, 0.004% бромфенол плавог, 20% глицерола). Након раздвајања електрофорезом на 12% или 15% SDS-полиакриламидном гелу, уследио је трансфер на поливинил дифлуоридну мембрану. За трансфер је коришћен полусуви систем за трансфер (*Fastblot B43, Biorad, Goettingen, Germany*) на 5 mA/cm². Неспецифично везивање антитела блокирано је 1h на собној температури са 5% BSA (Фракција V) у PBS-у са 0.1% *Tween*-20. Мембране су преко ноћи инкубиране на 4°C са антителима специфичним за CIAS1/NALP3 (NLRP3, 1:500), ASC (TMS1, 1:500), каспазу-1 (1:500), NF- κ B p65 (1:500), NF- κ B p65 (фосфо-S536) (1:500) (сва из *Abcam, Cambridge, UK*) и β -актин (Табела 3). Антитела су растворена у 1% BSA (Фракција V) у PBS-у са 0.1% *Tween*-20. Потом је уследила инкубација у трајању од 1h на собној температури са одговарајућим секундарним анти-зечјим или анти-мишјим IgG антителом коњугованим са пероксидазом рена (*GE Healthcare, Buckinghamshire, England*) у концентрацији 1:2500 (Табела 3). Везана антитела детектована су хемилуминесценцијом (*ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, England*). Количина протеина мерена је дензитометријски употребом програма *Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA)* и прерачуната у односу на количину β -актина.

3.10. КУЛТУРА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА

За верификацију активације NLRP3 инфлазома, каспаза-1 зависне продукције IL-1 β и експресије фосфорилисаног NF- κ B p65, перитонеалне ћелије су добијене из перитонеалног испирка са 5 ml хладног PBS-а. Након додавања по 5% FBS-а у сваку од суспензија, узорци су центрифугирани 5 минута на 1500 rpm. Након центрифугирања ћелије је ресуспендоване у комплетном медијуму (DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich*) са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пеницилина G и 100 μ g/ml стрептомицина) и постављене у културу у микротитар плочи са 96 бунарчића са равним дном (2×10^5 ћелија по бунарчићу) на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у инкубатору. Након претретирања липополисахаридом (LPS) у концентрацији 100 ng/ml у трајању од 4h, ћелије су стимулисане са BSA или палмитатом-BSA у финалној концентрацији 100 μ M, у присуству или одсуству 10 μ M каспаза-1 инхибитора (Z-YVAD-FMK, *Bachem AG, Bubendorf, Switzerland*), у трајању од 24h. За припремање раствора палмитат-BSA 200 mmol/l у етанолу је растворено у *Krebs Ringer Hepes* пуферу (*Sigma Aldrich*) са 20% BSA у размери 1:25. Добијена микстура је остављена на 37°C преко ноћи уз лагано мешање. Упоредо је припремљен и контролни медијум са етанолом и BSA. Након инкубације у супернатантима су одређивани IL-1 β и IL-6 ELISA методом. За испитивање експресије фосфорилисаног NF- κ B p65, ћелије су стимулисане LPS-ом (1 μ g/ml) и/или палмитатом (100 μ M) у трајању од 2h. Након инкубације експресија фосфорилисаног NF- κ B p65 и NLRP3 инфлазома у F4/80⁺ ћелијама су анализирани методом проточне цитометрије.

3.11. КОЛОРИМЕТРИЈСКИ ТЕСТ ОДРЕЂИВАЊА АКТИВНОСТИ КАСПАЗЕ-1

Ензимска активност каспазе-1 у стимулисаним перитонеалним ћелијама одређена је каспаза-1 колориметријским тестом према препорученом протоколу произвођача

(*Caspase-1 Colorimetric Assay, R&D Systems*). Принцип теста се заснива на додавању супстрата за каспазу-1 који је обележен хромофором р-нитроанилином (pNA) у претходно направљен лизат ћелија. Након ензимског разлагања супстрата ослобађа се pNA, а интензитет развијене боје се читава спектрофотометријски.

Ћелије су најпре центрифугиране 10 минута на 250 g. Супернатант је пажљиво одливен, а ћелије остале у пелету су лизирание додавањем пуфера за лизирање ћелија (енгл. *Lysis buffer*) у препорученом волумену од 25 μ l на 1×10^6 ћелија. Након инкубације на леду (+4°C) 10 минута, ћелијски лизат је центрифугиран 1 минут на 10000 g. Добијени супернатант је пребачен у нову епрувету и остављен на леду. Апроксимативна количина протеина у овако добијеном лизату је 2-4 mg/ml. Ензимска реакција одређивања активности каспазе-1 изведена је у микротитар плочи са 96 бунарчића са равним дном, адекватној за касније читавање абсорбанце. У свако бунарче је додато 50 μ l ћелијског лизата добијеног из 2×10^6 ћелија, односно 100-200 μ g протеина, као и 50 μ l 2X *Reaction buffer 1*. Пре коришћења 2X *Reaction buffer 1* је суплементован са 10 μ l/ml свеже припремљеног 1M DTT-a (*dithiothreitol*). У свако бунарче је додато по 5 μ l 4 mM каспаза-1 колориметријског супстрата (WEND-pNA, WEND супстрат коњугован са pNA). Плоча је икубирана 2 h на 37°C, а након тога је прочитана абсорбанца у ELISA читачу на 405 nm.

3.12. ИСКЉУЧИВАЊЕ ГЕНА ЗА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМ МЕТОДОМ ТРАНСФЕКЦИЈЕ siRNA

Искључивање (стављање ван функције) циљаног гена методом трансфекције siRNA (енгл. *small interfering RNA*) базирано је на открићу да дволанчана siRNA игра кључну улогу у регулацији експресије гена (315). Дволанчана siRNA супримира експресију гена на пост-транскрипционом нивоу. Ендогеним или егзогеним исецањем дугог ланца дволанчане RNA уз помоћ *RNase-like* ензима (званог *Dicer*), настају кратке дволанчане RNA са око 21 нуклеотидом. У следећем

кораку кодирајући ланац дволанчане RNA се уклања и ослобађа некодирајући ланац комплементаран циљаној информационој RNA (енгл. *messenger* RNA, mRNA). Некодирајући ланац се даље удружује са RNAi (енгл. *RNA interference*) ефекторским комплексом и формира се RISC (енгл. *RNA-induced silencing complex*). RISC садржи *Argonaute* ендонуклеазу и једноланчану siRNA. Комплементарни ланац siRNA интерферира са циљаном mRNA, ендонуклеаза исеца mRNA и зауставља се процес транслације протеина (315).

Метода искључивања циљаног гена за NLRP3 (*Cryopyrin*) инфламазом урађена је према препорученом протоколу произвођача *Cryopyrin* siRNA и пропратних хемикалија (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA*). Ћелије су добијене перитонеалним испирањем са 5 ml хладног PBS-а и након додавања 5% FBS-а, центрифугиране 5 минута на 1500 rpm. Након одливања супернатанта пелет је ресуспендован у ћелијском медијуму (DMEM) са 5% FBS-а без додатих антибиотика. У микротитар плочу са шест бунарчића је стављено по 1×10^6 ћелија, које су инкубирани на 37°C у присуству 5% CO₂, преко ноћи. Припремљени су раствори А и Б, према препорученом протоколу. За сваку од трансфекција, раствор А је добијен растварањем 8 µl siRNA *duplex* у 100 µl siRNA трансфекционог медијума. Раствор Б је за сваку од трансфекција добијен растварањем 8 µl siRNA трансфекционог реагенса у 100 µl siRNA трансфекционог медијума. Раствор А је пипетом директно додат у раствор Б и након благог мешања, остављен 45 минута на собној температури.

Ћелије су најпре опране у 2 ml трансфекционог медијума. Затим је у свако бунарче додато по 800 µl трансфекционог медијума заједно са предвиђеном мешавином раствора А и Б. Након благог мешања ћелије су инкубирани 6 h на 37°C у присуству 5% CO₂. По истој процедури, у експеримент је била укључена и негативна контрола, која је подразумевала примену контролне siRNA која садржи секвенцу нуклеотида која не интерферира ни са једном познатом mRNA. Сама

трансфекција siRNA у ћелије, детектована је FITC коњугованом контролном siRNA, методом проточне цитометрије.

После инкубације, трансфекциона мешавина је замењена комплетним медијумом, а ћелије су поново инкубиране 4h на 37°C у присуству 5% CO₂. Након завршене процедуре трансфекције, ћелије су претретиране LPS-ом у концентрацији 100 ng/ml 4h на 37°C у присуству 5% CO₂. После претретирања, ћелије су стимулисане палмитатом у концентрацији 100 μM, 18h на 37°C у присуству 5% CO₂. Након инкубације, у супернатантима је измерена концентрација продукованог IL-1β ELISA методом. Снижена експресија NLRP3 инфламазома у ћелијама из културе, после искључивања гена је верификована у односу на негативну и изотипску контролу, методом проточне цитометрије.

3.13. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

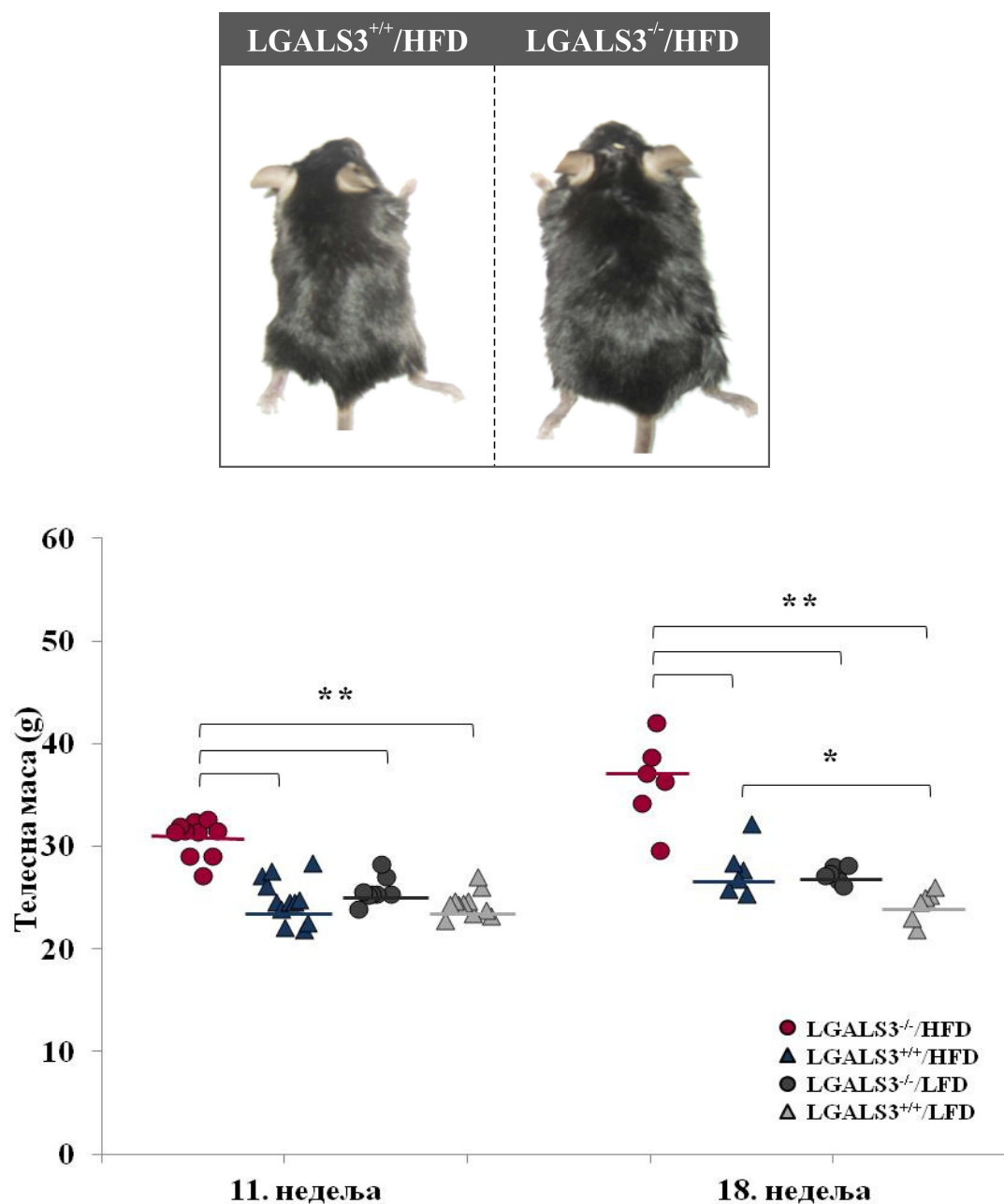
Све добијене вредности су презентоване као средња вредност ± стандардна грешка. За утврђивање статистичке значајности између група су коришћени тестови: анализа варијансе (ANOVA) и независни Т тест за параметарска обележја са нормалном расподелом, као и *Kruskal-Wallis* и *Mann-Whitney* тестови за параметарска обележја у којима није било нормалне расподеле. За тестирање зависности између појединих варијабли коришћен је тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање *Pearson*-овог коефицијента корелације. За обраду података коришћен је статистички пакет SPSS 13.0. Статистичка значајност је одређена на $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 УБРЗАВА НАСТАНАК ГОЈАЗНОСТИ У МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

У циљу испитивања утицаја галектина-3 на развој гојазности, LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишеви соја C57BL/6 су храњени дијетом са високим садржајем масти (60%) или контролном дијетом са ниским садржајем масти (3%) у трајању од 11 или 18 недеља. Експерименталне животиње су имале слободан приступ храни и води током трајања експеримента. Увећање телесне масе праћено је мерењем сваке друге недеље током експеримента. Након 11 недеља LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани богатој мастима су имали значајно увећање телесне масе у односу на LGALS3^{-/-} мишеве на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти (Фигура 1). После 18 недеља дијете са високим садржајем масти уочен је прогресивни пораст телесне масе код мишева оба генотипа, иако су LGALS3^{-/-} мишеви и даље имали статистички значајно већу телесну масу у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима (Фигура 1). Насупрот томе, измерена телесна маса LGALS3^{+/+} мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на исхрани са ниским процентом масти је била увећана 18. недеље од почетка специјалног режима исхране (Фигура 1).

Добијени резултати импликују да у одсуству галектина-3 настаје убрзан развој гојазности у мишева храњених дијетом богатом мастима. Овај резултат додатно потврђује чињеница да је статистички значајно већа телесна маса LGALS3^{-/-} у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти добијена већ у 3. недељи индукције болести ($26.,25 \pm 0.,66$ vs. $22.,19 \pm 0.,67$ g, $p=0.010$).

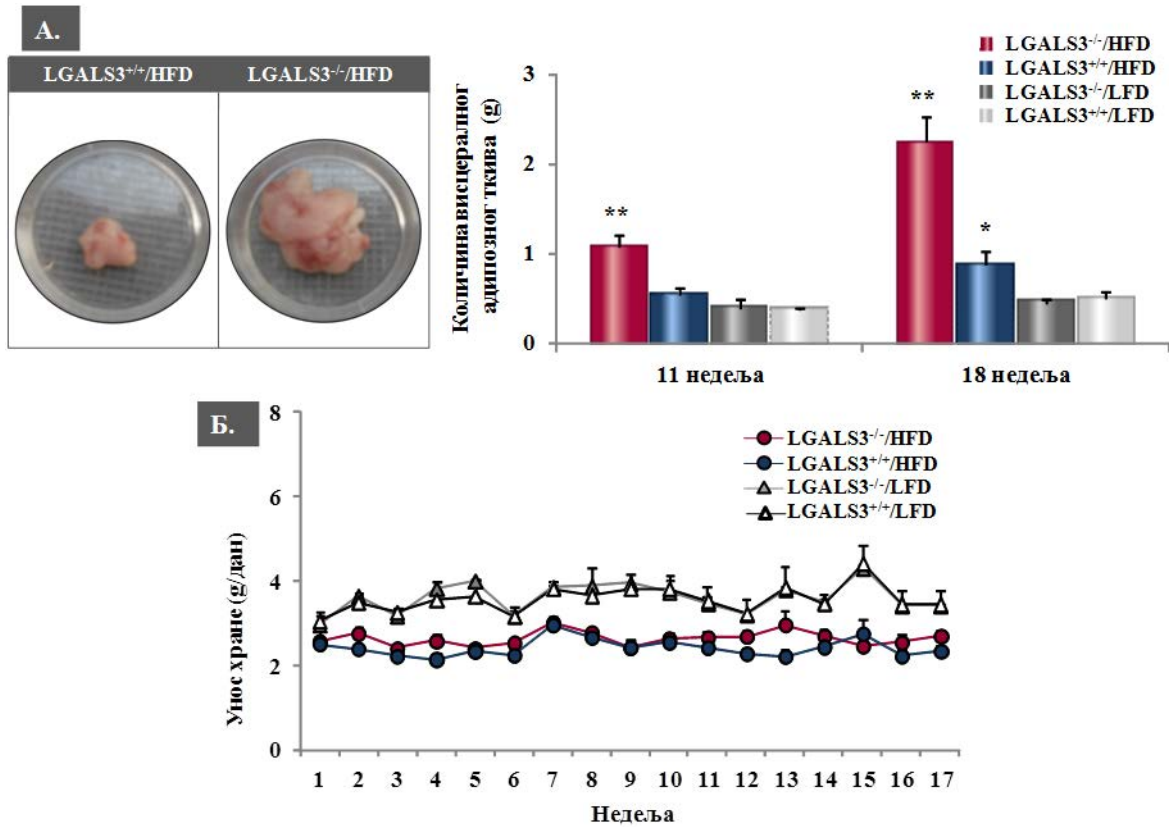


Фигура 1. Повећана телесна маса LGALS3^{-/-} мишева након 11, односно 18 недеља, на исхрани са високим садржајем масти. Телесна маса експерименталних животиња мерена је сваке друге недеље током трајања експеримента. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као појединачне вредности за сваког миша. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и мултиплом компарацијом између група. **p<0.001, *p<0.05

Гојазност је поремећај телесне композиције који се најпрецизније дефинише апсолутним увећањем количине, пре свега висцералног адипозног ткива у организму. У мишева висцерално адипозно ткиво је претежно локализовано у перигонадалним масним депоима. Након периода индукције болести, животиње су жртвоване и измерена је маса изолованог тоталног висцералног адипозног ткива из перитонеалне шупљине. Уочено је да је количина висцералног адипозног ткива у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти значајно већа у односу на LGALS3^{-/-} мишеве на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти након 11 или 18 недеља специјалног режима исхране (Фигура 2А). LGALS3^{+/+} мишеви на дијети са високим садржајем масти су имали повећану количину висцералног адипозног ткива у односу на групу LGALS3^{+/+} мишева на контролној дијети након 18 недеља индукције болести (Фигура 2А). У исто време, просечна количина унете хране недељно, мерена током трајања целог експеримента, се није значајно разликовала између два генотипа мишева на истој врсти исхране (Фигура 2Б).

4.2. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 РЕМЕТИ ГЛИКОРЕГУЛАЦИЈУ И УБРЗАВА НАСТАНАК ТИП 2 *DIABETES MELLITUS*-А У МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Са патофизиолошког становишта, у основи патогенезе тип 2 *Diabetes mellitus*-а су три основна поремећаја: резистенција на инсулин у периферним ткивима, пре свега у масном ткиву, мишићима и јетри, поремећај секреције инсулина у панкреасним острвцима и повећана глуконеогенеза у јетри. Током трајања индукције болести праћени су параметри гликорегулације и то: гликемија наше након четворочасовног гладовања сваке друге недеље, као и концентрација инсулина наше и проценат гликозилираног хемоглобина након жртвовања мишева после 11 и 18 недеља специјалног режима исхране.



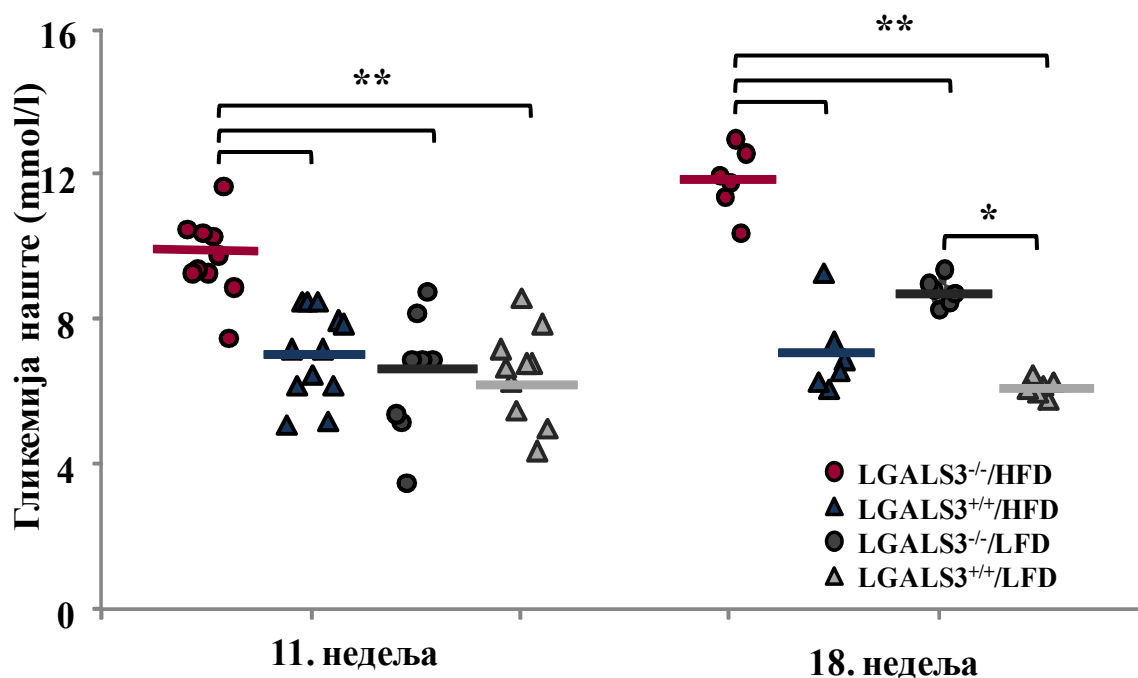
Фигура 2. Повећана количина висцералног адипозног ткива у $LGALS3^{-/-}$ мишева након 11, односно 18 недеља на исхрани богатој мастима. **2A.** Тотално висцерално адипозно ткиво изоловано је из перитонеалне шупљине експерименталних животиња након жртвовања 11., односно 18. недеље експеримента. $LGALS3^{-/-}$ мишеви на исхрани богатој мастима имају статистички значајно више висцералног адипозног ткива у односу на све остале експерименталне групе 11. и 18. недеље индукције болести (** $p < 0.001$). Статистички значајно већа количина висцералног адипозног ткива $LGALS3^{+/+}$ мишева на исхрани богатој мастима у односу на $LGALS3^{+/+}$ мишеве на исхрани са ниским процентом масти запажа се 18. недеље индукције болести (* $p < 0.05$). **2B.** Количина унете хране дневно (изражена у g/дан) мерена је сваке недеље током трајања експеримента за сваког миша појединачно. Резултати показују да није било статистички значајне разлике у количини унете хране дневно између два генотипа мишева на истој врсти исхране. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и мултиплом компарацијом између група.

LGALS3^{-/-} мишеви који су развили гојазност су имали значајно повећане вредности гликемије у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти, као и у поређењу са контролним групама животиња оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти после 11 и 18 недеља трајања експеримента (Графикон 1). Интересантно је запажање да је измерена вредност гликемије наше била статистички значајно већа у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на одговарајуће LGALS3^{+/+} мишеве, већ у 3. недељи индукције болести (8.92 ± 0.47 vs. 6.82 ± 0.31 mmol/L, $p=0.004$). Важну улогу галектина-3 у процесу очувања хомеостазе гликорегулације додатно потврђује чињеница да је након 18 недеља специјалног режима исхране вредност гликемије наше у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са ниским садржајем масти била значајно већа у односу на контролну групу LGALS3^{+/+} мишева (Графикон 1).

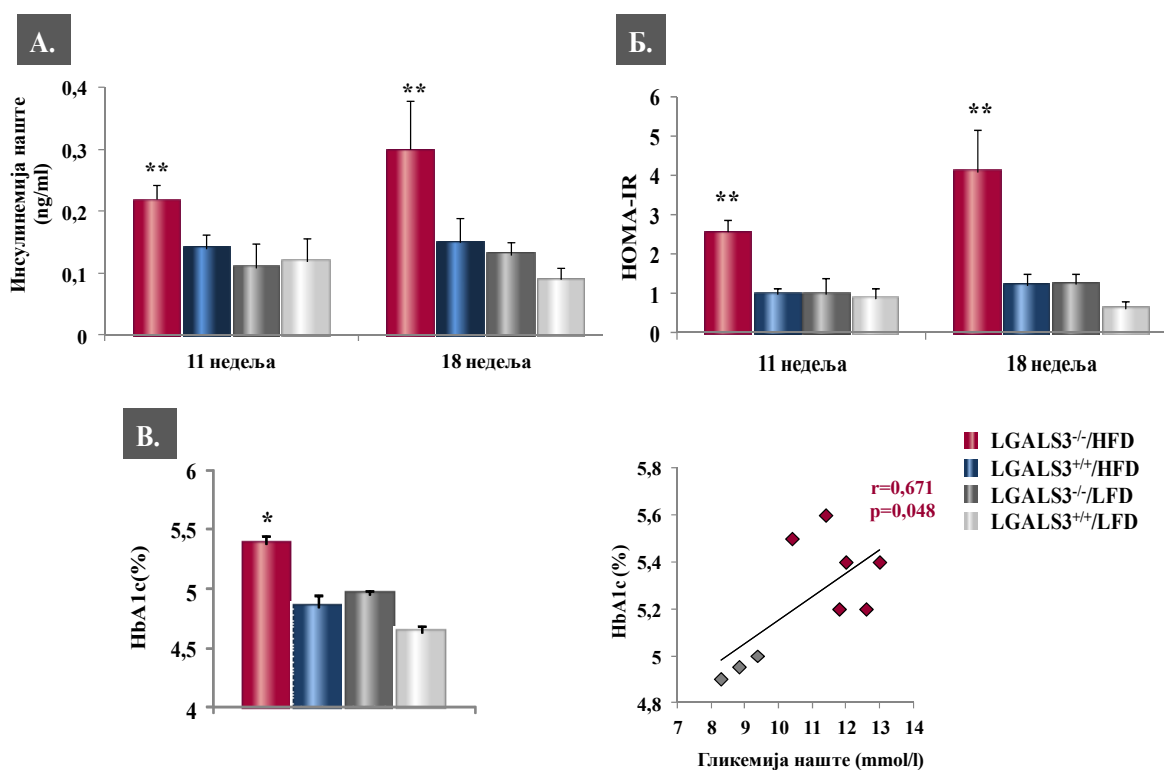
Константно присуство инсулинске резистенције у патогенези тип 2 *Diabetes mellitus*-а компензаторно је праћено повећаном секрецијом инсулина и појавом хиперинсулинемије, која траје до момента исцрпљивања капацитета β ћелија панкреасних острваца и коначног смањења критичне масе секреторних ћелија.

LGALS3^{-/-} мишеви који су развили гојазност су имали значајно повећане вредности инсулина наше у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти, као и у поређењу са контролним групама животиња оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти након 11 и 18 недеља трајања индукције болести (Графикон 2А). Додатно, вредности НОМА-IR индекса су показале изражен степен инсулинске резистенције у LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3^{-/-} мишеве на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти, после 11 и 18 недеља специјалног режима исхране (Графикон 2Б). HbA1c или гликозиловани хемоглобин је фракција хемоглобина која настаје не-ензимском гликозилацијом хемоглобина изложеног одговарајућим концентрацијама глукозе у крви, чије вредности пропорционално расту са порастом просечних вредности гликемије.

Након 11 недеља специјалног режима исхране, вредност HbA1c је била знатно повећана у групи LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишове на дијети са високим или ниским садржајем масти (Графикон 2B). Додатно је уочено да HbA1c позитивно корелира са измереним вредностима гликемије наште у LGALS3^{-/-} мишева независно од врсте дијете (Графикон 2B).



Графикон 1. Повећан ниво гликемије наште у LGALS3^{-/-} мишева након 11 и 18 недеља на исхрани богатој мастима. Гликемија наште мерена је после 4 h-овног гладовања из пуне крви добијене пункцијом репне вене, сваке друге недеље трајања експеримента. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као појединачне вредности за сваког миша. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и мултиплом компарацијом између група. **p<0.001, *p<0.05



Графикон 2. LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани богатој мастима развијају инсулинску резистенцију након 11 и 18 недеља специјалног режима исхране. **2А.** Концентрација инсулина измерена је у серуму мишева ELISA методом. Резултати показују статистички значајно већу инсулинемију наше у LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на све остале експерименталне групе (** $p<0.001$). **2Б.** На основу измерених вредности гликемије и инсулинемије наше израчунат коефицијент инсулинске резистенције (HOMA-IR). Значајно веће вредности HOMA-IR у групи LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на све остале експерименталне групе (** $p<0.001$). **2В.** Спектрофотометријски је одређена вредност HbA1c у серуму 11. недеље индукције болести. LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани богатој мастима имају значајно веће вредности HbA1c у поређењу са осталим експерименталним групама. Вредност HbA1c позивно корелира са гликемијом наше у LGALS3^{-/-} мишева (r-Pearson-ов коефицијент корелације). Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и мултиплом компарацијом између група.

