



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

**Александар Арсенијевић**

**Примарни билијарни холангитис мишева изазван  
бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*:  
улога галектина-3 у активацији инфламазома**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Марија Миловановић, ванредни професор**

**Крагујевац, 2020. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Александар Арсенијевић
Датум и место рођења: 30.11.1986. Крагујевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Онкологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Примарни билијарни холангитис мишева изазван бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> : улога галектина-3 у активацији инфламазома
Број страница: 134
Број слика: 18 графикона, 5 слика, 1 табела
Број библиографских података: 289
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Марија Миловановић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 22.07.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-989/19 од 12.12.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан 3. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

## САЖЕТАК

Галектин-3 је гликопротеин који остварује различите, често и потпуно супротне улоге у различитим инфламацијским реакцијама. У овој студији је анализирана улога галектина-3 у примарном билијарном холангитису (енгл. *Primary Biliary Cholangitis*, PBC) изазваном бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* (*N. aromaticivorans*). PBC је изазван инфекцијом мишева C57BL/6 интраперитонеалном апликацијом бактерије два пута у току две недеље. Улога галектина-3 у патогенези PBC анализирана је коришћењем *Lgals3*<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01. Анализирани су хистолошки и серолошки параметри болести, фенотип дендритских, NK, NKT и Т ћелија и активација инфламазома. Слабије изражена болест са значајно мањим оштећењем билијарних каналића и мањом фиброзом јетре детектована је у групама *Lgals3*<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01. У јетрама *wild type* мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* је у инфилтратима детектована већа заступљеност инфламацијских макрофага, NK, NKT и Т ћелија. Делеција *Lgals3* и третман инхибитором галектина-3, GM-CT-01, смањује оштећење билијарних каналића, фиброзу јетре, моноклеарни инфилтрат, експресију инфламазома NLRP3 у инфилтратима у јетри и продукцију IL-1 $\beta$  у јетри мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans*. *In vitro* стимулација *wild type* перитонеалних макрофага бактеријом *N. aromaticivorans* за последицу има већу експресију NLRP3, активност каспазе-1 и продукцију IL-1 $\beta$  у поређењу са стимулираним перитонеалним макрофагима *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева. GM-CT-01 такође редукује активацију DC и експресију цитокина IL-4, IL-1 $\beta$  и p40, заједничке субјединице IL-12 и IL-23 у DC *in vitro* стимулираним бактеријом *N. aromaticivorans*.

Наши резултати указују на значај галектина-3 у стимулацији инфламације у PBC изазваном инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans*, а који се огледа у активацији DC и инфламазома NLRP3 и последичној продукцији IL-1 $\beta$ , и указују да галектин-3 може да буде мета деловања потенцијалних нових лекова. Галектин-3 је вероватно укључен у инфламацијски одговор на коменсалне бактерије црева што може да буде инцијални окидач за развој примарног билијарног холангитиса.



## ABSTRACT

Galectin-3 has the role in multiple inflammatory pathways. Multiple-hit etiology of primary biliary cholangitis (PBC) and evolving immune response at various stages of the disease include involvement of Gal-3 in PBC pathogenesis. In this study we aimed to clarify the role of Gal-3 in *Novosphingobium aromaticivorans* (*N. aromaticivorans*) induced biliary disease. Primary biliary cholangitis was induced in C57BL/6 mice by two intra-peritoneal injections of *N. aromaticivorans* within 2 weeks. The role of Gal-3 in PBC development was evaluated by using *Lgals3*<sup>-/-</sup> mice and mice treated with Galectin-3 inhibitor, GM-CT-01. The histological and serological parameters of disease, phenotype of dendritic, NK, NKT, and T cells and inflammasome expression were evaluated. Marked attenuation of the disease in *Lgals3*<sup>-/-</sup> and Galectin-3 inhibitor, GM-CT-01, treated mice is manifested by the absence of bile duct damage and fibrosis. Liver infiltrates of *N. aromaticivorans* infected wild type mice had higher incidence of pro-inflammatory macrophages, NK, NKT, and T cells. *Lgals3* deletion and treatment with Galectin-3 inhibitor, GM-CT-01, reduced liver damage and fibrosis, inflammatory mononuclear cell infiltrate, expression of NLRP3 inflammasome in the liver infiltrates and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production in the livers of *N. aromaticivorans* infected mice. *In vitro* stimulation of wild type peritoneal macrophages with *N. aromaticivorans* caused increased NLRP3 expression, caspase-1 activity and IL-1 $\beta$  production compared with *Lgals3*<sup>-/-</sup> cells. GM-CT-01 reduced activation of dendritic cells and expression of IL-4, IL-1 $\beta$ , and p40, common subunit of IL-12 and IL-23 in dendritic cells *in vitro* stimulated with *N. aromaticivorans*. Our data highlight the importance of Galectin-3 in promotion of inflammation in *N. aromaticivorans* induced PBC by enhancing the activation of dendritic cells and NLRP3 inflammasome leading to enhanced production of IL-1 $\beta$ , and indicate Galectin-3 as possible therapeutic target in autoimmune cholangitis. Galectin-3 appears involved in inflammatory response to gut commensal leading to PBC

# ЗАХВАЛНИЦА

У временима која ће се памтити, ако уопште и остану у сећању, по недовршеним пословима ја ето други пут докторирам вољом распомамљене власти. Два пута је ипак два пута.

Нека –од мене им благослов, иако се не може рећи опрости им Боже не знају шта чине. Знају и зли су.

Ипак у време људи који све што додирну чине ништавним, имао сам среће да у изради обе дисертације сарађујем са дивним особама: Маријом и Јеленом Миловановић и Бојаном Стојановић. Свака од њих три заслужује усклик: *Ecce homo!*

Обично се људи захваљују и званичницима Факултета и Универзитета али ја то не могу да урадим пошто су сада на реду мишеви који су страдали током израде тезе, они су имали више заслуга и куражи, а места више немам.

# Садржај

1.	УВОД.....	10
1.1.	Примарни билијарни холангитис.....	10
1.1.1.	Генски фактори.....	11
1.1.2.	Фактори околине.....	12
1.1.3.	Поремећаји епигенске регулације.....	13
1.1.4.	Имунска дисрегулација у РВС.....	14
1.1.5.	Холангиоцити и РВС.....	17
1.1.6.	Метаболизам жучних киселина и нови лек за лечење РВС.....	18
1.2.	Експериментални модели РВС.....	20
1.3.	Галектини.....	21
1.3.1.	Структура галектина-3.....	23
1.3.2.	Функције галектина-3.....	24
1.3.2.1.	Функције интрацелуларног галектина-3.....	24
1.3.2.2.	Функције екстраћелијског и мембранског галектина-3.....	25
1.3.2.3.	Функција галектина-3 на нивоу организма.....	26
1.3.3.	Улога и значај галектина-3 у регулацији имунског одговора.....	27
1.3.4.	Инхибитори галектина-3.....	28
1.3.5.	Галектин-3 и болести јетре.....	29
2.	ЦИЉ РАДА.....	30
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
3.1.	Лабораторијске животиње.....	31
3.2.	Индукција примарног билијарног холангитиса и процена болести.....	31
3.3.	Апликација инхибитора галектина-3, GM-CT-01.....	32
3.4.	Имунохистохемија мишијих узорака јетре.....	32
3.5.	Мерење цитокина у хомогенатима јетре.....	33
3.6.	Изолација моноклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија.....	33
3.7.	Продукција цитокина и експресија маркера активације након стимулације DC <i>in vitro</i> .....	34

3.8.	<i>In vitro</i> стимулација перитонеалних макрофага бактеријом.....	34
3.9.	Имунофлуоресценца.....	34
3.10.	Активност каспазе-1 .....	35
3.11.	Одређивање концентрације галектина-3 у култури спленocyта.....	35
3.12.	Анализа експресија гена реакцијом ланчаног умножавања.....	35
3.13.	Статистичка анализа.....	36
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	37
4.1.	Делеција <i>Lgals3</i> ублажава примарни билијарни холангитис индукован бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> .....	37
4.2.	Присуство галектина-3 значајно појачава имунски одговор тип 17 у јетри мишева са примарним билијарним холангитисом индукованим инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> .....	43
4.3.	Одсуство галектина-3 не само да значајно смањује инфилтрацију јетре активираним, цитотоксичким и инфламацијским НК ћелијама већ смањује и инфламацијски и цитотоксички потенцијал ових ћелија.....	46
4.4.	Дефицијенција галектина-3 значајно редукује експресију компоненте инфлазома NLRP3, продукцију IL-1 $\beta$ и активност каспазе-1 у перитонеалним макрофагима стимулираних бактеријом <i>N. aromaticivorans in vitro</i> .....	51
4.5.	GM-CT-01 сигнификантно смањује оштећење малих билијарних канала и фиброзу јетре у моделу РВС изазваном инфекцијом <i>N. aromaticivorans</i> -ом.....	58
4.6.	Инхибитор галектина-3 значајно смањује активацију DC бактеријом <i>N. aromaticivorans</i> .....	67
4.7.	Инхибитор галектина-3 значајно редукује инфлукс T1, T2 и T17 лимфоцита у јетре инфицираних мишева.....	71
4.8.	Експресија компоненте инфлазома NLRP3 и инфламацијског цитокина IL-1 $\beta$ је мања у јетрама инфицираних <i>Lgals3<sup>-/-</sup></i> и WT мишева третираних GM-CT-01-ом.....	73
4.9.	GM-CT-01 смањује и продукцију галектина-3 у јетри мишева инфицираних бактеријом <i>N. aromaticivorans</i> .....	79
5.	ДИСКУСИЈА.....	81
5.1.	Делеција <i>Lgals3<sup>-/-</sup></i> и фармаколошка инхибиција галектина-3 ублажавају манифестације примарног билијарног холангитиса.....	81
5.2.	Делеција <i>Lgals3<sup>-/-</sup></i> и фармаколошка инхибиција галектина-3 у јетри мишева инфицираних бактеријом <i>N. aromaticivorans</i> смањују заступљеност T, NK и NKT ћелија које експримирају IL-17 .....	85
5.3.	Делеција <i>Lgals3<sup>-/-</sup></i> и фармаколошка инхибиција галектина-3 смањују активацију DC изазвану <i>N. aromaticivorans</i> .....	86
5.4.	Делеција <i>Lgals3<sup>-/-</sup></i> и фармаколошка инхибиција галектина-3 смањују активацију инфлазома изазвану <i>N. aromaticivorans</i> .....	87
6.	ЗАКЉУЧЦИ .....	90



7.	ЛИТЕРАТУРА .....	92
8.	БИОГРАФИЈА .....	119
9.	БИБЛИОГРАФИЈА .....	120
9.1.	Научни радови објављени у целини у часописима категорије М20: .....	120
9.2.	Научни радови објављени у целини у часописима категорије М50: .....	124
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА .....	126
	Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације .....	136

# 1. УВОД

## 1.1. Примарни билијарни холангитис

Примарни билијарни холангитис (енгл. *Primary Biliary Cholangitis*; PBC) је хронично запаљењско обољење јетре са аутоимунском основом, које карактеришу: деструктивно лимфоцитно запаљење интрахепатичних жучних каналића, присуство анти-митохондријских антитела (енгл. *Anti-Mitochondrial Antibodies*, АМА) специфичних за аутоантиген који се налази у митохондријама и изразито чешће јављање болести у женској популацији (1, 2). Кључни серолошки налаз у примарном билијарном холангитису је присуство АМА- антитела специфичних за болест која се детектују у више 95% оболелих (3). Ова аутоантитела специфична су за антигенску детерминанту Е2 која се налази у склопу различитих делова сложеног ензима дехидрогеназе смештене у мембрани митохондрије. Те субјединице су: 2-*охо-ацид* (2OADC-E2), пируват (PDC-E2), рачvasti ланац 2-*охо-ацид* (BCOADC-E2) и 2-*охо-глутарат* (OGDC-E2) (1). Доминантни аутоантиген у овој болести је PDC-E2. Престанак толеранције на овај аутоантиген праћен је развојем оштећења билијарног епитела (1). Све до 2015. године, ова болест је у званичној номенклатури називна: примарна билијарна цироза (од енгл. *Primary Biliary Cirrhosis*; PBC), међутим скраћеница је остала иста (4).

Механизми настанка и развоја болести су веома сложени и подразумевају губитак толеранције на аутоантигене присутне у холангиоцитима што је узрок инфламације са последичним оштећењем билијарних каналића, развојем холестазе и фиброзе јетре. У настанку и развоју болести улогу играју: излагање одређеним супстанцама присутним у окружењу, имуногенска предиспозиција, епигенска контрола билијарног епитела, урођени и стечени имунски одговор и поремећај продукције жучне киселине. Тек од скора се у патогенези PBC-а разматра заједничка улога имунских механизма, поремећаја продукције жучних соли, функције билијарног транспорта и апоптозе холангиоцита (5).

Данас се сматра да је за почетно оштећење билијарног епитела, у овој болести, неопходно да се сустрекну генски, епигенски и фактори околине, а да су комбиновани имунски и

инфламацијски одговор на оштећење последица примарне лезије епитела и да су одговорни за хронични ток обољења (6). Клиничке презентације болести као и одговори на терапију су веома хетерогени. Клиничке манифестације РВС варирају од асимптоматске холестазе која се детектује само биохемијским тестовима, преко појаве свраба коже изазваног холестазом, до фаталног исхода услед завршног стадијума билијарне цирозе. Крајњи стадијуми цирозе у РВС могу да буду подлога за развој хепатоцелуларног карцинома, али не и холангиокарцинома (7). Серумски биохемијски маркери, концентрација алкалне фосфатазе и билирубина, могу да се користе као параметри који указују на потребу трансплантације и као помоћни параметри за праћење одговора на терапију (8). На основу хистолошких промена примарни билијарни холангитис се класификује у неколико стадијума: први стадијум- портни хепатитис; други стадијум- перипортни хепатитис; трећи стадијум- септална фиброза (брицинг некроза) и четврти стадијум- цироза (9, 10). Степен хистолошки верификоване синусоидне фиброзе може да укаже на клинички исход болести независно од биохемијских и серолошких параметара: декомпензација јетре, смрт услед холестазе/трансплантације јетре, смрт услед портне хипертензије, смрт услед других компликација РВС и преживљавање (11).

### **1.1.1. Генски фактори**

На улогу генских фактора као фактора ризика за развој РВС указано је у бројним студијама у којима је показана конкордантност од 63% код монозиготних близанаца и већа стопа јављања болести у одређеним породицама са релативним ризиком од 9.13–10.5 у првој линији сродства до 1,66 у петој линији сродства (12,13). Преваленца АМА код особа у првој линији сродства је 13.1%, а у контроли 1%. Поред тога већа је преваленца у женској популацији у првој линији сродства (сестре 20.7%, мајке 15.1%, ћерке 15.1%) у поређењу са мушким сродницима у првој линији сродства (браћа 7.8%, очеви 3.7% и синови 0%) (13).

Описана је удруженост одређених генских варијанти HLA, али и non-HLA гена, и већег ризика од развоја РВС. Продукти гена који повећавају ризик од развоја РВС модулишу процесе који играју улогу у патогенези болести, на које у исто време утичу и фактори окружења (14). Удруженост одређених HLA алела и развоја РВС се разликује за одређене популације, па су тако у европској популацији алели *HLA-DRB1\*11* и *HLA-DRB1\*13*

удружени са мањим ризиком (15, 16), док су међу Јапанцима алели *HLA-DQB1\*06* и *HLA-DQB1\*03* удружени са већим ризиком од развоја болести (6, 17). Међутим корелација између присуства одређеног алела HLA и већег или мањег ризика од развоја PBC је мања у поређењу са описаним корелацијама за друге аутоимунске болести.

Од *non*-HLA гена, највећа удруженост PBC и одређених варијанти показана је за гене *IL12RB2*, *STAT4*, *STAT1*, *CD80*, *IL12A*, *NFKB1*, *IL7R*, *TNFSF15*, *CXCR5*, *DDX6*, *RF8*, чији производи контролишу бројне имунске реакције, као што су презентација антигена, диференцијација лимфоцита, имунски одговор на микроорганизме (18-20).

Међу наведеним генима изгледа да најзначајнију улогу у патогенези PBC имају гени чији производи контролишу сигналне путеве које стимулише IL-12 и који имају бидирекционе улоге у развоју болести јер су кључни су за активацију и диферентовање наивних Т лимфоцита у правцу инфламациског Th1 фенотипа, али и за синтезу и лучење IFN- $\gamma$  који инхибира развој инфламацијских Th17 лимфоцита (21). Студије у којима су рађене имунохистохемијске анализе јетри оболелих од PBC указују на значај сигналних путева IL-12 и IL-23 у PBC (22). Одређене варијанте гена за хемокин CCL20 су удружене са мањим ризиком од развоја PBC (20), јер интеракција хемокина CCL20 и хемокинског рецептора CCR6 има улогу у диференцијацији и функцији лимфног ткива у слузницама, хомингу Th17 лимфоцита, оштећењу билијарног епитела и функцији ефекторских CD8+T лимфоцита у портном тракту (23-25).

### 1.1.2. Фактори околине

Претпоставља се да више фактора из окружења могу да буду нека врста окидача за прекид толеранције на митохондријске антигена чиме започиње први, кључни корак у развоју PBC. Показана је већа преваленца PBC у урбаним него у руралним пределима у Њу Кастлу у Енглеској, што се повезује са већом изложеношћу органским једињењима која имитирају PDC-E2 (26). Студије које су спроведене у Енглеској и Сједињеним Америчким Државама указале су на већи ризик од развоја PBC у популацији пушача (27), што се објашњава чињеницом да дувански дим индукује Th1 имунски одговор. Студија спроведена у Француској показала је већи ризик од развоја PBC и у популацији пасивних пушача, а показано је и да дувански дим смањује регулаторне активности дендритских ћелија (енгл. *Dendritic Cells*, DC), док ароматични угљоводоници присутни у диму

имитирају митохондријске аутоантигене и тако вероватно доприносе прекиду ауто толеранције (28). Рекурентне уринарне инфекције изазване бактеријом *Escherichia coli* повећавају шансу обољевања од РВС јер индукују продукцију специфичних анти РДС-Е2 антитела (29). Слични механизми предложени су као објашњење за повећани ризик од развоја РВС после инфекција другим микроорганизмима као што су: *Novosphingobium aromaticivorans*, *H. pylori*; *C. pneumoniae*; *M. gordonae*; *Epstein-Barr virus*; *Cytomegalovirus*; *Toxoplasma gondii*; *L. delbrueckii* (30) (31). Истраживања анималних модела болести су показала да ксенобиотици као што је 2-октиноична киселина, играју улогу патогенези РВС (32).

### 1.1.3. Поремећаји епигенске регулације

У јетри оболелих од РВС показана је измењена експресија 35 микро РНК које играју улогу у пролиферацији ћелија, ћелијској смрти и оштећењу (33). Измењивач јона АЕ2 (енгл. *Anion Exchanger 2*, АЕ2) регулише секрецију  $\text{HCO}_3^-$  који одржава бикарбонатни „штит“ на апикалној површини билијарног епитела штитећи тако ове ћелије од штетног ефекта жучних киселина (34). Микро РНК, miR-506, регулише експресију АЕ2 и више је експримирана у интрахепатичним жучним каналићима оболелих од РВС (35). Претерана експресија miR-506 у холангиоцитима *in vitro* за последицу има смањење експресије АЕ2, а блокирање miR-506 у овим ћелијама повећава активност АЕ2 (36). Испитивањем епигенске регулације у РВС показано је да постоји значајна веза између билијарног оштећења и поремећаја регулације имунског одговора и донекле је објашњена већа инциденца болести у женској популацији.

Холангиоцити у којима је повећана експресија miR-506 експримирају више инфламацијских и про-фибротских молекула што повећава ћелијски стрес и чини овакве ћелије осетљивијим на жучне киселине (36), али и повећава експресију РДС-Е2, што може да укаже на везу између епигенске регулације, оштећења ћелија и поремећаја регулације имунских реакција у РВС.

Поред тога, miR-506 је локализована на Хq27.3 хромозому (37) што може да укаже да поремећена епигенска инактивација Х хромозома и последична прекомерна експресија miR-506 доприносе већој инциденци РВС у женској популацији.

У јетрама оболелих од РВС нађена је и повећана експресија miR-21 која може да буде укључена у процесе некроптозе (38). Биохемијски параметри који указују на холестазу код мишева којима је облитерисан жучни канал су бољи код miR-21<sup>-/-</sup> у поређењу са *wild-type* мишевима, а код њих је показана и повећана експресија нуклеарног рецептора који везује жучне киселине- FXR (енгл. *Farnesoid X Receptor*, FXR) и неколико транспортера жучних киселина, што све заједно указује на могући холестатски ефекат miR-21 и некроптозе (38). Показана је и већа експресија miR-21 у ефекторским CD8+Т лимфоцитима удуржена са већом продукцијом инфламацијских цитокина у моделу РВС-а који развијају доминантно негативни *Tgfb2* мишеви (39). Ови подаци указују и на значај miR-21 у регулацији имунских механизма значајних за развој РВС.

#### 1.1.4. Имунска дисрегулација у РВС

РВС карактерише мултилинијска имунска дисрегулација и губитак ауто толеранције PDC-E2 комплекса што за последицу има циљано оштећење холангиоцита (40, 41). Анти-митохондријска антитела, специфична за болест, се везују за имунодоминантне епитопе на PDC-E2 лоцираног у унутрашњој мембрани митохондрија. PDC-E2 садржи везу липоична киселина-лизин која је неопходна за ово препознавање и активацију имунског система (42, 43). Без обзира на то што је овај аутоантиген убиквитаран циљано оштећење холангиоцита је вероватно последица аберантне модификације митохондријскоог PDC-E2 унутар апоптотичних телашаца билијарних епителних ћелија, које одржавају овај епитоп имунски интактним. Овај имуногени комплекс препознају циркулишућа антитела што резултује формирањем антиген-антитело комплекса (44, 45). У развој РВС-а укључен је специфични имунски одговор на шта указује и пораст АМА у серуму али и инфилтрација јетре и портних простора оболелих CD4+Т и CD8+Т лимфоцитима (46, 47). Популација ефекторско меморијских CD8+Т лимфоцити која се у јетрама оболелих локализује око портних путева препознаје антигенске секвенце унутар домена PDC-E2 комплекса који садржи липоичну киселину и доприносе циљаном оштећењу билијарних путева (48, 49). У развоју болести улогу имају Th17, Th1 као и фоликуларни помагачки лимфоцити (50, 51). Стадијум већ одмакле фиброзе удружен је са скретањем имунског одговора ка Th17 фенотипу у коме доминира продукција IL-17, IL-6 и TGF- $\beta$  што је потврђено у инфилтратима јетре оболелих од РВС-а (52, 53). Фоликуларни помагачки Т лимфоцити,

такође нађени у већем броју у јетрама оболелих од РВС-а, обезбеђују неопходну помоћ В лимфоцитима како би продуковали специфичних антитела промењених класа (54). Трег ћелије се налазе у мањем броју у јетри оболелих од РВС (54, 55).

На значај урођене имуности у развоју РВС указују присуство гранулома и поликлонска продукција IgM, али механизми урођене имуности сами по себи независно од стечене имуности нису довољни да изазову прекид ауто толеранције (56). Холангиоцити експримирају TLR које активирају различити лиганди укључујући продукте микроорганизама, што индукује продукцију проинфламацијских фактора као што су NF-κB, CX3CL1 и IL-8 који доприносе оштећењу билијарних епителних ћелија и регрутују ефекторске ћелије имунског система у портне путеве (57, 58). Повећана експресија CX3CL1 у оштећеним холангиоцитима привлачи CD4+T и CD8+T лимфоците који се у већем броју налазе у јетри оболелих од РВС-а (57). Једна скорија студија указала је на повећање броја супресорских ћелија мијелоидног порекла у јетри оболелих од примарног билијарног холангитиса и да њихов број корелира са биохемијским параметрима болести: концентрацијом ALP-а и билирубина у серуму (59). У присуству циркулишућих АМА и апоптотских холангиоцита, макрофаги повећавају експресију проинфламацијског цитокина IL-12 и тако доводе у везу апоптозу холангиоцита и одговор урођеног имунског система (60). Већа заступљеност NKT ћелија је показана у јетри оболелих од РВС-а у поређењу са здравим контролама, као и NK ћелија које такође доприносе оштећењу холангиоцита, ослобађању аутоантигена и активацији аутореактивних Т лимфоцита (61, 62). MAIT ћелије (енгл. *Mucosal associated invariant T cells*), инваријантни Т лимфоцити мукозе, су нова популација ћелија урођене имуности које синтетишу и секретују цитокине IFN-γ, TNF-α, IL-17, или независно, или по стимулацији микроорганизмима, а присутне су у мањем проценту у јетри и крви оболелих од РВС-а у поређењу са контролама (1, 62, 63).

Сви метаболити, нутријенти, бактеријски продукти као и ћелије имунског система из црева путем портне циркулације прво одлазе у јетру (64, 65). Поред тога, посредством ентерохепатичне циркулације примарних и секундарних жучних киселина и имуноглобулина, јетра директно утиче на хомеостатске процесе и апсорпцију у интестинуму (66-68). Дисбиоза микробиома црева је или резултат, или је одговор на развој одређених болести, а може да утиче на разградњу нутријената, оштећење чврстих веза епитела повећавајући интестиналну пермеабилност (69). Поремећај баријерне функције

цревног епитела може да резултује повећањем дифузије молекулских образаца микроорганизама (енгл. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs), молекулских образаца оштећења (енгл. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs), слободних масних киселина и ендотоксина у портну циркулацију све до синусоида јетре што може да буде окидач за оштећење јетре и дисрегулацију имунских реакција у јетри, а уколико постоје и други фактори који могу да допринесу одржавању оштећења, развија се хронично обољење јетре (70). Купферове ћелије су прва линија одбране имунског система од патогена који су до јетре доспели из црева (71). Уколико су Купферове ћелије тип М1 активирани бактеријама, липополисахаридом (LPS) или токсинима који су доспели до јетре, продукују проинфламацијске цитокине IL-6, TNF и IL-1 $\beta$  који активирају профибротске стелатне ћелије у јетри, док је М2 фенотип Купферових ћелија толероген јер ћелије овог типа продукују IL-10 и TGF- $\beta$  што повећава активност имunosупресивних Treg ћелија (72). Тако микроорганизми доспели до јетре могу да буду одговорни за развој PBC, јер су окидачи који покрећу одговоре урођене имуности што за резултат има дисрегулацију имунског система у јетри.

Интрехепатичне MAIT ћелије су нова популација ћелија урођене имуности. Ради се о Т лимфоцитима који поседују инваријантни TCR и који имају кључну улогу у одговору на антигене настале метаболизмом витамина В, а у ком учествују цревне бактерије. Ове антигене MAIT ћелијама, у јетри, у склопу молекула I класе MHC приказују макрофаги, холангиоцити и В лимфоцити (73, 74). MAIT ћелије се називају и одбрамбеним системом билијарног епитела, а налазе се углавном у портном тракту где се активирају излагањем антигену и започињу локализовани имунски одговор који има за циљ контролу патогених микроорганизама који доспевају до јетре што укључује и регрутовање ефекторских лимфоцита (75). Број MAIT ћелија је смањен у јетрама оболелих од PBC чиме се ограничава њихова протективна улога и одржавање билијарног интегритета, нарочито после излагања бактеријским патогенима (74). Број MAIT ћелија у јетри оболелих од PBC је значајно редукован у поређењу са здравим контролама, за разлику од конвенционалних CD4+Т и CD8+Т лимфоцита чија се заступљеност у јетри оболелих значајно повећава (74). Током терапијског третмана урзодезоксихолном киселином број MAIT ћелија се не нормализује, чак и ако се региструје побољшање болести, што је један од механизма



којим се може објаснити прогресивно оштећење јетре без обзира на терапијски одговор (76).

Секреторна антитела класе А која продукују плазмацити присутни у портном систему и која се секретују у лумен црева заједно са жучним киселинама, такође могу да имају улогу у заштити билијарног епитела од микроорганизама. Унутар интестиналног тракта секреторна IgA се директно везују за бактерије и тиме их заробљавају унутар мукуса што омогућава њихово избацивање из црева фецесом. Осим тога ова антитела неутралишу бактеријске токсине и ометају везивање бактерија за апикалне површине ентероцита (77). Код оболелих од РВС су запажене мање концентрације IgA антитела на интестиналној површини ентероцита дуоденума у поређењу са здравим контролама, што доприноси нарушавању епителне баријере (67, 78).

Дисбиоза за последицу има промену имунске активности у интестинуму, повећава се поларизација CD4+Т лимфоцита ка фенотипу Th17 и повећава се продукција проинфламацијских цитокина који су кључни за одбрану од патогена, што одржава баријерне функције црева. Инфекција мишева бактеријом *Citrobacter rodentium* за последицу има апоптозу ентероцита који осолобађају аутоантигене и подстичу диференцијацију и пролиферацију аутореактивних Т лимфоцита (79). Код оболелих од РВС-а присутна је измењена фекална микрофлора (79, 80).

#### **1.1.5. Холангиоцити и РВС**

Интензивно изучавање и све боље разумевање нормалне физиологије билијарног тракта и комплексних механизма који су неопходни да би се одржао интегритет билијарних епителних ћелија су омогућили и боље разумевање патогенезе РВС. Свако оштећење ћелија стимулише различите координисане реакције у правцу репарације. Одговор ћелија на оштећење може да буде индукција апоптозе или старење што може да има и позитивне и негативне ефекте, а присуство бикарбонатног заштитног слоја може да буде одлучујуће за исход. За очување интегритета билијарних епителних ћелија, обзиром на присуство жучних киселина и последичне киселе средине на површини ћелија, неопходна је адекватна продукција бикарбоната. Поремећај продукције бикарбоната и губитак бикарбонатног заштитног слоја може да повећа вулнерабилност и оштећење холангиоцита без обзира који је инцијални окидач тог оштећења (81). Холангиоцити експримирају АЕ2,

главни измењивач хлоридног и бикарбонатног анјона, који регулише продукцију бикарбоната у холангиоцитима и тако вредност рН у ћелији (82). Смањењем експресије АЕ2 повећава се рН у холангиоцитима, што активира солубилну интрацелуларну аденилил циклазу која олакшава ацидификацију жучних соли. На тај начин се повећава њихова хидрофобност и пермеабилност ћелијске мембране, а то холангиоците чини осетљивијим на индукцију апоптозе (83, 84). Смањење експресије АЕ2 у ћелијској линији холангиоцита је удружено са повећаном експресијом интрацелуларне аденилил циклазе и сензибилише ове ћелије на апоптозу изазвану жучним солима, а фармаколошка инхибиција аденилил циклазе има за последицу дозно зависну инхибицију апоптозе (35, 85). Мишеви са делецијом гена за АЕ2 имају повећане концентрације циркулишућих проинфламацијских цитокина и антимиохондријалних антитела, у поређењу са *wild type* мишевима, што је удружено са хистолошким налазима карактеристичним за аутоимунски холангитис (86).

Оштећење холангиоцити услед поремећаја експресије АЕ2 олакшава улазак ових ћелија у апоптозу омогућујући тако повећано излагање PDC-E2 у апоптотским телашцима и појачава циљану деструкцију билијарног епитела, без обзира на то што је PDC-E2 убиквитаран молекул. Престарели холангиоцити који нису уклоњени продукују цитокине и хемокине: IL-1, IL-6, CX3CL1, CXCL8 и CCL2 који ремете хомеостазу имунског система и доприносе развоју холестазе и фиброзе (87, 88).

#### **1.1.6. Метаболизам жучних киселина и нови лек за лечење PBC**

Присуство великих количина жучних киселина је токсично за ћелије па је за одржавање континуитета холангиоцита неопходна веома строга контрола синтезе и метаболизма жучних киселина, а оба ова процеса су поремећена у холестатским болестима као што је PBC (89). Жучне киселине су крајњи продукат метаболизма холестерола који се одиграва у јетри класичним и алтернативним путевима који резултују формирањем примарних жучних соли: холне и хенодеоксихолне киселине. Ове соли се касније конјугују са угљеним хидратима и таурином што повећава њихову растворљивост (90). Већина овако конјугованих молекула пролази у лумен каналића активним транспортом. Након сваког obroка се депоноване конјуговане киселине ослобађају у танко црево, путују до дисталног илеума где их ентероцити реапсорбују активним транспортом преко апикалне површине.

Путују кроз цитосол до базолатералне мембране ентероцита илеума одакле се транспортују у портну циркулацију транспортерима који се налазе на базолатералној мембрани, укључујући транспортер OST $\alpha\beta$  (енгл. *Organic Solute Transporter  $\alpha\beta$* , OST $\alpha\beta$ ) (89, 91, 92). У јетри ове молекуле из портне циркулације преузимају хепатоцити, реконјугују и поново секретују у каналиће чиме се скоро комплетно рециклирају (93). Око 5% жучних киселина се не реапсорбује у илеуму већ прелазе у колон где интерреагују са микроорганизмима и пролазе процес деамидације и дехидроксилације чиме се формирају секундарне жучне киселине- деоксихолна и литохолна које се или пасивно реапсорбују кроз епител колона или пролазе у фецес (91).

Жучне киселине су природни лиганди за интрацелуларне нуклеарне хормоне и мембранске рецепторе, а сигнални путеви које ови рецептори активирају су веома значајни за патогенезу РВС, они контролишу синтезу жучних киселина преко транскрипционе активације (89). Међу тим рецепторима је и рецептор за жучне киселине односно FXR (енгл. *Farnesoid X Receptor*, FXR) који регулише апсорпцију, транспорт и синтезу жучних киселина, а откриће ефеката стимулације овог рецептора обетихолном киселином је омогућило појаву новог терапеутика који је одобрен за лечење РВС 2016. године, првог новог терапеутика одобреног за лечење РВС, поред урзодеоксихолне киселине која се годинама користила.

Примарне жучне киселине, холна и хенодеоксихолна киселина се везују за FXR што изазива његову хетеродимеризацију (94, 95) и везивање за промоторски регион циљаних гена укључујући ту и гене за: SHP (енгл. *Small Heterodimer Partner*, SHP), FGF19 (енгл. *Fibroblast growth factor 19*, FGF19), и транспортере жучних киселина BSEP (енгл. *Bile Salt Export Pump*, BSEP) и OST $\alpha\beta$  (96-99). Активација неког од ових гена у хепатоцитима инхибира транскрипцију ензима CYP7A1 (енгл. *Cytochrome P450 7A1*, CYP7A1) чиме се супримира синтеза жучних киселина (89). По реапсорпцији из лумена илеума и пре уласка у портну циркулацију, жучне киселина такође активирају FXR у ентероцитима. Активација FXR у овим ћелијама повећава експресију FGF19 који улази у портну циркулацију, везује се за површински FGFR4 (енгл. *Fibroblast Growth Factor Receptor 4*, FGFR4) исказан на хепатоцитима, активира интрацелуларне сигнале који супримирају ензим CYP7A1 чиме се опет смањује синтеза жучних киселина (99- 101). Поред овог ефекта, BSEP и OST $\alpha\beta$ , чију експресију такође повећава FXR, убрзавају излазак жучних

киселина из хепатоцита и ентероцита и тако се редукује њихово поновно преузимање у хепатоцитима и ентероцитима илеума (102-104).