4.3. ПОВЕЋАН СИСТЕМСКИ НИВО МОКРАЋНЕ КИСЕЛИНЕ У LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ДИЈЕТИ БОГАТОЈ МАСТИМА

После 11 недеља специјалног режима исхране анализиран је липидни статус експерименталних животиња одређивањем концентрације триглицерида, холестерола и мокраћне киселине у серуму. Очекивано, добијени подаци су показали да мишеви на дијети богатој мастима имају значајно већи системски ниво холестерола независно од генотипских разлика. У исто време није било статистички значајне разлике у концентрацији триглицерида у серуму између група. Према најновијим истраживањима, повишени нивои мокраћне киселине у серуму (хиперурикемија) позитивно корелирају са настанком инсулинске резистенције и имају предиктивну улогу у настанку тип 2 *Diabetes mellitus*-а. У контексту ових резултата, показано је да је ниво мокраћне киселине у серуму LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима значајно већи од нивоа измереног у серуму LGALS3^{+/+} мишева на истој врсти исхране (Табела 4).

	LGALS3 ^{-/-} /HFD	LGALS3 ^{+/+} /HFD	LGALS3 ^{-/-} /LFD	LGALS3 ^{+/+} /LFD
ТРИГЛИЦЕРИДИ	2.88 ± 0.48	2.76 ± 0.22	2.59 ± 0.51	2.18 ± 0.16
ХОЛЕСТЕРОЛ	5.37 ± 0.55*	4.37 ± 0.24*	2.49 ± 0.36	1.99 ± 0.20
МОКРАЋНА КИСЕЛИНА	518.60 ± 47.59*	269.40 ± 18.46	403.25 ± 55.70	387.17 ± 42.97

Табела 4. Повећана концентрација холестерола у серуму мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на дијети са ниским садржајем масти (*p<0.05). Повећана концентрација мокраћне киселине у серуму LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети богатој мастима (*p<0.05). Измерене вредности су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и независним Т тестом.

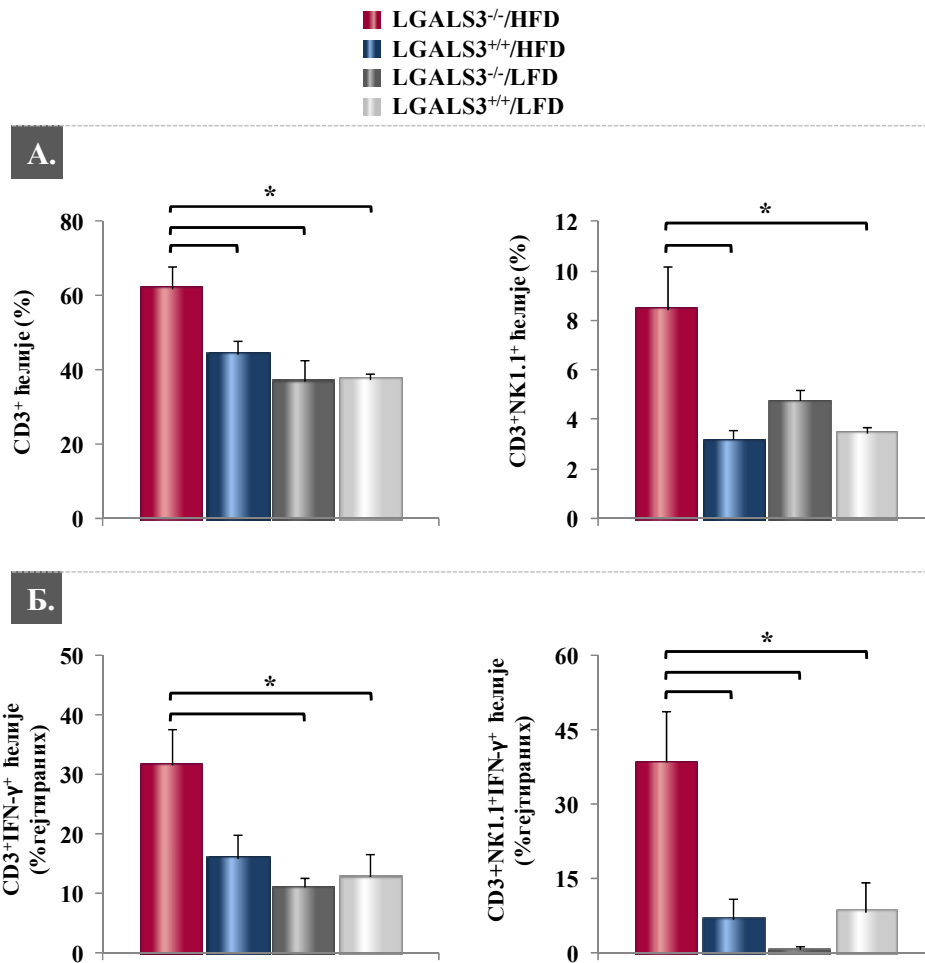
4.4. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА ТИП 1 Т И NKT И СНИЖЕНА ЗАСТУПЉЕНОСТ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Присуство и природа инфламације у висцералном адипозном ткиву експерименталних животиња испитани су анализом фенотипских карактеристика изолованих ћелија стромалне васкуларне фракције методом проточне цитометрије. После 11 недеља специјалног режима исхране запажена је значајно повећана инфилтрација CD3⁺ Т у висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{-/-} мишеве на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти (Графикон 3А). Заступљеност CD3⁺NK1.1⁺ NKT лимфоцита је била значајно већа у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти (Графикон 3А).

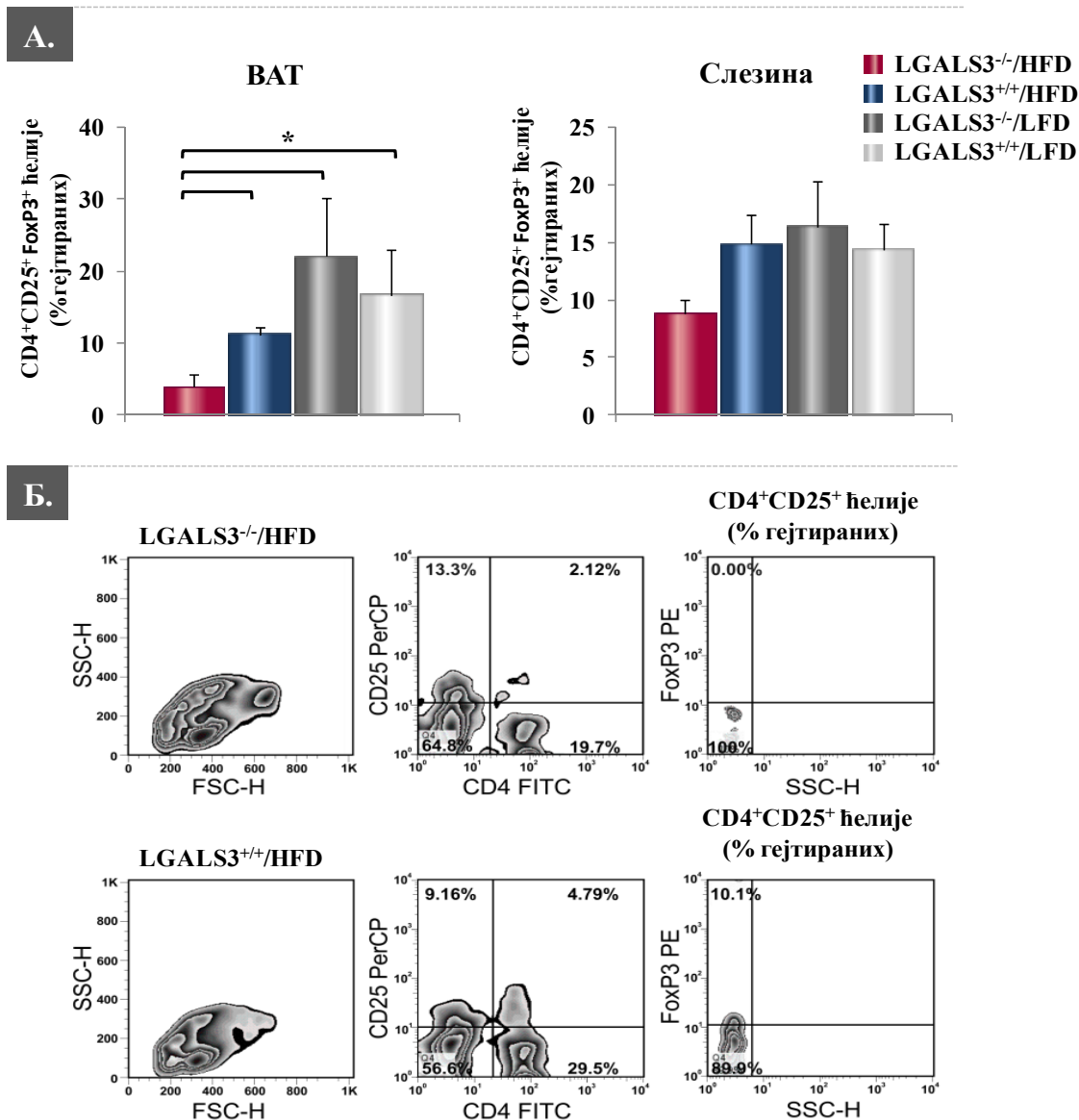
Испитивањем функционалних карактеристика ових ћелија уочено је да доминантно продукују IFN- γ (Графикон 3Б). Тако је проценат селекованих CD3⁺ Т који експримирају IFN- γ био значајно већи у гојазних LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са мишевима оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти (Графикон 3Б). Такође је уочено да је проценат IFN- γ продукујућих CD3⁺NK1.1⁺ NKT лимфоцита значајно већи у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и LGALS3^{+/+} мишевима на обе врсте исхране (Графикон 3Б).

У исто време, процентуална заступљеност CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т регулаторних лимфоцита је била значајно нижа у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и LGALS3^{+/+} мишевима на обе врсте исхране (Фигура 3А). Иако није било јасне статистичке значајности, сличан тренд је

уочен и у слезини (LGALS3^{-/-}/HFD vs. LGALS3^{+/+}/HFD, p=0.071) (Фигура 3А). Снижена заступљеност регулаторних Т лимфоцита у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева на дијети са високим садржајем масти је приказана и репрезентативним дотпловима (Фигура 3Б).

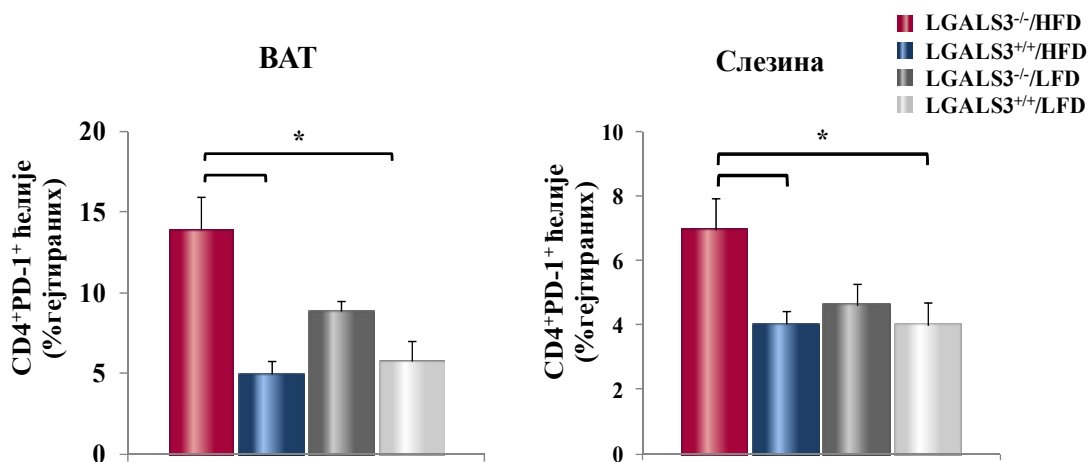


Графикон 3. Повећана заступљеност тип 1 Т и NKT ћелија у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. Мононуклеарне ћелије изоловане из ВАТ-а 11. недеље експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-NK1.1 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IFN-γ антитело. Приказана је процентуална заступљеност ћелија у мононуклеарном инфилтрату. Измерене вредности су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и независним Т тестом (*p<0.05).



Фигура 3. Снижена процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита у висцералном адипозном ткиву (BAT) LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. **3А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из висцералног адипозног ткива и слезине су анализирани методом проточне цитометрије. За фенотипизацију регулаторних Т лимфоцита коришћена су анти-CD4, анти-CD25 и анти-FoxP3 антитела. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и независним Т тестом (*p<0.05). **3Б.** Репрезентативни плотови приказују процентуалну заступљеност регулаторних Т лимфоцита у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева на дијети са високим садржајем масти.

Анализа експресије PD-1 (енгл. *programmed cell death protein-1*) маркера активације Т лимфоцита показала је значајно повећану заступљеност CD4⁺PD-1⁺ лимфоцита у висцералном адипозном ткиву и слезини гојазних LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на обе врсте исхране (Графикон 4).



Графикон 4. Повећана процентуална заступљеност CD4⁺ Т лимфоцита који експримирају маркер активације PD-1 у висцералном адипозном ткиву (BAT) и слезини LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. Мононуклеарне ћелије изоловане из висцералног адипозног ткива и слезине су анализирани методом проточне цитометрије. За фенотипизацију ћелија коришћена су мембранска анти-CD4 и анти-PD-1 антитела. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и независним Т тестом (*p<0.05).

4.5. ПОВЕЋАНА ЗАСТУПЉЕНОСТ M1 И СНИЖЕНА ЗАСТУПЉЕНОСТ M2 МАКРОФАГА У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

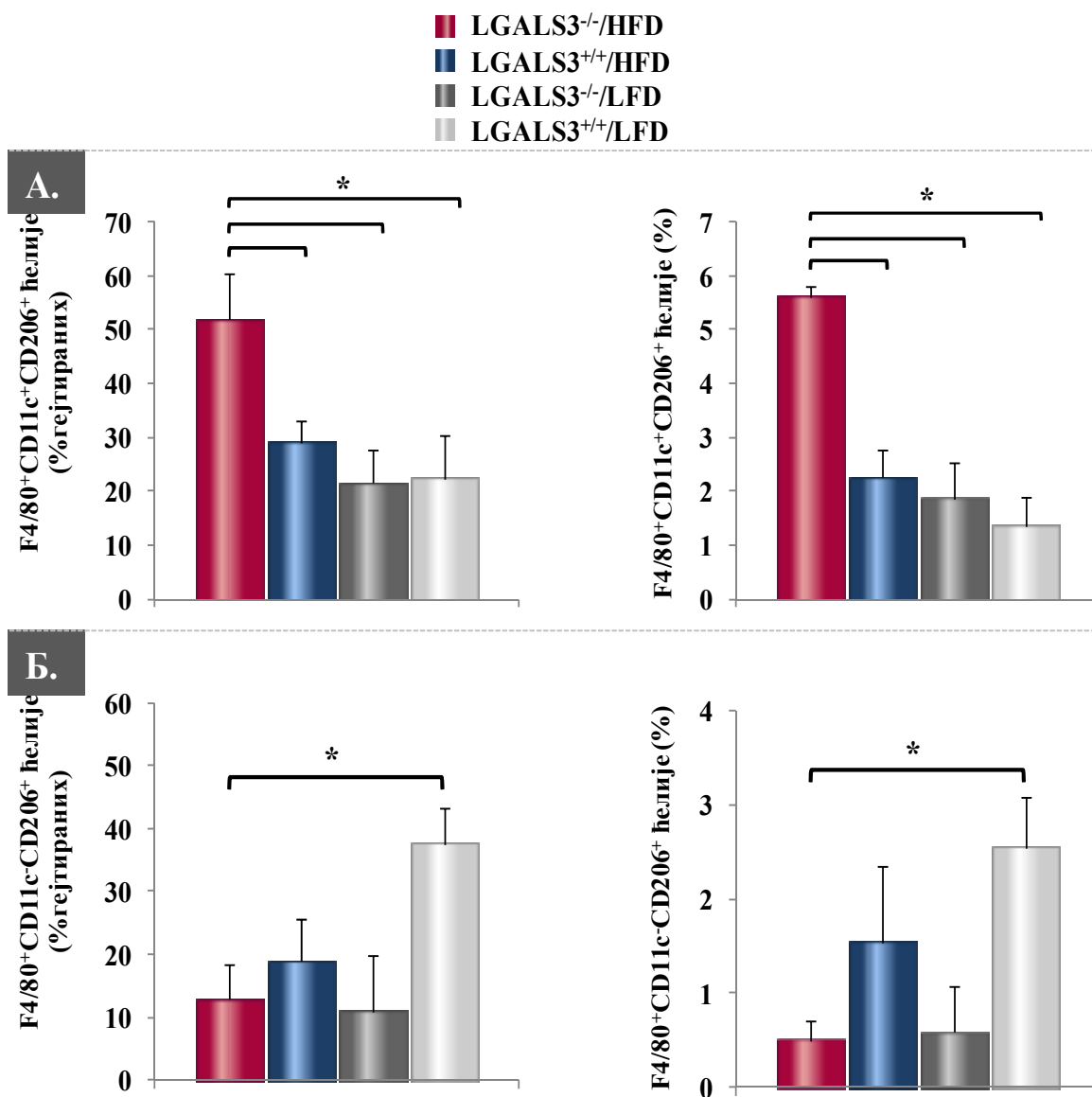
У циљу даљег испитивања потенцијалног механизма поремећаја метаболизма глукозе након 11 недеља индукције болести, методом проточне цитометрије у висцералном адипозном ткиву је анализирана инфилтрација и доминантни фенотип макрофага. Процентуална заступљеност M1 макрофага, дефинисаних као F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺ ћелије, је била значајно већа у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са

високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим и ниским садржајем масти (Графикон 5А). Додатно, уочено је да дијета са високим садржајем масти значајно утиче на инфилтрацију F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ дендритских ћелија пореклом из костне сржи (енгл. *bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) у слезини мишева оба генотипа. Након 18 недеља специјалног режима исхране, заступљеност BMDCs у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева је достигла статистички значајно већи проценат у односу на LGALS3^{+/+} мишеве (72.63 ± 3.91 vs. 38.04 ± 10.54, p=0.006).

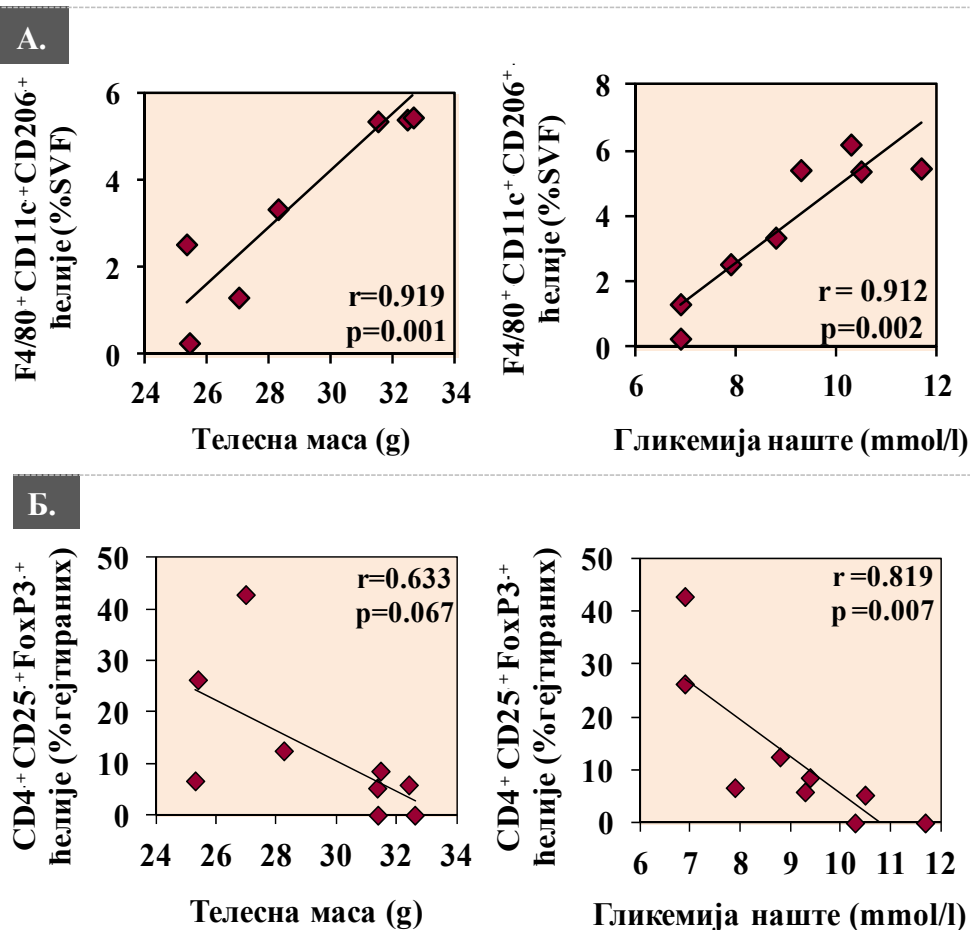
Насупрот томе, након 11 недеља специјалног режима исхране, процентуална заступљеност алтернативно активираних M2 макрофага, фенотипа дефинисаног као F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺, била је значајно редукована у висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са ниским садржајем масти (Графикон 5Б).

4.6. ТЕЛЕСНА МАСА И ГЛИКЕМИЈА ПОЗИТИВНО КОРЕЛИРАЈУ СА ПРОЦЕНТОМ M1 МАКРОФАГА И НЕГАТИВНО СА ПРОЦЕНТОМ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА У LGALS3^{-/-} МИШЕВА

У циљу испитивања повезаности између степена инфилтрације и фенотипа изолованих мононуклеарних ћелија из висцералног адипозног ткива и метаболичких параметара развоја гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а, методом линеарне регресије и одређивањем Pearson-овог коефицијента корелације утврђена је позитивна корелација између степена инфилтрације проинфламаторних макрофага (F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺) и телесне масе и гликемије наше у LGALS3^{-/-} мишева (Графикон 6А). Са друге стране, процентуална заступљеност регулаторних Т лимфоцита (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) је негативно корелирала са измереном телесном масом и гликемијом наше у LGALS3^{-/-} мишева независно од врсте дијете (Графикон 6Б). Корелација између поменутих параметара у LGALS3^{+/+} мишева није постојала.



Графикон 5. Повећана заступљеност проинфламаторних M1 и снижена заступљеност антиинфламаторних M2 макрофага у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. Мононуклеарне ћелије изоловане из ВАТ-а 11. недеље експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени мембранским анти-F4/80, анти-CD11c и анти-CD206 антителима. Приказана је процентуална заступљеност ћелија у мононуклеарном инфилтрату. Измерене вредности су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је одређена ANOVA тестом и независним T тестом (*p<0.05).

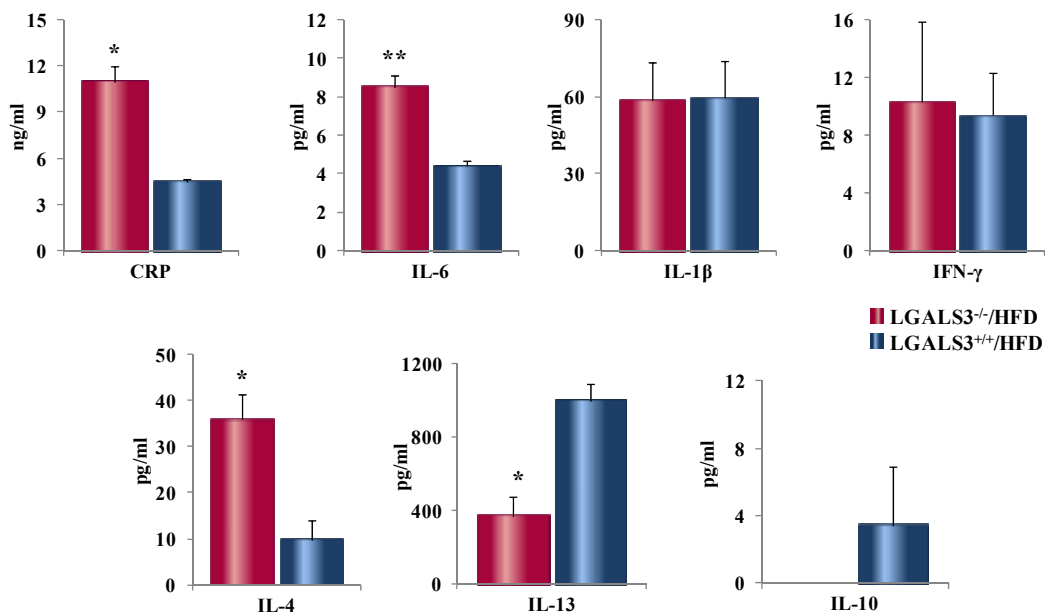


Графикон 6. Телесна маса и гликемија позитивно корелирају са процентом M1 макрофага и негативно са процентом регулаторних T лимфоцита у LGALS3^{-/-} мишева. Међусобна повезаност између испитиваних варијабли утврђена је линеарном логистичком регресијом. Корелација је испитана одређивањем Pearson-овог коефицијента корелације (r).

4.7. ПОВЕЋАНА КОНЦЕНТРАЦИЈА ПРО-ИНФЛАМАТОРНИХ И СНИЖЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈА АНТИ-ИНФЛАМАТОРНИХ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Параметри системске инфламације експерименталних животиња испитивани су мерењем концентрације маркера инфламације, укључујући ниво про-

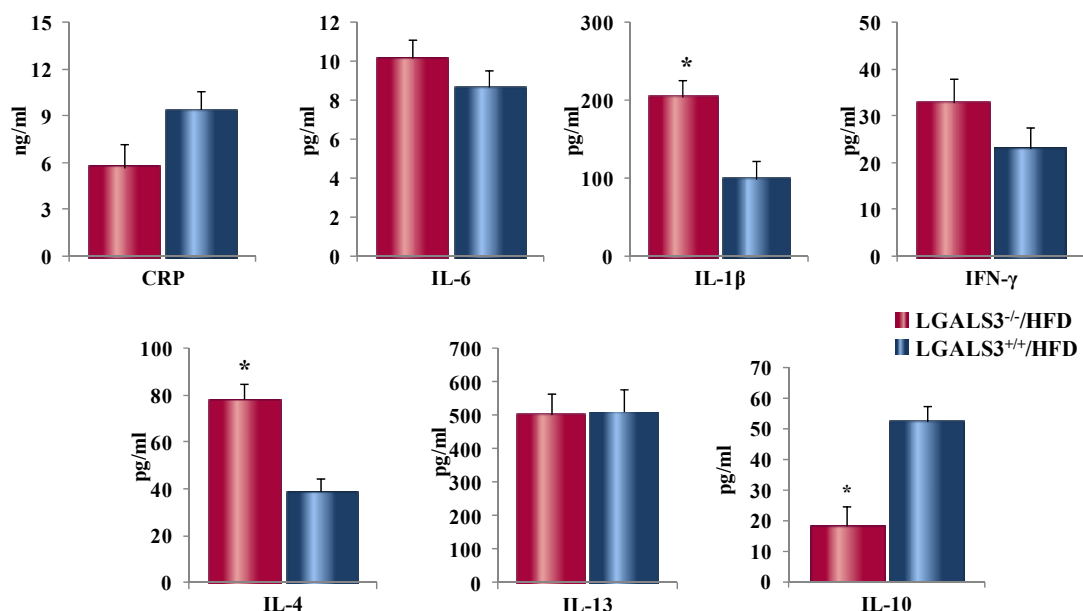
инфламаторних и анти-инфламаторних цитокина у серуму након 11 и 18 недеља специјалног режима исхране. После 11 недеља дијете са високим садржајем масти уочене су значајно повећане концентрације CRP-а, IL-6 и IL-4 у серуму LGALS3^{-/-} у односу на LGALS3^{+/+} мишеве. Насупрот томе, ниво анти-инфламаторних цитокина као што су IL-13 и IL-10 је био значајно нижи у LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти. У овом тренутку мерења нису уочене статистички значајне разлике у концентрацији IL-1β и IFN-γ између два генотипа животиња на дијети са високим садржајем масти (Графикон 7).



Графикон 7. Маркери инфламације у серуму LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева након 11 недеља дијете са високим садржајем масти. Концентрације CRP-а и цитокина мерене су у серуму експерименталних животиња ELISA методом. Добијене вредности су представљене као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (*p<0.05, **p<0.001).

Након 18 недеља уочен је значајан пораст концентрације IL-1β у гојазних LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти. Концентрација IL-4 остала је повећана у LGALS3^{-/-} мишева, док је концентрација IL-10 и даље била значајно нижа у односу на LGALS3^{+/+} контролу. У исто време, серумски нивои CRP-а, IL-6, IFN-γ и IL-13 се нису значајно разликовали

између LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева после 18 недеља дијете са високим садржајем масти (Графикон 8).