## 1.2. Експериментални модели РВС

Највише података о патогенетским механизмима одговорним за развој примарног билијарног холангитиса добијено је из експерименталних модела болести. Иако ниједан од експерименталних модела РВС нема све карактеристике хуманог РВС ипак оболеле животиње показују имунске и хистолошке карактеристике типичне за болест коју развијају људи и помогли су да се сагледа да болест зависи од генских фактора као и да важну улогу у иницијацији болести играју окидачи из околине: микроорганизми и/или ксенобиотици који прекидају толеранцију на аутоантигене што за резултат има појаву манифестација болести (29).

Одређене варијанте NOD мишева као што су NOD.c3c4 и конгени NOD.ABD спонтано развијају болест која има карактеристике РВС (105). Поред тога C57BL/6 мишеви дизајнирани тако да имају претерану експресију IFN- $\gamma$  развијају серолошке и хистолошке карактеристике хуманог аутоимунског холангитиса, а и већа је инциденца болести у женској популацији у поређењу са другим мишјим моделима РВС. Код ових мишева је показана већа концентрација циркулишућег IFN- $\gamma$  у женској популацији у поређењу са мужјацима, а кад су ови мишеви повратно укрштени са *knock out* мишевима за  $\alpha$  ланац рецептора за IFN тип 1, преминација болести у женској популацији је елиминисана, а побољшали су се и хистолошки знаци болести (106, 107). У овом моделу болести забележна је и мултилинијска имунска дисрегулација као и различита осетљивост на развој болести мушке и женске популације као и у хуманој популацији, болест се спонтано развија и за сада је тај модел болести најближи хуманом РВС.

Постоје и модели у којима се индукују болест на пример имунизацијом ксенобиотицима или инфекцијом микроорганизмима и који јасно указују на улогу фактора окружења као окидача за развој болести, али у овим моделима није показана већа инциденца болести у

женској популацији што је типично за РВС код људи. Сингени мишеви соја C57BL/6 имунизовани 2-октаноичном киселином конјугованом са албуминима говеђег серума (енгл. *Bovine Serum Albumine*, BSA) развијају хистолошке и серолошке карактеристике болести сличне хуманом РВС-у укључујући и инфилтрацију јетре CD8+Т лимфоцитима и повећану експресију TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (109). Инфекција NOD.B6-Idd10/Idd18 мишева бактеријом *Escherichia coli* такође за резултат има повишен титар антимиохондријских антитела и развој тешког холангитиса (29, 108). Такође инфекција NOD, C57BL/6 и SJL мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* за резултат има појаву специфичних антитела у серуму и активацију Т лимфоцита која зависи од NKT ћелија што оштећује жучне каналиће (109). *Novosphingobium aromaticivorans* је екстрацелуларна, убиквитарна, Gram-, коменсална бактерија која припада фамилији *Sphingomonadaceae* и може да насељава дигестивни тракт људи (110). Ћелијски зид *Novosphingobium aromaticivorans*-а не садржи липополисахарид (LPS), али поседује гликофинголипиде ( $\alpha$ -галактуронилцерамиде [ $\alpha$ GalACer]) (111). *Novosphingobium aromaticivorans* садржи молекулске хомологе аутоантигену PDC-E2 који у мишева инфицираних овом бактеријом иницира продукцију IgG специфичних за PDC-E2 и оштећења јетри готово идентичних оним лезијама које се развијају током РВС-а у људи (109), са већим бројем NKT ћелија у јетри и већом експресијом CD1d молекула на ћелијама урођене имуности (112). Овако индукована болест може се трансферисати CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима из болесног миша у здраве мишеве, док трансфер антитела или NKT ћелија нема такве последице.

### 1.3. Галектини

Галектини (енгл. *Galectins*, Gal) су протеини који везују угљене хидрате и укључени су у бројне физиолошке процесе, као што су ин фламацијски и имунски одговор, миграција ћелија, аутофагија спровођење сигнала.

Седамдесетих година 20. века, у потрази за протеинима који везују сложене гликане на површини ћелија откривени су протеини који везују галактозид и који су тада названи “галаптени” и лектини типа S (113). Тек су 1994. године добили име галектини када су дефинисани као фамилија протеина која унутар карактеристичних домена, којима препознају угљене хидрате и који садрже око 130 аминокиселина (енгл. *Carbohydrate*

*Recognition Domain*, CRD), садржи конзервирано место које везује  $\beta$ - галактозид (114). Галектини се синтетишу у цитосолу, већи део животног века се налазе у цитосолу или у једру и везују галактозидне лиганде тек након неklasичне секреције која заобилази Голџијев комплекс (115). Галектини остварују интеракције и са разним молекулима који не садрже галактозу, чак и у оквиру CRD-а садрже места која везују и друге врсте макромолекула (116, 117).

CRD домен галектина има облик благо савијеног  $\beta$ -сендвича (118, 119). Конкавна, S страна, домена формира плитак жлеб који може да веже тетрасахарид. Дефинисано место којим галектини везују галактозу садржи конзервирану секвенцу од око седам аминокиселина и налази се унутар овог жлеба. Места са обе стране конзервиране секвенце за коју се везује галактоза појачавају или смањују афинитет везе галектина и лиганда, због чега сваки CRD регион галектина има јединствену специфичност (119-122). Везујуће место галектина се се може прилагодити лиганда (123, 124). Због тога, иако је афинитет везе CRD унутар галектина и молекула галактозе у милимоларном опсегу, афинитет галектина за дисахарид N-ацетил-лактозамин је већи, а афинитет везе коју остварују са гликопротеинима са којима остварују највише интеракција је у субмикромоларном опсегу. Такође су дефинисана подручја у оквиру CRD региона која везују лиганде који не садрже угљене хидрате. Тако, CRD регион галектина-3 везује и сопствени N-терминални домен (125). Галектин-3 се налази у форми мономера и у релативно високим концентрацијама (100 $\mu$ M), али може да формира агрегате са различитим лигандима и аглутинираним ћелијама и у много нижим концентрацијама. У овим интеракцијама учествује N-терминус (126, 127). Удруживањем више молекула галектина-3 формирају се решетке (123) које остварују интеракције са многим глукоконјугатима трансмембранских протеине па их тако унакрсно повезује што за последицу има активацију сигналних каскада којима се регулише ћелијска пролиферација, диференцијација, одржава имунска хомеостаза (119, 128).

Галектини садрже један или два CRD-а (129), а на основу присуства и распореда домена који везују угљене хидрате, чланови галектинске фамилије су подељени у три типа (123, 130, 131):

**Прототип галектини** (Gal- 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 и 15) су сачињени од две идентичне субјединице повезане међусобом нековалентним везама (хомодимери) ови галектини имају два домена којима препознају угљене хидрате

**Тандемски галектини** (Gal- 4, 6, 8, 9 и 12) састављени од две различите субјединице, спојених кратким пептидом, са неистоветним доменима којима препознају различите угљене хидрате

**Химерски галектини** (Gal-3) садрже два домена и то један којим препознају угљене хидрате и један дугачак, флексибилан домен на N крају (128, 132).

### 1.3.1. Структура галектина-3

Галектин-3 (Gal-3) молекул масе 29-35kD је првобитно препознат, назван тада Мас-2, и то као мембрански молекул перитонеалних макрофага мишева за чију експресија је одговоран тиогликолат (133). Недуго затим су, у мишијим 3Т3 фибробластима, идентификовани слични лектини: СВР-35 (134), εВР (135), RL-29, лектин масе 29-kD (136), HL-29 (137), L-34, лектин масе 34-kD (138) и LBP (139). Дешифровање аминокиселинских секвенци указало је на веома велику хомологију ових молекула (139) да би 1994. године за све ове протеине био усвојен садашњи назив Gal-3 (114). Хумани галектин-3 кодира *LGALS3* -ген на хромозому 14.

Галектин-3 је молекул уникатне грађе која је другачија од свих сродних молекула из породице галектина кичмењака (140). Поседује један полипептидни ланац са два различита домена: N-терминални домен (енгл. *N-terminal Domain*, ND) и C-терминални домен (141). N-терминални регион садржи понављајуће секвенце сличне колагену-α које су богате глицином, пролином и тирозином (142, 143). N-терминус галектина-3 омогућава мултивалентна удруживања која укључују интеракције N-терминус са N-терминусом другог молекула и интеракције N-терминуса са CRD-ом (144). N-терминални домен, заједно са CRD регионом, учествује у везивању олигосахарида за шта су најодговорнији тирозин (на позицији 102) и непосредно суседне аминокиселине (145). N-терминус у присуству лиганда (мултивалентни угљенохидрати) омогућаје полимеризацију и стварање пентамерног облика галектина-3 који везујући трансмембранске гликане унакрст покреће унутарћелијске сигналне путеве, утичући тако на експресију различитих гена и промену функције ћелија (146-149). Колагеназе и матрикс металопротеиназе MMP-2 и

MMP-9 (енгл. *Matrix Metalloproteinase*, MMP), кидају везу унутар N-терминалног домена, богатог глицином, пролином и тирозином (тзв. секвенца слична колагену- $\alpha$ ) (150). Разградња пептидне везе 62. (аланина) 63. (тирозин) аминокиселине унутар N-терминалног домена утиче на повећање афинитета CRD региона за лиганде, али смањује и капацитет за међусобно повезивања молекула галектина-3 све функције олигомерног галектина-3 (150). N-терминални домен је пресудан и за секрецију Gal-3 (151), јер када недостаје почетни део овог ланца (11 аминокиселина) нема ни излучивања Gal-3 из ћелије (143). N-терминус је, такође, битан и за функцију Gal-3 током апоптотских процеса. Па тако измена серина (конзервиран на позицији 6) мења антиапоптотске ефекте галектина-3 (152). У склопу C-терминалног домена галектина-3 се налази CRD регион. Интерреакција CRD региона галектина-3 са глукоконјугатима узрокује конформационе промене (153) и реаранжирање секвенце у близини везујућег места (154). Унутар CRD региона се налази NWGR мотив: Asp-Trp-Gly-Arg (такође конзервирана секвенца) који се сматра кључним за антиапоптотску активност галектина-3, јер NWGR наликује домену BH1 породице Bcl-2 протеина (155). Gal-3 се високо-афинитентно повезује са поли-N-ацетиллактозаминским секвенцама присутним у лигандима (156, 157).

### **1.3.2. Функције галектина-3**

Галектин-3 је убиквитаран молекул, присутан како екстра- тако и интра- целиларно али и као мембрански молекул. Највише је експримиран у епителним, ендотелним и ћелијама имунског система (158, 159). Галектин-3 је у ћелијама присутан у једру, митохондријама или цитосолу, а на његову дистрибуцију утичу тип ћелије и фаза ћелијског циклуса у којој се ћелија налази (160, 161). Експресија галектина-3 се повећава у малигно трансформисаним ћелијама (162-164).

#### *1.3.2.1. Функције интрацелуларног галектина-3.*

Галектини интерреагују са мноштвом цитосолних и нуклеарних лиганата, који су по структури протеини, и тако регулишу сигналне путеве (165). Галектин-3 интерреагује са малим GTP-азама HRAS (166) и KRAS, активира киназе сигналног пута Raf-1/MEK/ERK и подстиче ћелијску пролиферацију (167). Остварује интеракцију са базалним телима и центрозомима па је у одсуству галектина-3 нарушена организација микротубула и



морфогенеза примарних цилија (168) и мотилитет цилија респираторног епитела (169). Галектин-3 се удружује и са протеином NuMa (енгл. *Nuclear apparatus Mitotic protein*, NuMa) који је кључни регулатор митозе (170). Галектин-3 такође реагује са компонентом ALG-2 комплекса ESCRT (енгл. *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*, ESCRT) који регулише транспорт ендозома и учествује у ремоделовању мембране (171). Ова интеракција утиче на смањење експресије TCR-а на мембрани Т лимфоцита, интрацелуларни промет рецептора за епидермални фактор раста (172) и ослобађање вируса хумане имунодефицијенције-1 (HIV-1) из ћелије (173). Цитосолни галектин-3 ослобађа  $\beta$ -катенин из комплекса са Wnt и омогућава његову транслокацију у једру и тако утиче на Wnt сигнализацију (174). Интерреагује са молекулом Bcl-2 и тако остварује антиапоптотске ефекте (175). За молекул Bcl-2 се везује NWGR мотив галектина-3 који је и део CRD домена (176, 122).

Галектин-3 стално путује између цитоплазме и једра. У једру галектин-3 учествује у сплајсингу пре-иРНК и у регулацији експресије гена и удружује се са малим једарним рибонуклеопротеинима (snRNP) (177, 178). Осим тога Gal-3 омогућује одржавање стабилном везу CREB и Sp1 (транскрипциони фактори) за гене промотерског региона гена одговорног за синтезу циклина D<sub>1</sub> (179).

#### 1.3.2.2. Функције екстраћелијског и мембранског галектина-3.

Након описане неklasичне секреције галектини улазе у ванћелијски простор, где се сусрећу са лигандима као што су гликопротеини (који садрже галактозу) и гликолипиди. Галектини се секретују неklasичним путем, вероватно путем егзозома (180). Показано је да галектини брзо окружују оштећене ендцитне везикуле јер се по дисрупцији везикула гликани присутни у лумену везикула излажу цитосолу. Овај феномен је први пут откривен када је описано везивање галектина-3 за вакуоле које садрже *Shigellae* (181), а затим је описано везивање галектина-3 за ендозома који садрже аденовирусе (182). Галектини се накупљају и око ендозома разорених агрегацијом протеина (у неуродегенеративним болестима) (183, 184), што може да укаже да галектини користе процес аутофагије како би се секретовали у ванћелијски простор (185). Међутим тачан механизам неklasичне секреције галектина је ипак и даље нејасан.

Екстрацелуларни лиганди галектина-3 (присутни на ћелијским мембранама и међућелијском матриксу) су: интегрини, ламинин, протеин који везује Мас-2, витронектин, еластин и фибронектин (156, 158, 186). Екстрацелуларни Gal-3 се везује молекуле угљених- хидрата присутне на мембранама ћелија или ванћелијском матриксу чиме омогућава интеракцију ћелија и њихову адхезију за екстрацелуларни матрикс (158). Gal-3, подстиче усмерену миграцију моноцита и макрофага према себи односно учествује у хемотакси ових ћелија (187). Такође, Gal-3 олакшава зрелим Т лимфоцитима излазак из тимуса (188). Овај молекул стимулише и настанак нових крвних судова што је показано и *in vitro* и *in vivo* (189).

Галектини из екстраћелијског простора могу поново да уђу у ћелије ендоцитозом (190), а онда се задржавају у ендоцитозним везикулама (191) и ендозомима (192). Галектин-3 везује гликопротеине који се налазе изван рафтова у мембрани (193, 194) и тако вероватно контролише сортирање протеина на апикалној мембрани ћелије (193, 194). Ванћелијски галектини такође индукују спровођење сигнала са ћелијске мембране, модификују интеракције унутар екстрацелуларног матрикса, као и са микроорганизма (118, 195-197). Галектини, се повезују и са површинским гликанима хелмината што је важно за урођену имуност према овим паразитима (198).

Функције цитосолних и нуклеарних (199) екстрацелуларних (118) галектина су познате, али није најбоље разјашњено да ли постоји нека заједничка регулација функције галектина у екстра- и интра- целуларном простору. Познато је да се галектин-1 у културама миобласта налази претежно у ћелијама, а да по диференцијацији миобласта у миоците углавном прелази у ванћелијски простор (200). Постоји могућност да ванћелијски галектин-3 у форми глукоконјугата смањује концентрацију галектина у цитосолу и/или једру.

#### *1.3.2.3. Функција галектина-3 на нивоу организма.*

Концентрација галектина у серуму или плазми је обично у пикомоларном опсегу. Мало је вероватно да галектини остварују ефекте на даљину, слично циркулишућим хормонима већ је вероватније да је њихово присуство у серуму резултат отпуштања из ткива, као што је откривено и за многе друге протеине (201). Позната је корелација између концентрације галектина-3 у серуму и оштећења срца (202). Међутим познато је и да галектин-3 и у веома ниској концентрацији у серуму стимулише ендоцитозу CD44

молекула (203) тако да неки од ћелијских процеса које контролишу галектини могу да одговарају на промене концентрације галектина у серуму. Галектин-3 из мијелоидних ћелија утиче на раст туморских ћелија и индукује отпорност на инсулин у адипоцитима (204) што указује да остварује и аутокрине и паракрине функције.

Када се говори о деловању галектина на нивоу организма онда се углавном одвојено описују функције галектина у ванћелијском простору, на ћелијској мембрани и интрацелуларно (197, 205). Међутим, галектини из ванћелијског простора се веома брзо ендоцитују и брзо се крећу између ендо- и егзо- цитних везикула (192, 206). Успостављање оптималног нивоа галектина у ћелији и ванћелијском простору утиче на кретање галектина кроз везикуле и тиме директно утиче на ћелијске процесе које галектин контролише као што су индукција апоптозе лимфоцита или апикална експресија и латерална организација гликозилираних рецептора као што су TCR, рецептори за VEGF, TGF- $\beta$  и рецептор за инсулин, чиме се последично регулишу процеси које ови сигнални путеви контролишу: ангиогенеза, лимфангиогенеза, фиброза, инфламација (197, 205).

### **1.3.3. Улога и значај галектина-3 у регулацији имунског одговора**

Конститутивно је Gal-3 експримиран у моноцит/макрофагним ћелијама, а такође и у DC, полиморфонуклеарима и мастоцитима, а лимфоцити (и Т и В) га синтетишу само кад су активирани (207).