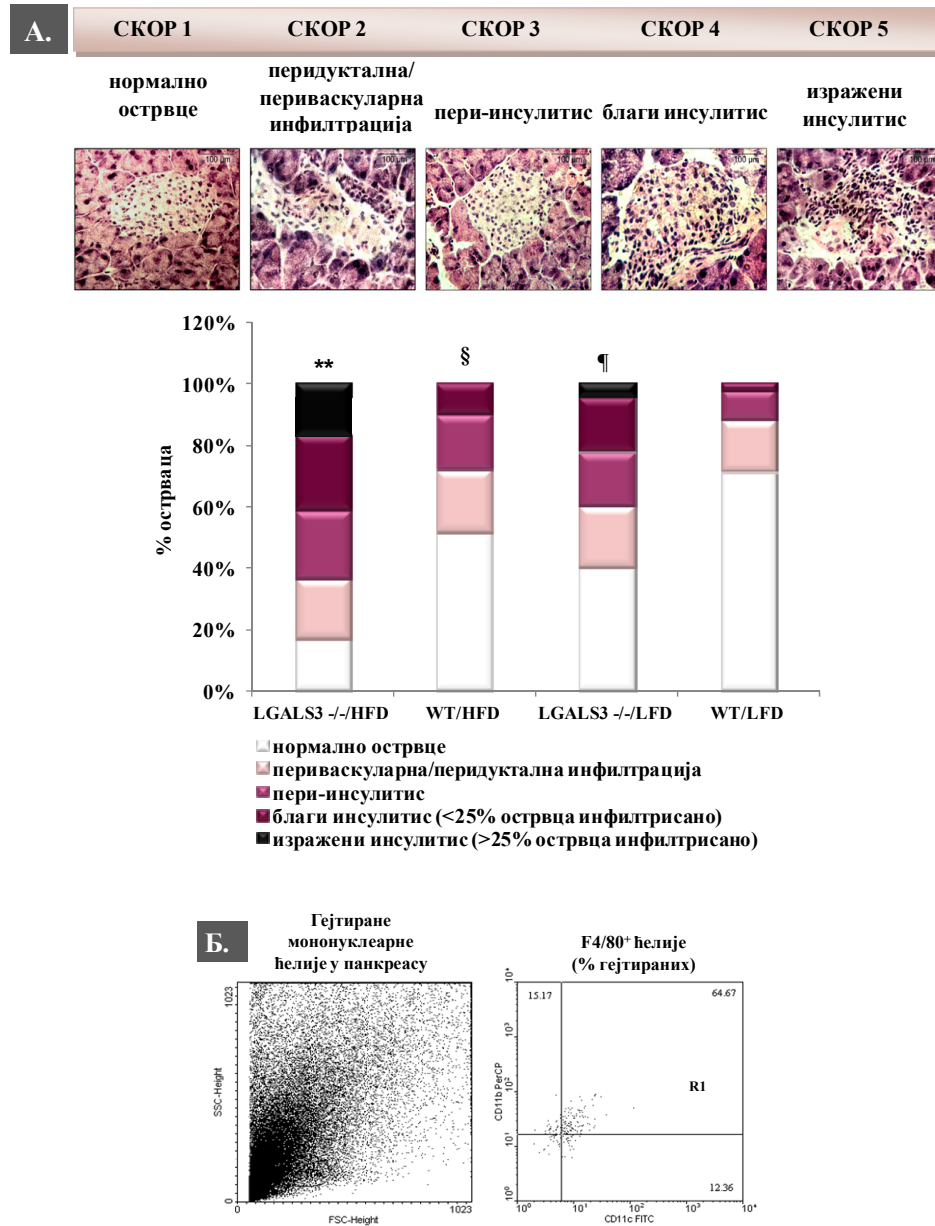
Графикон 8. Маркери инфламације у серуму LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева након 18 недеља дијете са високим садржајем масти. Концентрације CRP-а и цитокина мерене су у серуму експерименталних животиња ELISA методом. Добијене вредности су представљене као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (*p<0.05).

4.8. ИСХРАНА БОГАТА МАСТИМА ИНДУКУЈЕ ИЗРАЖЕНУ ИНФИЛТРАЦИЈУ МОНОНУКЛЕАРА У ПАНКРЕАСНА ОСТРВЦА LGALS3^{-/-} МИШЕВА

Праћењем метаболичких параметара индукције гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а уочено је да LGALS3^{-/-} мишеви развијају хипергликемију у периоду од 11 недеља на исхрани богатој мастима. У складу са овим налазом, хистолошком анализом испитани су степен и дистрибуција инфилтрисаних мононуклеара у панкреасна острвца експерименталних животиња (Фигура 4А). Степен мононуклеарне инфилтрације подељен је у пет скорова и то: скор 1=без

инфилтрације; скор 2=периваскуларна/перидуктална инфилтрација, скор 3=периинсулитис, скор 4= благи инсулитис (мање од 25% острвца захваћено инфилтратом) и скор 5=изражен инсулитис (више од 25% острвца захваћено инфилтратом). Хистолошка анализа је показала да је проценат острваца са израженим инсулитисом (17%), као и оних са благим инсулитисом (24%) значајно већи у групи LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на истој врсти дијете (0% односно 10%). Насупрот томе, проценат интактних острваца, као и острваца са периваскуларним/перидукталним инфилтратом и периинсулитисом је значајно редукован у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти (58%) у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти (89%). У сагласности са налазом да LGALS3^{-/-} мишеви чак и на контролној дијети развијају хипергликемију након 18 недеља праћења, запажена је значајно већа заступљеност острваца са израженим инсулитисом (5%), односно острваца са благим инсулитисом (17%) код ових животиња у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на контролној дијети (0% односно 2%). Ипак, да дијета са високим садржајем масти индукује инфилтрацију панкреасних острваца мононуклеарним ћелијама, показује и налаз да је проценат острваца са благим инсулитисом био је значајно већи у групи LGALS3^{+/+} мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са ниским садржајем масти.

Анализа фенотипа мононуклеарних ћелија изолованих из ткива панкреаса LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти је показала да доминантно испољавају фенотип F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ ћелија описаних као дендритске ћелије пореклом из костне сржи (енгл. *bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) (Фигура 4Б). У осталим експерименталним групама није регистрован значајан број мононуклеарних ћелија у једноћелијској суспензији добијеној ензимском дигестијом ткива панкреаса.



Фигура 4. Изражена инфилтрација монолеара у панкреасна острвца LGALS3^{-/-} мишева. 4A Репрезентативне слике панкреасних острваца различитих скорова бојених хематоксилином и еозином. Према унапред утврђеним критеријумима степен мононуклеарног инфилтрата је квантификован. Процент острваца одговарајућег скорa у односу на укупан број прегледаних острваца је приказан графички. Статистичка значајност је утврђена независним Т тестом, при вредности ** $p < 0.001$, ¶ $p < 0.05$ и § $p < 0.05$. **4Б.** Репрезентативни дотплотови приказују проценат заступљених F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ ћелија изолованих из пулованог ткива панкреаса у групи LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високом садржајем масти.

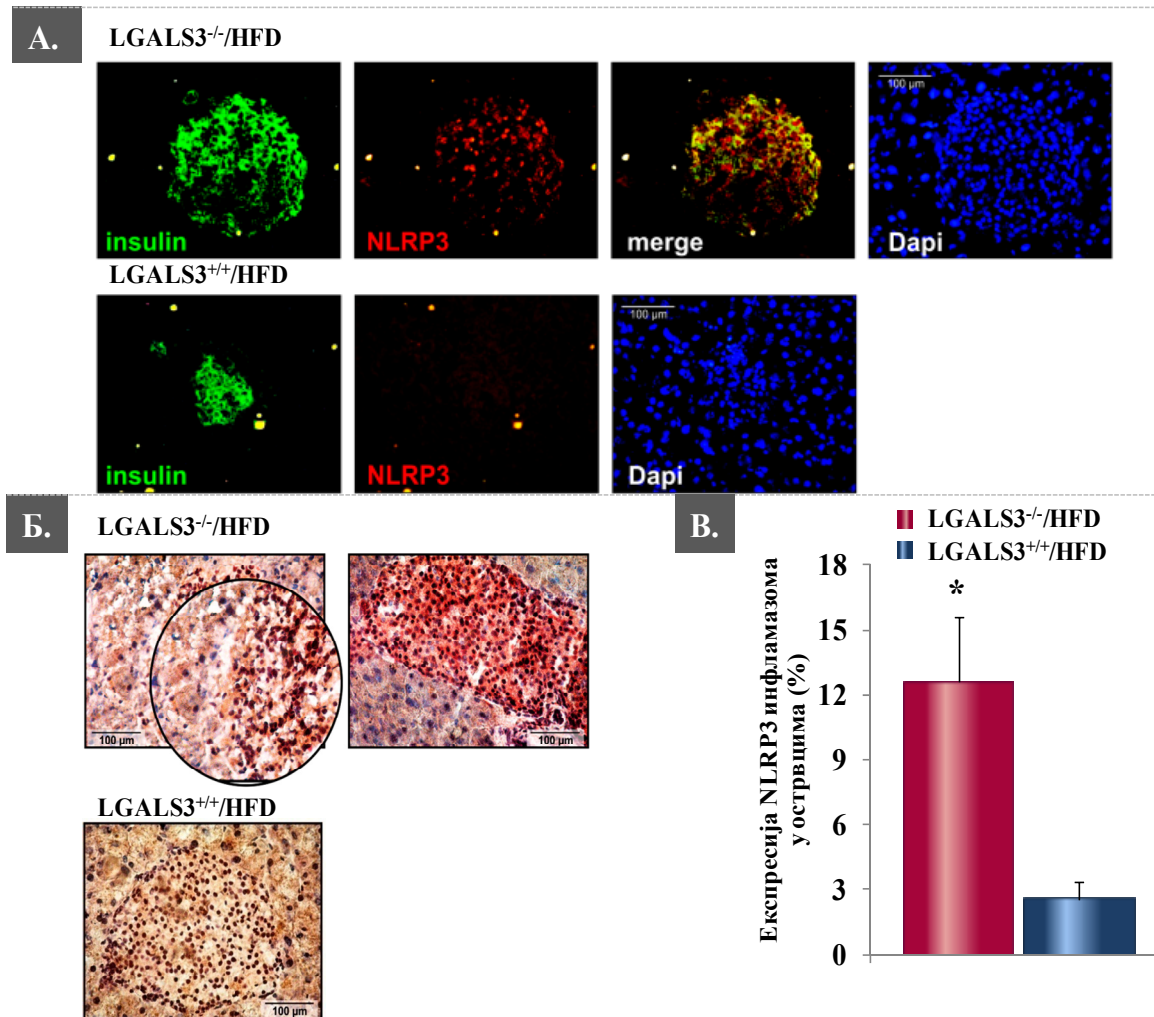
4.9. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА МАКРОФАГА И ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

У складу са претходно добијеним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију моноклеарних ћелија у панкреасна острвца LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима, у даљем току истраживања испитан је фенотип инфилтришућих ћелија и могући механизам настанка инфламације.

Крио-исечци ткива панкреаса LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева на дијети са високим садржајем масти су испитани техником имунофлуоресценце и то двоструким бојењем на инсулин (FITC) и NLRP3 инфламазом (PE). Резултати указују да је експресија NLRP3 инфламазома значајно већа у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти (Фигура 5А).

Двоструким имунохистохемијским бојењем је показано да је моноклеарни инфилтрат у панкреасна острвца ових животиња доминантно макрофагни (F4/80⁺ ћелије визуелизоване DAB-ом) уз колокализацију експресије NLRP3 инфламазома (везуелизован АЕС-ом) (Фигура 5Б). За разлику од LGALS3^{-/-} у групи LGALS3^{+/+} мишева на исхрани богатој мастима није уочена инфилтрација макрофага у панкреасна острвца.

Након квантификације позитивног бојења, добијени резултати су показали да је експресија NLRP3 била статистички значајно већа у групи LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3^{+/+} мишове на истој врсти дијете (Фигура 5В).



Фигура 5. Повећана експресија NLRP3 инфламазома и инфилтрација макрофага у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. 5А. Крио-исечци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC коњугованим анти-инсулинском антителом и PE коњугованим анти-NLRP3 антителом. Једра ћелија визуализована су применом DAPI mounting медијума. На графикону су приказане репрезентативне слике имунофлуоресценце (FITC, PE, DAPI и спојене све три боје (енгл. *merge*). **5Б.** Имунохистохемијским бојењем показана је инфилтрација F4/80⁺ ћелија (DAB) са колокализацијом експресије NLRP3 инфламазома (AEC). **5В.** Према унапред утврђеним критеријумима квантификована је експресија NLRP3 инфламазома. Приказана је средња вредност процентуалне експресије NLRP3 инфламазома у односу на површину сваког од прегледаних острваца. Статистичка значајност је утврђена независним Т тестом, при вредности * $p < 0.05$.

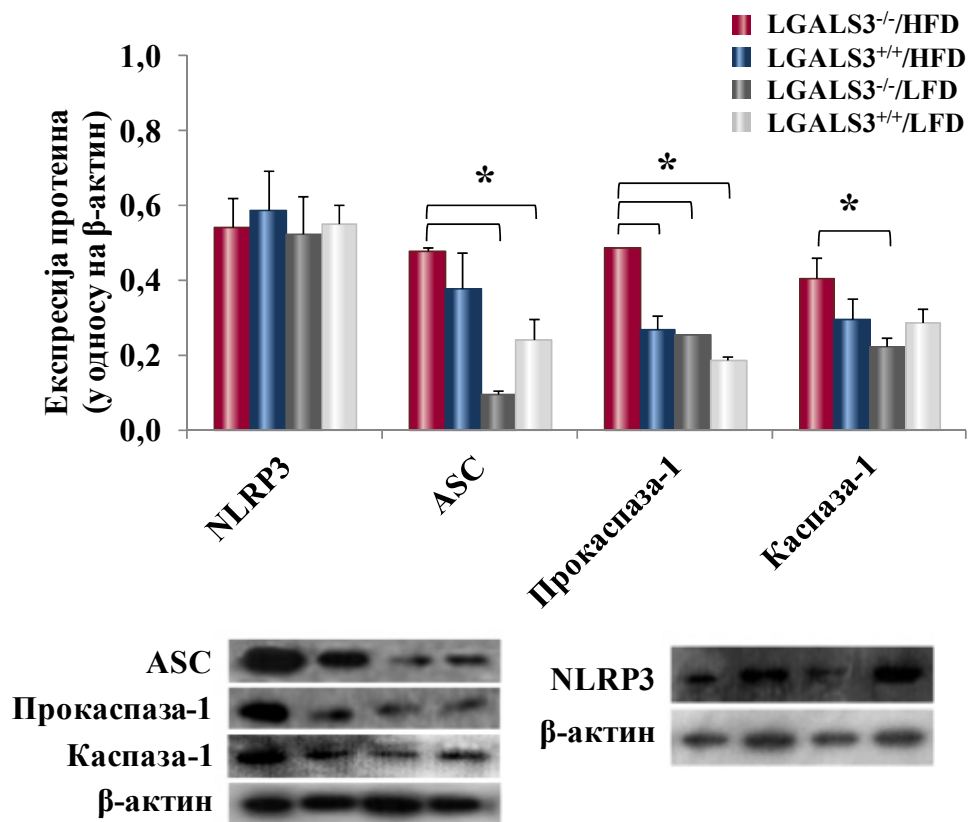
4.10. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА КАСПАЗЕ-1 У ТКИВУ ПАНКРЕАСА LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

NLRP3 инфламазом представља цитоплазматски протеински комплекс који чине инфламазом, адаптерски протеин ASC и молекул прокаспазе-1 који каталитичком разградњом активира каспазу-1 и иницира ослобађање про-инфламаторних IL-1 β и IL-18. У лизатима ткива панкреаса одређивана је експресија различитих компоненти комплекса NLRP3 инфламазома *Western blot* методом (Фигура 6). Иако није било разлике у експресији NLRP3 компоненте инфламазома између група, показано је да је експресија адаптерског протеина ASC значајно већа у панкреасу гојазних LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са мишевима оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти. Експресија прокаспазе-1 је била значајно већа у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишове на обе врсте исхране. Такође је уочено да је експресија активне каспазе-1 била значајно већа LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти.

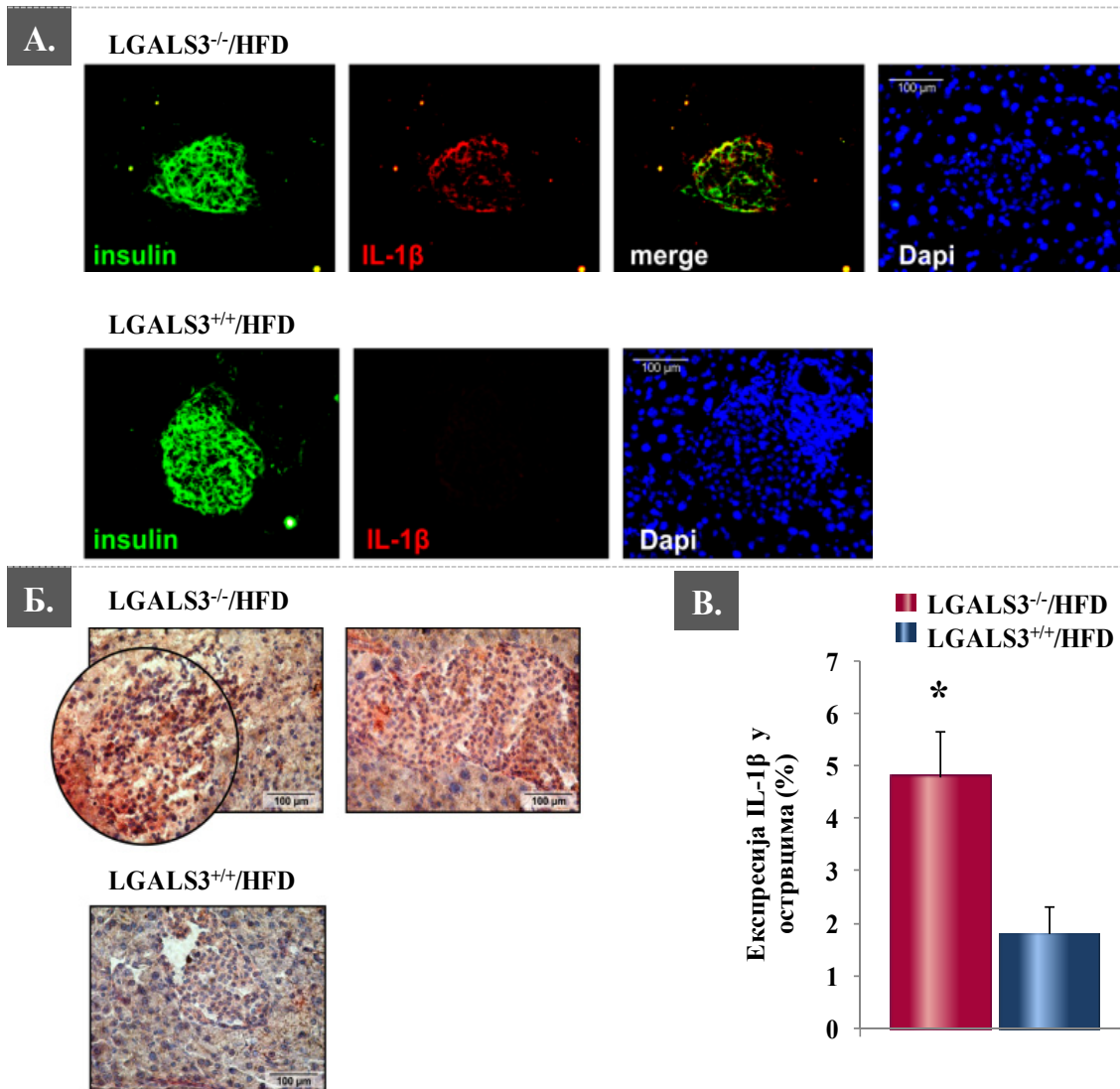
4.11. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА IL-1 β У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Досадашња истраживања су показала да IL-1 β игра кључну улогу у индукцији инфламације и следственој деструкцији β ћелија. У контексту претходних резултата који се односе на повећану експресију NLRP3 инфламазома у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева који су развили хипергликемију и улоге његове активације у продукцији IL-1 β , испитана је експресија IL-1 β у панкреасним острвцима методама имунофлуоресценце и имунохистохемије. Бојењем крио-исечака ткива панкреаса методом имунофлуоресценције, показана је значајно већа експресија IL-1 β (PE) у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на истој дијети

(Фигура 7А). Налаз добијен методом имунохистохемије је верификован бојењем методом имунохистохемије где је IL-1 β визуелизован АЕС супстратом (Фигура 7Б). Према утврђеним критеријумима, експресија IL-1 β је квантификована и показана је статистички значајна разлика у експресији између LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева на дијети са високим садржајем масти (Фигура 7В).

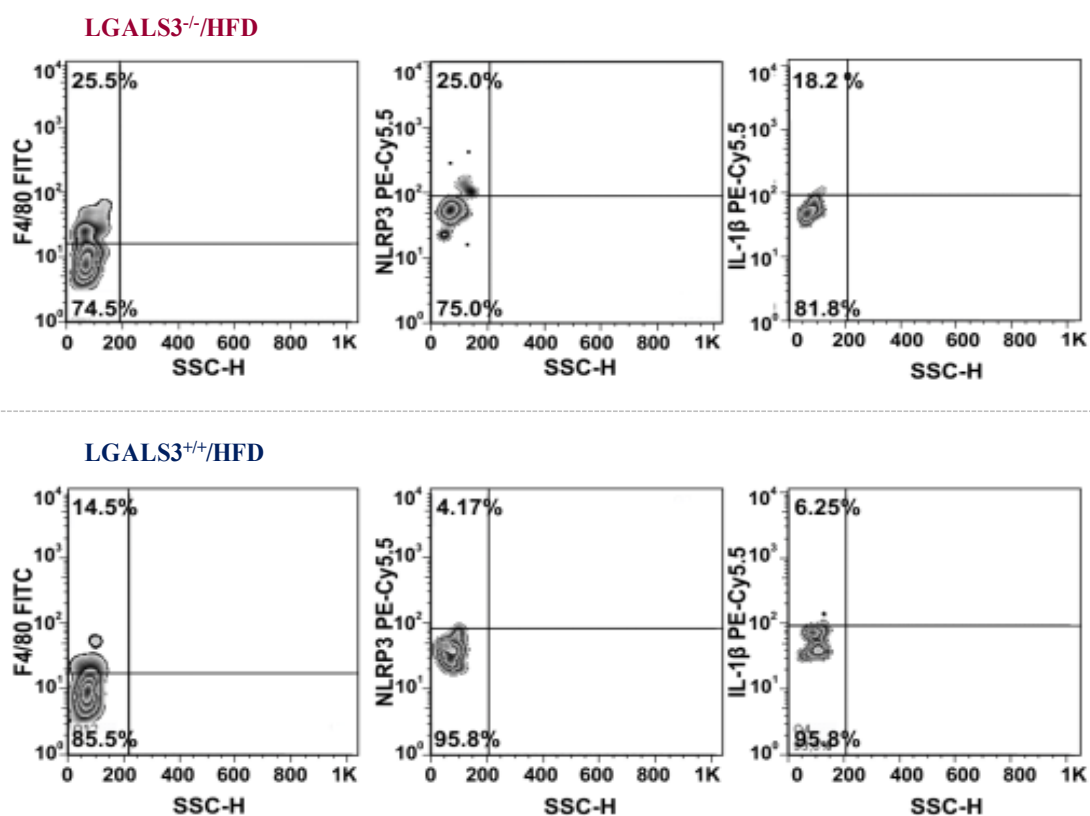


Фигура 6. Анализа експресије појединачних компоненти комплекса NLRP3 инфлазома у ткиву панкреаса. Појединачне компоненте протеинског комплекса NLRP3 инфлазома, као што су: NLRP3 инфлазом, адаптерски протеин ASC, прокаспаза-1 и активна каспаза-1 мерени су у лизатима ткива панкреаса експерименталних животиња *Western blot* методом. Експресија сваког од протеина приказана је као релативна вредност у односу на експресију β -актина за сваки појединачни узорак. Добијене вредности су представљене као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (* $p < 0.05$).



Фигура 7. Повећана експресија IL-1β у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. 7А. Крио-исечци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC коњугованим анти-инсулинским антителом и PE коњугованим анти-IL-1β антителом. Једра ћелија визуализована су применом DAPI mounting медијума. Приказане репрезентативне слике имунофлуоресценце (FITC, PE, DAPI и спојене све три боје (енгл. merge). **7Б.** Имунохистохемијским бојењем потврђена је повећана експресија IL-1β у LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. **7В.** Према унапред утврђеним критеријумима за квантификацију, а на основу препарата бојених методом имунохистохемије, квантификована је експресија IL-1β. Приказана је средња вредност процентуалне експресије IL-1β у односу на површину сваког од прегледаних острваца. Статистичка значајност је утврђена независним Т тестом, при вредности *p<0.05.

У наставку анализе експресије NLRP3 инфламазома и IL-1 β у ткиву панкреаса, изоловане мононуклеарне ћелије су испитане методом проточне цитометрије. Добијени резултати су показали да су NLRP3 инфламазом и IL-1 β доминантно експримирани у инфилтришућим F4/80⁺ макрофагима. Процент селектованих F4/80⁺ ћелија које експримирају NLRP3 инфламазом и IL-1 β је био значајно већи у групи LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на истој врсти дијете (Фигура 8).

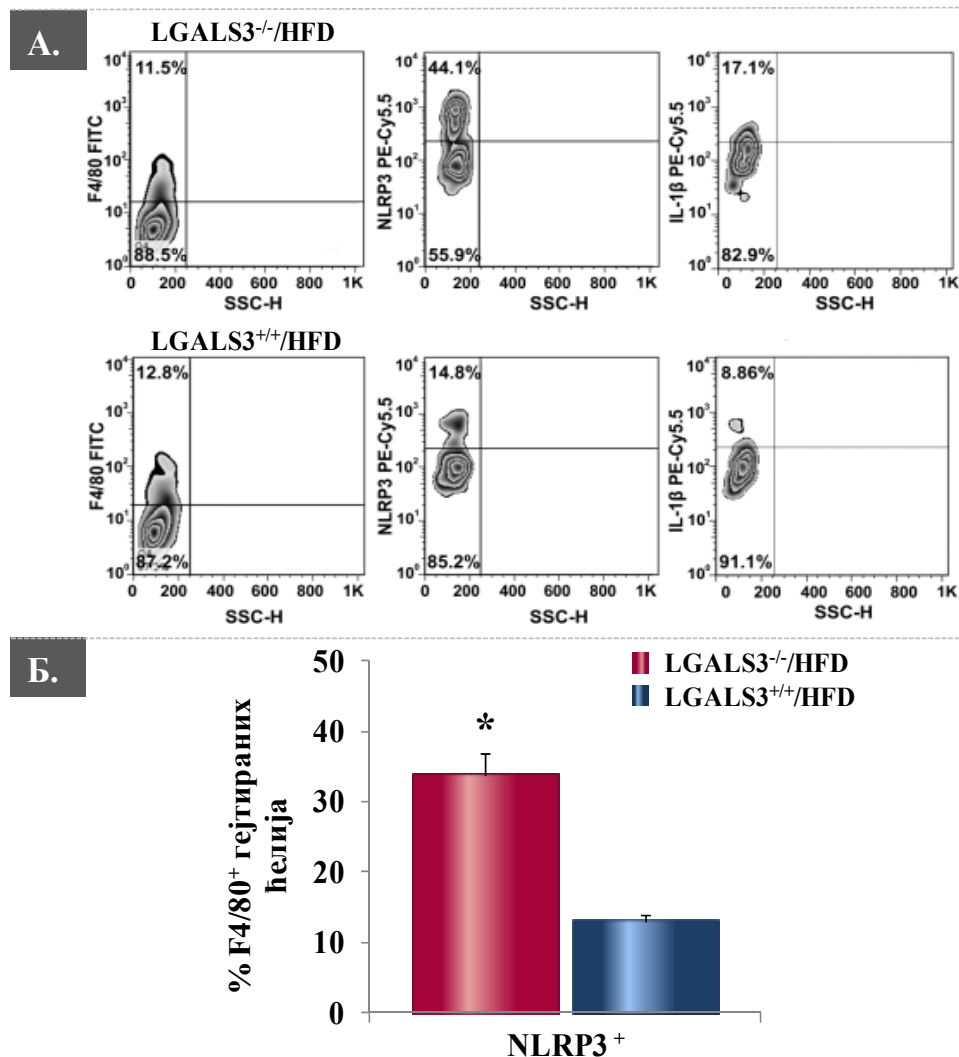


Фигура 8. Анализа експресије NLRP3 инфламазома и IL-1 β методом проточне цитометрије у макрофагима изолованим из ткива панкреаса. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса 11. недеље експеримента и пуловане по групама су анализиране методом проточне цитометрије. Изоловане мононуклеарне ћелије су обележене мембранским анти-F4/80, а након стимулације и интрацелуларним анти-NLRP3 и анти-IL-1 β антителима. Приказани репрезентативни плотови показују значајно већу експресију NLRP3 инфламазома и IL-1 β у гејтованим F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти.

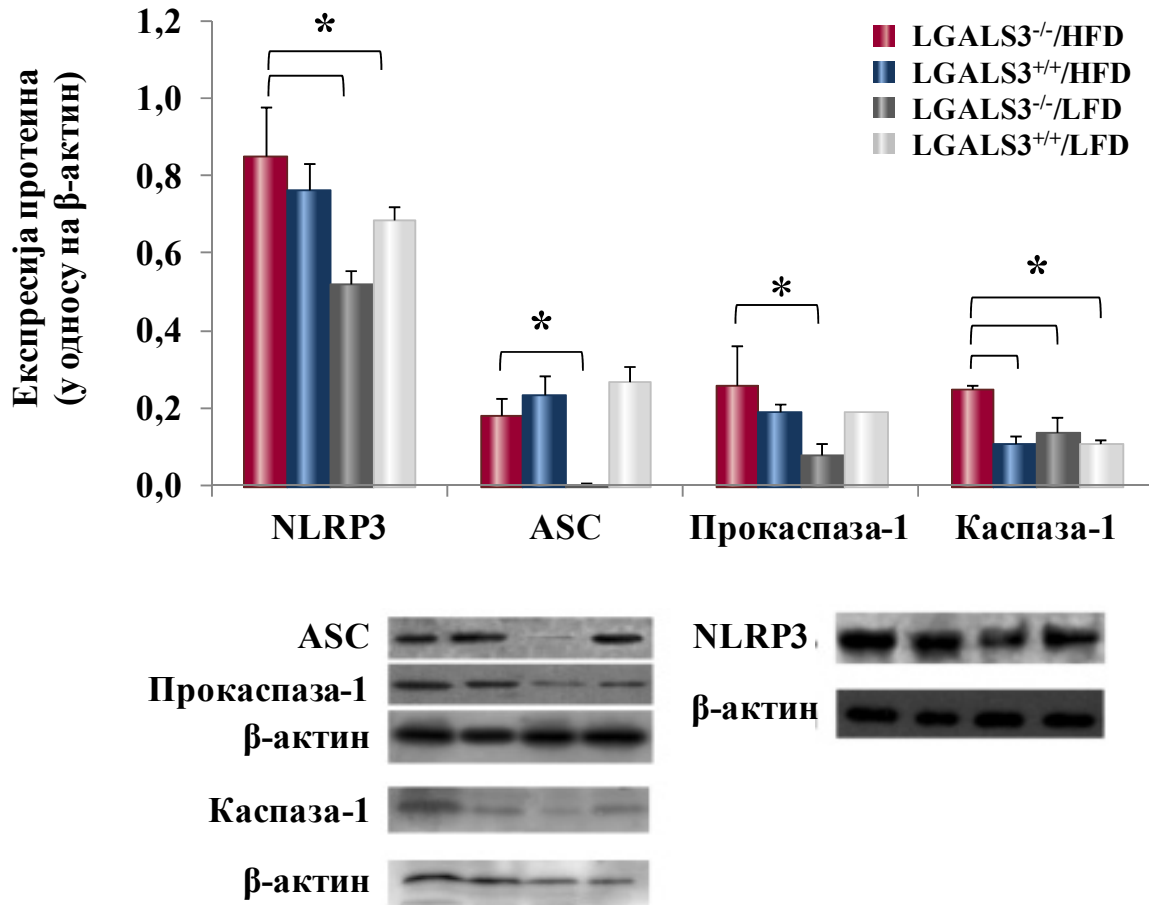
4.12. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА И IL-1 β У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ LGALS3^{-/-} МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Узимајући у обзир резултате добијене анализом ткива панкреаса и инфилтришућих моноклеарних ћелија из острваца, а у складу са кључном улогом адипозног ткива у оркестрацији системског инфламаторног миљеа у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у, испитана је експресија NLRP3 инфламазома и IL-1 β у изолованим моноклеарним ћелијама из висцералног адипозног ткива методом проточне цитометрије. Аналогно добијеним резултатима у ткиву панкреаса, повећана експресија селектованих F4/80⁺ макрофага који експримирају NLRP3 инфламазом и IL-1 β у висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} мишева је документована репрезентативним плотовима (Фигура 9А). Процент селектованих F4/80⁺ макрофага који експримирају NLRP3 инфламазом је статистички значајно већи у групи LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на истој врсти дијете (Фигура 9Б).

У даљем току анализе експресије NLRP3 инфламазома у висцералном адипозном ткиву, у ткивним лизатима је испитана експресија компоненти протеинског комплекса инфламазома *Western blot* методом (Фигура 10). Добијени резултати су показали да је дијета са високим садржајем масти значајно утицала на повећање експресије NLRP3 инфламазома у групи LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима у поређењу са мишевима оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти. Експресија адаптерског протеина ASC и прокаспазе-1 је била значајно повећана у групи LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима у односу на LGALS3^{-/-} мишеве на дијети са ниским садржајем масти. Коначно, активна каспаза-1 је била значајно више експримирана у групи LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти, као и у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим или ниским садржајем масти.



Фигура 9. Анализа експресије NLRP3 инфламазома и IL-1β методом проточне цитометрије у макрофагима изолованим из висцералног адипозног ткива. 9А. Мононуклеарне ћелије изоловане из висцералног адипозног ткива након 11 недеља специјалног режима исхране су анализирани методом проточне цитометрије. Изоловане мононуклеарне ћелије су обележене мембранским анти-F4/80, а након стимулације и интрацелуларним анти-NLRP3 и анти-IL-1β антителима. Приказани репрезентативни дотплотови показују значајно већу експресију NLRP3 инфламазома и IL-1β у гејтованим F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти. **9Б.** Статистички значајно већа експресија NLRP3 инфламазома у селектованим F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти (*p<0,05), потврђена је поређењем средњих вредности експресије добијеним у испитиваним групама животиња коришћењем независног Т-теста.



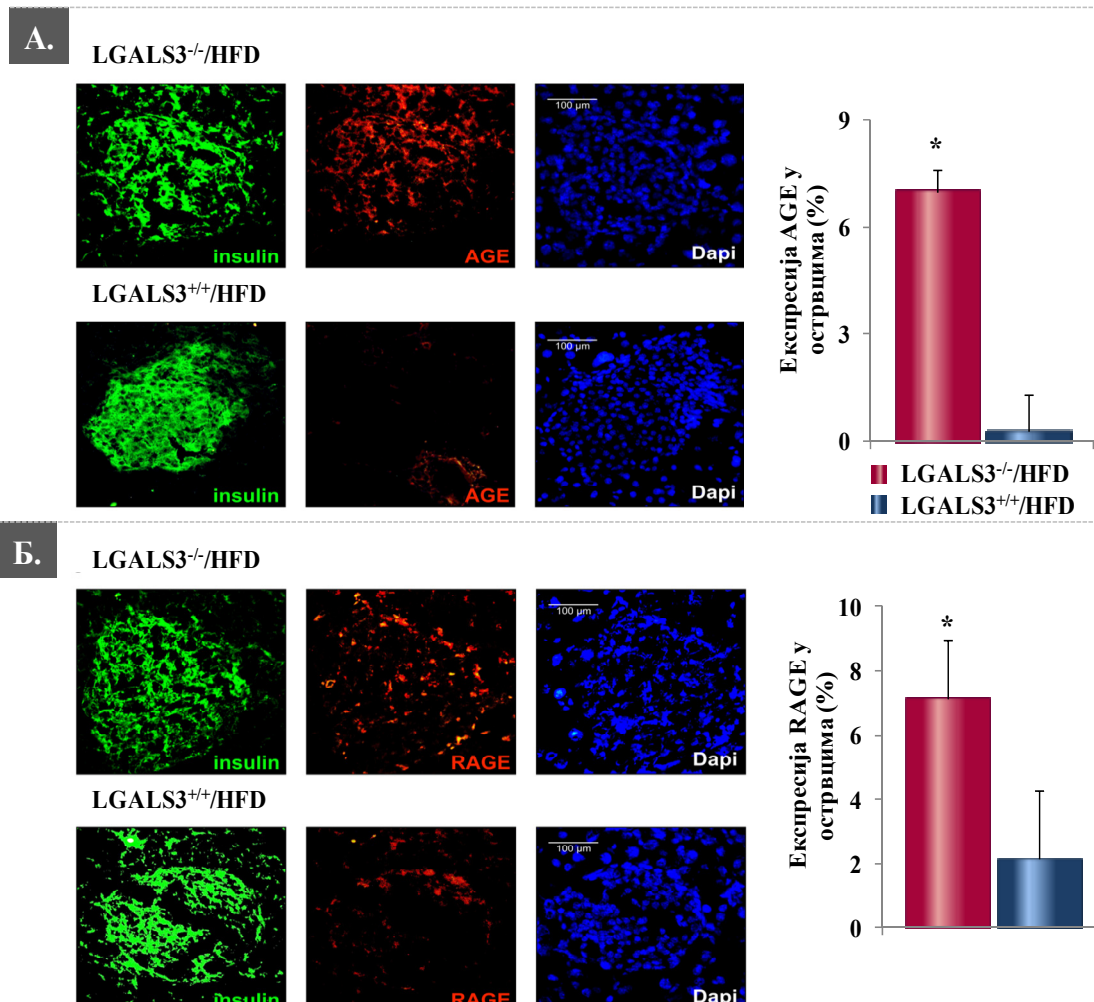
Фигура 10. Анализа експресије појединачних компоненти комплекса NLRP3 инфламазома у висцералном адипозном ткиву. Појединачне компоненте протеинског комплекса NLRP3 инфламазома, као што су: NLRP3 инфламазом, адаптерски протеин ASC, прокаспаза-1 и активна каспаза-1 мерени су у лизатима висцералног адипозног ткива експерименталних животиња Western blot методом. Експресија сваког од протеина приказана је као релативна вредност у односу на експресију β -актина за сваки појединачни узорак. Добијене вредности су представљене као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (* $p < 0.05$).

4.13. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА AGE И RAGE У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА ГАЛЕКТИН-3 ДЕФИЦИЈЕНТНИХ МИШЕВА НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

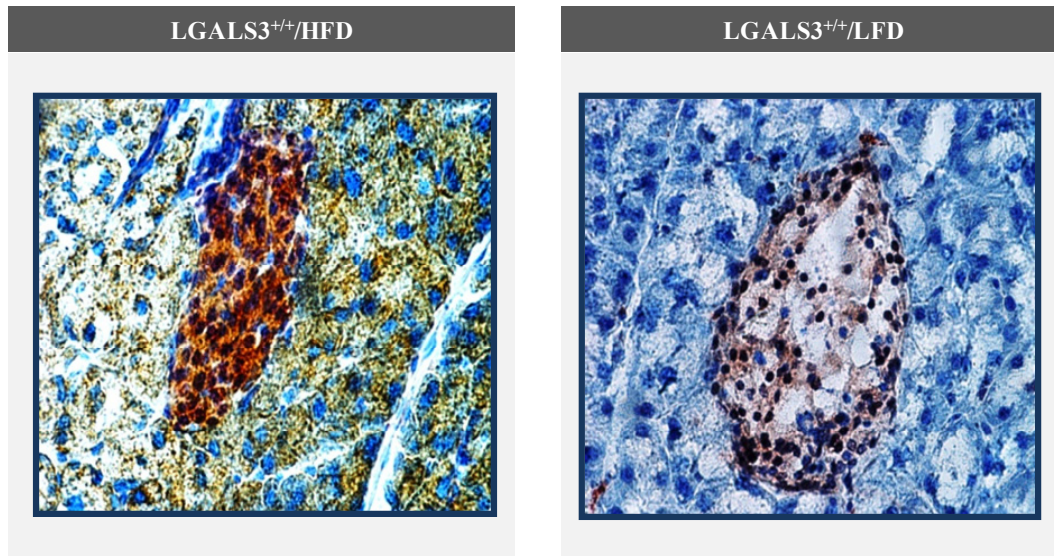
Узимајући у обзир познату улогу галектина-3 у везивању и уклањању продуката метаболизма глукозе и липида, који показују про-инфламаторна својства у патогенези метаболичких поремећаја, испитана је експресија метаболита AGE и рецептора RAGE у панкреасним острвцима експерименталних животиња након 11 недеља индукције болести. Методом имунофлуоресценце и имунохистохемије показана је повећана експресија метаболита AGE у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на исхрани са високим садржајем масти у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на истој врсти дијете (Фигура 11А). У одсуству галектина-3, уочено је да са порастом експресије метаболита AGE расте и експресија рецептора RAGE. Тако LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају значајно већу експресију RAGE у панкреасним острвцима у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на истој врсти дијете (Фигура 11Б).

4.14. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА ИНДУКОВАНА ДИЈЕТОМ БОГАТОМ МАСТИМА

Узимајући у обзир функцију галектина-3 као рецептора чистача за AGE, а у контексту његове протективне улоге у IL-1 β посредованом цитотоксичком ефекту на β ћелије, испитана је експресија галектина-3 у панкреасном острвцима LGALS3^{+/+} мишева у зависности од врсте исхране. Методом имунохистохемијског бојења галектина-3 (АЕС визуелизација) у панкреасним острвцима је показана повећана експресија у мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на дијети са ниским садржајем масти што указује на могући компензаторни протективни ефекат у процесу деструкције β ћелија (Слика 1).



Фигура 11. Повећана експресија AGE и RAGE у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. Крио-исецци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC коњугованим анти-инсулинском антителом и PE коњугованим анти-AGE (11А.), односно анти-RAGE (11Б.) антителом. Једра ћелија визуализована су применом DAPI mounting медијума. На графикону су приказане репрезентативне слике имунофлуоресценце (FITC, PE, DAPI). Имунохистохемијским бојењем потврђена је повећана експресија AGE и RAGE у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на дијети богатој мастима. Према унапред утврђеним критеријумима за квантификацију, а на основу препарата добијених методом имунохистохемије, урађена је квантификована експресија AGE и RAGE. Приказана је средња вредност процентуалне експресије AGE и RAGE у односу на површину сваког од прегледаних острваца. Статистичка значајност је утврђена независним Т тестом, при вредности * $p < 0.05$.



Слика 1. Анализа експресије галектина-3 у панкреасним острвцима LGALS3^{+/+} мишева након 11 недеља специјалног режима исхране. Експресија галектина-3 у панкреасним острвцима LGALS3^{+/+} мишева након 11 недеља примене дијете са високим или ниским садржајем масти детектована је методом имунохистохемије коришћењем анти-галектин-3 антитела уз визуелизацију АЕС супстратом. Репрезентативне фотографије указују на значајно већу експресију галектина-3 у панкреасним острвцима мишева на дијети са високим садржајем масти, у односу на контролну групу животиња.

4.15. ПАЛМИТАТ СТИМУЛИШЕ КАСПАЗА-1 ЗАВИСНУ ПРОДУКЦИЈУ IL-1 β У LGALS3^{-/-} МАКРОФАГИМА

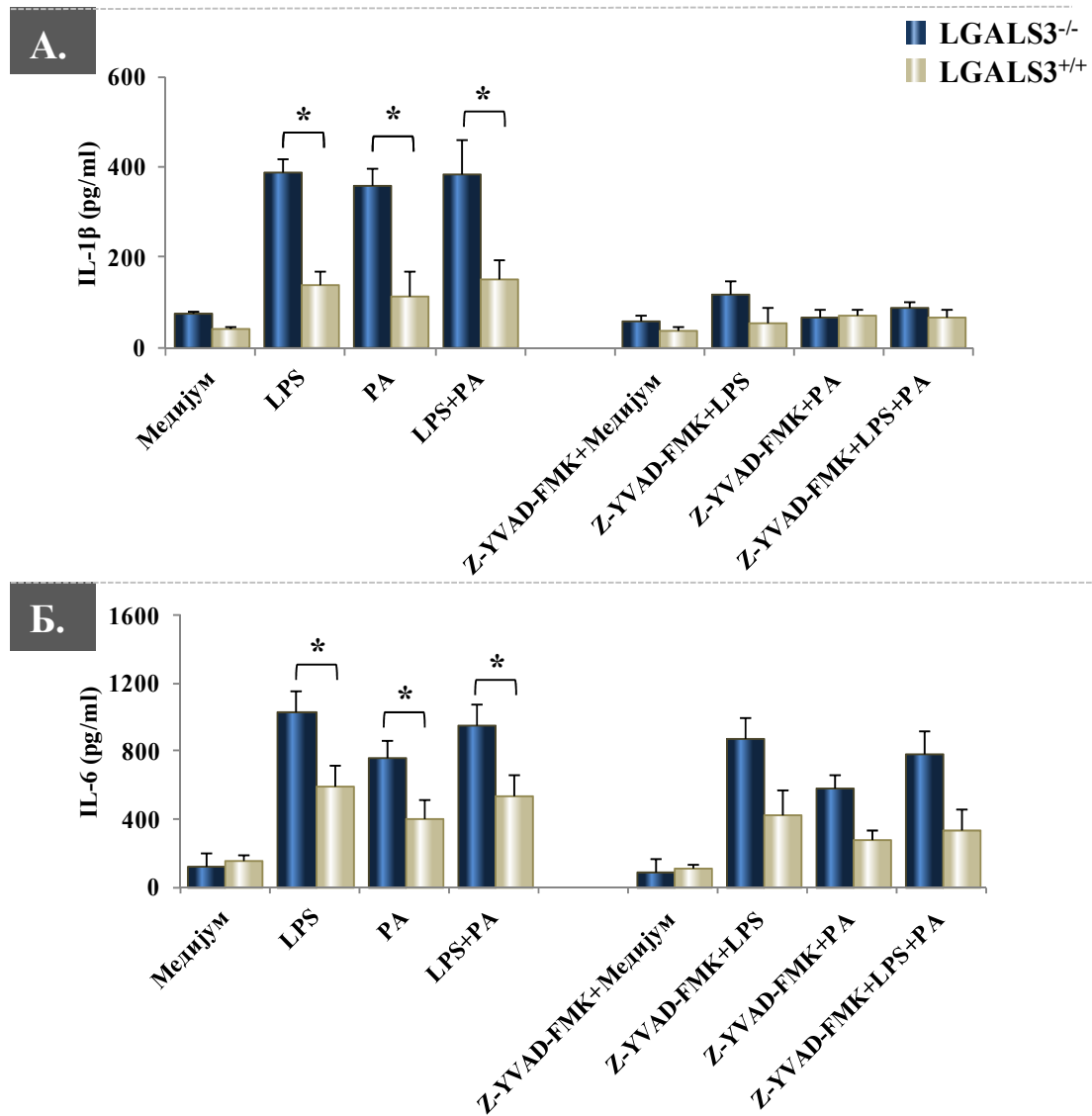
У циљу додатног испитивања механизма настанка инфламације у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, изоловани перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева су у 24-часовној култури ћелија стимулирани засићеном масном киселином палмитатом уз претходно претретирање LPS-ом *in vitro*. Одређивањем концентрације IL-1 β у супернатантима, уочено је да LGALS3^{-/-} макрофаги стимулирани палмитатом и/или LPS-ом, продукују више IL-1 β у поређењу са макрофагима LGALS3^{+/+} мишева (Графикон 9А). Додатним претретирањем ћелија инхибитором каспазе-1 (Z-YVAD-FMK) продукција IL-1 β је значајно смањена у третираним ћелијама, што указује на чињеницу да је активација каспазе-1 важан корак у процесу секреције IL-1 β (Графикон 9А).

Изолувани перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} мишева, у одговору на палмитат и/или LPS продукују већу количину IL-6 у односу на LGALS3^{+/+} мишеве (Графикон 9Б). Насупрот ефекту на продукцију IL-1β, концентрација IL-6 није била значајно снижена након третирања ћелија инхибитором каспазе-1 (Графикон 9Б).

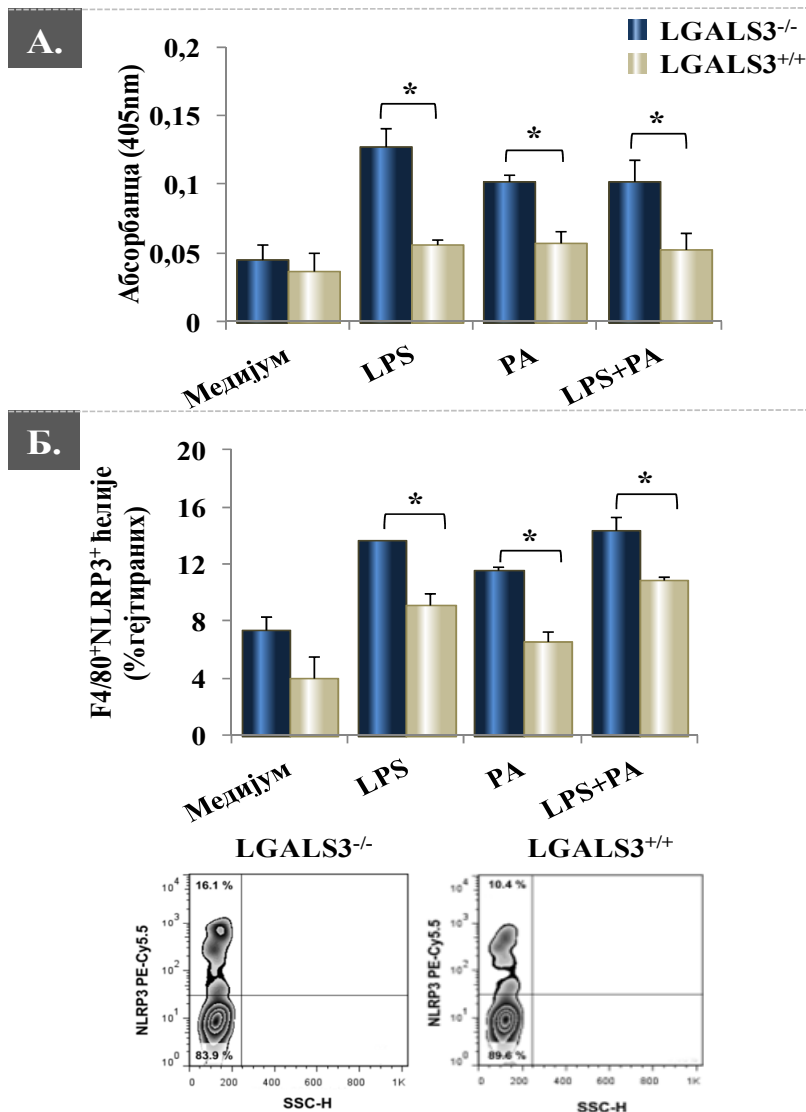
У даљем току истраживања колориметријским тестом испитана је активност каспазе-1 у лизатима перитонеалних макрофага након стимулације палмитатом са или без претретирања LPS-ом. Анализа је показала да је у LGALS3^{-/-} макрофагима активност каспазе-1 након стимулације палмитатом и/или LPS-ом значајно већа у поређењу са LGALS3^{+/+} макрофагима (Фигура 12А). Узимајући у обзир улогу активације инфламазома у процесу матурације каспазе-1, у макрофагима стимулираним на претходно описан начин је испитана експресија NLRP3 инфламазома методом проточне цитометрије. Добијени подаци су потврдили значајно већу експресију NLRP3 инфламазома у LGALS3^{-/-} F4/80^{+/+} макрофагима третираним LPS-ом и/или палмитатом, у односу на LGALS3^{+/+} контролу (Фигура 12Б).

У циљу додатне потврде активације NLRP3 инфламазома као могућег механизма настанка инфламације, у перитонеалним макрофагима је искључен ген за NLRP3 инфламазом методом трансфекције siRNA. Ћелије су затим третиране LPS-ом и/или палмитатом *in vitro*, након чега је у супернатантима мерена концентрација секретованог IL-1β. Резултати су показали да је искључивањем гена за NLRP3 инфламазом продукција IL-1β статистички значајно опала у LGALS3^{-/-} макрофагима у којима је искључен ген за NLRP3 у поређењу са макрофагима који су трансфектовани контролном siRNA након стимулације LPS-ом или LPS-ом са палмитатом (Фигура 13А). Добијени резултат наводи на закључак да је механизам продукције IL-1β доминантно посредован активацијом NLRP3 инфламазома од стране метаболита у условима повећаног уноса масти. Искључивање циљаног гена је верификовано анализом експресије NLRP3 инфламазома у макрофагима методом

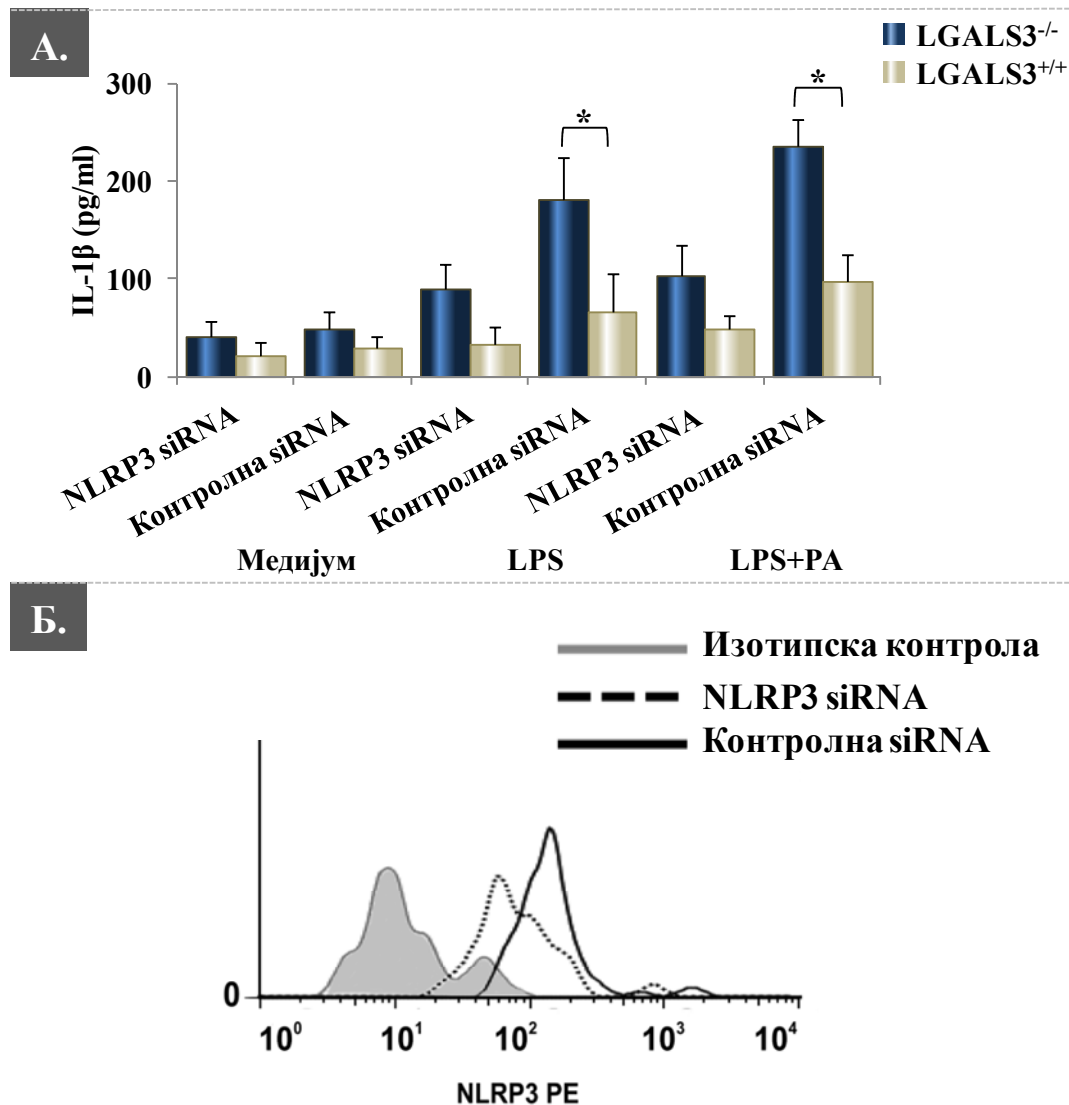
проточне цитометрије, а у односу на ћелије трансфектоване контролном siRNA као и у поређењу са изотипском контролом (Фигура 13Б).



Графикон 9. Повећана продукција IL-1 β од стране перитонеалних макрофага LGALS3^{-/-} мишева стимулираних LPS-ом и/или палмитатом је зависна од активности каспазе-1. Изоловани перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева су *in vitro* стимулирани палмитатом (PA) у концентрацији 100 μ M, са или без претходног претретирања са 100 ng/ml LPS-a, у присуству или одсуству 10 μ M инхибитора каспазе-1 (Z-YVAD-FMK). Концентрације IL-1 β и IL-6 су мерене у супернатантима ELISA методом. Добијене вредности су представљене као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (* $p < 0.05$).