Галектин-3 учествује у диференцијацији макрофага, В лимфоцита и DC (208-210). Експресија галектина-3 се повећава у хуманим моноцитима у току *in vitro* диференцијације у макрофаге (208). Јаче исказивање Gal-3 смањује ефекте транскрипционог фактора Blimp-1 што подстиче сазревање плазмоцита (209). Супротно, диференцијацију DC прати смањење експресије галектина-3 (210).

Галектин-3 је важан за адхезију и хемотаксу моноцит/макрофагних ћелија и миграцију ових ћелија кроз ендотел (146, 187). Галектин-3 активира и појачава фагоцитну и микробицидну активност фагоцита јер је *de facto* рецептор за препознавање молекулских образаца патогена. Тачније, овај молекул препознаје и везује се за површинске гликоконјугат следећих патогена: *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* и *Trypanosoma cruzi*, а уз то стимулише и опсонизацију (211-215).

Галектин-3 експримиран у DC је важан за поларизацију имунског одговора (216-220). У болестима са доминантним Th2 имунским одговором (инфекције паразитима, атопијски дерматитис) експресија галектина-3 у DC корелира са слабијом пролиферацијом помагачких Т лимфоцита (219, 220). CD4+Т лимфоцити коинкубирни са DC Gal-3-/- мишева показују већи степен пролиферације него након инкубације са DC Gal-3+/+ мишева (219).

Галектин-3 је исказан искључиво на активисаним лимфоцитима Т и В (207) битан је за пролиферацију и апоптозу Т лимфоцита (221-223). Интрацелуларни и екстрацелуларни галектин-3 имају супротно дејство на апоптозу Т лимфоцита. Интрацелуларна експресија галектина-3 инхибира, а екстрацелуларна поспешује апоптозу активираних Т лимфоцита (155, 223). Овај про-апоптотски ефекат последица је везивања галектина-3 са гликоконјугатима исказаним на мембранама активираних Т ћелија (223).

#### **1.3.4. Инхибитори галектина-3**

Бројне улоге галектина у регулацији ћелијских процеса у физиолошким и патолошким стањима инспирисале су истраживање инхибитора галектина, као потенцијалних лековима или као експерименталних средстава за проучавање биологије ћелије. Најмоћнији инхибитори галектина базирани су на дериватима дисахарида који постижу високоафинитетне везе са галектинима чија је јачина у наномоларном распону. Синтетисан је дисахарид, тиодигалактозид ( $\text{Gal}\beta 1\text{-S-1}\beta\text{Gal}$ ) који је врло сличан природним дисахаридима (224) и који остварује чврсте везе са галектином-3 ( $K_d$  је око 2nM). Инхибитор галектина-3, TD139, показује *in vivo* ефекте у анималним моделима фиброзе и ангиогенезе (225, 226) и тренутно се спроводе клиничке студије у којима се испитује као потенцијални лек за лечење идиопатске фиброзе плућа. Инхибитори галектина који се базирају на дисахаридима су релативно растворљиви у води и не могу се дуго задржати на мембранама, што онемогућава њихову оралну примену. Недавно је развијена нова класа инхибитора галектина која садржи само једну резидуу шећера (227), који лако пролазе кроз мембране што омогућава њихову оралну примену ( $K_d$  је у ниском, nM, опсегу). Такође је показано да, полисахариди добијени из биљака, као што је модификовани цитрусни пектин (MCP) или галактоманан, делују као фармаколошки инхибитори галектина-3 (228-230). Међутим, ови инхибитори слабо или уопште не остварују везу са

канонским местом за везивање угљених хидрата на молекулу галектина (231) што не искључује интракције са другим деловима овог молекула (232-234). Два мултивалента инхибитора на бази полисахарида, GM-CT-01 (Davanat) и GR-MD-02, везују галектин-3 умереним афинитетом ( $K_d=2.9$  и  $2.8\mu\text{M}$ ). GM-CT-01 је природни галактоманан који садржи бројне резидуе галактозе са просечном молекулском масом до 60kDa (235, 236). Међутим, не постоји јасно и задовољавајуће структурно објашњење о томе како се ови пектини везују за галектине и на који начин су испољавају терапијску ефикасност. Али због растворљивости у води и релативно безбедне примене код људи, ови полисахариди биљака су добри кандидати за лекове.

### **1.3.5. Галектин-3 и болести јетре**

Галектин-3 је веома важан за патогенезу запаљенских болести и малигнома јетре (237-240). Истраживања су потврдила промењену експресија галектина-3 у јетрама и серумима болесника са хепатоцелуларним карциномима, стеатохепатитисима и цирозама (130, 237). Експресија галектина-3 може да се користи као прогностички фактор код хепатоцелуларних карцинома (238) јер већа експресија галектина-3 у једрима карциномских ћелија одговара лошијој прогнози (237). Супримирање исказивања галектина-3 у једру олакшава апоптозу и повећава осетљивост ћелија холангиокарцинома на хемиотерапијске агенсе (238).

Раније су показани супротни ефекти галектина-3 на ток примарног билијарног холангитиса у два различита експериментална модела. Показан је протективни ефекат галектина-3 у моделу РВС изазваном имунизацијом ксенобиотиком (241). Галектин-3 остварује антиапоптотски ефекат у холангиоцитима чиме највероватније смањује даље ослобађање аутоантигена и тако зауставља аутоимунски процес (241). У моделу РВС који спонтано развијају  $\text{dnTGF-}\beta\text{RII}$  мишеви, галектин-3 делује проинфламацијски, подстиче активацију инфлазома и тако погоршава манифестације аутоимунског холангитиса (242).

## 2. ЦИЉ РАДА

Главни циљ: утврдити улогу Gal-3 у патогенези РВС-а изазваног инфекцијом мишева, соја C57BL/6, *Novosphingobium aromaticivorans*-ом.

Сагласно основном циљу утврђени су и експериментални задаци:

1. Испитати улогу Gal-3 у развоју примарног билијарног холангитиса у експерименталном моделу болести која се индукује инфекцијом мишева соја C57BL/6 *Novosphingobium aromaticivorans*-ом.
2. Утврдити ефекте Gal-3 на састав и функционални фенотип ћелија које инфилтришу јетру.
3. Испитати утицај Gal-3 на активацију DC *Novosphingobium aromaticivorans*-ом.
4. Утврдити ефекте Gal-3 на активацију инфламазома у макрофагима излаганим *Novosphingobium aromaticivorans*-у.
5. Испитати да ли терапијска примена инхибитора галектина-3, GM-CT-01, може да ублажи манифестације РВС у моделу изазваним бактеријском инфекцијом.
6. Испитати да ли примена инхибитора галектина-3, GM-CT-01, смањује активацију инфламазома изазвану бактеријском инфекцијом.
7. Утврдити експресију Gal-3 у јетри мишева оболелих од РВС-а изазваног бактеријом и ефекте инхибитора Gal-3, GM-CT-01, на експресију галектина-3.

## 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3.1. Лабораторијске животиње

Истраживања су обављена на женкама, старим 8 недеља. Мишице су биле соја C57BL/6 (енгл. *Wild Type*, WT) и на истог соја мишева са *target* делецијом гена који кодира галектин-3 (*Gal-3 knock-out*[КО] или *Lgals3<sup>-/-</sup>* C57BL/6) (243). КО мишеви су првобитно допремљени из виваријума универзитета Калифорније љубазношћу проф. др *Daniel K. Hsu*-а (*Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA*). Мишеви коришћени у овој студији су одгојени у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Експерименталне процедуре у овој студији, рађене на мишевима, обављене су уз одобрење Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број одобрења: 01-8670) и у складу са свим смерницама за третирање лабораторијских животиња.

### 3.2. Индукција примарног билијарног холангитиса и процена болести

Примарни билијарни холангитис изазиван је инфицирањем женки C57BL/6 WT и C57BL/6 *Lgals3<sup>-/-</sup>*, старих 8 недеља, интравенском применом  $5 \times 10^7$  PFU *N. aromaticivorans* 0. и 15. дана експеримента као што је раније описано (109). Узорци крви добијени након жртвовања су прикупљани у епрувете без коагуланса, издвојен је серум и у њему

анализирана концентрација ензима: AST (енгл. *Aspartate Aminotransferase*), ALT (енгл. *Alanine Aminotransferase*) и ALP (енгл. *Alkaline Phosphatase*) на *Roche Cobas Mira Plus* аналајзеру. Након жртвовања животиња парафински исечци ткива јетре су обојени хематоксилином и еозином (*H&E*) стандардном процедуром. На сваком исечку је оцењивана инфламација перипортних простора, инфилтрација са и без оштећења билијарних канала, фиброза, некроза, хеморагије/билирагије и супкапсуларни инфилтрати. На основу интензитета и степена изражености патолошког налаза променма су додељивани бодови и то: нула- нема; један- блага; два- умерена; три- јака; четири- веома јака. Грануломи, хеморагије/билирагије и фиброза бодовани су као: нула- нема; једна- блага; два- умерена; три- јака. Хистолошка анализа и бодовање спроведени су слепом методом. Хистолошки препарати су фотографисани уз помоћ светлосног микроскопа (*Olympus BX51*) дигиталним фотоапаратом. За детекцију влакана колагена у исечцима коришћена је метода бојења *Picrosirius Red*-ом. Процент ткива захваћеног фиброзом је у мишијим исечцима јетре (сликано 10 поља на увећању 10X) израчунат коришћењем софтвера *ImageJ* (*NIHh, Bethesda, MD*).

### **3.3. Апликација инхибитора галектина-3, GM-CT-01**

Две групе *Lgals3<sup>+/+</sup>* мишева су формиране рандомизираним узорковањем. Мишеви једне групе су четири недеље интраперитонеално примали 300µg GM-CT-01 и то три пута недељно од почетка експеримента, односно од инфицирања бактеријом.

Посебна група мишева је ради процене терапијског ефекта инхибитора галектина-3 примала 300µg GM-CT-01 од почетка девете недеље експеримента истом учесталости и укупног трајања (3 x недељно/4 недеље).

### **3.4. Имунохистохемија мишијих узорака јетре**

Депарафинисани парафински исечци ткива јетре инкубирани су са примарним зечијим антителима специфичним за мишји NLRP3 и IL-1β и примарним мишијим антителом специфичним за Gal-3 (*Abcam, Cambridge, UK*). Хистолошки пресеци јетре визуелизовани су коришћењем кита за детекцију зечјих (*Expose Rb-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) и мишијих (*Expose Ms-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) антитела.



Обојени исечци су фотографисани дигиталном камером на светлосном микроскопу (Olympus BX5). Анализирано је 10 поља по пресеку (увеличање 40X) (244).

### 3.5. Мерење цитокина у хомогенатима јетре

Концентрације цитокина у хомогенатима јетре, добијених хомогенизацијом 100mg јетре у 0.5mL PBS-а и центрифугирањем на 14,000 обртаја 10 минута на 4°C, мерене су ELISA (енгл. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) техником употребом мишјег дуосета за IL-1 $\beta$  (R&D Systems) према упутству произвођача.

### 3.6. Изолација моноклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија

Мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом, а изолација моноклеарних леукоцита из јетре обављена је методом разграђивања јетре механичким средствима (245). На  $5 \times 10^5$  моноклеарних екстрахованих ћелија, ресуспендованих у пуферу (50 $\mu$ l) апликована су, у одговарајућим концентрацијама, моноклонска антитела обележена флуоресцентним материјама. Након инкубације у таму, на +4°C после 20 минута ћелијама је додавано 1,5ml хладног пуфера (енгл. *Staining Buffer*, BD) и центрифугиране на 400G пет минута. Након ресуспензије добијеног талог у 350 $\mu$ l пуфера ћелије су анализирани проточном цитометријом на апарату *FACSCalibur* (BD). за анализу добијених података послужио је софтвер *FlowJo*.

Бојење интрацелуларних цитокина изведено је коришћењем BD *Cytofix/CytoPerm*<sup>TM</sup> методе. За стимулацију ћелија коришћен је форбол миристат ацетат, 50ng/ml (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; Sigma) уз додавање јономицина, 500ng/ml (енгл. *Ionomycin*; Sigma) у трајању од 4 сата. У току *in vitro* стимулације ћелија, интрацелуларни транспорт протеина је блокиран моненсином (BD *GolgiStop*<sup>TM</sup>). После стимулације обојени су површински маркери, а затим су ћелије ресуспендоване у 250 $\mu$ l *Cytofix/CytoPerm*<sup>TM</sup> раствора (BD *Pharmingen*) и инкубирани на +4°C у трајању 20 минута. Ћелије су потом пране два пута у *Perm/Wash*<sup>TM</sup> пуферу (BD *Pharmingen*; 1ml/епрувети; 300G). Талогу су затим додата антитела за детекцију цитокина растворена у *Perm/Wash*<sup>TM</sup>

пуферу. Ћелије су потом пране пуфером *Perm/Wash<sup>TM</sup>*, и ресуспендоване помоћу 350µl пуфера и потом анализирани проточном цитометријом.

### **3.7. Продукција цитокина и експресија маркера активације након стимулације DC *in vitro***

Изоловање DC из слезина сваког миша појединачно обављено је методом магнетне сепарације уз помоћ *Pan Dendritic Cell Isolation Kit*-а (MACS *Miltenyi Biotec*) према упутству произвођача. Изоловане ћелије су ресуспендоване комплетним медијумом ако да им густина буде  $10^6$ /ml, 1ml суспензије је сипан у плоче са 24 отвора, и додато је по  $10^7$  бактеријских ћелија *Novosphingobium aromaticivorans* (246, 247). У одређене бунарчиће додат је инхибитор галектина-3, GM-CT-01 у финалној концентрацији 100µM. По истеку инкубације експресија маркера активације (CD86 и CD40) и цитокина (IL-4, IL-1β и p40 заједничке субјединице за IL-12/IL23) анализирана је проточном цитометријом.

### **3.8. *In vitro* стимулација перитонеалних макрофага бактеријом**

Перитонеални макрофаги су издвојени техником перитонелане лаваже комплетним медијумом као што је раније описано (248). Добијене ћелије су инкубирани са бактеријом *N. aromaticivorans* 24 сата (односно ћелија/бактерија 1:10) на 37°C у инкубатору са 5% CO<sub>2</sub>. Неке од ћелија су пре излагања бактеријама инкубирани са инхибитором каспазе-1 (Z-YVAD-FMK; 10µmol/L). По завршетку инкубације у слободној течности је ELISA техником измерена концентрација IL-1β и IL-6, употребом мишјег сета (R&D *Systems*). Експресија површинског маркера F4/80 и интрацелуларних IL-1β и NLRP3 анализирана је проточном цитометријом како је већ описано.

### **3.9. Имунофлуоресценца**

Изоловани перитонеални макрофаги ( $10^6$  ћелија/отвору) су инкубирани 7 дана у плочама са 6 отвора у које су стављене округле покровне љуспице и то у присуству *N. aromaticivorans* ( $10^7$  бактерија/отвору). Ћелије су затим обележене анти-F4/80, анти-IL-1β и анти-NLRP3 антителима, инкубирани са секундарним антителима конјугованим PE или FITC бојом (249). Љуспице су залепљене за предметна стакла коришћењем *ProLong Gold*

*antifade reagent with DAPI* и фотографисане коришћењем Olympus BX51 флуоресцентног микроскопа.

### **3.10. Активност каспазе-1**

Перитонеални макрофаги ( $1 \times 10^6$  ћелија/отвор) су инкубирани 24 сата у присуству бактерије *N. aromaticivorans* ( $1 \times 10^6$  бактерија/отвор) у плочама са 6 отвора, а активност каспазе-1 је измерена у лизатима ћелија коришћењем *Caspase-1 Colorimetric Kit*-а (R&D Systems).

### **3.11. Одређивање концентрације галектина-3 у култури спленоцита**

Мононуклеарне ћелије су изоловане из слезина нетретираних мишева методом механичке разградње. Изоловани спленоцити ( $2.5 \times 10^6$  ћелија/отвор) се инкубирани са инхибитором галектина-3, GM-CT-01 у финалној концентрацији 100 $\mu$ M 24 сата, а затим стимулирани липополисахаридом 1 $\mu$ g/ml (LPS, *Lipopolysaccharides* из *E. coli* 055:B5) 24 сата, као што је раније описано (228). Концентрација Gal-3 у супернатантима је измерена коришћењем *Duoset ELISA* сета (R&D Systems).

### **3.12. Анализа експресија гена реакцијом ланчаног умножавања**

РНК је изолована из ткива јетре коришћењем тризол реагенса (250). За мерење концентрација и оцену пречишћености RNA коришћено је спектрофотометријско мерење апсорбанце (260/280nm) уз помоћ уређаја *Eppendorf® Biophotometer* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). Процесом реверзне транскрипције је добијена комплементарна ДНК, уз помоћ кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), како је произвођач описао. Методом квантитативног PCR-а у реалном времену (*Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) одређена је релевантна генска експресија. qRT-PCR је одређиван апаратом *Mastercycler® ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у плочама са 96 отвора (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Коришћени су комерцијално доступни прајмери за проколаген  $\alpha 1$  (*forward: GCTCCTCTTAGGGGCCACT, reverse: CCACGTCTCACCATTTGGGG*),  $\alpha$ -SMA (*forward:*

ACTGGGACGACATGGAAAAG, *reverse*: CATCTCCAGAGTCCAGCACA),  $\beta$ -актин је коришћен као *housekeeping* ген (*forward*: AGCTGCGTTTTACACCCTTT, *reverse*: AAGCCATGCCAA TGTTGTCT). Тест је извођен у дупликату сваког узорака. Вредности  $C_t$  контролних трипликата (актин) су одузимане од измерених вредности  $C_t$  трипликата релевантних гена и тако је добијен  $\Delta C_t$ . Релативна експресија гена исказивана је као  $2^{-\Delta C_t}$ . Вредности су приказиване као релативне у односу према контроли, подешеној на 1 како је уобичајено.