Фигура 12. Повећана активност каспазе-1 у LPS-ом и/или палмитатом стимулираним перитонеалним макрофагима LGALS3^{-/-} мишева кореспондира са већом експресијом NLRP3 инфламазома. Изоловани перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева су *in vitro* стимулирани палмитатом (PA) (100 μ M) са или без претходног претретирања LPS-ом (100 ng/ml). **12А.** У супернатантима добијеним након 24-часовне културе је мерена активност каспазе-1 колориметријским тестом. **12Б.** Стимулисане ћелије су обележене анти-F4/80 и анти-NLRP3 антителом и анализирани методом проточне цитометрије. Добијене вредности су представљене као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (* $p < 0.05$). Репрезентативни плотови показују повећану експресију NLRP3 инфламазома у F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима.

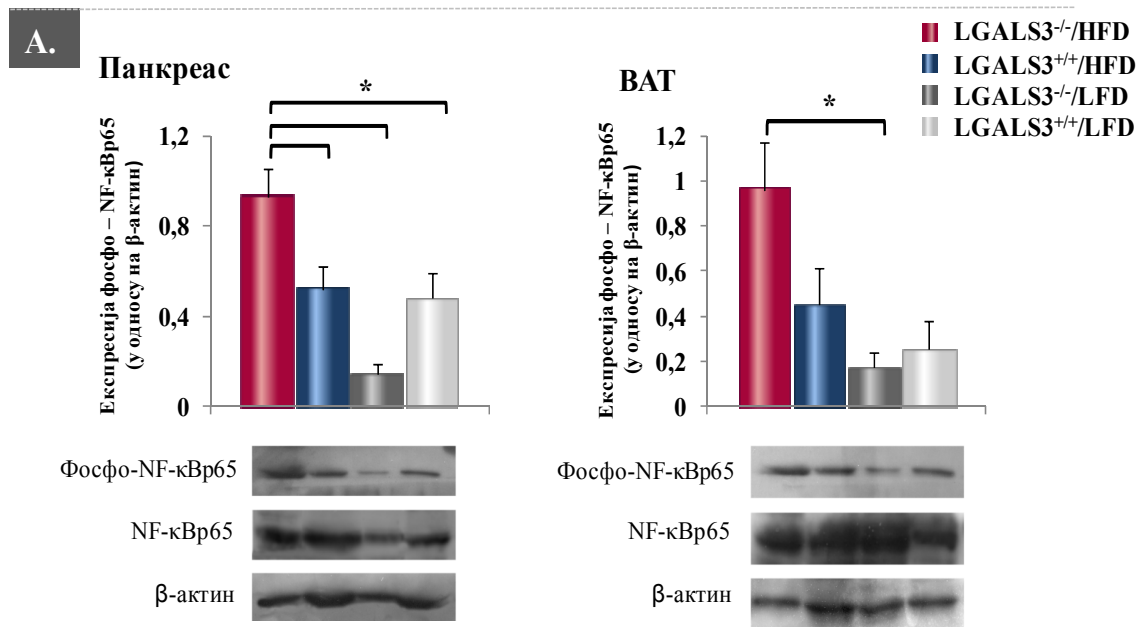


Фигура 13. Искључивањем гена за NLRP3 инфламазом значајно се смањује продукција IL-1 β од стране перитонеалних макрофага LGALS3^{-/-} мишева, а након стимулације LPS-ом и палмитатом. **13A.** У изолованим перитонеалним макрофагима LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева је методом трансфекције siRNA искључен ген за NLRP3 инфламазом. Затим су ћелије *in vitro* стимулисане LPS-ом (100 ng/ml) и палмитатом (PA) (100 μ M). У супернатантима добијеним након 24-часовне културе је мерена концентрација IL-1 β ELISA методом. Добијене вредности су представљене као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (* $p < 0.05$). **13B.** Репрезентативни хистограм представља верификацију значајног смањења експресије NLRP3 инфлазома у трансфектованим ћелијама у односу на нетрансфектоване ћелије, као и изотипску контролу, анализирану методом проточне цитометрије.

4.16. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ФОСФОРИЛИСАНОГ NF-κB p65 У ПАНКРЕАСУ, ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ И ПЕРИТОНЕАЛНИМ МАКРОФАГИМА LGALS3^{-/-} МИШЕВА

Молекулски механизми који повезују инфламацију, врсту исхране и настанак тип 2 *Diabetes mellitus*-а су и даље недовољно разјашњени. Познато је да активација транскрипционог фактора NF-κB и следствена регулација експресије про-инфламаторних цитокина може бити покренута различитим ћелијским стимулусима, укључујући хипергликемију и слободне масне киселине.

Након 18 недеља специјалног режима исхране, у лизатима ткива панкреаса и висцералног адипозног ткива испитана је експресија укупног и фосфорилисаног NF-κB *Western blot* методом. За детекцију активираних форме NF-κB коришћено је антитело на NF-κB p65 субјединицу фосфорилисану на аминокиселини серин на позицији 536. Анализа добијених резултата је показала значајно већу експресију фосфорилисаног NF-κB у панкреасу LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети богатој мастима, као и у односу на мишеве оба генотипа на дијети са ниским садржајем масти (Фигура 14А). У ткиву панкреаса, однос између фосфорилисаног и укупног NF-κB био је највећи у LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима (0,816) у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети богатој мастима (0,413), као и LGALS3^{-/-} (0,120) и LGALS3^{+/+} (0,345) мишевима на исхрани са ниским садржајем масти (Фигура 14Б). У висцералном адипозном ткиву експресија фосфорилисаног NF-κB је била значајно већа у LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са LGALS3^{-/-} мишевима на дијети са ниским садржајем масти (Фигура 14А). У висцералном адипозном ткиву, однос између фосфорилисаног и укупног NF-κB био је највећи у LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима (0,842) у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети богатој мастима (0,469), као и LGALS3^{-/-} (0,370) и LGALS3^{+/+} (0,272) мишевима на исхрани са ниским садржајем масти (Фигура 14Б).

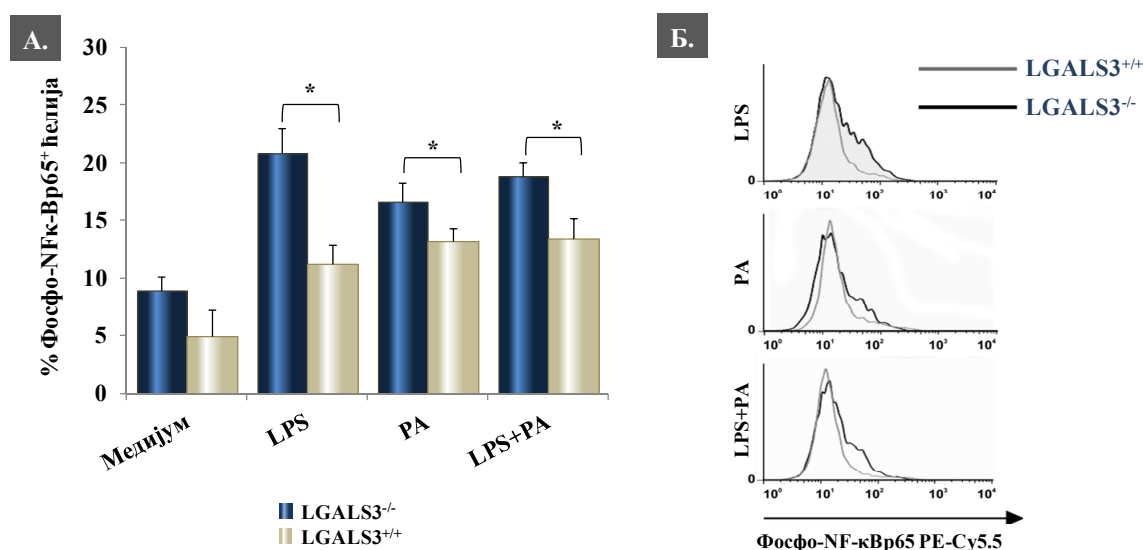


Б.

Фосфо-NF-κВ p65/NF-κВ-p65				
	LGALS3 ^{-/-} /HFD	LGALS3 ^{+/+} /HFD	LGALS3 ^{-/-} /LFD	LGALS3 ^{+/+} /LFD
Панкреас	0,816	0,413	0,120	0,345
Висцерално адипозно ткиво	0,842	0,469	0,370	0,272

Фигура 14. Повећана експресија активираниог NF-κВ у панкреасу и висцералном адипозном ткиву (BAT) LGALS3^{-/-} мишева на исхрани богатој мастима. **14А.** Експресија фосфорилисаног NF-κВ (фосфо-NF-κВp65) и укупног NF-κВp65 мерена је у лизатима ткива панкреаса и висцераног адипозног ткива експерименталних животиња *Western blot* методом. Експресија протеина приказана је као релативна вредност у односу на експресију β-актина за сваки појединачни узорак. Добијене вредности су представљене као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (*p<0.05). **14Б.** Однос између фосфорилисаног и укупног NF-κВp65 приказан је као количник добијених средњих вредности експресије фосфо-NF-κВp65 и NF-κВp65 за сваку од група.

У циљу анализе додатног механизма настанка инфламације, испитана је експресија активираниог NF-κB у перитонеалним макрофагима LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева. Изоловане ћелије су стимулисане LPS-ом и палмитатом у *in vitro* условима. После 24h-овне стимулације, ћелије су анализирание методом проточне цитометрије. Добијени резултати су показали значајно повећану експресију фосфорилисаног NF-κB у F4/80⁺ ћелијама LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} ћелије након третирања LPS-ом и/или палмитатом (Фигура 15А). Репрезентативним хистограмима је документована повећана експресија фосфорилисаног NF-κB у F4/80⁺ ћелијама LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима, након стимулације LPS-ом, палмитатом или LPS-ом + палмитат (Фигура 15Б).



Фигура 15. Повећана експресија фосфорилисаног NF-κB у F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} мишева у LPS-ом и/или палмитатом стимулираним перитонеалним макрофагима. 15А. Изоловани перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} и LGALS3^{+/+} мишева су стимулирани палмитатом (PA) (100 μM) и/или LPS-ом (1 μg/ml) *in vitro*. Након 24-часовне културе, стимулисане ћелије су обележене анти-F4/80 и анти-фосфо-NF-κBp65 антителима и анализирание методом проточне цитометрије. Добијене вредности су представљене као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је детерминисана независним Т тестом (*p<0.05). **15Б.** Репрезентативни хистограми показују повећану експресију фосфо-NF-κBp65 у F4/80⁺ макрофагима LGALS3^{-/-} у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима, након стимулације LPS-ом, палмитатом или LPS-ом и палмитатом.

5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује на чињеницу да делеција гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а индукованих применом дијете са високим садржајем масти. Главне манифестације убрзаног настанка болести у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти, огледају се у значајно већој телесној маси и количини висцералног адипозног ткива, појави хипергликемије, порасту индекса НОМА-IR, израженом инсулитису и прогресивној инфилтрацији про-инфламаторних макрофага у панкреасна острвца.

5.1. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА РАЗВОЈ ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 *DIABETES MELLITUS*-А У МИШЈЕМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ ИНДУКОВАНЕ ДИЈЕТОМ

Галектин-3 је члан фамилије β -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације (цитоплазматска, нуклеарна, мембранска или екстраћелијска) испољава своју мултифункционалност у процесима инфламације, апоптозе, канцерогенезе и вероватно различитим процесима регулације метаболичке хомеостазе (210). Досадашњим истраживањима делеција гена за галектин-3 доведена је у везу са убрзаном прогресијом дијабетесних компликација као што су експериментални гломерулонефритис, атеросклероза и не-алкохолна стеатоза јетре, указујући на могући протективни ефекат галектин-3 у метаболичким дисфункцијама и инфламацији ниског степена која је у основи патогенезе гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а (298,299,300). Један од могућих механизма протективног ефекта галектина-3 везан је за његову функцију рецептора чистача за крајње продукте метаболизма глукозе (енгл. *advanced glycation end-products*, AGE) и липида (енгл. *advanced lipoxidation endproducts*, ALE). Галектин-3

учествоваће у деградацији и уклањању AGE и ALE из циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита, који настаје као последица енергетског дисбаланса организма (316). Претпоставка је да је у одсуству галектина-3 појачано депоновање ових молекула, као и експресија PRR (енгл. *pattern recognition receptor*) за AGE (RAGE) који активира ћелије имунског система и подстиче продукцију про-инфламаторних медијатора. Такође је показано да RAGE индукује активацију ћелија адаптивног имунског одговора и контролише поларизацију Т лимфоцита у смеру Th1 имунског одговора (152). β -ћелије панкреасних острваца, изложене цитотоксичном дејству IL-1 β *in vitro*, повишено експримирају галектин-3 који има протективну улогу у процесу њиховог оштећења (317).

Гојазност је поремећај телесне композиције који се најпрецизније дефинише апсолутним увећањем количине, пре свега висцералног адипозног ткива у организму у условима прекомерног уноса нутријената. Најчешће, експанзију масног ткива прати увећање телесне масе. Висцерално адипозно ткиво је локализовано у трбушној дупљи и окружује унутрашње органе. У мишева висцерално адипозно ткиво је претежно локализовано у перигонадалним масним депоима. Након 11, односно 18 недеља дијете са високим садржајем масти уочено је да LGALS3^{-/-} мишеви имају значајно већу телесну масу и количину висцералног адипозног ткива у односу на LGALS3^{+/+} мишеве (Фигура 1 и 2А). Насупрот томе, у LGALS3^{+/+} мишева дијета са високим садржајем масти је индуковала значајно увећање телесне масе и количине висцералног адипозног ткива тек након 18 недеља индукције болести (Фигура 1 и 2А). У складу са овим резултатима су подаци из најновије студије која је документовала да аблација гена за галектин-3 индукује увећање адипозног ткива што је праћено развојем системске инфламације и инсулинске резистенције (318). У прилог закључку да делеција гена за галектин-3 убрзава развој гојазности говори и чињеница да се увећање телесне масе у LGALS3^{-/-} мишева уочава већ након 3. недеље дијете са високим садржајем масти. Убрзан развој гојазности у галектин-3 дефицијентних мишева није био праћен хиперфагијом што

је документовано тиме да није било значајне разлике у количини унете хране између два генотипа мишева на истој врсти дијете (Фигура 2В).

Експанзија висцералног адипозног ткива у условима повећаног уноса нутријената представља главни фактор ризика за настанак метаболичког синдрома у који спадају дислипидемија, хипертензија, инсулинска резистенција и тип 2 *Diabetes mellitus* (9). Праћењем параметара развоја инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-a је показано да LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима имају значајно веће вредности гликемије наше и инсулинемије након 11, односно 18 недеља специјалног режима исхране (Графикон 1 и 2А). НОМА-IR (енгл. *homeostasis model assessment of insulin resistance*) је метод који се користи за утврђивање функционалног капацитета β-ћелија и интензитета инсулинске резистенције на основу измерених вредности гликемије наше и концентрације инсулина у крви (319). Вредности индекса НОМА-IR су показале да гојазни LGALS3^{-/-} мишеви имају значајно веће вредности у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти што додатно потврђује прогресиван ток инсулинске резистенције код ових животиња (Графикон 2Б). Интересантно је запажање да су LGALS3^{-/-} мишеви на исхрани са ниским садржајем масти имали значајно повишене вредности гликемије наше у односу на LGALS3^{+/+} мишеве, што је указало на могућу протективну улогу галектина-3 у процесу прогресивне деструкције β-ћелија (Графикон 1).

Главни разлог настанка дислипидемије у тип 2 *Diabetes mellitus*-у је повећани ефлукс слободних масних киселина из инсулин резистентних масних депоа (21,320). Услед смањене способности инсулина да инхибира ослобађање слободних масних киселина, повећава се њихов инфлукс у јетру и продукција VLDL холестерола (321). Анализом липидног статуса експерименталних животиња документован је повећан ниво укупног холестерола у серуму мишева који су били на исхрани са високим садржајем масти, иако није било статистички значајне разлике између два генотипа мишева (Табела 4). Иако тачан механизма дејства није до краја разјашњен, већ дуго

је познато да хиперурикемија снажно позитивно корелира са настанком инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а и користи се као клинички маркер метаболичког синдрома (322). Интересантно је запажање да је серумски ниво мокраћне киселине био значајно већи у гојазних *LGALS3^{-/-}* мишева у поређењу са *LGALS3^{+/+}* мишевима на дијети са високим садржајем масти (Табела 4).

5.2. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА ИНФЛАМАЦИЈУ ИНДУКОВАНУ ДИЈЕТОМ У ВИСЦЕРАЛНОМ АДИПОЗНОМ ТКИВУ И СИСТЕМСКОЈ ЦИРКУЛАЦИЈИ

У основи, гојазност карактерише хронична инфламација у висцералном адипозном ткиву у којој партиципирају бројне ћелије имунског система (323). Значајан допринос разумевању настанка инфламације у висцералном адипозном ткиву дала су истраживања која су указала на важну улогу ћелија урођене имуности у прогресији гојазности и патогенези настанка компликација индукованих гојазношћу, као што је инсулинска резистенција. Тако је иницијално указано на кључни значај инфилтрације, локализације и функционалне хетерогености макрофага у процесу настанка инфламације (324). Ипак, новија истраживања су указала на важност других ћелија имунског система, а нарочито Т лимфоцита, у започињању и прогресији инфламаторне каскаде у висцералном адипозном ткиву (58,132).

Позната је чињеница да су Т лимфоцити, заједно са цитокинима које продукују, најважнији модулатори активације и функције ткивних макрофага што се нарочито односи на концепт М1/М2 поларизације њиховог фенотипа (71,325). IFN- γ кога продукује тип 1 помагачких Т лимфоцита (Th1), снажно стимулише активацију про-инфламаторних М1 макрофага у одговору на интрацелуларне патогене (326). Са друге стране, цитокини Th2 имунског одговора, као и имуномодулаторни IL-10, индукују алтернативну активацију М2 макрофага у одбрани од инфекција паразитима, резолуцији акутне инфламације и зарастању и ремоделовању ткивних

оштећења (69). Иако су механизми одговорни за активациони статус M1 макрофага у висцералном адипозном ткиву недовољно познати, логичан је закључак да би Т лимфоцити могли бити извор стимулуса. У физиолошким условима, резидентни макрофаги се у висцералном адипозном ткиву налазе у стању ниске инфламаторне активности, што је доминантно под контролом цитокина Th2 имунског одговора (72). Са развојем гојазности, нови макрофаги бивају регрутовани у експандирајуће висцерално адипозно ткиво и, стимулирани од стране Th1 лимфоцита, секретују про-инфламаторне цитокине који директно смањују сензитивност на инсулин у адипоцитима (327). Новија тумачења инфламације у висцералном адипозном ткиву указују на могућност да је инфилтрација про-инфламаторних M1 макрофага касни догађај у патогенези гојазности, који је недвосмислено повезан са настанком компликација, а пре свега инсулинске резистенције (327). Могуће је да је инфилтрација Т лимфоцита у експандирајуће висцерално адипозно ткиво примарни догађај у иницијацији инфламације, базиран на комуникацији антигена из масног ткива са ћелијама адаптивне имуности (328). Т лимфоците у висцералном адипозном ткиву одликује ограничена разноликост Т ћелијског рецептора (TCR), што је вероватно последица селективног притиска на најполиморфније CDR3 (енгл. *complementarity determining region 3*) регионе у процесу реаранжирања гена и генерисања TCR-а који препознају за сада непознате антигене у масном ткиву (79,80) (79) (80). Узимајући у обзир чињеницу да TCR може да препозна и липидне антигене, могуће је да одређене врсте липидних молекула које продукују адипоцити могу да иницирају имунски одговор. Показано је да инфилтрација CD8⁺ Т лимфоцита претходи акумулацији макрофага у експандирајуће висцерално адипозно ткиво, док деплеција ових ћелија смањује миграцију макрофага, чиме се значајно смањује инсулинска резистенција у периферним ткивима (81). У исто време је документовано да третирање гојазних лептин дефицијентних мишева анти-CD3 антителом редукује преминацију Th1 лимфоцита и смањује инсулинску резистенцију упркос дијети са високим садржајем масти (80). Ови резултати

импликују да је прогресија гојазности и инсулинске резистенције доминантно под контролом CD4⁺ Т лимфоцита.

У супротности са овим опсервацијама су резултати студије која је показала да се инфилтрација Т лимфоцита у висцерално адипозно ткиво мишева, као и повећана експресија гена за IFN- γ и хемокин RANTES (енгл. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) одговоран за миграцију Т лимфоцита, запажају тек 20 недеља након дијете са високим садржајем масти (329). Са друге стране, повећана инфилтрација CD11c⁺ макрофага је документована у првих 8 недеља индукције болести (329). У прилог оваквом налазу говоре и запажања да је експресија гена за про-инфламаторне цитокине ћелија урођене имуности, IL-12p40 и IL-18, значајно повећана у експандирајућем висцералном адипозном ткиву (329). Познато је да ови цитокини, у комбинацији са препознавањем специфичног антигена, стимулишу диференцијацију CD4⁺ Т лимфоцита у смеру Th1 имунског одговора и индукују појачану продукцију IFN- γ (330,331). CD4⁺ Т лимфоцити, претходно потакнути са IL-12, повећавају синтезу IFN- γ при поновном сусрету са антигеном или у одговору на егзогену стимулацију (332,333). Неоспорна је чињеница да Т лимфоцити, заједно са макрофагима, инфилтришу висцерално адипозно ткиво, иако се промене у релативном броју и активности CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, као и Th1, Th2 и регулаторних Т лимфоцита дешавају асинхроно и различитом динамиком (28). Експресија гена за хемокин RANTES и његовог рецептора CCR5 (енгл. *C-C chemokine receptor type 5*) на Т лимфоцитима је значајно повећана у висцералном адипозном ткиву адипонектин дефицијентних гојазних мишева, као и субкутаном масном ткиву пацијената са тешким степеном гојазности (334). Генерално гледано, CD8⁺ и Th1 лимфоцити доприносе погоршању инсулинске резистенције, док Th2 и FoxP3⁺ регулаторни Т лимфоцити теже успостављању ткивне хомеостазе и супротстављају се овом процесу (28).

Досадашња истраживања недвосмислено су показала да Th1 ефекторски лимфоцити играју важну улогу у хроничној инфламацији која је у основи патогенезе

гојазности и метаболичких дисфункција повезаних са гојазношћу (329). Гојазни IFN- γ дефицијентни мишеви имају значајно редуковану експресију гена за медијаторе инфламације у висцералном адипозном ткиву, смањену акумулацију про-инфламаторних ћелија, као и бољу толеранцију на глукозу у односу на контролну групу животиња на дијети богатој мастима (335). У складу са претходним подацима, резултати актуелне студије су показали да инфламацију насталу у експандирајућем висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} мишева након 11 недеља дијете са високим садржајем масти, превасходно карактерише повећана инфилтрација тип 1 CD3⁺ Т лимфоцита који доминантно продукују IFN- γ (Графикон 3). Значајно већа заступљеност CD3⁺ IFN- γ ⁺ лимфоцита у LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети богатој мастима додатно указује на могући значај галектина-3 у активацији Т лимфоцита. Под утицајем активације анти-CD3 антителом или митогенима, расте експресија галектина-3 у CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцитима (266). Ипак, улога ендогеног галектина-3 у Т ћелијском одговору је недовољно јасна. Новија студија је показала да CD4⁺ Т лимфоцити галектин-3 дефицијентних мишева продукују веће количине IFN- γ и IL-4 у односу на Т лимфоците галектин-3 позитивних мишева (275). Тумачење ових налаза указује на чињеницу да након препознавања антигена од стране TCR-a и активације Т лимфоцита настаје повећана експресија галектина-3. Сматра се да акумулација галектина-3 у периферној зони имунске синапсе дестабилише формирање исте (275). Тако галектин-3 супримира рану фазу пропагације сигнала са TCR-a и смањује активацију Т лимфоцита.

Поред конвенционалних ћелија имунског система (Т и В лимфоцити и макрофаги), новија истраживања указују на могући значај NKT ћелија у контроли метаболичке хомеостазе. У зависности од контекста (тип липидних антигена, врста ћелијске субпопулације, ткивна микросредина) NKT ћелије могу да стимулишу или супримирају стечени имунски одговор и усмере га у правцу Th1 или Th2 имунског одговора, продукцијом IFN- γ , односно IL-4 (336). Резултати досадашњих истраживања која се тичу улоге NKT ћелија у инфламацији у висцералном

адипозном ткиву и следственој појави инсулинске резистенције су опречни. Најпре је показано да активација NKT ћелија значајно погоршава инсулинску резистенцију тако што повећава инфилтрацију макрофага и експресију про-инфламаторних цитокина у висцералном адипозном ткиву (337,338). Насупрот овим резултатима, новија студија је показала да NKT ћелије, активирине применом α GalCer-a (α -галактозил церамид), повећаном продукцијом IL-4 и вероватно IL-13, стимулишу поларизацију макрофага у смеру M2 фенотипа и смањују глукозну интолеранцију (339). У актуелној студији је уочено да је висцерално адипозно ткиво гојазних LGALS3^{-/-} мишева инфилтрисано CD3⁺NK1.1⁺ NKT ћелијама, које процентуално продукују више IFN- γ (Графикон 3). Међутим, могућа интеракција између галектина-3 и функције NKT ћелија је и даље непозната. Ретки подаци који се односе на утицај галектина-3 на активацију и функцију NKT ћелија, указују на то да галектин-3 игра важну про-инфламаторну улогу у хепатитису индукованом конканавалином А тако што, између осталог, повећава инфилтрацију и активацију NKT ћелија (268). У исто време улога NKT ћелија у патогенези гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-a и даље је контроверзна.

Анализом фенотипа мононуклеарних ћелија изолованих из висцералног адипозног ткива и слезине уочена је значајно снижена заступљеност регулаторних CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т лимфоцита у гојазних LGALS3^{-/-} мишева (Фигура 3). У недавно објављеној студији, *Feuerer* и сарадници су запазили да више од половине CD4⁺ Т лимфоцита изолованих из висцералног адипозног ткива здравих мишева експримира транскрипциони фактор FoxP3, што је знатно већа фракција од оне која се нормално налази како у лимфним ткивима, тако и у паренхиматозним органима (79). Ове ћелије су идентификовали као јединствену популацију регулаторних Т лимфоцита који инфилтришу висцерално адипозно ткиво здравих животиња. Узимајући у обзир да ове ћелије продукују велике количине имуномодулаторног IL-10, али и експримирају рецептор за IL-10 и на тај начин успостављају баланс са резидентним конвенционалним Th1 лимфоцитима адипозног ткива, логична је

претпоставка да имају регулаторну улогу у очувању ткивне хомеостазе и сензитивности на инсулин. У прилог овом тумачењу говори и чињеница да заступљеност регулаторних Т лимфоцита значајно опада пропорционално са експанзијом адипозног ткива (79). Индукција и активација регулаторних Т лимфоцита у гојазних лептин дефицијентних *ob/ob* мишева супримира локалну инфламацију у висцералном адипозном ткиву што смањује инсулинску резистенцију и поправља гликорегулацију (340). Секреторни статус масних депоа током развоја гојазности карактерише дизбаланс у продукцији адипокина и то у смеру повећане секреције лептина и снижене продукције адипонектина (24). У недавно објављеној студији је документовано да *LGALS3^{-/-}* мишеви, независно од врсте исхране, тачније конститутивно, имају повећан ниво лептина у циркулацији уз значајно снижен ниво адипонектина (318). Показано је да је лептин негативни регулатор пролиферативног капацитета регулаторних Т лимфоцита (341). Са друге стране, могуће је да је адипонектин позитивни фактор у активацији ових ћелија што је базирано на индукцији синтезе IL-10 од стране ткивних макрофага (342). Могуће је да реципрочне вредности концентрација лептина и адипонектина у гојазних *LGALS3^{-/-}* мишева (318) синергистички делују на нисходну регулацију и снижену заступљеност регулаторних Т лимфоцита. Важну улогу регулаторних Т лимфоцита у очувању хомеостазе у масном ткиву и сензитивности на инсулин у галектин-3 дефицијентних мишева, додатно потврђује чињеница да проценат заступљености ових ћелија значајно негативно корелира са телесном масом и вредностима гликемије наше (Графикон 6Б).

PD-1 молекул је првобитно описан као инхибиторни рецептор експримиран на Т лимфоцитима, који учествује у ограничавању целуларног имунског одговора и индукцији апоптозе. Ипак, повећана експресија овог молекула на активираним Т и В лимфоцитима и моноцитима га у новијим студијама дефинише као маркер активације ових ћелија (343,344). $CD4^{+}CD28^{-}$ лимфоцити изоловани из периферне крви пацијената оболелих од тип 2 *Diabetes mellitus*-а повећано експримирају PD-1 рецептор у односу на здраве испитанике (345). У исто време концентрација

солубилног лиганда за PD-1 (sPD-L1), у циркулацији ових пацијената је повећана и корелира са појавом атеросклеротичних макроваскуларних компликација. Додатно, продукција sPD-L1 значајно корелира са нивоом циркулишућег IFN- γ код пацијената са тип 2 *Diabetes mellitus*-ом (345). У актуелној студији је показано да је дијета са високим садржајем масти утицала на значајно већу инциденцу активираних CD4⁺PD1⁺ Т лимфоцита у висцералном адипозном ткиву и слезини LGALS3^{-/-} мишева (Графикон 4). Интрацелуларно локализовани галектин-3 у Т лимфоцитима инхибира апоптозу ових ћелија, стимулише њихов раст и регулише трансдукцију сигнала преко TCR-а (221). Повећана експресија PD-1 молекула је највероватније последица појачане сигнализације преко TCR-а у одсуству галектина-3 (221,346).

Резидентни макрофаги у висцералном адипозном ткиву су класификовани у два основна фенотипа: класично активирани M1 макрофаги и алтернативно активирани M2 макрофаги. Активација и поларизација макрофага у смеру про-инфламаторног M1 фенотипа настаје као последица стимулације бактеријским липополисахаридом или IFN- γ , кога продукују Th1 лимфоцити (326). M2 макрофаги имају анти-инфламаторни фенотип и подељени су на неколико подгрупа на основу врсте стимулуса који их активира: M2a (активирани цитокинима IL-4 или IL-13), M2b (активирани током имунског одговора липополисахаридом или дејством IL-1 β) и M2c (активирани дејством IL-10, TGF- β , гликокортикоидима) (69). Савремено разумевање инфламације индуковане гојазношћу у висцералном адипозном ткиву и инсулинске резистенције у основи је базирано на концепту фенотипског шифта макрофага. Према овом концепту, гојазност промовише поларизацију резидентних M2a макрофага, који одржавају ткивну хомеостазу, у смеру про-инфламаторног M1 фенотипа. CD11c молекула је члан фамилије β 2-интегрин експримиран на мишјим дендритским ћелијама, као и неким субпопулацијама моноцита и макрофага (347). Користи се као маркер активације моноцита и макрофага, а његова основна улога је у адхезији моноцита за ћелије ендотела на месту инфламације и то везивањем за ћелијски адхезивни протеин крвних судова-1 (енгл. *vascular cell adhesion protein-1*,

VCAM1) молекула (348). У мишјем моделу дијетом индуковане гојазности, али и код гојазних пацијената, значајно расте заступљеност CD11c⁺ ћелија у висцералном адипозном ткиву и системској циркулацији (349). Додатно је показано да CD11c дефицијентни гојазни мишеви имају значајно снижене маркере инфламације у висцералном адипозном ткиву, као и смањен степен инсулинске резистенције (349). *Luteng* и сарадници су документовали да CD11c⁺ макрофаги изоловани из висцералног адипозног ткива продукују про-инфламаторне цитокине TNF- α и IL-6, као и индуцибилну азот-моноксид синтазу (iNOS), и припадају M1 фенотипу ових ћелија (72). Важну улогу у поларизацији макрофага у смеру M1 фенотипа игра и повећана експресија хемокинског рецептора CCR2, што је доказано чињеницом да CCR2 дефицијентни гојазни мишеви преваходно експримирају гене који карактеришу M2 фенотип макрофага (72). Са друге стране, CD11c⁻ макрофаги експримирају маркере M2 фенотипа и то Ym1, аргиназу-1 и IL-10 (72). Скорија студија је проширила ова истраживања и класификовала фенотип макрофага у висцералном адипозном ткиву гојазних мишева на основу експресије два маркера: CD11c⁺CD206⁻ ћелије дефинисане су као про-инфламаторни M1 макрофаги, док су CD11c⁻CD206⁺ ћелије дефинисане као M2 макрофаги (76). У недавно спроведеној клиничкој студији је показано да управо макрофаги дефинисани као CD11c⁺CD206⁺ ћелије изоловане из адипозног ткива значајно утичу на настанак инфламације и појаву инсулинске резистенције у гојазних испитаника (350). Тачније, показано је да инсулинска резистенција расте са повећаним присуством CD11c⁺CD206⁺ ћелија у адипозном ткиву и корелира са порастом односа CD11c⁺CD206⁺/CD11c⁻ ћелија (350).

На основу претходних сазнања, у актуелној студији је анализиран фенотип инфилтришућих макрофага у висцералном адипозном ткиву. Анализом степена инфилтрације и фенотипа макрофага у висцералном адипозном ткиву експерименталних животиња је уочено доминантно присуство про-инфламаторних F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺ макрофага у гојазних LGALS3^{-/-} мишева у поређењу са осталим експерименталним групама (Графикон 5A). Додатно је уочено да телесна

маса и вредности гликемије наше позитивно корелирају са заступљеношћу про-инфламаторних F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺ ћелија (Графикон 6А). Истовремено је уочено значајно смањење инциденце алтернативно активираних F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺ M2 макрофага у висцералном адипозном ткиву галектин-3 дефицијентних мишева (Графикон 5Б). Чињеница да макрофаги високо експримирају и секретују галектин-3 указује на могуће импликације овог молекула у регулацији њихове диференцијације и функције. У претходним студијама је уочена повећана експресија галектина-3 у процесу диференцијације моноцита у макрофаге, док је насупрот томе галектин-3 нисходно регулисан у процесу диференцијације макрофага у дендритске ћелије (248,351). Додатно је документовано да галектин-3 промовише интеракције између моноцита у процесу формирања мултиједарних циновских ћелија које представљају фенотип повезан са алтернативном активацијом макрофага, као и хроничним инфламаторним болестима и фиброзом (289,290). У складу са овим запажањима, *MacKinnon* и сарадници су утврдили да галектин-3 позитивно утиче на алтернативну активацију макрофага у смеру M2 фенотипа (288). Тако, IL-4 стимулише експресију и ослобађање галектина-3 заједно са осталим маркерима M2 фенотипа макрофага. Насупрот томе, класична активација макрофага липополисахаридом инхибира експресију галектина-3. У контексту импликације галектина-3 у процесу поларизације макрофага, логичан је закључак да у његовом одсуству расте однос M1/M2 макрофага у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева.

Макрофаги су хетерогена популација ћелија, па је у недавно објављеној студији показано да важну улогу у инфламацији индукованој гојазношћу играју троструко позитивне F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ ћелије, познате као дендритске ћелије пореклом из костне сржи (енгл. *bone marrow derived dendritic cells*, BMDCs) (74). Ове ћелије доминантно експримирају про-инфламаторни фенотип у висцералном адипозном ткиву гојазних мишева. Параметри инфламације у висцералном адипозном ткиву су анализирани након 18 недеља дијете са високим садржајем масти. У складу са претходним резултатима уочено је да су управо про-инфламаторне

F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ ћелије повећано засупљене у висцералном адипозном ткиву LGALS3^{-/-} мишева након 18 недеља на дијети са високим садржајем масти.

Бројне студије су показале да пацијенти оболели од тип 2 *Diabetes mellitus*-а имају повећане системске концентрације протеина акутне фазе (CRP, хаптоглобин, фибриноген, инхибитор активатора плазминогена, серумски амилоид А), цитокина и хемокина (352,353). Повећани нивои про-инфламаторних IL-6, IL-1β и CRP-а имају предиктивну вредност за настанак тип 2 *Diabetes mellitus*-а (353,354). Актуелним истраживањем је показано да је убрзан настанак гојазности и инсулинске резистенције у LGALS3^{-/-} мишева нераскидиво повезан са појавом системске инфламације, која је испитана детекцијом маркера инфламације у серуму експерименталних животиња (Графикон 7 и 8). Дијета са високим садржајем масти у трајању од 11 недеља је индуковала значајно повећање концентрације IL-6 и CRP-а у серуму LGALS3^{-/-} мишева (Графикон 7), што је у складу са претходним резултатима да експресија про-инфламаторних TNF-α, IL-6 и IL-1β у гојазности корелира са настанком инсулинске резистенције (355). Упоредо са порастом телесне масе и количине висцералног адипозног ткива током 18 недеља индукције болести у LGALS3^{+/+} мишева на дијети богатој мастима, дошло је до пораста концентрација про-инфламаторних IL-6 и CRP-а у серуму ових животиња (Графикон 8). Ипак, након 18 недеља индукције болести концентрација серумског IL-1β је била значајно већа у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на истој врсти исхране (Графикон 8). У прилог повећаној продукцији про-инфламаторних цитокина у LGALS3^{-/-} мишева говори и податак да макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева појачано продукују IL-6 и IL-1β у одговору на бактеријску инфекцију у поређењу са макрофагима галектин-3 позитивних мишева (356). Интересантно је да је повећан системски ниво IL-4 у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти у односу на одговарајуће LGALS3^{+/+} мишове запажен и 11.-те и 18.-те недеље индукције болести, што је вероватна последица појачане активације Т лимфоцита у условима ексцеса нутријената (327). У прилог оваквом резултату иде и чињеница да CD4⁺ Т

лимфоцити у одсуству галектина-3 продукују веће количине IL-4 и IFN- γ , што настаје као последица стимулације и активације TCR-a (275).

Поред поменутих про-инфламаторних цитокина, клиничка истраживања су показала да су серумски нивои анти-инфламаторног IL-10 снижени код испитаника са гојазношћу и тип 2 *Diabetes mellitus*-ом и позитивно корелирају са сензитивношћу на инсулин код здравих особа (357-359). Познато је да је IL-10 снажан инхибитор продукције про-инфламаторних цитокина и стимулише одговор β -ћелија на глукозу *in vitro* (360,361). Додатно, претходне студије су показале да IL-10 игра протективну улогу у тип 2 *Diabetes mellitus*-у на тај начин што повећава сензитивност на инсулин у скелетним мишићима (115). Резултати актуелне студије су показали да је серумска концентрација IL-10 значајно снижена у гојазних LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} контролу након 11, односно 18 недеља индукције болести (Графикон 7 и 8). У прилог томе говоре и подаци да делеција галектина-3 на дендритским ћелијама утиче на снижену продукцију IL-10, праћену повећаном продукцијом IFN- γ од стране алогених Т лимфоцита (362). IL-13 је цитокин Th2 имунског одговора укључен у процесе алтернативне активације макрофага и следствено очување хомеостазе гликорегулације (71,86,363). Аблација гена за IL-13 код мишева је праћена појавом хипергликемије и повећаном експресијом ензима одговорних за глуконеогенезу у јетри (364). У складу са овим подацима је чињеница да гојазни LGALS3^{-/-} мишеви имају значајно снижен циркулишући ниво IL-13 у односу на LGALS3^{+/+} контролу након 11 недеља индукције болести (Графикон 7). Снижени нивои серумских IL-10 и IL-13 су вероватна последица појачане инфламације индуковане гојазношћу.

5.3. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА ИНФЛАМАЦИЈУ У ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА ИНДУКОВАНУ ДИЈЕТОМ

Концепт појаве инсулитиса, односно инфламације у панкреасним острвцима у прогресији тип 2 *Diabetes mellitus*-а је релативно нов, али вишеструко документован у научним истраживањима (365). Док је инсулитис у тип 1 *Diabetes mellitus*-у последица аутоимунског одговора, сматра се да инфилтрацију ћелија имунског система у панкреасна острвца у тип 2 *Diabetes mellitus*-у узрокују метаболички стресори као што су хипергликемија и повишен ниво слободних масних киселина у циркулацији (28). Овакав механизам настанка инфламације у тип 2 *Diabetes mellitus*-у је назван аутоинфламација (28). Инфламаторни процес у панкреасним острвцима пацијената са тип 2 *Diabetes mellitus*-ом карактерише присуство цитокина, ћелија имунског система, апоптозе β -ћелија, амилоидних депозита и фиброзе (27). Сматра се да је инсулитис директна последица активације ћелија урођене имуности од стране метаболичких стресора и следствене продукције IL-1 β (27). Први закључци о постојању инфламације у панкреасним острвцима су проистекли из опсервације да хипергликемија индукује апоптозу β -ћелија (31). Високе концентрације глукозе индукују експресију про-апоптотског рецептора *Fas* на β -ћелијама (366). Додатно, продукција IL-1 β од стране β -ћелија индукована глукозом повећава експресију про-апоптотских протеина. Сви ови фактори заједно учествују у процесу прогресивне деструкције β -ћелија. Недавно објављена студија је документовала повећану инфилтрацију ћелија имунског система, пре свих макрофага, у панкреасна острвца пацијената оболелих од тип 2 *Diabetes mellitus*-а, али и у панкреасна острвца C57BL/6 мишева на дијети са високим садржајем масти (122). Интересантно је запажање да депоновани амилоид у хуманим панкреасним острвцима индукује секрецију IL-1 β од стране макрофага пореклом из костне сржи, што указује на његову улогу у процесу настанка инсулитиса (367). Заједно са амилоидом, у панкреасним острвцима оболелих од тип 2 *Diabetes mellitus*-а је уочена појава фиброзе као могућег маркера присуства хроничне инфламације.

Један од најзначајнијих резултата актуелног истраживања је присуство израженог инсулитиса у панкреасним острвцима гојазних LGALS3^{-/-} мишева, али не и LGALS3^{+/+} мишева, након 11 недеља примене дијете са високим садржајем масти (Фигура 4А). Такође је уочен значајно већи проценат острваца са благим инсулитисом у LGALS3^{-/-} мишева у односу на LGALS3^{+/+} мишеве на дијети са високим садржајем масти. Интересантан је податак да је и код LGALS3^{-/-} мишева на дијети са ниским садржајем масти детектовано присуство острваца са израженим инсулитисом (Фигура 4А). Овај резултат је указао на потенцијално важну улогу галектина-3 у очувању функционалног капацитета β-ћелија. Ипак, доступни подаци у литератури везани за овакву функцију галектина-3 су веома оскудни. У зависности од ћелијске локализације галектин-3 може да испољи и про- и анти-апоптотско дејство (188). Галектин-3 експримиран у цитоплазми штити Т лимфоците од апоптозе, док мембрански или екстрацелуларни галектин-3 индукује апоптозу истих (273,368). Све је више података који указују на имунорегулаторну и анти-апоптотску улогу овог молекула. Показано је да галектин-3 инхибира апоптозу ћелија коју индукују анти-Fas антитела, TNF-α и NO (азот-моноксид) (185,188,369). IL-1β снажно индукује експресију галектина-3 у панкреасним острвцима BB пацова (енгл. *biobreding rat*) који спонтано развијају аутоимунски *Diabetes mellitus*, као и хуманим панкреасним острвцима током прогресије тип 1 *Diabetes mellitus*-а (282). Показано је да повећана експресија галектина-3 у панкреасним острвцима пацова има протективни ефекат на β ћелије изложене цититоксичном дејству IL-1β *in vitro* (282). Иако се зна да је галектин-3 високо експримиран у ендотелним ћелијама панкреасних острваца мишева код којих је *Diabetes mellitus* индукован применом дијете са високим садржајем масти (370), његова улога у процесу дијабетогенезе је и даље недовољно разјашњена. Слично резултатима претходних испитивања, актуелним истраживањем је показано да дијета са високим садржајем масти индукује значајно повећање експресије галектина-3 у панкреасним острвцима LGALS3^{+/+} мишева, код којих претходно нису детектовани изражени инсулитис или измењена архитектура острваца (Слика 1). Могуће је да појачана експресија

галектина-3 има протективни ефекат на процес прогресивне деструкције панкреасних острваца у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у. Имунохистохемијским бојењем је показано да су моноклеарне ћелије које доминантно инфилтришу панкреасна острваца F4/80⁺ макрофаги (Фигура 5Б), док је анализа методом проточне цитометрије показала да је њихов фенотип F4/80⁺CD11c⁺CD11b⁺ (Фигура 4Б) и да припадају популацији BMDCs ћелија које играју про-инфламаторну улогу у инфламацији индукованој гојазношћу (74).

5.4. УТИЦАЈ ДЕЛЕЦИЈЕ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 НА МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА ИНФЛАМАЦИЈЕ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ ДИЈЕТОМ

Неколико про-инфламаторних цитокина, а пре свих IL-1 β , је укључено у процес настанка инсулинске резистенције и прогресивне деструкције β -ћелија (134,371). Базирано на овим подацима, клиничке студије су документовале да блокирање дејства IL-1 β , применом хуманог рекомбинантног IL-1 β рецептор антагониста (анакинра), смањује инсулинску резистенцију и поправља гликорегулацију (372,373). Ипак, порекло инфламације у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у, као и молекуларни механизми одговорни за њен настанак и даље су недовољно познати.

Ћелије урођене имуности, као што су макрофаги, препознају молекулске обрасце микроорганизама уз помоћ рецептора за молекулске обрасце као што су TLR и NLR (374,375). Све је више доказа да макрофаги, уз помоћ истих рецептора могу да препознају и структуре пореклом из оштећених ћелија (енгл. *danger-associated molecular patterns*, DAMPs). У одговору на њих макрофаги продукују про-инфламаторне цитокине као што је IL-1 β (376,377). Дијета богата мастима је један од кључних фактора ризика за настанак тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Првобитна претпоставка да слободне масне киселине могу да индукују инфламаторни одговор, базирана је на чињеници да је концентрација ових метаболита значајно повећана у циркулацији оболелих од тип 2 *Diabetes mellitus*-а (378). Молекуларни механизми

путем којих нутријенти као што су глукоза или слободне масне киселине индукују активацију IL-1 β су веома комплексни. Слободне масне киселине могу директно или преко својих метаболита као што је церамид да активирају TLR2 и TLR4 и индукују продукцију про-инфламаторних медијатора посредовану активацијом транскрипционог фактора NF- κ B (379-382).

Све више је података да продукција IL-1 β и IL-18 у макрофагима зависи од аутокаталитичке разградње про-каспазе-1 у ензимски активан хетеродимер каспаза-1 (383-385). Активна каспаза-1 даље каталитички разграђује молекуле про-IL-1 β и про-IL-18 и индукује ослобађање њихове биоактивне форме (376,377). За конформациону промену и пуну активацију каспазе-1 неопходна је активација цитоплазматског протеинског комплекса названог инфламазом. NLRP3 инфламазом је један од најбоље проучених чланова фамилије NLR рецептора и састоји се из NLRP3 компоненте, адапторског протеина ASC (енгл. *apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain*; PYCARD) и молекула прокаспазе-1 (386,387).

Документовано је да NLRP3 инфламазом интер-реагује са DAMPs стресорима као што су екстрацелуларни АТФ, уратни кристали, амилоид и др (165,167,388). У складу са овим подацима је и истраживање које је показало да засићена масна киселина, палмитат, индукује активацију NLRP3 инфламазома и следствену каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β (389). Иста студија је показала да IL-1 β утиче на смањење сензитивности на инсулин независно од активације TNF- α , чиме је додатно истакнута важност овог сигналног пута у настанку инсулинске резистенције (389). Поред макрофага, β ћелије могу бити значајан извор IL-1 β уколико су изложене про-инфламаторним метаболичким сигнаlima, а вероватан механизам продукције IL-1 β подразумева активацију управо NLRP3 инфламазома (28). Најновија истраживања су указала на то да је тип 2 *Diabetes mellitus* ауто-инфламаторна болест у којој централну улогу игра продукција IL-1 β посредована активацијом NLRP3-ASC инфламазома (390,391). Мишеви дефицијентни за NLRP3

инфламазом, каспазу-1 или IL-1 β на нормалној исхрани имају бољу сензитивност на инсулин и гликорегулацију, што потврђује ове тврдње (392).

У процесу испитивања могућег механизма настанка инфламације у панкреасним острвцима гојазних LGALS3^{-/-} мишева је показана повећана експресија NLRP3 инфламазома и IL-1 β у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти, што додатно потврђује инфламацију насталу у панкреасним острвцима (Фигуре 5 и 7). Анализом фенотипа ћелија инфилтрованих у панкреасна острвца и висцерално адипозно ткиво је документовано да управо F4/80⁺ макрофаги појачано експримирају NLRP3 инфламазом и IL-1 β у гојазних LGALS3^{-/-} мишева (Фигуре 8 и 9). Иако у лизатима ткива панкреаса и висцералног адипозног ткива гојазних LGALS3^{-/-} мишева није уочена статистички значајна разлика у експресији NLRP3 инфламазома *Western blot* методом у поређењу са контролним LGALS3^{+/+} мишевима на истој врсти дијете, запажен је пораст експресије адаптерског протеина ASC у овим ткивима (Фигура 6 и 10). Повећана експресија активне каспазе-1 у висцералном адипозном ткиву и панкреасу гојазних LGALS3^{-/-} мишева указује на појачану активацију NLRP3 инфламазома у одсуству галектина-3 (Фигура 6 и 10). Добијени резултати су у складу са новијом студијом која је документовала да делеција гена за NLRP3 инфламазом супримира настанак инфламације индуковане гојазношћу у масним депоима и јетри (168). Аблација гена за NLRP3 инфламазом у гојазних мишева редукује продукцију IL-1 β и IFN- γ , повећава заступљеност наивних и смањује заступљеност ефекторских Т лимфоцита у адипозном ткиву (168).

Повећана продукција IL-1 β од стране LGALS3^{-/-} макрофага у поређењу са LGALS3^{+/+} макрофагима је зависна од активације каспазе-1 што је потврђено стимулацијом перитонеалних макрофага LPS-ом и/или палмитатом у присуству или одсуству инхибитора каспазе-1 (Графикон 9). У складу са студијом која је показала да палмитат активира NLRP3 инфламазом у процесу настанка инсулинске резистенције (389) је и резултат да LGALS3^{-/-} макрофаги стимулирани LPS-ом и/или палмитатом показују повећану експресију NLRP3 инфламазома, као и активност

каспазе-1 у односу на LGALS3^{+/+} макрофаге (Фигура 12). Искључивање гена за NLRP3 инфламазом методом трансфекције siRNA утиче на значајно смањење продукције IL-1 β од стране LGALS3^{-/-} макрофага, што додатно потврђује значај активације NLRP3 инфлазома у процесу настанка инфламације у галектин-3 дефицијентних мишева (Фигура 13).

Метаболити AGE и ALE нормално настају не-ензимском, пост-транслационом модификацијом протеина реактивним карбонилним врстама насталим као резултат оксидативног метаболизма и њихова акумулација расте са старашћу (393). Њихово формирање и акумулација у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у значајно расте као последица повећаног стварања реактивних карбонилних врста као што су метилглиоксал, деоксиглукозон, 4-хидрокси-транс-ноненал (HNE) и акролеин (394,395). Специфичне епитопе настале у овим хемијским реакцијама, заједничке са бројним ендогеним и егзогеним структурама, препознају рецептори за молекулске обрасце на ћелијама урођене имуности као што су TLR или ендоцитозни рецептори чистачи (енгл. *scavenger receptors*, SRs) (396). Активација TLR иницира про-инфламаторну сигналну каскаду и активацију макрофага, док SRs интернализују липопротеинске партикуле и учествују у њиховом уклањању без покретања инфламације (397). Упоредо са PRR, способност да препознају AGE метаболите имају класични рецептори RAGE и галектин-3 (398). Показано је да трансдукција сигнала са RAGE рецептора активира NADPH оксидазу и повећава продукцију реактивних кисеоничних врста. Као резултат настаје активација про-инфламаторног транскрипционог фактора NF- κ B и индукција инфламације (399-401). Са друге стране, вероватно је да галектин-3 функционише као рецептор чистач за ове метаболите, учествује у њиховој интернализацији и уклањању без покретања инфламације (257,402). У прилог оваквом тумачењу говоре студије које су показале да аблација гена за галектин-3 убрзава настанак атеросклерозе, гломерулопатије или ретинопатије које настају као компликације *Diabetes mellitus*-а (298,299,403). Резултати ових студија импликују да је галектин-3 доминантно укључен у уклањање

AGE и ALE чиме је супримирана сигнализација преко RAGE рецептора и следствена индукција инфламације.

У складу са претходним подацима показано је да је експресија метаболита AGE значајно повећана у панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима на дијети са високим садржајем масти, што је вероватна последица њиховог смањеног уклањања у одсуству галектина-3 (Фигура 11А). У исто време, повећано депоновање метаболита AGE утиче на пораст експресије рецептора RAGE у LGALS3^{-/-} мишева на дијети са високим садржајем масти, што додатно импликује настанак инфламације у панкреасним острвцима ових животиња (Фигура 11Б).

Најновија истраживања су показала да TLR агонисти, укључујући LPS, индукују повећање експресије NLRP3 инфлазома путем активације NF-κB (404). Добијени резултати су показали да LGALS3^{-/-} макрофаги стимулирани LPS-ом, појачано продукују IL-6 и IL-1β (Графикон 9), што је у складу са претходним подацима да макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева продукују више про-инфламаторних цитокина у одговору на LPS што је последица изостанка везивања LPS-а галектином-3 који супримира његово дејство (405). Са друге стране, показано је да дијета са високим садржајем масти снажно индукује повећање пермеабилности интестинума и пораст нивоа ендотоксина у системској циркулацији (406). Ендотоксин, слободне масне киселине и AGE, путем рецептора TLR и RAGE, активирају транскрипциони фактор NF-κB и индукују продукцију IL-1β и TNF-α, и на тај начин утичу на настанак и прогресију инсулинске резистенције (390,407,408).

У нестимулисаним ћелијама NF-κB је секвестриран у цитоплазми везивањем за инхибиторне IκB (енгл. *inhibitor of nuclear factor kappa-B*) протеине (409). Под дејством стимулуса ИКК киназе фосфорилишу инхибиторне IκB протеине који подлежу брзој деградацији у протеазомима. Као последица тога настаје ослобађање активаног транскрипционог фактора NF-κB, његов транспорт у једро и следствена регулација генске експресије (410). У циљу испитивања активаног NF-κB p65 детектована је његова фосфорилисана форма на позицији серин 536 (407). Повећана

експресија фосфорилисаног NF- κ B p65 у панкреасу и висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} вероватно је повезана са порастом експресије AGE и следственом активацијом и експресијом RAGE (Фигура 14А). Добијене вредности односа између фосфорилисаног и укупног NF- κ B p65 додатно указују на појачану активацију транскрипционог фактора NF- κ B у висцералном адипозном ткиву и панкреасу гојазних LGALS3^{-/-} мишева (Фигура 14Б). Актуелном студијом је показано да LGALS3^{-/-} макрофаги појачано експримирају фосфорилисани NF- κ B p65 у одговору на LPS и/или палмитат (Фигура 15), што додатно учвршћује претходно објављене резултате (298). Ови налази указују да активација про-инфламаторних сигналних путева посредованих транскрипционим фактором NF- κ B (316) игра важну улогу у оркестрацији и амплификацији инфламације индуковане гојазношћу у LGALS3^{-/-} мишева. У складу са добијеним резултатима су најновија тумачења која истичу централну улогу активације TLRs и NLRP3 инфламазома у настанку инфламације у панкреасним острвцима и следственом развоју тип 2 *Diabetes mellitus*-a (411).

Генерално гледано, убрзана и појачана инфламација у висцералном адипозном ткиву и панкреасу LGALS3^{-/-} мишева указује на важну протективну улогу галектина-3 у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у што би у будућности могло имати терапијске импликације.

6. ЗАКЉУЧАК

Делеција гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а у мишјем моделу гојазности индуковане дијетом са високим садржајем масти, а који су повезани са присуством системске инфламације генерисане у висцералном адипозном ткиву. Делеција гена за галектин-3 индукује инфилтрацију панкреасних острваца макрофагима и настанак израженог инсулитиса, што указује на потенцијално важну протективну улогу галектина-3 у развоју тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Изражена инфламација која настаје у одсуству галектина-3 је последица изостанка његове функције рецептора чистача за крајње продукте гликозилације протеина који покрећу инфламацију. Главни сигнални путеви одговорни за настанак инфламације у галектин-3 дефицијентних мишева подразумевају активацију NLRP3 инфламазома и следствену продукцију про-инфламаторног IL-1 β , као и активацију транскрипционог фактора NF- κ B и следствених про-инфламаторних сигналних путева у висцералном адипозном ткиву и панкреасу (Схема 2).