### 3.13. Статистичка анализа

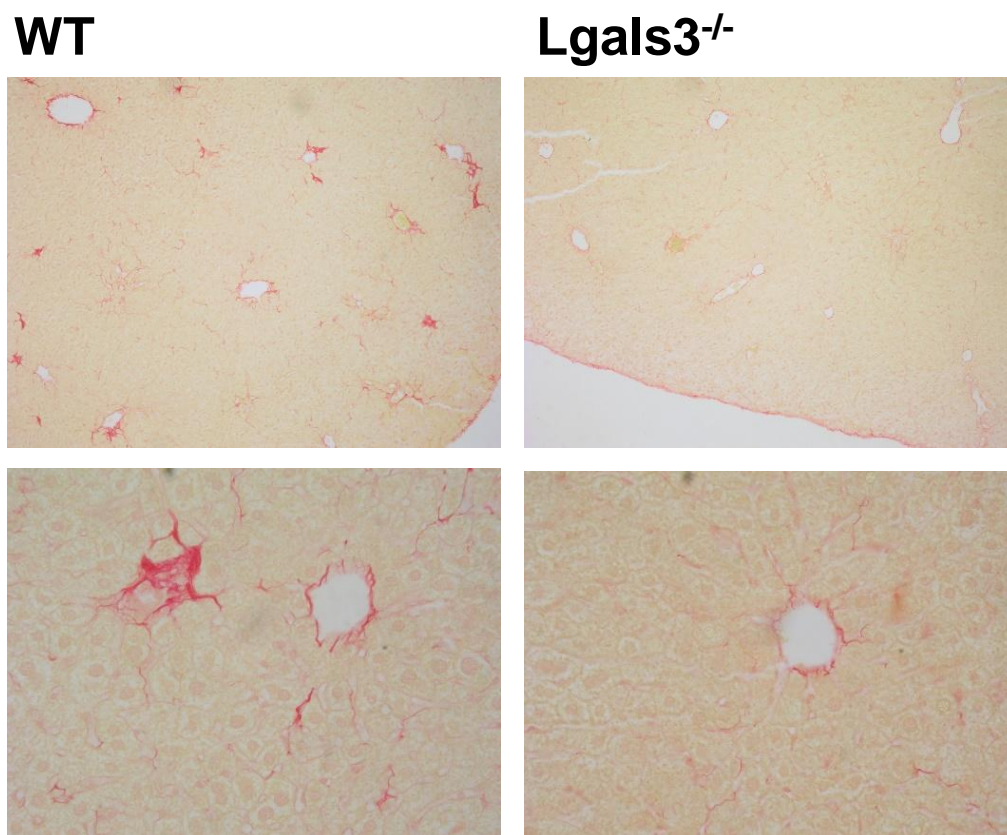
Подаци су приказани као вредност  $\pm$  SD или  $\pm$  SEM. Статистичка значајност одређивана је независним узорком *Student's T test* и *ANOVA*-ом и где је било потребно *Mann-Whitney U test*-ом или *Kruskal-Wallis*-ом. Статистички значајним означене су добијене вредности  $p < 0.05$ . Подаци су анализирани коришћенем програма за статистику *SPSS 20.0* и *SPSS 22.0*.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Делација *Lgals3* ублажава примарни билијарни холангитис индукован бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Раније смо показали да су *Lgals3*<sup>-/-</sup> C57BL/6 мишеви готово резистентни на индукцију примарног билијарног холангитиса који се изазива инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans* (251). На исечцима јетри C57BL/6 WT мишева обојених хематоксилин-еозином 8 недеља после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* детектована је инфилтрација билијарних каналића, оштећење билијарних каналића са облитерацијом, перипортна и инфилтрација паренхима и фиброза. Супротно томе у свим анализираним исечцима ткива јетре инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева запажено је потпуно одсуство оштећених каналића (251). Серолошки параметри болести, концентрације трансаминаза AST и ALT и IgA антитела специфичног за PDC-E2 су у групи инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева такође били веома слични параметрима у групи нетретираних (здравих) мишева, за разлику од групе инфицираних WT мишева у којој је детектовано статистички значајно повећање наведених серумских параметра од четврте недеље по инфекцији (251). Значајно израженија фиброза у јетрама WT него у јетрама *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева 8 недеља после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* (Слика 1) потврђена је и *Picrosirius red* бојењем којим се црвено боје влакна колагена и користи се за детекцију фиброзе органа (252).

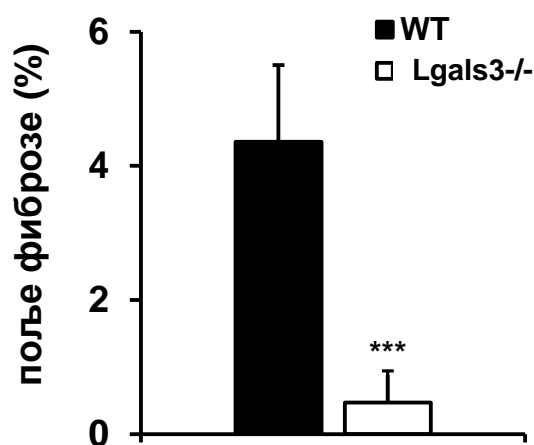
Слика 1



Слика 1. Репрезентативни примери исечака јетри инфицираних мишева обојених техником *Picrosirius red*. Увеличања: 100X (горњи панел) и 400X доњи панел

Квантитативном анализом исечака јетри WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* је утврђено да је проценат ткива захваћен фиброзом значајно статистички већи ( $p < 0.001$ ) за групу WT него за групи *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева (Графикон 1)

Графикон 1



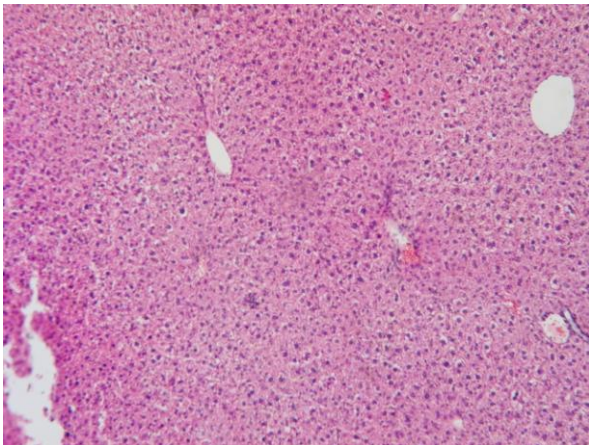
Графикон 1. Процент ткива јетре са депозитима колагена је значајно већи у групи WT мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* него у групи инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева. Приказана је средња вредност  $\pm$  SD процента ткива јетре са обојеним депозитима колагена израчунат анализирањем препарата ткива јетре третираних *Picosirius red*-ом у програму *ImageJ*. Статистичка сигнификантност је одређивана *Student*-овим t тестом, \*\*\*  $p < 0.001$

И седам месеци после инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* у јетрама *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева нема ни инфилтрације ни фиброзе док се у јетрама C57BL/6 *wild type* мишева примећује фиброза, некроза ткива и скоро потпуно одсуство жучних каналића (Слика 2). И у исечцима јетри C57BL/6 *wild type* мишева добијеним 7 месеци после бактеријске инфекције обојених методом *Picosirius red* јасно се уочава присуство изражених влакана колагена (Слика 3). У јетрама *wild type* мишева, 7 месеци после инфекције, запажају се: благи инфилтрати у паренхиму и перипотном простору, одсуство

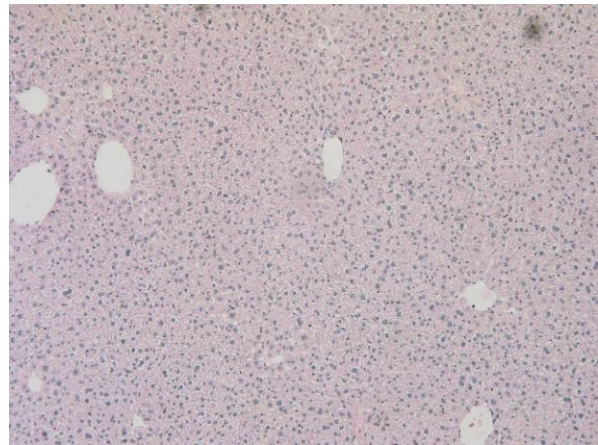
гранулома, облитерација билијарних каналића у значајном проценту, значајна фиброза, некроза ткива као и хеморагије са билирагијама (Слика 2, Графикон 2). Хистолошки скор који указује на оштећење билијарних каналића ( $p < 0.001$ ), фиброзу ( $p < 0.001$ ), некрозу ткива ( $p < 0.001$ ) и хеморагије ( $p < 0.001$ ) је статистички значајно већи у групи C57BL/6 *wild type* у поређењу са групом *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева (Графикон 2).

Слика 2.

C57BL/6 *wild type*



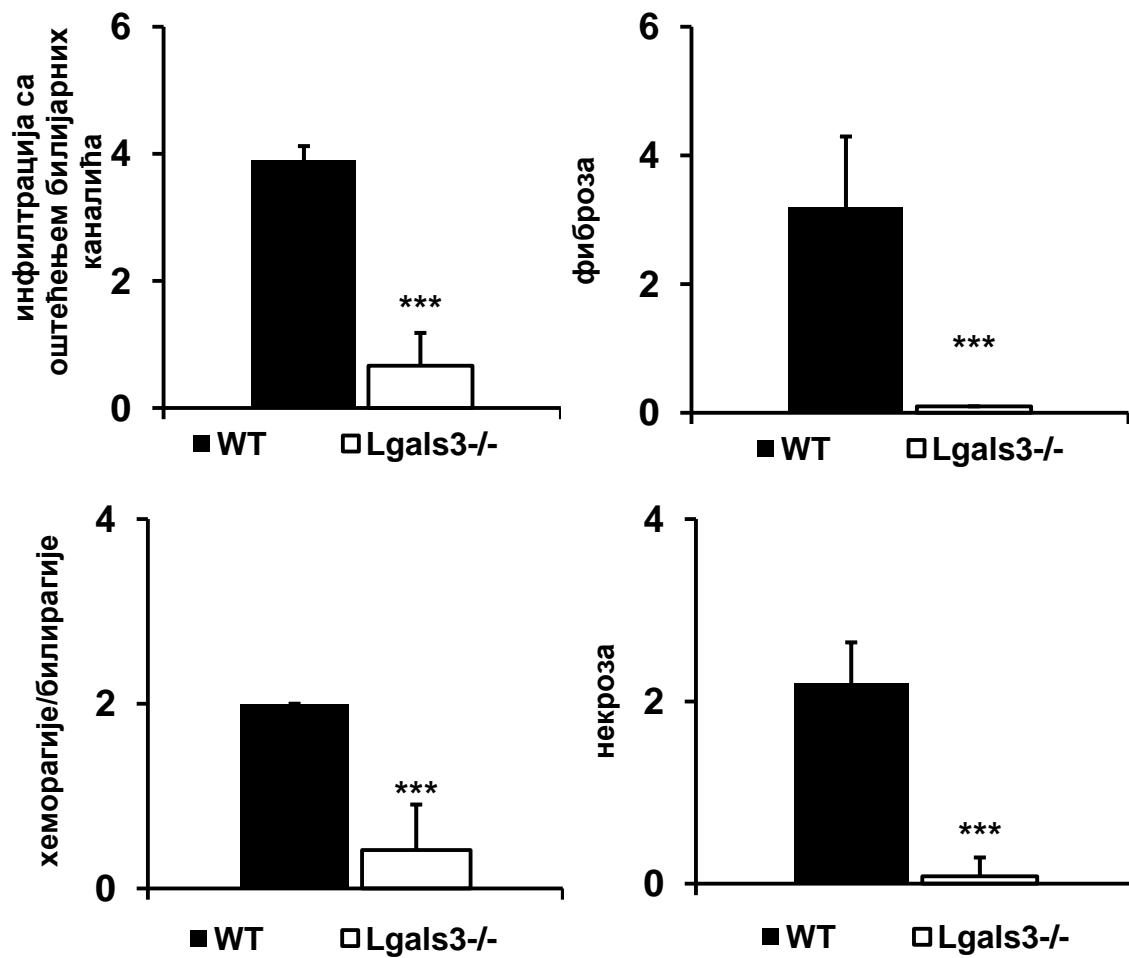
C57BL/6 *Lgals3<sup>-/-</sup>*



Слика 2. Јетре C57BL/6 WT мишева седам месеци после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* скоро да немају жучне каналиће. Репрезентативни исечци ткива јетри C57BL/6 WT мишева и C57BL/6 *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева добијени 7 месеци по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* обојени техником хематоксилин-еозин.



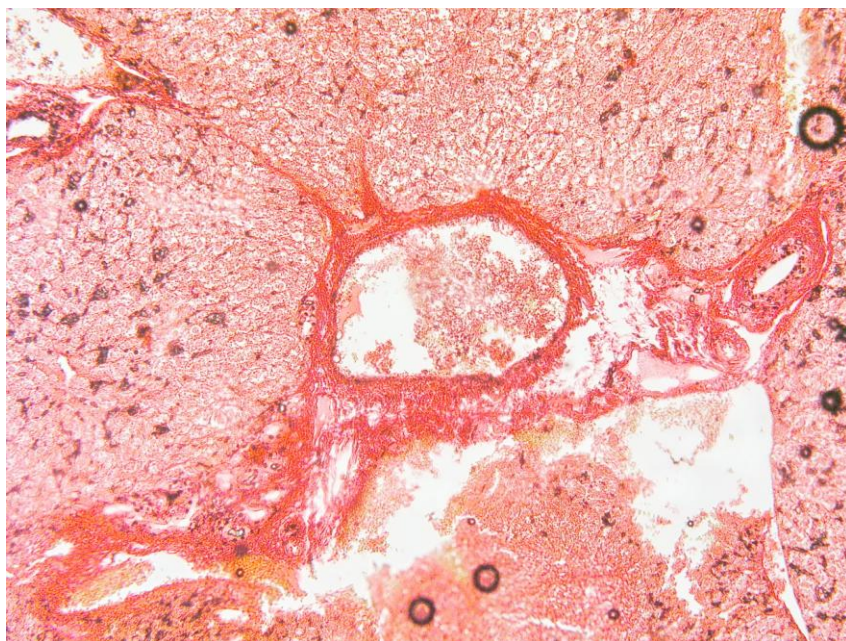
Графикон 2



Графикон 2. Значајно оштећење јетри C57BL/6 WT мишева се задржава и 7 месеци након инфекције *N. aromaticivorans*-ом. Ткива јетри C57BL/6 WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева изолована су 7 месеци након инфицирања *N. aromaticivorans*-ом. Исечци (5 $\mu$ m) бојени су хематоксилин-созином. Израчунате су средње вредности скова параметара

оштећења билијарних каналића, фиброзе, некрозе и хеморагије/билирагије + SD. Статистичка сигнификантност је одређивана *Student*-овим t тестом, \*\*\* $p < 0.001$ .

**Слика 3**



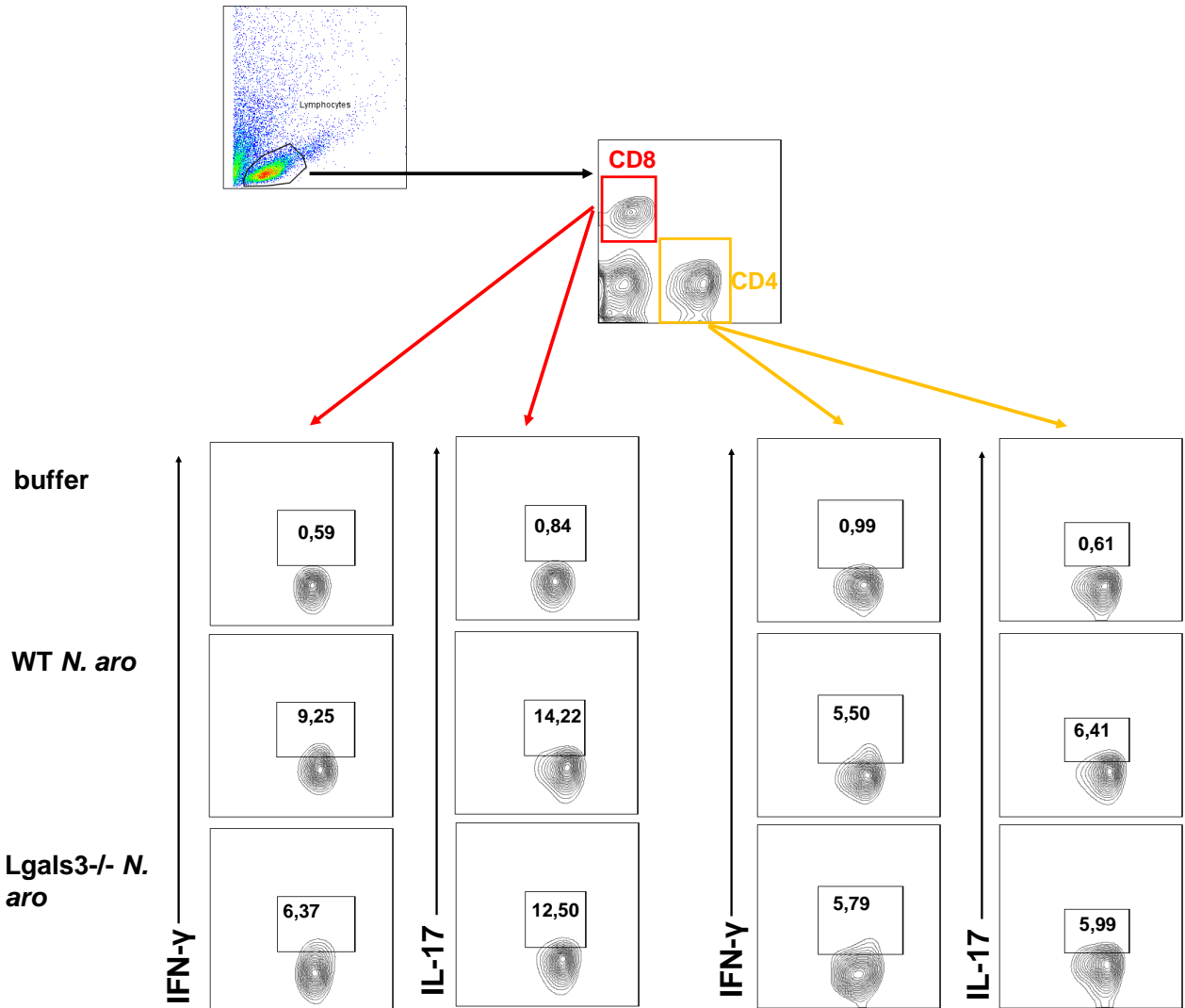
**Слика 3. Исечак јетре C57BL/6 WT мишице седам месеци после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* обојен техником *Picrosirius red*.**

## 4.2. Присуство галектина-3 значајно појачава имунски одговор тип 17 у јетри мишева са примарним билијарним холангитисом индукованим инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Пошто је за развој примарног билијарног холангитиса важна продукција инфламацијских цитокина анализирана је заступљеност CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцита са експресијом IFN- $\gamma$  и IL-17, међу ћелијама изолованих из јетри *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишица, осам недеља после инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Иако су проценти IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у оквиру CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> популација већи у јетрама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева него у јетрама инфицираних WT мишева разлике нису достигле статистичку значајност. Репрезентативни плотови са процентима IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у оквиру CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> популација у јетрама инфицираних и контролних мишева и стратегија гејтовања су приказани на Слици 4.