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Галектин-3 дефицијентни мишеви на дијети са високим садржајем масти убрзано развијају гојазност што се огледа у значајном увећању телесне масе и количине висцералног адипозног ткива
2. Галектин-3 дефицијентни мишеви на дијети са високим садржајем масти убрзано развијају инсулинску резистенцију и тип 2 *Diabetes mellitus* што се манифестује појавом хипрегликемије, хиперинсулинемије, повећањем HbA1c и НОМА-IR индекса
3. Делеција гена за галектин-3 утиче на значајно повећање концентрације маркера инфламације CRP-а, IL-1 β и IL-6, уз значајно смањење нивоа имунорегулаторних IL-10 и IL-13 у серуму мишева на дијети са високим садржајем масти

4. Системска инфламација у галектин-3 дефицијентних мишева на исхрани са високим садржајем масти је генерисана у висцералном адипозном ткиву које појачано инфилтришу IFN- γ продукујући Th1 лимфоцити и NKT ћелије и про-инфламаторни M1 макрофаги, док се значајно смањује заступљеност регулаторних T лимфоцита и анти-инфламаторних M2 макрофага
5. Делеција гена за галектин-3 утиче на повећану инфилтрацију F4/80⁺ макрофага у панкреасна острвца и појаву израженог инсулитиса независно од врсте исхране
6. У одсуству галектина-3 је појачано депоновање метаболичких стресора AGE и повећано испољавање рецептора RAGE у панкреасним острвцима мишева на дијети са високим садржајем масти
7. Делеција гена за галектин-3 утиче на повећану активацију NLRP3 инфламазома и следствену каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β у F4/80⁺ макрофагима у висцералном адипозном ткиву и панкреасним острвцима мишева на дијети са високим садржајем масти
8. Перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} мишева у одговору на стимулацију LPS-ом и/или палмитатом имају већу експресију NLRP3 инфламазома и повећану продукцију IL-1 β
9. Делеција гена за галектин-3 утиче на повећану активацију NF- κ B у висцералном адипозном ткиву и панкреасу мишева на дијети са високим садржајем масти
10. Перитонеални макрофаги LGALS3^{-/-} мишева у одговору на стимулацију LPS-ом и/или палмитатом имају већу експресију фосфорилисаног NF- κ B p65

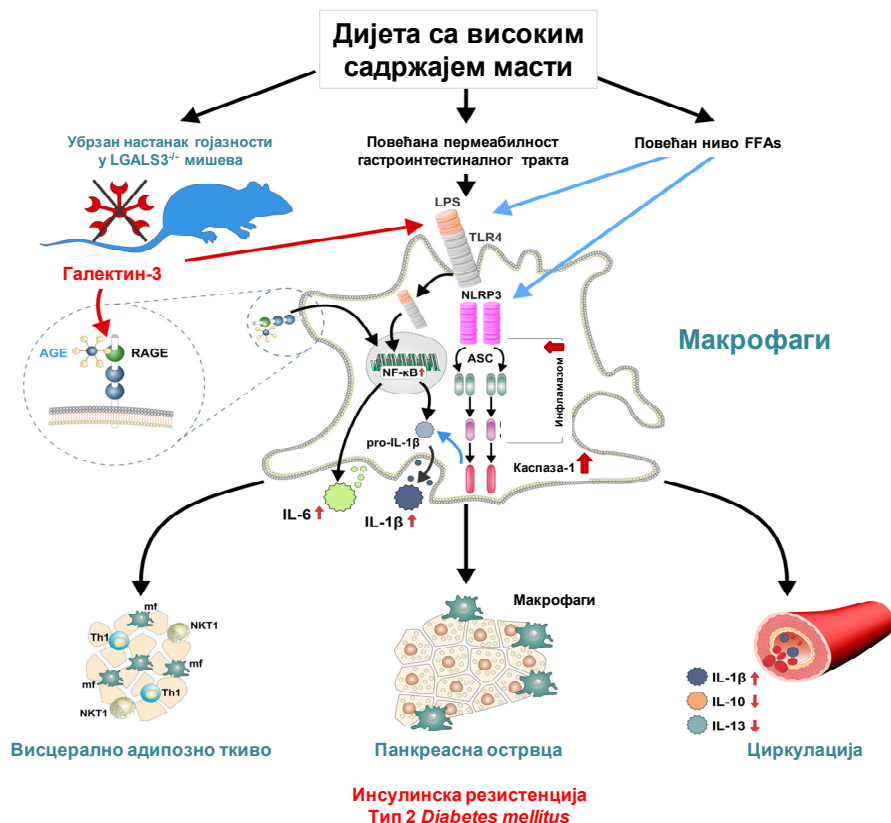


Схема 2. Галектин-3 је важан регулатор гојазности, метафламације и тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Дијета са високим садржајем масти повећава концентрацију ендотоксина (метаболичка ендотоксемија) и zasiћених масних киселина у циркулацији, који делују као стресори ткивних макрофага. Активирани макрофаги у метаболичким ткивима, укључујући масно ткиво и панкреасна острвца, продукују про-инфламаторне цитокине, TNF- α , IL-6 и IL-1 β , и хемокине који додатно привлаче ћелије имунског система и промовишу системско запаљење. Галектин-3 везује ендотоксин и делује као рецептор чистач за крајње продукте гликозилације и липооксидације протеина. Метаболички стресори активирају TLR4, рецептор за LPS, и индукују активацију NF- κ B сигналног пута и NLRP3 инфламазома и следствену продукцију IL-1 β који игра кључну улогу у настанку инсулинске резистенције. Делетија гена за галектин-3 убрзава развој гојазности и системске инфламације и промовише инфламацију у адипозном ткиву и панкреасним острвцима што се манифестује повећаном инфилтрацијом тип 1 Т и NKT лимфоцита и про-инфламаторних макрофага у адипозно ткиво, као и повећаном експресијом NLRP3 инфламазома и IL-1 β у макрофагима у панкреасним острвцима. Повећана експресија AGE преко рецептора RAGE активира NF- κ B сигнални пут. LPS и палмитат активирају NLRP3 инфламазом и индукују каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β . Повећан ниво IL-1 β и снижен ниво IL-10 и IL-13 у системској циркулацији доприносе прогресији инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а.

СКРАЋЕНИЦЕ

AGE	крајњи производи гликозилације протеина (енгл. <i>advanced glycation end-products</i>)
ALE	крајњи производи липооксидације протеина (енгл. <i>advanced lipoxidation end-products</i>)
ASC	(енгл. <i>apoptotic speck protein</i>)
BMI	индекс телесне масе (енгл. <i>body mass index</i>)
BMDCs	дендритске ћелије пореклом из костне сржи (енгл. <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>)
BSA	албумин телећег серума (енгл. <i>bovine serum albumin</i>)
CARD	(енгл. <i>caspase recruitment and activation domain</i>)
CCR2	(енгл. <i>C-C chemokine receptor type 2</i>)
CCR5	(енгл. <i>C-C chemokine receptor type 5</i>)
CD	(енгл. <i>cluster of differentiation</i>)
Con A	конканавалин А (енгл. <i>concanavalin A</i>)
CRD	домен за препознавање угљених хидрата (енгл. <i>carbohydrate recognition domain</i>)
CRP	С реактивни протеин (енгл. <i>C reactive protein</i>)
DAMP	молекулски обрасци оштећених ћелија (енгл. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMEM	(енгл. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAE	експериментални аутоимунски енцефаломијелитис
ELISA	(енгл. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)

FBS	фетални телећи серум (енгл. <i>fetal bovine serum</i>)
FFAs	слободне масне киселине (енгл. <i>free fatty acids</i>)
FIAU	(енгл. <i>1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil</i>)
FoxP3	(енгл. <i>forkhead box P3</i>)
GLUT4	транспортер за глукозу тип 4 (енгл. <i>glucose transporter type 4</i>)
HbA1c	гликозилирани хемоглобин-A1c (енгл. <i>glycated hemoglobin-A1c</i>)
HBSS	(енгл. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HDL	липопротеини велике густине (енгл. <i>high-density lipoprotein</i>)
HFD	дијета са високим садржајем масти (енгл. <i>high-fat diet</i>)
HMGB-1	(енгл. <i>high mobility group box-1</i>)
HOMA-IR	(енгл. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>)
IKK-β	инхибитор κВ киназе-β (енгл. <i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>)
IFN-γ	интерферон-γ (енгл. <i>interferon-γ</i>)
IL	интерлеукин (енгл. <i>interleukin</i>)
IL-1Ra	IL-1 рецептор антагонист (енгл. <i>IL-1 receptor antagonist</i>)
IRS-1	инсулин рецептор супстрат-1 (енгл. <i>insulin receptor substrate-1</i>)
JNKs	c-Jun N-терминалне киназе (енгл. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
LDL	липопротеини мале густине (енгл. <i>low-density lipoprotein</i>)
LFD	дијета са ниским садржајем масти (енгл. <i>low-fat diet</i>)
LPS	липополисахарид (енгл. <i>lipopolysaccharide</i>)
LTB4	(енгл. <i>leukotriene B4</i>)

MCP-1	(енгл. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
MMP	матриксна металопротеиназа (енгл. <i>matrix metalloproteinase</i>)
NADPH оксидаза	(енгл. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>)
NF-κB	нуклеарни фактор-κB (енгл. <i>nuclear factor kappa-B</i>)
NK ћелије	урођено убилачке ћелије (енгл. <i>natural killer cells</i>)
NKT ћелије	урођено убилачке T ћелије (енгл. <i>natural killer T cells</i>)
NLRs	рецептори слични NOD-у (енгл. <i>nucleotide binding and oligomerization domain, NOD-like receptors</i>)
NLRP3	(енгл. <i>NOD-like receptor family; pyrin-containing domain 3</i>)
PAMP	молекулски обрасци микроорганизама (енгл. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	(енгл. <i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	протеин програмиране ћелијске смрти-1 (енгл. <i>programmed cell death protein-1</i>)
pNA	p-нитроанилин (енгл. <i>p-nitroaniline</i>)
PRR	рецептор за молекулске обрасце (енгл. <i>pattern recognition receptor</i>)
PPAR-γ	(енгл. <i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>)
PYD	домен 3 који садржи пирин (енгл. <i>pyrin-containing domain 3</i>)
Rag-1	активациони ген рекомбинације-1 (енгл. <i>recombination activating gene-1</i>)
RAGE	рецептор за AGE (енгл. <i>receptor for advanced glycation end-products, RAGE</i>)
RANTES	(енгл. <i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>)
RNA	рибонуклеинска киселина (енгл. <i>ribonucleic acid</i>)

SDS	(енгл. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	(енгл. <i>small interfering RNA</i>)
SOCS	протеини који супримирају сигнализацију цитокина (енгл. <i>suppressor of cytokine signaling</i>)
SRs	рецептори чистачи (енгл. <i>scavenger receptors</i>)
STAT3	(енгл. <i>signal transducer and activator of transcription-3</i>)
TCR	T ћелијски рецептор (енгл. <i>T cell receptor</i>)
TGF- β	трансформишући фактор раста- β (енгл. <i>transforming growth factor-β</i>)
Th	помагачки T лимфоцити (енгл. <i>T helper</i>)
TLR	рецептор сличан Toll-у (енгл. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (енгл. <i>tumor necrosis factor-α</i>)
VCAM1	ћелијски адхезивни протеин крвних судова-1 (енгл. <i>vascular cell adhesion protein-1</i>)
VLDL	липопротеини веома мале густине (енгл. <i>very low-density lipoprotein</i>)

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Health percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:694-701.
2. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* 2005; 293:1861-1867.
3. Klein S, Romjin JA. Chapter 35. Obesity in Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of endocrinology*. Saunders Elsevier 2008; 1563-1587.
4. Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Yudkin JS, Heine RJ, Nijpels G, Seidell JC. Hoorn study. Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels: theHoorn study. *Diabetes Care* 2004; 27:372-377.
5. Kuk JL, Katzmarzyk PT, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:336-341.
6. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991; 14:1132-1143.
7. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 1994; 74:761-811.
8. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adams PW. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54:254-260.

9. Kahn R1, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 2005; 48(9):1684-99.
10. Bergman RN. Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia* 2000; 43:946-952.
11. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2009; 9(1): 26–32.
12. Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 24(suppl).S111-S116.
13. Bavenholm PN, Pigon J, Ostenson CG, Efendic S. Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance. *Diabetes* 2001; 50:1449-1454.
14. Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22:414-423.
15. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46:1768-1774.
16. Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Chapter 30: Type 2 diabetes mellitus. In Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of endocrinology*. Saunders Elsevier 2008;1329-1389.

17. Svedberg J, Björntorp P, Smith U, Lönnroth P. Freefatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39:570-574.
18. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46: 3-10.
19. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(Suppl 4):S12-21.
20. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46: 733–749.
21. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 2009; 5:150-159.
22. Sam S, Haffner S, Davidson MH, D'Agostino RB Sr, Feinstein S, Kondos G, Perez A, Mazzone T. Relationship of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue with lipoprotein particle number and size in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57:2022–2027.
23. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113:1582-1588.
24. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011 February; 11(2): 85–97.
25. Klein S, Romjin JA. Chapter 35: Obesity. In Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of endocrinology*. Saunders Elsevier 2008; 1563-1587.
26. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 1990; 113:909-915.

27. Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. Islet Inflammation Impairs the Pancreatic b-Cell in Type 2 Diabetes. *Physiology* 2009; 24:325-331.
28. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:98–107.
29. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest* 1983; 71:1544–1553.
30. Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J Clin Invest* 1986; 77:908–915.
31. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999; 48:738–744.
32. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 2004; 53:S16–S21.
33. Yki-Jarvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes* 1987; 36:892–896.
34. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37:1020-1024.
35. Walker KZ, O'Dea K, Johnson L, Sinclair AJ, Piers LS, Nicholson GC, Muir JG. Body fat distribution and non-insulindependent diabetes: comparison of a fiber-rich, highcarbohydrate, low-fat (23%) diet and a 35% fat diet high in monounsaturated fat. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:254–260.

36. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β -cell turnover and function. *Diabetes* 2003; 52:726–733.
37. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes* 2001; 50:69–76.
38. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 2010; 1801:209–214.
39. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008; 29:351–366.
40. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23:599–622.
41. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52:1–8.
42. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 2003; 42:7–14.
43. Izumi T, Yokota-Hashimoto H, Zhao S, Wang J, Halban PA, Takeuchi T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 2003; 52:409–416.
44. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140:900–917.

45. Zraika S, Hull RL, Verchere CB, Clark A, Potter KJ, Fraser PE, Raleigh DP, Kahn SE. Toxic oligomers and islet β cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia* 2010; 53:1046–1056.
46. Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 2008; 14:1225–1230.
47. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008; 118:2992–3002.
48. Williamson RT. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. *BMJ* 1901; 1:760–762.
49. Feingold KR, Soued M, Staprans I, Gavin LA, Donahue ME, Huang BJ, Moser AH, Gulli R, Grunfeld C. Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1989; 83:1116–1121.
50. Grunfeld C, Feingold KR. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy* 1991; 3:143–158.
51. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87–91.
52. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389:610–614.
53. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κ)B kinase- β . *Nature* 1998; 396:77–80.

54. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 2001; 293:1673–1677.
55. Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 (suppl. 3):S49–S52.
56. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420:333–336.
57. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:10741–10746.
58. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–1830.
59. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Med* 2005; 11:183–190.
60. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51:2005–2011.
61. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 2005; 54:2351–2359.

62. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796–1808.
63. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72:219–246.
64. Chakrabarti SK, Wen Y, Dobrian AD, Cole BK, Ma Q, Pei H, Williams MD, Bevard MH, Vandenhoff GE, Keller SR, Gu J, Nadler JL. Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300:E175–E187.
65. Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes* 2005; 29:146–150.
66. Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175:81–92.
67. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891–928.
68. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006; 116:115–124.
69. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453–461.
70. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Chapter 10. Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity. In: *Cellular and Molecular Immunology*. Seventh edition. Elsevier Saunders 2012; 225-242.

71. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:451–483.
72. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–184.
73. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; 56:16–23.
74. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007; 282:35279–35292.
75. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:23–35.
76. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* 2009; 58:2574-2582.
77. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O'Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Orešič M, Ricote M, Vidal-Puig A. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 2011; 60:797–809.
78. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine* 2012; 18(3):363-374.

79. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009; 15:930-939.
80. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009; 15(8):921-929.
81. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009; 15:914-920.
82. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348–2357.
83. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, Engleman EG. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 2011; 17:610–617.
84. Hellman B, Larsson S, Westman S. Mast cell content and fatty acid metabolism in the epididymal fat pad of obese mice. *Acta Physiol Scand* 1963; 58:255–262.
85. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clément K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 2009; 15:940–945.

86. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 2011; 332:243–247.
87. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J Biol Chem* 2002; 277:48115–48121.
88. Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 2003; 278:24944–24950.
89. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4640–4645.
90. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; 130:440–455.
91. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 2000; 275:15985–15991.
92. Kawazoe Y, Naka T, Fujimoto M, Kohzaki H, Morita Y, Narazaki M, Okumura K, Saitoh H, Nakagawa R, Uchiyama Y, Akira S, Kishimoto T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 2001; 193(2):263-9.

93. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24:5434–5446.
94. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *J Am Med Assoc* 2001; 286:327–334.
95. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008; 322:1539–1543.
96. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, Zaffino LA, Babb JR, Boon J, Meikle PJ, Jowett JB, Watt MJ, Jansson JO, Bruce CR, Febbraio MA. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 2010; 53:2431–2441.
97. Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem* 2011; 286:30926–30936.
98. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54 (suppl. 2):S114–S124.
99. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3–L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 1991; 266:21839–21845.
100. Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374:405–408.

101. Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, Watt MJ, Benner C, Febbraio MA, Nguyen AK, Folian B, Subramaniam S, Gonzalez FJ, Glass CK, Ricote M. Macrophage PPAR- γ is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2007; 117:1658–1669.
102. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; 447:1116–1120.
103. Jotic A, Covickovic Sternic N, Kostic VS, Lalic K, Milicic T, Mijajlovic M, Lukic L, Covicic M, Colak E, Macesic, Seferovic JP, Aleksic S, Lalic NM. Type 2 diabetic patients with ischemic stroke: decreased insulin sensitivity and decreases in antioxidant activity are related to different stroke subtypes. *Int J Endocrinol* 2013; 2013:401609. doi: 10.1155/2013/401609.
104. Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, Knotts TA, Shui G, Clegg DJ, Wenk MR, Pagliassotti MJ, Scherer PE, Summers SA. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:1858–1870.
105. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, Zhang R, Kelly KR, Defronzo RA, Kirwan JP. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009; 58:337–343.
106. Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 1993; 268:15523–15530.
107. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. Adipose tissue is a major

- source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes* 2003; 52:1104–1110.
108. Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS. Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274:31868–31874.
109. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 2004; 53:1060–1067.
110. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 2008; 7:496–507.
111. Obstfeld AE, Sugaru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, Ables EV, Ferrante AW Jr. C–C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 2010; 59:916–925.
112. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385:351–356.
113. Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298:G107–G116.
114. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 1981; 30:1000–1007.

115. Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 2009;58:2525–2535.
116. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R698–R709.
117. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF α by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 97:1111–1116.
118. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146:4192–4199.
119. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; 40:140–155.
120. Münzberg H, Flier JS, Bjørbæk C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004; 145:4880–4889.
121. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008; 135:61–73.
122. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 2007; 56:2356–2370.

123. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced β -cell production of interleukin-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110:851–860.
124. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 2011; 12:5–9.
125. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011; 121:2126–2132.
126. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116:3015–3025.
127. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, Corthesy I, Macé K, Chou CJ. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J* 2008; 22:2416–2426.
128. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932–936.
129. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E333–E342.
130. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 2009; 58:718–725.
131. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for

- ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 2003; 161:1233–1243.
132. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347–55.
133. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56:2910–2918.
134. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11:191–198.
135. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J* 2010; 24:2596–2611.
136. Yan SF, Ramasamay R, Schmidt AM. The Rage Axis. A Fundamental Mechanism Signaling Danger to the Vulnerable Vasculature. *Cir Res* 2010; 106:842-853.
137. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 2008; 322:1539–1543.
138. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 2007; 6:386–397.
139. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:10741–10746.

140. Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004; 119:285–298.
141. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008; 135:61–73.
142. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. Conditional and specific NF- κ B blockade protects pancreatic β cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:5072–5077.
143. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response – the evidence mounts. *J Leukoc Biol* 2009; 86:505–512.
144. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling. *J Biol Chem* 1999; 274(44):31740-31749.
145. Somoza V, Lindenmeier M, Hofmann T, Frank O, Erbersdobler HF, Baynes JW, Thorpe SR, Heidland A, Zill H, Bek S, Huber J, Weigle T, Scheidler S, Busch AE, Sebekova K. Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:492-500.
146. Chang JS, Wendt T, Qu W, Kong L, Zou YS, Schmidt AM, Yan SF. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res* 2008; 102:905–913.

147. Schmidt AM, Sahagan B, Nelson RB, Selmer J, Rothlein R, Bell JM. The role of RAGE in amyloid-beta peptide-mediated pathology in Alzheimer's disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10:672– 680.
148. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrad R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91:2155–2168.
149. Hou FF, Miyata T, Boyce J, Yuan Q, Chertow GM, Kay J, Schmidt AM, Owens WF. beta(2) Microglobulin modified with advanced glycation end products delays monocyte apoptosis. *Kidney Int* 2001;59:990 –1002.
150. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation endproducts. *J Immunol* 2005; 174(12):7506-15.
151. Moser B, Szabolcs MJ, Ankersmit HJ, Lu Y, Qu W, Weinberg A, Herold KC, Schmidt AM. Blockade of RAGE suppresses alloimmune reactions in vitro and delays allograft rejection in murine heart transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:293–302.
152. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. RAGE Ligation Affects T Cell Activation and Controls T Cell Differentiation. *J Immunol* 2008;181;4272-4278.
153. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation endproducts and cardiovascular disease. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e9.
154. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011; 479:117–121.

155. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 2002; 10:417–426.
156. Kanneganti T. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:688–698.
157. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* 2012; 13(4):333-342.
158. de Alba E. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem* 2009; 284:32932–32941.
159. Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan P, Witzenrath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 β , depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol* 2010; 184:922–930.
160. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, Hornung V. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40:1545–1551.
161. Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, Brickey WJ, Huang MT, Taxman DJ, Duncan JA, Ting JP. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2009; 183:2008–2015.
162. Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, Ting JP. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol* 2009; 182:6460–6469.

163. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, Fitzgerald KA. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5:487–497.
164. 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.
165. 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.
166. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem* 2009; 284:12762–12771.
167. 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.
168. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011; 17:179–88.
169. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013; 62(1):194-204.
170. Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269:20807–20810.

171. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:237–264.
172. Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:209-231.
173. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19:433–440.
174. 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.
175. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Transact* 1997; 25:1194–1198.
176. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:172–185.
177. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29-41.
178. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1183: 158–182.
179. Rini JM. and Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9:578–584.
180. 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.
181. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e17.

182. Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 1992; 267:14 167–14 174.
183. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews* 2009; 230: 160–171.
184. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. b-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:2311–2319.
185. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:263–273.
186. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
187. Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Brazil J Med Biol Res* 1999; 32:383–393.
188. 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.
189. 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.
190. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128: 1221-1228.

191. Roff CF, Wang JI. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; 258:10657-10663.
192. Liu FT, Orida N. Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1984; 259(17):10649-10652.
193. Cerra RF, Gitt MA. and Barondes SH. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *J Biol Chem* 1985; 260(19):10474-10477.
194. Sparrow CP, Leffler H. and Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262(15):7383-7390.
195. Raz A, Meromsky L, Zvibel I, Lotan R. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer* 1987; 39:353-360.
196. 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.
197. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597–598.
198. 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.
199. Agrwal N, Sun Q, Wang SY, Wang JL. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem* 1993; 268:14932-14939.

200. Mehul B, Bawumia S, Martin SR, Hughes RC. Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP30, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 1994; 269:18230-18258.
201. 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.
202. 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.
203. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19:527-535.
204. Almkvist J. and Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19: 575-581.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. 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.

209. Yang RY, Hsu DK and Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6737-6742.
210. Domic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616–635.
211. Newlaczyl AU, Yu LG. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett* 2011; 313:123-128.
212. Tsay YG, Lin NY, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL. Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 1999; 252: 250-261.
213. Funasaka T, Balan V, Raz A, Wong RW. Nucleoporin Nup98 mediates galectin-3 nuclear-cytoplasmic trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434: 155-161.
214. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T, Raz A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:7546-7553.
215. 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.
216. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1213-1217.
217. 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. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:3595-3602.

218. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 2005; 65: 3535-3537.
219. 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.
220. 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.
221. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev* 2009; 230:114–127.
222. 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.
223. Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Downregulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:661–668.
224. Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001; 18(4):787–792.
225. Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem* 2004; 279(33):34922–34930.
226. Ashery U, Yizhar O, Rotblat B, Elad-Sfadia G, Barkan B, Haklai R, Kloog Y. Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasosomes and the galectin switch. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26(4–6):471–495.

227. 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.
228. 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(18):6363–6367.
229. Inohara H, Raz A. Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res* 1995; 55(15):3267–3271.
230. Inohara H, Akahani S, Koths K, Raz A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell–cell adhesion. *Cancer Res* 1996; 56(19):4530–4534.
231. Khaldoyanidi SK, Glinsky VV, Sikora L, Glinskii AB, Mossine VV, Quinn TP, Glinsky GV, Sriramarao P. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J Biol Chem* 2003; 278:4127–4134.
232. Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K, Huflejt ME, Glinskii OV, Deutscher SL, Quinn TP. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 2001; 61:4851–4857.
233. Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* 2004; 19:543–549.
234. Krishnan V, Bane SM, Kawle PD, Naresh KN, Kalraiya RD. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22(1):11–24.
235. Zhao Q, Barclay M, Hilkens J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* 2010; 9:154.

236. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28(5):451–462.
237. O’Driscoll L, Linehan R, Liang YH, Joyce H, Oglesby I, Clynes M. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res* 2002; 22(6A):3117–3125.
238. Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 2000; 85(4):545–554.
239. Kim SJ, Shin JY, Lee KD, Bae YK, Choi IJ, Park SH, Chun KH. Galectin-3 facilitates cell motility in gastric cancer by up-regulating protease-activated receptor-1 (PAR-1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). *PLoS One* 2011; 6(9):e25103.
240. 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(3):899–909.
241. Califice S, Castronovo V, Van Den Bru’le F. Galectin-3 and cancer (review). *Int J Oncol* 2004; 25(4):983–992.
242. Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der Smissen P, Colau D, Luescher IF, Hivroz C, Nicaise J, Squifflet JL, Mourad M, Godelaine D, Boon T, van der Bruggen P. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity* 2008; 28(3):414–424.
243. Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol* 2006; 168(5):1666–1675.

244. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996;156:3939–3944.
245. 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.
246. Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Björstad A, Brown KL, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H, Bylund J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 2009;19:16–20.
247. Frigeri LG, Zuberi RI, 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.
248. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR. Expression and function of galectin-3, β -galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 1995; 147:1016–1028.
249. 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.
250. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp /Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 1995;154:3479–3487.
251. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073–1083.

252. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 2006; 177:4718–4726.
253. Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol* 2008;172:395–405.
254. Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 1998; 91:3430–3438.
255. Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology* 2005; 15:519–527.
256. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol* 1999;163:5592–5598.
257. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing “danger”: galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004;19:583–591.
258. 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(1):10–21.
259. 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(3):1902–1907.

260. 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.
261. Pelletier I, Sato S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem* 2002; 277(20):17663–17670.
262. 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 *Trypanozoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2007; 170(2):546–556.
263. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, HsuDK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006;168(6):1910–1920.
264. Ruas LP, Bernardes ES, Fermino ML, de Oliveira LL, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque Barreira MC. Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2- biased immunity. *PLoS One* 2009;4(2):e4519.
265. 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; 75:5148–5157.
266. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69(4):555-564.

267. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010; 185:7037–7046.
268. 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(6):1954-1964.
269. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2004; 19:441–449.
270. Ocklenburg F, Moharreg-Khiabani D, Geffers R, Janke V, Pfoertner S, Garritsen H, Groebe L, Klempnauer J, Dittmar KE, Weiss S, Buer J, Probst-Kepper M. UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* 2006; 86:724–737.
271. Fahrer AM, Konigshofer Y, Kerr EM, Ghandour G, Mack DH, Davis MM, Chien YH. Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10 261–10 266.
272. Haining WN, Angelosanto J, Brosnahan K, Ross K, Hahn C, Russell K, Drury L, Norton S, Nadler L, Stegmaier K. High-throughput gene expression profiling of memory differentiation in primary human T cells. *BMC Immunol* 2008; 9:44.
273. Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 2006; 176:778–789.
274. 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.
275. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, Maverakis E, Yang RY, Hsu DK, Dustin ML, Liu FT. Galectin-3 negatively regulates TCR-

- mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(34):14496-14501.
276. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res* 2008; 68:7228–7236.
277. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu FT, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009;182(2):1167–1173.
278. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010;185:7037–7046.
279. Forsman H, Islander U, Andreasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlstrom A, Savman K, Magnusson M, Brown KL, Karlsson A. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63:445–454.
280. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol* 2009; 130:83–88.
281. Saksida T, Nikolic I, Vujicic M, Nilsson UJ, Leffler H, Lukic ML, Stojanovic I, Stosic-Grujicic S. Galectin-3 Deficiency Protects Pancreatic Islet Cells From Cytokine-Triggered Apoptosis In Vitro. *J Cell Physiol* 2013;228(7):1568-1576.
282. Karlsten AE, Størling ZM, Sparre T, Larsen MR, Mahmood A, Størling J, Roepstorff P, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey S, Nielsen K, Heding P, Ricordi C, Johannesen J, Kristiansen OP, Christensen UB, Kockum I, Luthman H, Nerup J, Pociot F. Immune-mediated beta-cell destruction in vitro and in vivo-A pivotal role for galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:406–415.

283. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res* 1998; 245:294–302.
284. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; 278:18 938–18 944.
285. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:5060–5065.
286. Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol* 1999; 187:481–489.
287. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3121–3128.
288. 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.
289. Helming L, Gordon S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *Eur J Immunol* 2007; 37:33–42.
290. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *J Dermatol Sci* 2003; 31: 119–128.

291. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, Berberat PO, Büchler MW. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest* 2000; 80:1233–1241.
292. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, Kawashima S, Tanabe M, Goto T, Matsuzawa Y, Matsumura R, Tomioka H, Liu FT, Shirai K. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int* 2007; 56:57–65.
293. deFilippi CR, Felker GM. Galectin-3 in heart failure-linking fibrosis, remodeling, and progression *US Cardiology* 2010; 7:67-70.
294. Lok D, van der Meer P, de La Porte PM, et al. Galectin-3, a novel marker of macrophage activity, predicts outcome in patients with stable chronic heart failure *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:98A.
295. de Boer RA, Yu L, van Veldhuisen DJ. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2010;7:1-8.
296. Martínez-Martínez E, Jurado-López R, Valero-Muñoz M, Bartolomé MV, Ballesteros S, Luaces M, Briones AM, López-Andrés N, Miana M, Cachofeiro V. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. *J Hypertens* 2014; 32(5):1104-1114.
297. Pugliese G, Pricci F, Iacobini C, Leto G, Amadio L, Barsotti P, Frigeri L, Hsu DK, Vlassara H, Liu FT, Di Mario U. Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice. *FASEB J* 2001; 15:2471–2479.
298. Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, Olivieri A, Sorcini M, Di Mario U, Pesce C, Pugliese G. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J* 2004; 18:1773–1775.
299. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Scipioni A, Sansoni V, Cordone S, Taurino M, Serino M, Marano G, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Accelerated lipid-induced

- atherogenesis in Galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:831-836.
300. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol* 2006; 210(4):469-477.
301. 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.
302. 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.
303. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14(15):32.
304. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
305. 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.
306. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–419.
307. Boitard C, Debray-Sachs M, Pouplard A, Assan R, Hamburger J. Lymphocytes from diabetics suppress insulin release in vitro. *Diabetologia* 1981; 21:41–46.

308. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124.
309. Heidenhain M. Noch einmal uber die darstellung der centralkorper durch eishamatoxylin nebst einigen allgemeinen bemerkungen uber die hamatoxylinfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1896; 13:186.
310. Gurr AB. Biological staining methods. Hopkin and Williams Chadowell Heath 1976.
311. Hall TR, Bogdani M, Leboeuf RC, Kirk EA, Maziarz M, Banga JP, Oak S, Pennington CA, Hampe CS. Modulation of diabetes in NOD mice by GAD65 specific monoclonal antibodies is epitope specific and accompanied by anti-idiotypic antibodies. *Immunology* 2008; 123:547–554.
312. Lohmann C, Schäfer N, von Lukowicz T, Sokrates Stein MA, Borén J, Rütli S, Wahli W, Donath MY, Lüscher TF, Matter CM. Atherosclerotic mice exhibit systemic inflammation in periadventitial and visceral adipose tissue, liver, and pancreatic islets. *Atherosclerosis* 2009; 207:360–367.
313. Saksida T, Stosic-Grujicic S, Timotijevic G, Sandler S, Stojanovic I. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 2012; 90:688–698.
314. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
315. Fuchs U, Damm-Welk C, Borkhardt A. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr Mol Med* 2004; 4(5):507-517.
316. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of Disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Endocrinol Metabol* 2008; 4(5):285-293.

317. Christensen UB, Kockum I, Luthman H, Nerup J, Pociot F. Immune-mediated beta-cell destruction in vitro and in vivo-A pivotal role for galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344(1):406-415.
318. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, Cooper D, Perretti M, Fantuzzi G. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One* 2013; 8(2):e57915.
319. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004; 27:1487–1495.
320. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46: 733–749.
321. Adiels M, Westerbacka J, Soro-Paavonen A, Häkkinen AM, Vehkavaara S, Caslake MJ, Packard C, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Taskinen MR, Borén J. Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia* 2007; 50:2356–2365.
322. Kodama S, Saito K, Yachi Y, Asumi M, Sugawara A, Totsuka K, Saito A, Sone H. Association Between Serum Uric Acid and Development of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1737–1742.
323. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132:2169–2180.
324. Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008;3:545–556.
325. Mariotti S, Sargentini V, Marcantonio C, Todero E, Teloni R, Gagliardi MC, Ciccaglione AR, Nisini R. T-cell-mediated and antigen-dependent differentiation of human monocyte into different dendritic cell subsets: a feedback control of Th1/Th2 responses. *FASEB J* 2008; 22:3370–3379.

326. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993; 259:1739–1742.
327. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nature Medicine* 2009; 15(8):846-847.
328. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky M, Barth TFE, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:1304-1310.
329. Strissel KJ, DeFuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1918–1925.
330. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Höfer T. Sequential Polarization and Imprinting of Type 1 T Helper Lymphocytes by Interferon-[gamma] and Interleukin-12. *Immunity* 2009; 30:673–83.
331. Nembrini C, Abel B, Kopf M, Marsland BJ. Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *J Immunol* 2006; 176:7180–7188.
332. Heckford S, Gelmann E, Agnor C, Jacobson S, Zinn S, Matis L. Distinct signals are required for proliferation and lymphokine gene expression in murine T cell clones. *J Immunol* 1986; 137:3652–3663.
333. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:1557–1569.

334. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith W, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 2007; 115:1029-1038.
335. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, Libby P. Interferon- γ , a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circulation Research* 2008; 103:467-476.
336. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes wiiittth innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:354-364.
337. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoé K, Tsutsui H. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:193–199.
338. Wu L, Parekh VV, Gabriel CL, Bracy DP, Marks-Shulman PA, Tamboli RA, Kim S, Mendez-Fernandez YV, Besra GS, Lomenick JP, Williams B, Wasserman DH, Van Kaer L. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *PNAS* 2012; 109(19):E1143-52.
339. Ji Y, Sun S, Xu A, Bhargava P, Yang L, Lam KSL, Bin Gao B, Lee CH, Kersten S, Qi L. Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose Tolerance via the IL-4/STAT6 Signaling Axis in Obesity. *JBC* 2012.doi/10.1074/jbc.M112.350066.
340. Ilan Y, Maron R, Tukpah AM, Maioli TU, Murugaiyan G, Yang K, Wu HY, Weiner HL. Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9765–9770.

341. De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A, Matarese G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007; 26:241–255.
342. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the antiinflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323:630–635.
343. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology* 1996; 8(5):765–772.
344. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:451694.
345. Shi B1, Du X, Wang Q, Chen Y, Zhang X. Increased PD-1 on CD4(+)CD28(-) T cell and soluble PD-1 ligand-1 in patients with T2DM: association with atherosclerotic macrovascular diseases. *Metabolism*. 2013; 62(6):778-85.
346. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; 236:219–242.
347. Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard X-YD, Ma RD, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, Ballantyne CM. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* 2009; 119:2708 – 2717.
348. Zhao L, Moos MP, Grabner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lotzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med* 2004; 10:966–973.

349. Wu H, Perrard XD, Wang Q, Perrard JL, Polsani VR, Jones PH, Smith SW, Ballantyne CM. CD11c Expression in Adipose Tissue and Blood and Its Role in Diet-Induced Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:186-192.
350. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 2010; 59:1648–1656.
351. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275:731–738.
352. Pickup J C, Mattock M B, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; 40:1286–1292.
353. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-potsdam study. *Diabetes* 2003; 52:812–817.
354. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286:327–334.
355. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389:610-614.
356. Ferraz LC, Bernardes ES, Oliveira AF, Ruas LP, Fermino ML, Soares SG, Loyola AM, Oliver C, Jamur MC, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC.

- Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. *Eur J Immunol* 2008; 38:2762–2775.
357. Ban Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002; 51:1088–1092.
358. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1055–1058.
359. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Krukowska A, Gorska M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. *Diabetes Care* 2005; 28:2036–2037.
360. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001; 103:131–136.
361. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:169–175.
362. Mobergslien A, Sioud M. Galectin-1 and -3 gene silencing in immature and mature dendritic cells enhances T cell activation and interferon-g production. *J Leukoc Biol* 2012; 91:461–467.
363. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2008; 7(6):485–495.
364. Stanya KJ, Jacobi D, Liu S, Bhargava P, Dai L, Gangl MR, Inouye K, Barlow JL, Ji Y, Mizgerd JP, Qi L, Shi H, McKenzie AN, Lee CH. Direct control of hepatic glucose production by interleukin-13 in mice. *J Clin Invest* 2013; 123:261–271.

365. Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehses JA. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* 2008; 31:S161–S164.
366. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces β -cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50:1683–1690.
367. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nuñez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunol* 2010; 11:897–904.
368. Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett* 2000; 473:311–315.
369. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:267–276.
370. Darrow AL, Shohet RV, Maresh JG. Transcriptional analysis of the endothelial response to diabetes reveals a role for galectin-3. *Physiol Genomics* 2011; 43:1144–1152.
371. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007; 148:241–251.
372. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007; 356:1517–1526.

373. Osborn O, Brownell SE, Sanchez-Alavez M, Salomon D, Gram H, Bartfai T. Treatment with an Interleukin-1 β antibody improves glycemic control in diet induced obesity. *Cytokine* 2008; 44:141–148.
374. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:535–542.
375. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428–435.
376. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227:95–105.
377. 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.
378. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:545–549.
379. Ehses JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, Schraenen A, Lemaire K, Debray S, Van Lommel L, Pospisilik JA, Tschopp O, Schultze SM, Malipiero U, Esterbauer H, Ellingsgaard H, Rütli S, Schuit FC, Lutz TA, Böni-Schnetzler M, Konrad D, Dona. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and β cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 2010; 53:1795–1806.
380. Haversen L, Danielsson KN, Fogelstrand L, Wiklund O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis* 2009; 202:382–393.
381. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:16683–16689.

382. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem* 2004; 279:16971–16979.
383. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:519–550.
384. 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.
385. 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.
386. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:372–379.
387. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140:821–832.
388. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NLRP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440:237–241.
389. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Tze-Han Huang M, Brickey WJ, Ting JPY. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011; 12(5):408-416.
390. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 2010; 327:296–300.
391. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1b in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17:314–321.

392. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009; 12:593–605.
393. Baba SP, Hellmann J, Srivastava S, Bhatnagar A. Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chem Biol Interact* 2011; 191(1-3):357–363.
394. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersele de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997; 100(12):2995–3004.
395. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99(3):457–468.
396. Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 2008; 263:479–488.
397. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:297–329.
398. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*. 2003; 25:283–292.

399. Li JH, Wang W, Huang XR, Oldfield M, Schmidt AM, Cooper ME, Lan HY. Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol* 2004; 164(4):1389–1397.
400. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* 2009; 87(3):235–247.
401. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(5):E685–694.
402. Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Miyazaki A, Horiuchi S. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:1183–1188.
403. Zong H1, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2011; 11(4):244-252.
404. Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF- κ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett* 2012; 586: 1022–1026.
405. 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.
406. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57:1470–1481.
407. Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T, Saiki I. Tumor necrosis factor- α -induced IKK phosphorylation of NF- κ B p65 on

- serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 2003; 278:36916–36923.
408. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34:392–397.
409. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 1995; 80(4):573-82.
410. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 1996; 84(6):853-62.
411. Westwell-Roper C, Nackiewicz D, Dan M, Ehses JA. Toll-like receptors and NLRP3 as central regulators of pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes. *Immunol Cell Biol.* 2014; 92(4):314-323.

8. ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

Редни број:
РБ

Идентификациони број:
ИБР

Тип документације:
ТД

Монографска публикација

Тип записа:
ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:
ВР

Докторска дисертација

Аутор:
АУ

Јелена М. Пантић

Ментор/коментор
МН

Проф. др Миодраг Ј. Лукић

Наслов рада:
НР

Галектин-3 у патогенези гојазности и
тип 2 *Diabetes mellitus-a*

Језик публикације:
ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:
ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања: ЗП	Србија
Уже географско подручје: УГП	Србија
Година: ГО	2014.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 174 стране, садржи 8 поглавља, 15 фигура, 9 графикона, 4 табеле, 1 слику, 2 схеме и 411 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Имунологија
Предметна одредница/кључне речи: ПО	Галектин-3, гојазност, тип 2 <i>Diabetes mellitus</i> , инфламација, NLRP3 инфламазом, NF-κB, IL-1β
УДК	
Чува се: ЧУ	У Библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Важна напомена: МН	

Извод:

ИД

Патогенеза тип 2 *Diabetes mellitus*-а индукованог гојазношћу је базирана на инфламацији генерисаној у експандирајућем висцералном адипозном ткиву и инфилтрацији макрофага у панкреасна острвца. Метаболичка инфламација („метафламација“) је хронична инфламација ниског степена (енгл. *low-grade inflammation*) индукована бројним штетним метаболитима насталим у условима повећаног енергетског уноса и предиспонира настанак инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а. Галектин-3 је мултифункционални β -галактозид-везујући лектин експримиран у различитим ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације (цитоплазматска, нуклеарна, мембранска или екстраћелијска) учествује у регулацији бројних функција адаптивног и урођеног имунског одговора. Галектин-3 игра важну имунорегулаторну улогу у патогенези аутоимунских, инфламаторних и малигнух болести и вероватно различитим процесима регулације метаболичке хомеостазе.

Главни циљ студије је био да испита улогу галектина-3 у патогенези гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а у мишјем моделу гојазности индуковане применом дијете са високим садржајем масти. У студију су укључени мишеви којима је циљано уклоњен ген за галектин-3 (LGALS3^{-/-}), као и одговарајући галектин-3 позитивни мишеви (LGALS3^{+/+}) соја C57BL/6.

Аблација гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а што се манифестује увећањем телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, хипергликемијом, хиперинсулинемијом, увећањем гликозилираног хемоглобина (HbA1c), НОМА-IR (енгл. *homeostasis model assessment of insulin resistance*) и системских маркера инфламације у мишева на исхрани са високим садржајем масти. У висцералном адипозном ткиву гојазних LGALS3^{-/-} мишева је повећана инфилтрација тип 1 Т и НКТ лимфоцита и про-инфламаторних М1 макрофага, док је заступљеност регулаторних CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т лимфоцита и алтернативно активираних М2 макрофага значајно снижена у поређењу са

LGALS3^{+/+} мишевима на истој врсти дијете. У панкреасним острвцима LGALS3^{-/-} мишева на исхрани са високим садржајем масти документована је повећана инфилтрација мононуклеарних ћелија, повећана експресија NLRP3 инфламазома и интерлеукина-1 β (IL-1 β) у инфилтришућим макрофагима и појачано депоновање метаболита AGE (енгл. *advanced glycation end products*) и рецептора за AGE (RAGE), што је праћено повећаном експресијом фосфорилисаног нуклеарног фактора- κ B (NF- κ B) p65 и активне каспазе-1 у висцералном адипозном ткиву и панкреасним острвцима. *In vitro* стимулација перитонеалних макрофага LGALS3^{-/-} мишева липополисахаридом (LPS) и/или засићеном масном киселином палмитатом индукује појачану каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β и фосфорилацију NF- κ B p65 у поређењу са LGALS3^{+/+} мишевима. Искључивање гена за NLRP3 инфламазом у перитонеалним макрофагима LGALS3^{-/-} мишева методом трансфекције siRNA (енгл. *small interfering RNA*) атенуира продукцију IL-1 β у одговору на стимулацију палмитатом и LPS-ом.

Убрзана и појачана инфламација у висцералном адипозном ткиву и панкреасним острвцима галектин-3 дефицијентних мишева указује на важну протективну улогу галектина-3 у гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-у што би у будућности могло имати терапијске импликације.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 27.03.2013.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник:

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

Ментор:

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

Члан:

Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина

Члан:

Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду

Члан:

Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија

Члан:

Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија.

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Jelena M. Pantić

Menthor/co-mentor:

MN

Prof. dr Miodrag L. Lukić

Title:

TI

Galectin-3 in pathogenesis of obesity and type 2 *Diabetes mellitus*

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:
LP Serbia

Publication year:
PY 2014.

Publisher:
PU Author reprint

Publication place:
PP 34000 Kragujevac, Serbia,
Svetozara Markovica 69

Physical description:
PD Thesis contains 174 pages, 8 chapters,
15 figures, 9 graphs, 4 tables, 1 picture, 2
schemes and 411 citations

Scientific field:
SF Medicine

Scientific discipline:
SD Immunology

Subject/key words:
SKW Galectin-3, obesity, type 2 Diabetes
mellitus, inflammation, NLRP3
inflammasome, NF- κ B, IL-1 β

UDC

Holding data:
Library of Faculty of Medical Sciences
Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia,
Svetozara Markovica 69

Note:
N

Abstract:

AB

Obesity-induced type 2 Diabetes mellitus is associated with inflammation originated in expanding visceral adipose tissue and macrophage infiltration of pancreatic islets. Metabolic inflammation, “metaflammation,” is a chronic, low-grade adipose tissue inflammation triggered by various metabolic “danger” signals during obesity that precedes the development of insulin resistance and type 2 Diabetes mellitus. Galectin-3 is a multifunctional β -galactoside-binding lectin expressed by a variety of cell types. Depending on its cellular localization (cytoplasmic, nuclear, membrane-bound or extracellular), Galectin-3 regulates various T-cell functions and innate immune responses. Galectin-3 plays an important immunoregulatory role in pathogenesis of autoimmune, inflammatory and malignant diseases, but also in metabolic abnormalities.

The aim of this study was to investigate the role of Galectin-3 in high-fat diet (HFD)-induced obesity and associated metabolic abnormalities by using mice lacking galectin-3 (LGALS3^{-/-}) on a C57BL/6 background.

Ablation of galectin-3 accelerates high-fat diet-induced obesity and diabetes. Obese LGALS3^{-/-} mice have increased body weight, amount of total visceral adipose tissue, fasting blood glucose and insulin levels, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), glycated haemoglobin (HbA1c) and markers of systemic inflammation compared with diet-matched wild-type (LGALS3^{+/+}) animals. Visceral adipose tissue of obese LGALS3^{-/-} mice exhibited increased incidence of type 1 T and NKT lymphocytes and proinflammatory M1 macrophages and decreased CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and M2 macrophages. Pronounced mononuclear cell infiltrate, increased expression of NLRP3 inflammasome and interleukin-1 β (IL-1 β) in macrophages, and increased accumulation of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGE (RAGE) expression were present in pancreatic islets of obese LGALS3^{-/-} animals accompanied with elevated phosphorylated nuclear factor-kB (NF-kB) p65 and mature caspase-1 protein expression in pancreatic tissue and visceral adipose tissue. In vitro stimulation of LGALS3^{-/-} peritoneal macrophages with lipopolysaccharide

(LPS) and saturated fatty acid palmitate caused increased caspase-1–dependent IL-1 β production and increased phosphorylation of NF-kB p65 compared with LGALS3^{+/+} cells. Transfection of LGALS3^{-/-} macrophages with NLRP3 small interfering RNA attenuated IL-1 β production in response to palmitate and LPS plus palmitate.

Collectively, the amplified obesity-induced inflammation in adipose tissue and pancreatic islets in LGALS3^{-/-} mice suggest a protective role for Gal-3 in obesity and type 2 diabetes, which could be of therapeutic relevance.

Accepted by the Scientific Board on:
ASB

27.03.2013.

Defended on:
DE

Thesis defended board
(Degree/name/surname/title/faculty)
DB

President:

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

Menthor:

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

Member:

Academic, prof. dr Nebojša Lalić, Professor of Internal medicine, Faculty of Medicine, University of Belgrade

Member:

Dr Stanislava Stošić-Grujičić, Research professor at Institute for Biological Research "Sinisa Stankovic", Belgrade

Member:

Prof. dr Aleksandar Đukić, Professor of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member:

Prof. dr Nada Pejnović, Associate professor of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Јелена Пантић је рођена 25.08.1977. године у Крушевцу. Основну школу и Гимназију (природно-математички смер) завршила је у Крушевцу. Медицински факултет Универзитета у Београду, уписала је школске 1995/96. године, а дипломирала 2002. године и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи лекарски стаж на Војно-медицинској академији у Београду и положила стручни испит 2003. године. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална интерна медицина, подподручје Ендокринологија, уписала је 2008. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Усмени докторски испит је положила у новембру 2010. године са оценом 9 (девет). Члан је Друштва имунолога Србије.

Од јануара 2012. године до данас, ради као сарадник у настави на Катедри за Микробиологију и имунологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. У фебруару 2013. године изабрана је у звање асистента за ужу научну област Микробиологија и имунологија. У школској 2013/2014. години уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Факултета медицинских наука у Крагујевцу уписала је специјалистичке студије из области Имунологије.

Кандидат Јелена М. Пантић је кроз разне видове укључена у наставни и научно-истраживачки рад. Активно се бави научно истраживачким радом у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Континуирани научно-истраживачки рад се огледа у учешћу на пројектима које финансира Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, као и Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Јелена М. Пантић је остварила 36,7 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- пет радова у целини публикована у научним часописима међународног значаја;
- два рада у целини публикована у националним часописима;
- већи број сажетака на међународним и домаћим научним скуповима.

8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Pantic JM**, Mechkarska M, Lukic ML, Conlon JM. Effects of tigerinin peptides on cytokine production by mouse peritoneal macrophages and spleen cells and by human peripheral blood mononuclear cells. *Biochimie* 2014;101:83-92.
IF 3.142 M22-5 бодова

1. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, **Pantic JM**, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer* 2014;134(7):1669-82.
IF 6.198 M21-8 бодова

2. Pejnovic NN*, **Pantic JM***, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 Deficiency Accelerates High-Fat Diet Induced Obesity and Amplifies Inflammation in Adipose Tissue and Pancreatic Islets. *Diabetes* 2013; 62(6):1932-1944. *Први аутори (енгл. *equal contribution*)
IF 7.895 M21- 8 бодова

3. Scorciapino MA, Manzo G, Rinaldi AC, Sanna R, Casu M, **Pantic JM**, Lukic ML, Conlon JM. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages.

Biochemistry 2013; 52(41):7231-41.

IF 3.377 M22-5 бодова

4. Conlon JM, Mechkarska M, **Pantic JM**, Lukic ML, Coquet L, Leprince J, Nielsen PF, Rinaldi AC. An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides* 2013;40:65-71.

IF 2.522 M22-5 бодова

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:

1. **Pantic JM**, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Jovanovic IP, Djukic ALJ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Lack of ST2 enhances high-fat diet-induced visceral adiposity and inflammation in BALB/c mice. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2013; 14 (4): 155-160.

M52-1,5 бодова

2. **Pantic J**, Volarevic V, Djukic A. Experimental models of diabetes mellitus. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2011; 12(1):29-35.

M52-1,5 бодова

Зборници међународних научних скупова:

1. Pejnovic N, **Pantic J**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Zdravkovic N, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Gal-3 Deficiency Accelerates Diet-induced Obesity and Increases NLRP3 Inflammasome and IL-1 β expression in Pancreatic Islets in Mice. 10th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference. Štrbské Pleso (Tatra Mountains), Slovakia 2012. Abstract Book.

M34 - 0,5 бодова

2. I. Jovanovic, N. Pejnovic, G. Radosavljevic, **J. Pantic**, M. Milovanovic, N. Arsenijevic, M. Lukic. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer Progression and Angiogenesis by Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Natural Helper Cells. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p842.

M34 - 0,5 бодова

3. N. Pejnovic, **J. Pantic**, I. Jovanovic, G. Radosavljevic, M. Milovanovic, I. Nikolic, N. Zdravkovic, A. Djukic, N. Arsenijevic, M. Lukic. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet induced obesity and diabetes by amplifying metaflammation. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p886.

M34 - 0,5 бодова

4. **J. Pantic**, N. Pejnovic, I. Jovanovic, G. Radosavljevic, G. Besra, N. Arsenijevic, M. Lukic. Activation of Natural Killer T Cells Promotes Th2 Immune Response in Adipose Tissue of Obese Galectin-3 Deficient Mice and Improves Systemic Glucose Homeostasis. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p891.

M34 - 0,5 бодова

5. G. Radosavljevic, N. Pejnovic, **J. Pantic**, I. Jovanovic, I. Jetic, N. Jovicic, N. Arsenijevic, M. Lukic. ST2 deficiency enhances diet-induced inflammation in visceral adipose tissue and obesity in mice. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p892.

M34 - 0,5 бодова

Зборници националних научних скупова:

1. **Pantić J.** Racionalna terapija osteoporoze-značaj i prevencija nastanka fragility fractures. Drugi nacionalni kongres racionalne terapije u medicini. Kragujevac, Srbija 2009. godine. Knjiga sažetaka, Racionalna terapija 2009; 1(2): 64-65.

M64 - 0,2 бода

8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper in extenso in international journals:

2. **Pantic JM**, Mechkarska M, Lukic ML, Conlon JM. Effects of tigerinin peptides on cytokine production by mouse peritoneal macrophages and spleen cells and by human peripheral blood mononuclear cells. *Biochimie* 2014;101:83-92.
IF 3.142 M22-5 points
3. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, **Pantic JM**, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer* 2014;134(7):1669-82.
IF 6.198 M21-8 points
4. Pejnovic NN*, **Pantic JM***, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 Deficiency Accelerates High-Fat Diet Induced Obesity and Amplifies Inflammation in Adipose Tissue and Pancreatic Islets. *Diabetes* 2013; 62(6):1932-1944. *Први аутори (енгл. *equal contribution*)
IF 7.895 M21-8 points
5. Scorciapino MA, Manzo G, Rinaldi AC, Sanna R, Casu M, **Pantic JM**, Lukic ML, Conlon JM. Conformational analysis of the frog skin peptide, plasticin-L1, and its effects on production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Biochemistry* 2013; 52(41):7231-41.
IF 3.377 M22-5 points

6. Conlon JM, Mechkarska M, **Pantic JM**, Lukic ML, Coquet L, Leprince J, Nielsen PF, Rinaldi AC. An immunomodulatory peptide related to frenatin 2 from skin secretions of the Tyrrhenian painted frog *Discoglossus sardus* (Alytidae). *Peptides* 2013;40:65-71.

IF 2.522 M22-5 points

The published paper in extenso in national journals:

1. **Pantic JM**, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Jovanovic IP, Djukic ALJ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Lack of ST2 enhances high-fat diet-induced visceral adiposity and inflammation in BALB/c mice. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2013; 14 (4): 155-160.

M52-1,5 points

2. **Pantic J**, Volarevic V, Djukic A. Experimental models of diabetes mellitus. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2011; 12(1):29-35.

M52-1,5 points

The international congress presentations published as abstracts:

1. Pejnovic N, **Pantic J**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Zdravkovic N, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Gal-3 Deficiency Accelerates Diet-induced Obesity and Increases NLRP3 Inflammasome and IL-1 β expression in Pancreatic Islets in Mice. 10th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference. Štrbské Pleso (Tatra Mountains), Slovakia 2012. Abstract Book.

M34 - 0,5 points

2. I. Jovanovic, N. Pejnovic, G. Radosavljevic, **J. Pantic**, M. Milovanovic, N. Arsenijevic, M. Lukic. Interleukin-33/ST2 Axis Promotes Breast Cancer

Progression and Angiogenesis by Intratumoural Accumulation of Immunosuppressive and Natural Helper Cells. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p842.

M34 - 0,5 points

3. N. Pejnovic, **J. Pantic**, I. Jovanovic, G. Radosavljevic, M. Milovanovic, I. Nikolic, N. Zdravkovic, A. Djukic, N. Arsenijevic, M. Lukic. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet induced obesity and diabetes by amplifying metaflammation. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p886.

M34 - 0,5 points

4. **J. Pantic**, N. Pejnovic, I. Jovanovic, G. Radosavljevic, G. Besra, N. Arsenijevic, M. Lukic. Activation of Natural Killer T Cells Promotes Th2 Immune Response in Adipose Tissue of Obese Galectin-3 Deficient Mice and Improves Systemic Glucose Homeostasis. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p891.

M34 - 0,5 points

5. G. Radosavljevic, N. Pejnovic, **J. Pantic**, I. Jovanovic, I. Jetic, N. Jovicic, N. Arsenijevic, M. Lukic. ST2 deficiency enhances diet-induced inflammation in visceral adipose tissue and obesity in mice. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy 2013. Book of Abstracts; p892.

M34 - 0,5 points

The national congress presentations published as abstracts:

1. **Pantić J.** Racionalna terapija osteoporoze-značaj i prevencija nastanka fragility fractures. Drugi nacionalni kongres racionalne terapije u medicini. Kragujevac, Srbija 2009. godine. Knjiga sažetaka, Racionalna terapija 2009; 1(2): 64-65.

M64 - 0,2 points

8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Јелена М. Пантић
Датум и место рођења: 25.08.1977. године, Крушевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Галектин-3 у патогенези гојазности и тип 2 <i>Diabetes mellitus-a</i>
Број страница: 174
Број слика: 27
Број библиографских података: 411
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Имунологија
Ментор: Проф. др Миодраг Л. Лукић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 07.11.2012.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 177/12; 02.04.2013.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Миодраг Л.Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, председник2. Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан3. Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник

2. Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, члан
4. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, председник
2. Академик, проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
3. Др Станислава Стошић-Грујичић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду, члан
4. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена М. Панчић
број уписа 2008/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
ГЛЕКТИН-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ГОЈАЗНОСТИ И
ТИП 2 DIABETES MELLITUS-A

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 26.05.2014.

Јелена Панчић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена М. Панчић
Број уписа 2008/08
Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ ОБУЧНЕ
Наслов рада ГАЛЕКТИН-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ГОЛАЗНОСТИ И ТИП 2 DIABETES MELLITUS-A
Ментор ПРОФ ДР МИОДРАГ Л. ЛУКИЋ

Потписани Јелена М. Панчић

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

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 26.05.2014.

Јелена Панчић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ТАЛЕКТИН-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ГОЈАЗНОСТИ И
ТИП 2 DIABETES MELLITUS-A
која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 26.05.2014.

Јелена Павић