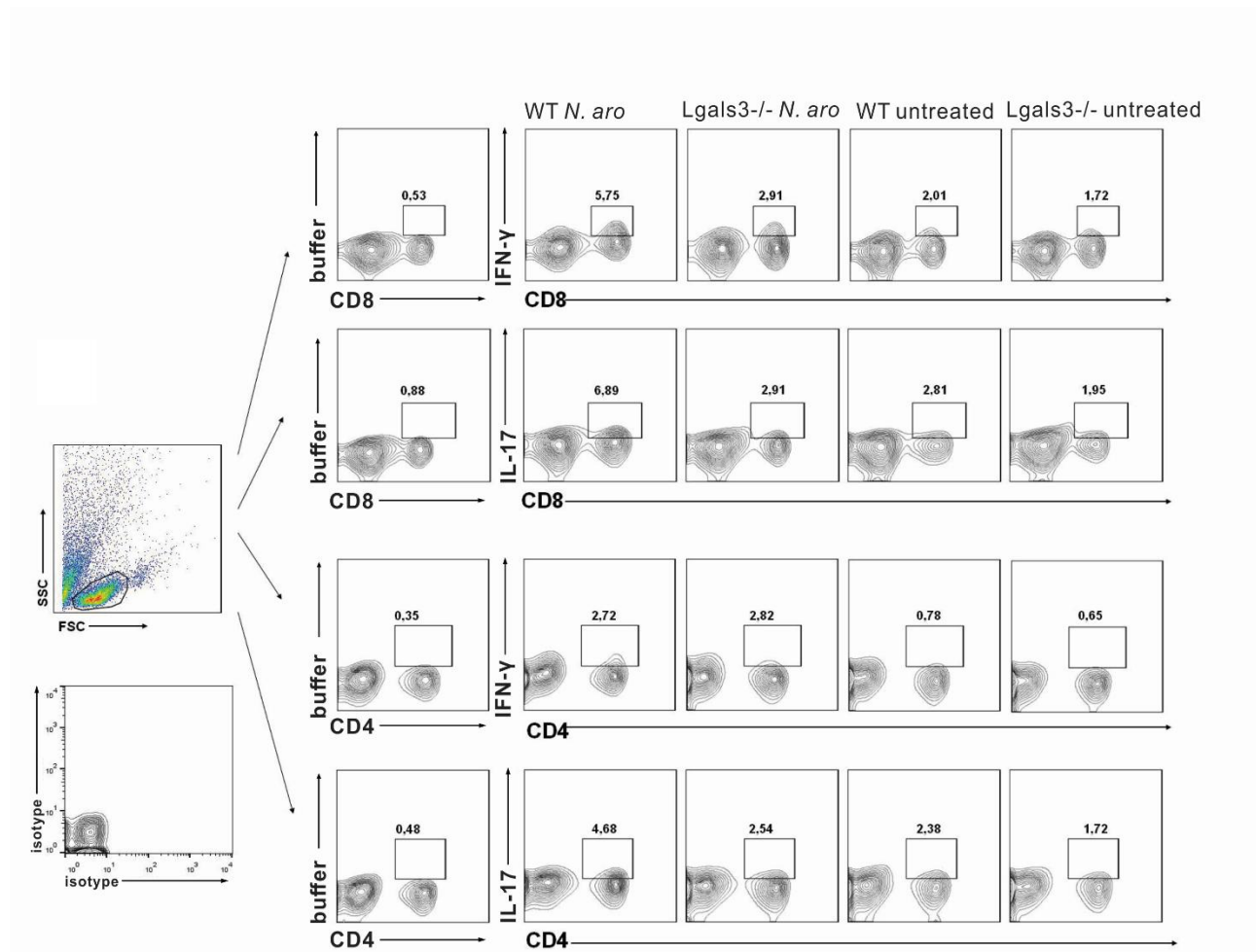
Међу групама инфицираних мишева нису регистроване статистички значајне разлике у проценту IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у популацијама CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Међутим даља анализа указала је да је проценат и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцита који продукују IL-17<sup>+</sup> у оквиру популације мононуклеарних ћелија значајно већи у инфицираних WT него у инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева (251). Већи проценат IL-17 позитивних CD4 и CD8 лимфоцита у групи инфицираних WT мишева се уочава на репрезентативним плотовима приказаним на Слици 5. Проценти IL-17<sup>+</sup> и IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 и CD8 ћелија у групи инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева нису већи од процената ових ћелија у групама контролних нетретираних мишева (Слика 5). Процент IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ћелија је нешто већи у јетрама инфицираних WT него у јетрама *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева (Слика 5). Нема разлике у проценту CD8<sup>+</sup> ћелија које експримирају IFN- $\gamma$  у јетрама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева (Слика 5).

**Слика 4**



Слика 4. Стратегија гејтовања за детекцију IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у оквиру CD4+ и CD8+ популација. Гејтоване су мононуклеарне ћелије, а затим CD4+ и CD8+ ћелије, у оквиру којих су детектовани проценти IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија. Репрезентативни дот плотови приказују проценти IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у оквиру CD4+ и CD8+ популација у јетрама C57BL/6 WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans*.

Слика 5

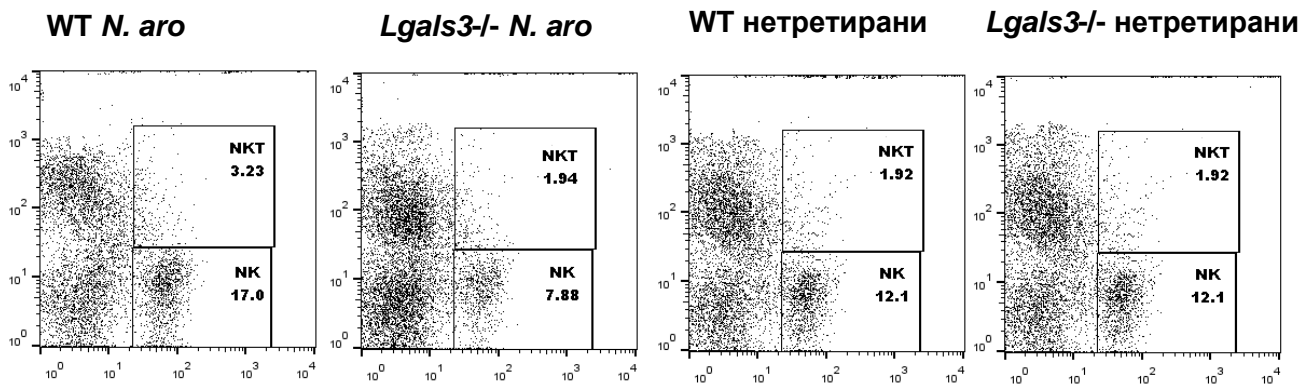


Слика 5. Делеција *Lgals3* смањује присуство IL-17+ и IFN-γ+ CD4 и CD8 лимфоцита у јетрама мишева након индукције РВС-а. Осам недеља после инфицирања бактеријом *N. aromaticivorans* из јетри су издвојене мононуклеарне ћелије, инкубирани са антителима специфичним за CD4 и CD8 молекуле и инфламацијске цитокине и анализирани проточним цитометром. На слици се виде dot plot-ови који приказују проценте CD4 и CD8 ћелија које експримирају IFN-γ и IL-17.

**4.3. Одсуство галектина-3 не само да значајно смањује инфилтрацију јетре активираним, цитотоксичким и инфламацијским NK ћелијама већ смањује и инфламацијски и цитотоксички потенцијал ових ћелија**

За развој билијарног холангитиса након инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* неопходна је активност NKT ћелија. Ове ћелије преко CD1d молекула активира  $\alpha$ -глукуронозилцерамид присутан у ћелијском зиду бактерија. Поред тога NK ћелије помажу активацију аутореактивних Т лимфоцита, појачавају њихову активност и тако доприносе оштећењу билијарних епителних ћелија (231). Имајући у виду значај NK и NKT ћелија за развој РВС, проточном цитометријом је анализиран проценат и фенотип ових ћелија у јетрама инфицираних WT и *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева. У јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева, 8 недеља после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*, нађена је значајно мања проценатна заступљеност NK (CD49b+CD3-) ћелија него у јетрама инфицираних WT мишева (251). Штавише, инфекција уопште није повећала заступљеност NK ћелија у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева. Већи проценти NK ћелија у групи инфицираних WT мишева се уочавају на Слици 6 на којој су приказани репрезентативни *dot plot*-ови који приказују NK (CD49b+CD3-) и NKT (CD49b+CD3+) ћелије.

**Слика 6**



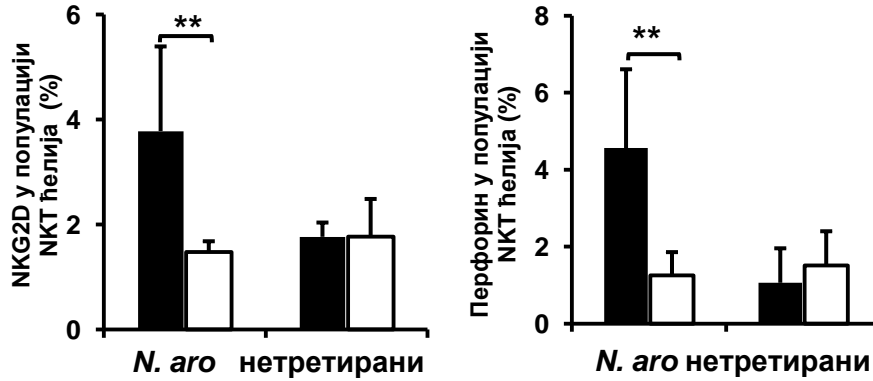
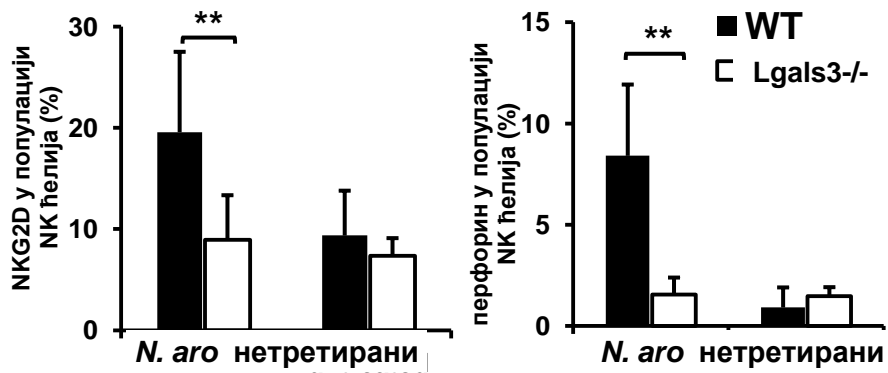
**Слика 6.** Делесија *Lgals3* смањује проценат NK ћелија у јетри инфицираних мишева. Осам недеља након инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*-ом из јетри су изоловане су мононуклеарне ћелије и проточном цитометријом анализирани (CD49b+CD3-) NK и (CD9b+CD3+) NKT ћелије. Репрезентативни *dot plot*-ови показују заступљеност NK и NKT који инфилтришу јетре инфицираних и неинфицираних WT, *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева.

Даље је испитивано да ли је блажа болест *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева удружена са слабијом активацијом NK и NKT ћелија и као што се види на Графикону 3А у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* присутан је статистички значајно мањи проценат активираних, NKG2D позитивних, и цитотоксичких, перфорин позитивних, ћелија у оквиру популације NK и NKT ћелија у поређењу са групом

инфицираних WT мишева. У популацији НК и НКТ ћелија присутних у јетрама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева детектована је и слабија експресија NKG2D и перфорина у поређењу са експресијом ових молекула у у популацији НК и НКТ ћелија у јетрама инфицираних WT мишева (Графикон 3Б).

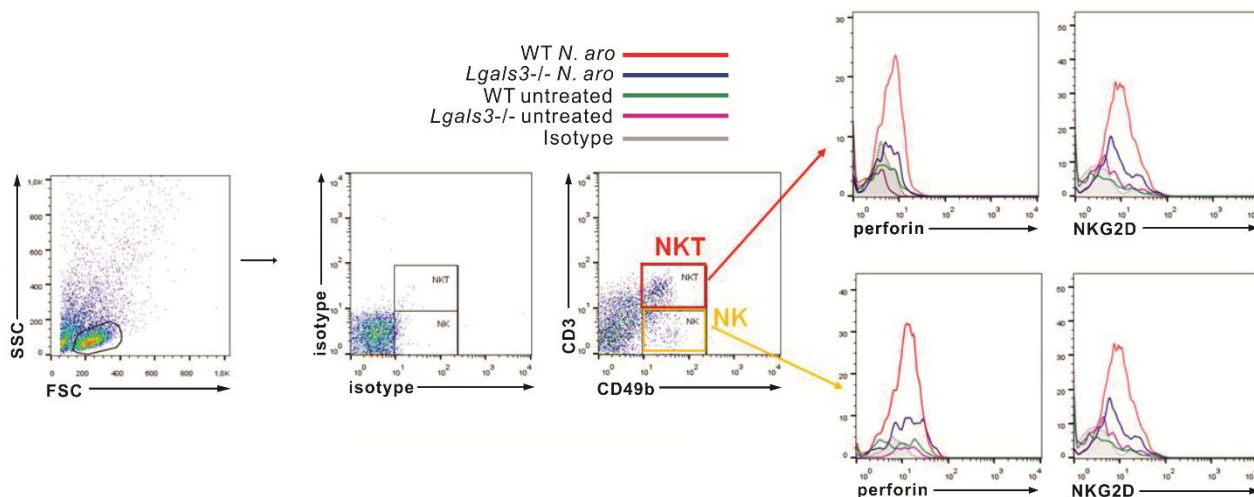
Графикон 3

А



Б



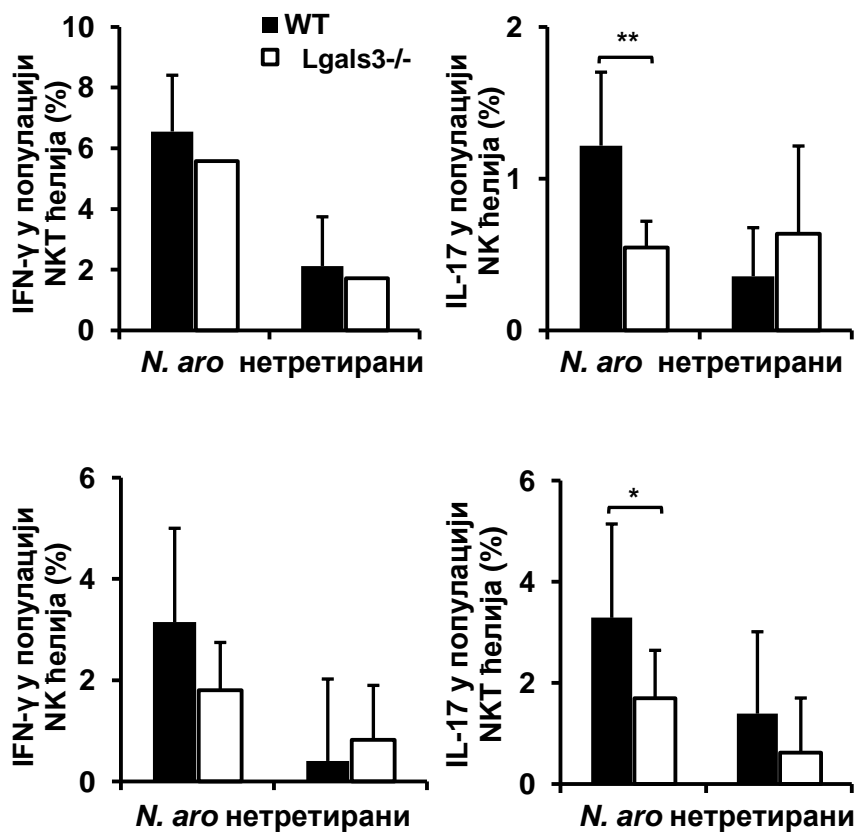


**Графикон 3.** Делесија *Lgals3* смањује проценат цитотоксичких НК и NKT ћелија у јетрама инфицираних мишица. Мононуклеари изоловани из јетри, осме недеља након инфицирања *N. aromaticivorans*-ом анализирани су (проточном цитометријом) (A) Приказани су проценти позитивних NKG2D и перфорин позитивних ћелија у популацијама NK и NKT ћелија. Вредности су приказане као средња вредност + SE, 8 мишева/групи. \*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ . Статистичка значајност разлике је утврђена *Student*-овим t тестом. (B) Репрезентативни плотови и хистограми приказују експресију маркера активације NKG2D и маркера цитотоксичности у популацијама NK и NKT у јетрама инфицираних и неинфицираних WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишица.

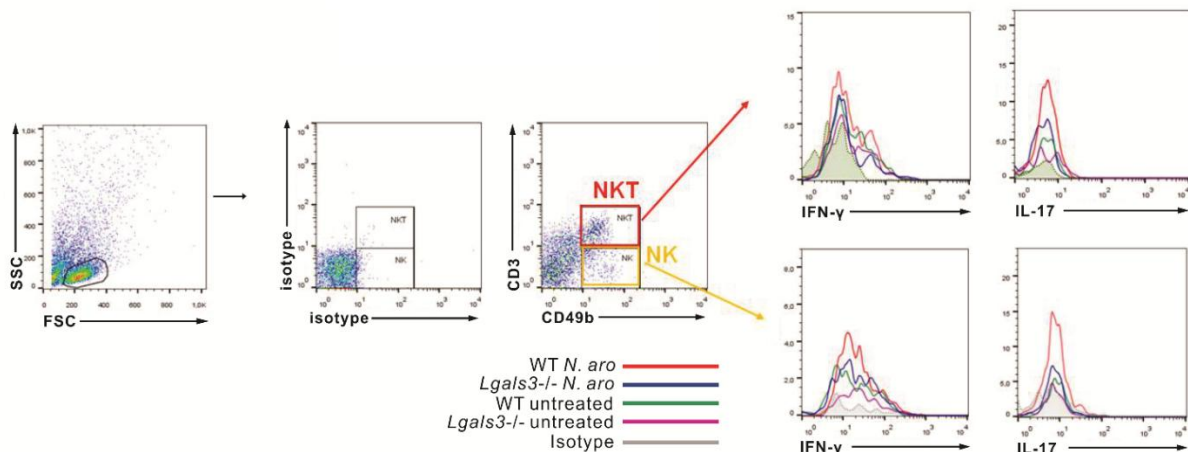
Четири недеље по инфекцији *N. Aromaticivorans*-ом у јетрама *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева је забележен значајно већа процентуална заступљеност IFN- $\gamma$  позитивних NK и NKT ћелија него у јетрама инфицираних *Wild Type* мишева (251). Међу групама, четири недеље после инфекције није забележена разлика у проценту IL-17 позитивних NK и NKT ћелија (251). Даље је испитан проценат IFN- $\gamma$ + и IL-17+ ћелија у популацијама NK и NKT, осме недеље након инфицирања *N. aromaticivorans*-ом. Проточна цитометрија мононуклеарних ћелија изолованих из јетри мишева 8 недеља после инфекције између *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева није регистровала значајне разлике у процентима NK и NKT ћелија позитивних на IFN- $\gamma$  (Графикон 4А). Али су, 8 недеља после бактеријске инфекције проценти IL-17+ ћелија у популацијама NK и NKT статистички сигнификантно мањи у јетрама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева (Графикон 3А). Детектована је и мања експресија IL-17 у популацији NK и NKT ћелије у јетрама *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева након инфекције *N. aromaticivorans*-ом у поређењу са групом WT мишева (Графикон 4Б).

Графикон 4

А



Б



**Графикон 4.** Делесија *Lgals3* смањује проценат инфламацијских NK и NKT ћелија у јетрама инфицираних мишица. Мононуклеари су екстраховани из јетри, осме недеље након апликације *N. aromaticivorans*-а, и употребом проточне цитометрије анализирана је експресија IFN- $\gamma$  и IL-17 у NK и NKT ћелијама (A) Проценти IL-17 и IFN- $\gamma$  позитивних ћелија у оквиру популација NK и NKT ћелија. Вредности су приказане као средња вредност + SE, 8 мишева/групи. \*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ . Статистичка значајност разлике је утврђена *Student*-овим t тестом. (B) Репрезентативни плотови и хистограми приказују експресију IFN- $\gamma$  и IL-17 у оквиру популација NK и NKT ћелија заступљених у јетрама инфицираних и неинфицираних WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишица.

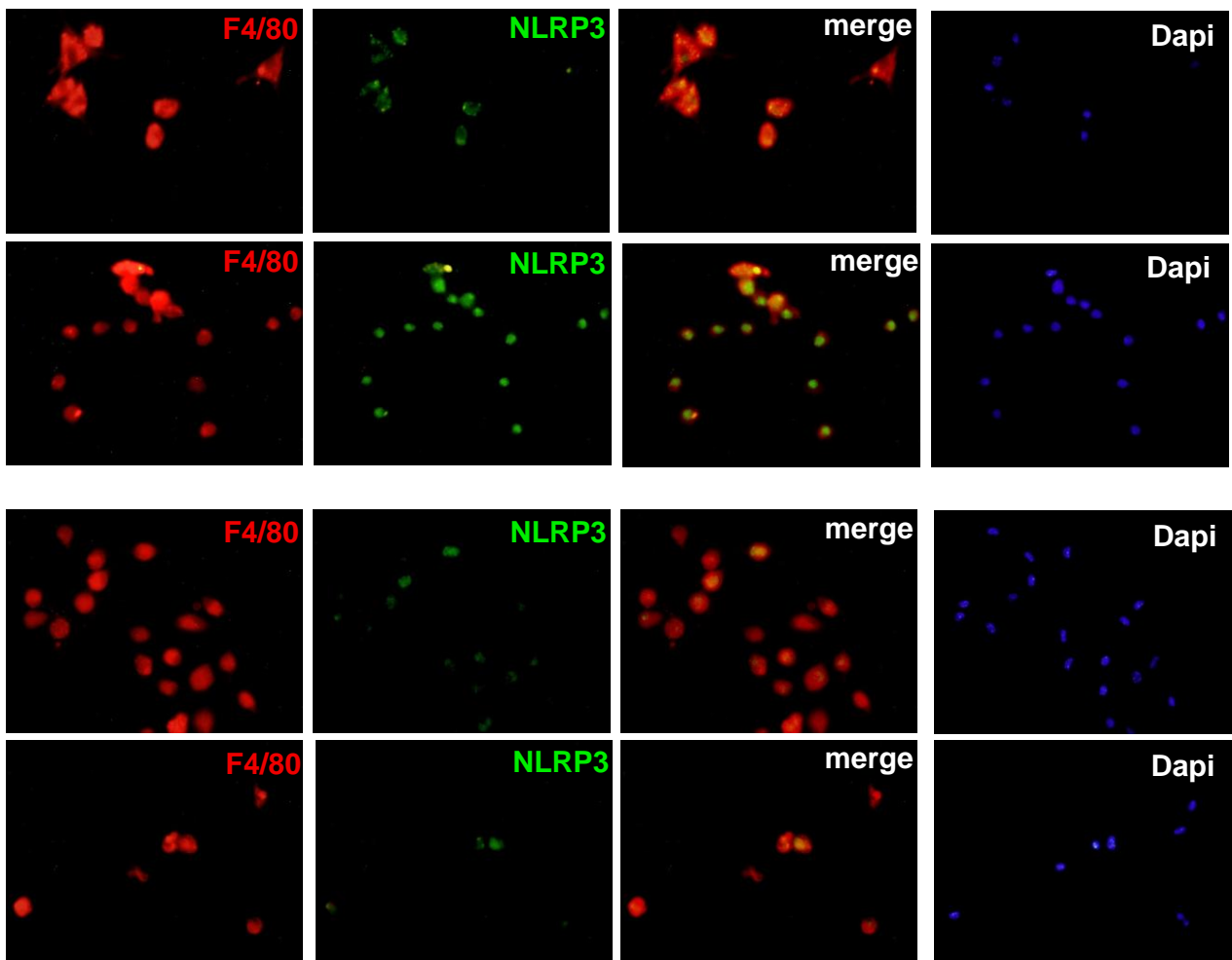
#### 4.4. Дефицијенција галектина-3 значајно редукује експресију компоненте инфламазома NLRP3, продукцију IL-1 $\beta$ и активност каспазе-1 у перитонеалним макрофагима стимулираних бактеријом *N. aromaticivorans in vitro*

Пошто је раније показано да инфекција бактеријом *N. aromaticivorans* повећава експресију NLRP3 компоненте инфламазома у јетри и да је проценатна заступљеност DC у којима се региструје NLRP3 значајно већи и у јетрама и слезинама WT мишева поредећи их са групом инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева, три дана по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* (251) у даљем раду је детаљније испитиван утицај галектина-3 на активацију инфламазома бактеријом *N. aromaticivorans*. Перитонеални макрофаги изоловани из нетретираних WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева су *in vitro* стимулирани бактеријом у току седам дана након чега је имунофлуоресценцом анализирана експресија NLRP3 као и IL-1 $\beta$ . Као што се види на Слици 7 стимулација бактеријом *N. aromaticivorans* повећава експресију NLRP3 само у WT макрофагима. У макрофагима изолованим из *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева се након стимулације бактеријом не уочава повећање експресије NLRP3 у

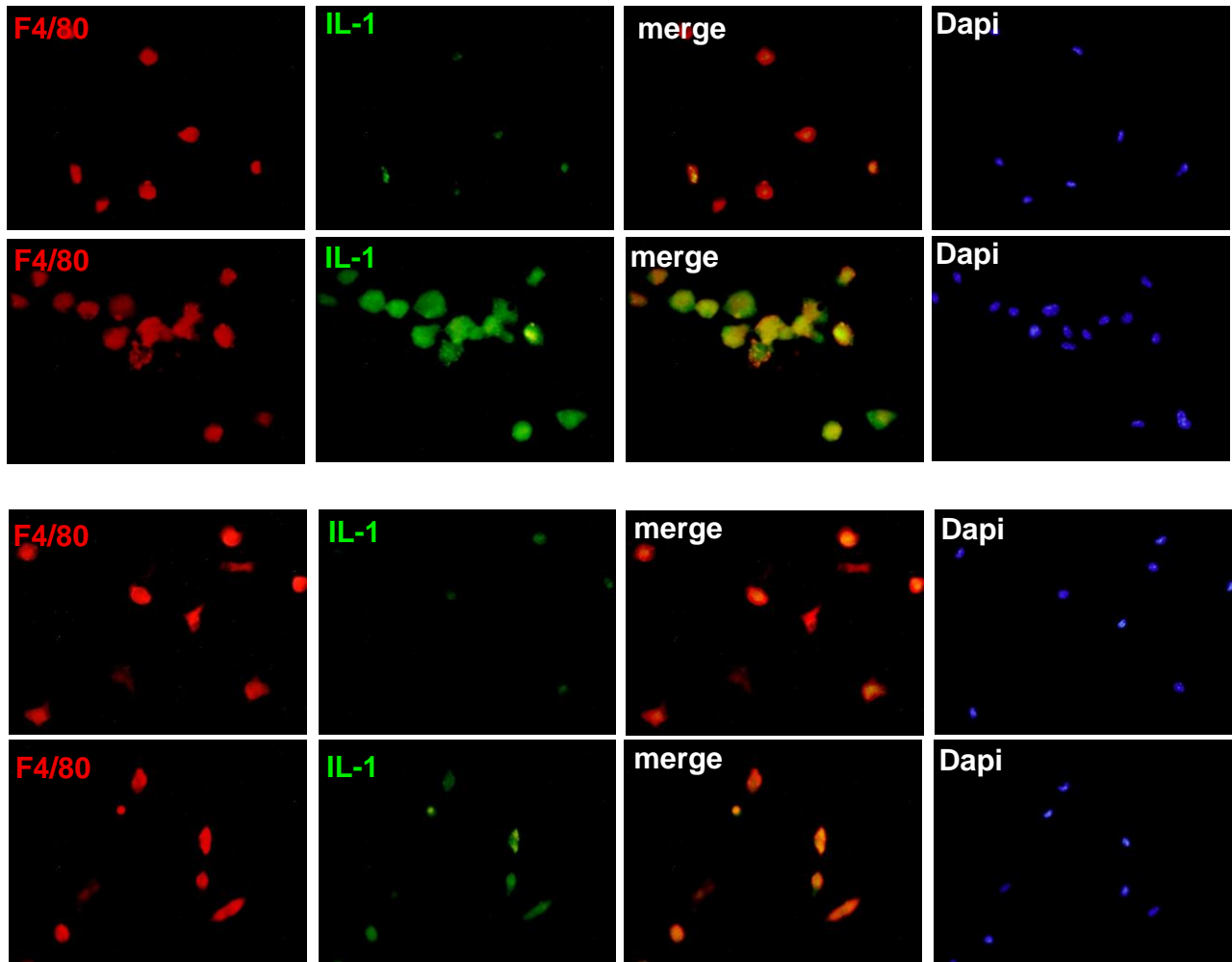
поређењу са нестимулисаним макрофагима (гајеним у медијуму без бактерија). Слично, пораст експресије IL-1 $\beta$  у макрофагима стимулисаним *N. aromaticivorans* у поређењу са макрофагима гајеним само у медијуму, се уочава само у WT макрофагима (Слика 7Б). Експресија IL-1 $\beta$  у *Lgals3*<sup>-/-</sup> макрофагима стимулисаним бактеријом је слична као и у нестимулисаним WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> макрофагима.

Слика 7

А



Б

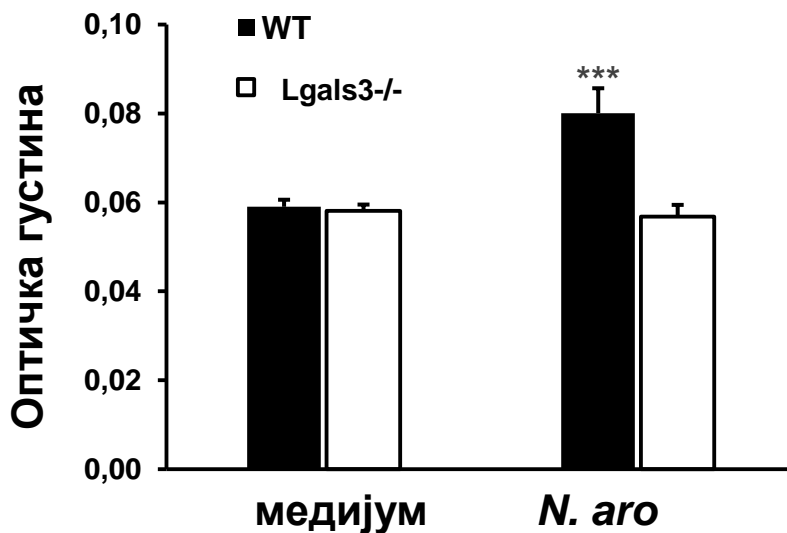


Слика 7. Експресија компоненте инфламазома NLRP3 и IL- $\beta$  се након *in vitro* стимулације бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* не повећава у перитонеалним макрофагима добијеним из галектин-3 дефицијентних мишева. Имунофлуоресценца, F4/80 (црвено) NLRP3 инфламазома (А), или IL-1 (Б) (зелено) ДНК обојена ДАPI-јем (плаво), перитонеалних макрофага изолованих из WT (горња два панела) и Lgals3<sup>-/-</sup> (доња два панела) гајених 7 дана у присуству бактерије (први и трећи панел) или само медијума (други и четврти панел).

Како је имунофлуоресценцом уочена повећана експресија NLRP3 и IL-1 $\beta$ , након стимулације бактеријом *N. aromaticivorans*, само у макрофагима изолованим из WT мишева наредни експерименти су урађени да би се утврдио значај галектина-3 у активацији инфламазома бактеријом *N. aromaticivorans* и стимулацији инфламације.

Активација инфламозома за последицу има конверзију про-каспазе-1 у активни облик каспазе-1 која катализује реакцију добијања активне форме IL-1 $\beta$  и IL-18 (253) па је зато анализирана активност каспазе-1 у лизатима перитонеалних макрофага WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева стимулираних бактеријом. Активност каспазе-1 је статистички значајно већа у популацији перитонеалних макрофага WT мишева *in vitro* стимулираних бактеријом *N. aromaticivorans* у поређењу са *Lgals3*<sup>-/-</sup> макрофагима стимулираних на исти начин (Графикон 5).

**Графикон 5**

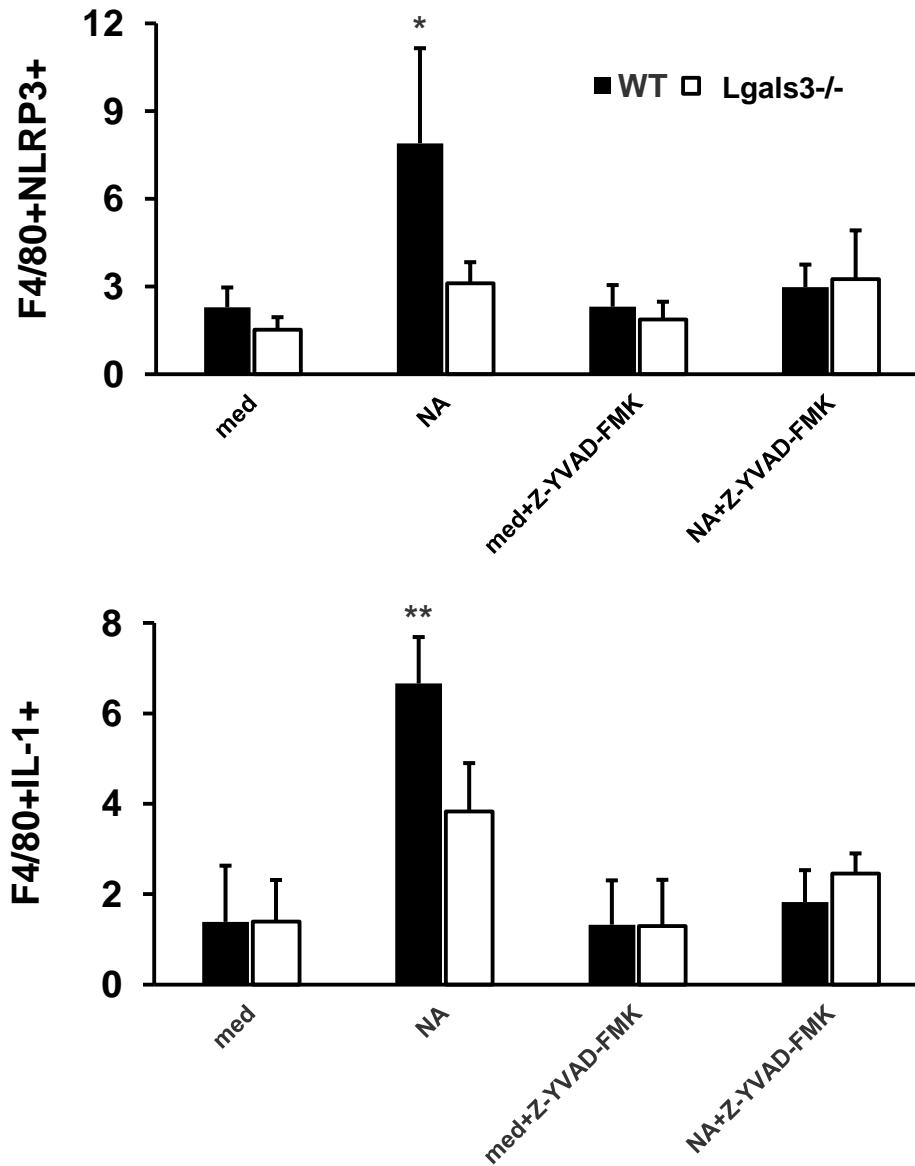


**Графикон 5.** Галектин-3 је неопходан за активацију каспазе-1 у макрофагима стимулираним бактеријом *Novosphynobium aromaticivorans*. Перитонеални макрофаги изоловани из нетретираних WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева ( $1 \times 10^6$  ћелија/отвор), су инкубирани 24 сата само у медијуму, или у присуству бактерије *N. aromaticivorans* ( $1 \times 10^7$  бактерија/отвор) у плочама са 6 отвора. Активност каспазе-1 у лизатима третираних ћелија је одређена коришћењем *Caspase-1 Colorimetric Kit*-а (R&D Systems). Приказана је средња вредност очитане оптичке густине + SD која је директно сразмерна активности каспазе-1 (пет мишева по групи, \*\*\* $p < 0.001$ ). Значајност је утврђивана Student-овим *t* тестом.

Да би се потврдио значај галектина-3 за активисање инфламозома бактеријом *N. aromaticivorans*, макрофаги изоловани из *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT су стимулирани бактеријом (односно ћелија/бактерија 1:10) у присуству инхибитора каспазе-1 Z-YVAD-FMK у концентрацији 10 μmol/L након чега је у њима проточном цитометријом анализирана експресија NLRP3 и IL-1β чија се активна форма добија тек након активације инфламозома и каспазе-1. Контролне ћелије су стимулиране само бактеријом без присуства инхибитора. Процент макрофага (F4/80<sup>+</sup>) који исказују NLRP3 и IL-1β (Графикон 6) су статистички значајно већи у популацији перитонеалних макрофага WT мишева *in vitro* стимулираних бактеријом *N. aromaticivorans* у поређењу са *Lgals3<sup>-/-</sup>* макрофагима стимулираних на исти начин. Нема повећања процента NLRP3 и IL-1β позитивних макрофага у групи ћелија изолованих из WT мишева и стимулираних бактеријом у присуству инхибитора каспазе-1 (Графикон 6).

Налаз значајно веће продукције IL-1β и IL-6 у перитонеалним макрофагима изолованим из WT мишева нагоне у онима изолованим из *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева, након стимулације *N. aromaticivorans*-ом, (Графикон 7) потврђује различит одговор WT и *Lgals3<sup>-/-</sup>* ћелија на *in vitro* стимулацију бактеријом *N. aromaticivorans*. Није детектована статистички значајна разлика у продукцији IL-1β између група *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT макрофага гајених само у медијуму без додавања бактерија (Графикон 7). Међутим, показано је да додавање инхибитора каспазе-1, Z-YVAD-FMK (10 μmol/L) у културу WT макрофага стимулираних бактеријом *N. aromaticivorans* значајно редукује продукцију IL-1β, а не утиче на продукцију IL-6 у WT макрофагима стимулираним бактеријом (Графикон 7). Овај налаз указује да је галектин-3 неопходан за активацију инфламозома и каспазе-1, као и последичне продукције проинфламацијског цитокина у макрофагима стимулираним бактеријом.

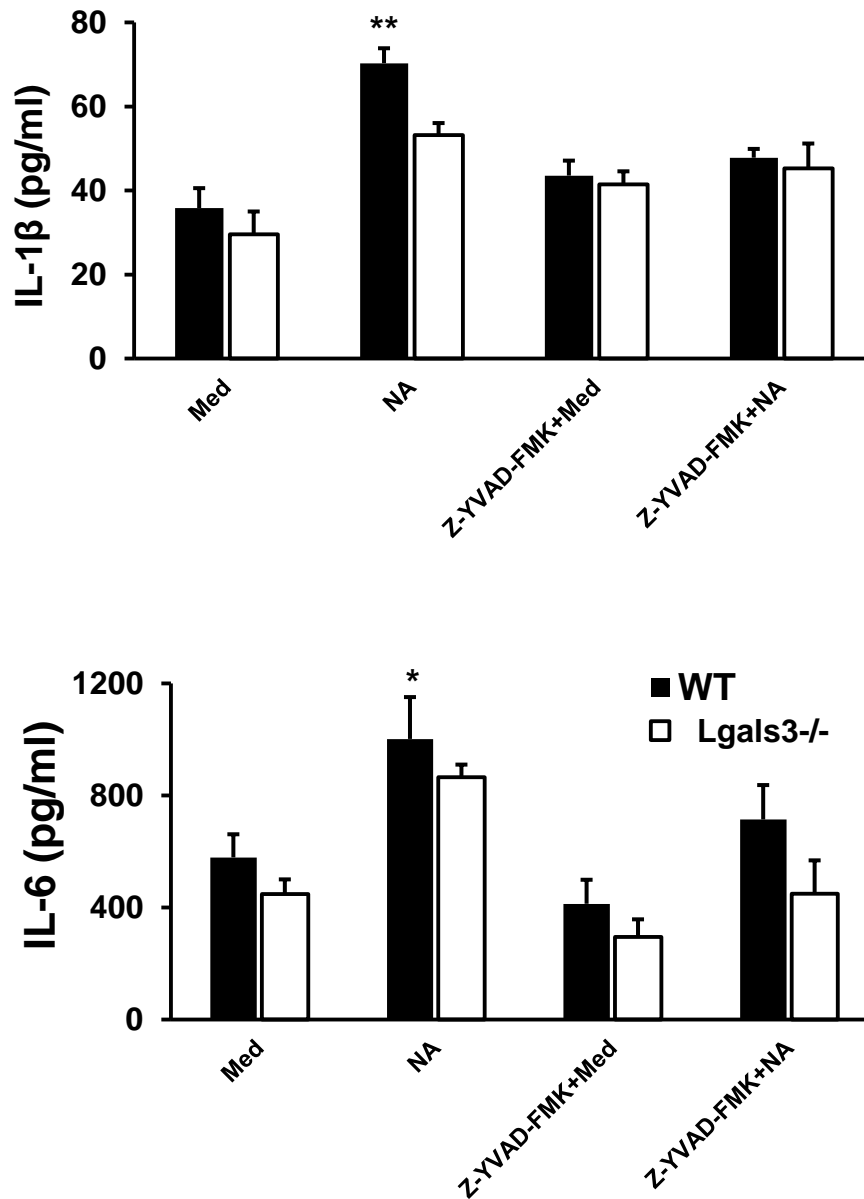
Графикон 6



Графикон 6. Галектин-3 дефицијентни перитонеални макрофаги стимулирани бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* имају мању експресију компоненте инфлазома- NLRP3 и IL- $\beta$ . Перитонеални макрофаги изоловани из нетретианих WT и *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева ( $1 \times 10^6$  ћелија/отвор), су инкубирани 24 сата у присуству бактерије *N. aromaticivorans* ( $1 \times 10^7$  бактерија/отвор) са или без додатка инхибитора каспазе-1 Z-YVAD (10mmol/L). Експресија NLRP3 и IL- $\beta$  је анализирана проточном цитометријом и приказана је средња вредност процента F4/80+ NLRP3+ и F4/80+IL-1 $\beta$ + макрофага + SD за 5 мишева по групи, \*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ . Статистичка сигнификантност је одређивана Student-овим t тестом.



Графикон 7



Графикон 7. Галектин-3 је неопходан за продукцију IL- $\beta$  у макрофагима стимулираним бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Перитонеални макрофаги изоловани из нетретианих WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева ( $1 \times 10^6$  ћелија/отвор), су инкубирани 24 сата у присуству бактерије *N. aromaticivorans* ( $1 \times 10^7$  бактерија/отвор) са или без додатка инхибитора каспазе-1 Z-YVAD (10 mmol/L). Продукција IL-1 $\beta$  и IL-6 у супернатантима културе макрофага је анализирана ELISA методом и приказана је средња вредност концентрације IL-1 $\beta$  и IL-6 + SD за 5 мишева по групи, \*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ . Статистичка сигнификантност је одређивана Student-овим t тестом.

#### **4.5. GM-CT-01 сигнификантно смањује оштећење малих билијарних канала и фиброзу јетре у моделу PBC изазваном инфекцијом *N. aromaticivorans*-ом**

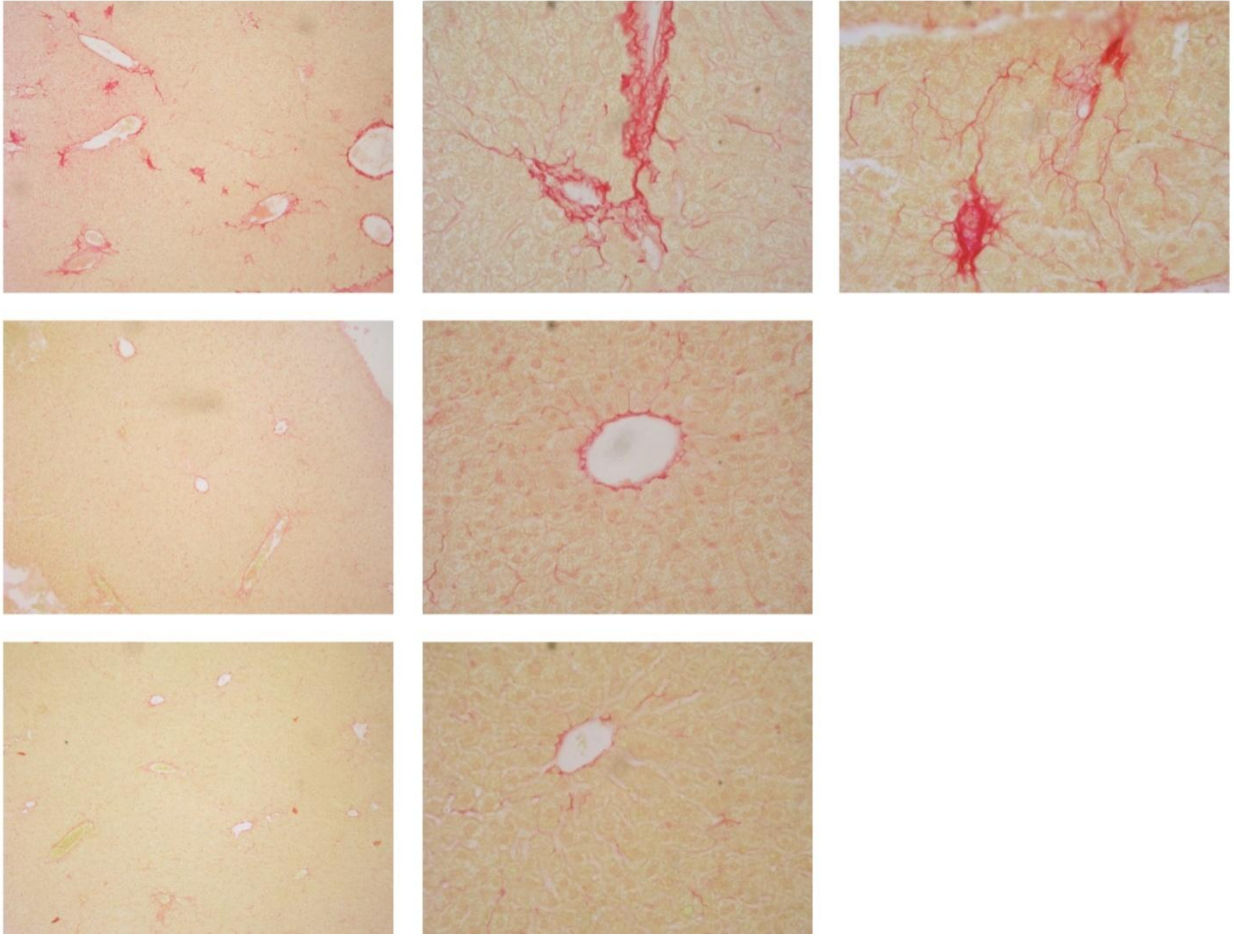
##### ***aromaticivorans*-ом**

Значај галектина-3 у индукцији примарног билијарног холангитиса изазваног инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* и развоју оштећења билијарних каналића и фиброзе јетре је потврђен експериментима у којима је WT мишевима од почетка индукције болести апликован и инхибитар галектина-3 (GM-CT-01) и показано је да оваква примена инхибитора галектина-3 значајно редукује хистолошке и серумске параметре PBC (251). И 24 недеље после инфекције бактеријом у јетрама мишева третираних инхибитором галектина-3 више нема оштећења билијарних каналића и фиброзе (251). У јетрама таквих мишева се по истеку 24 недеље од инфицирања, уочавају само грануломи, за разлику од јетри WT мишева у којима се 24 недеље после инфекције задржава перибилијарна инфилтрација и облирација каналића уз присуство гранулома у паренхиму (251).

Концентрације AST и ALT у серумима тако претираних мишева су значајно мање него концентрације истих трансминаза измерених у серумима нетретираних WT мишева 4 недеље након инфицирања(251).

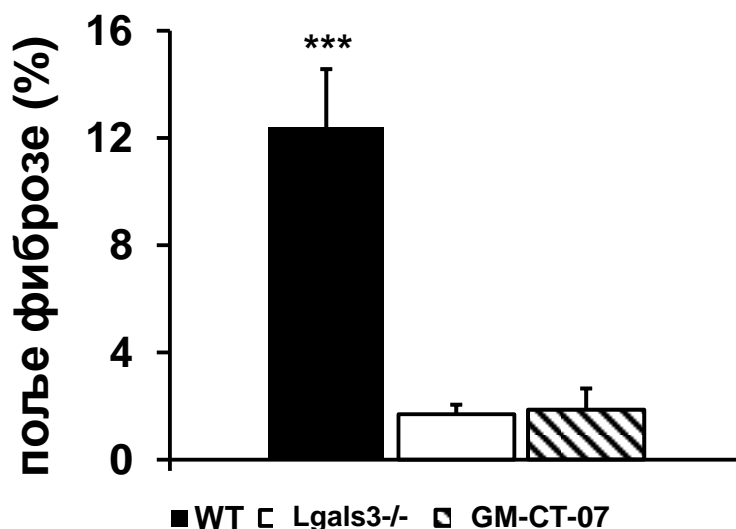
Да апликавање GM-CT-01 у почетку индукције болести значајно смањује оштећење јетре показано је и *Picrosirius red* бојењем (које указује на присуство колагенских влакана, фиброзе) исечака јетри добијених три месеца после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*. Овим специфичним бојењем је потврђено присуство фиброзе у јетри WT мишева 12 недеља после инфекције бактеријом (Слика 6). Занемарљива депозиција колагена детектована је и у јетри *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, три месеца после инфекције *N. aromaticivorans*. Процент ткива јетре захваћеног фиброзом је статистички значјано већи у јетрама инфицираних WT мишева него у инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева који су примали GM-CT-01 (Графикон 8).

**Слика 8**



**Слика 8. Инхибитор галектина-3 смањује депоновање колагена у јетре инфицираних мишева. *Picro-sirius red*** бојење исечака јетре WT (први ред), *Lgals3<sup>-/-</sup>* (други ред) и WT (трећи ред) мишева третираних инхибитором галектина-3 три месеца после инфекције.

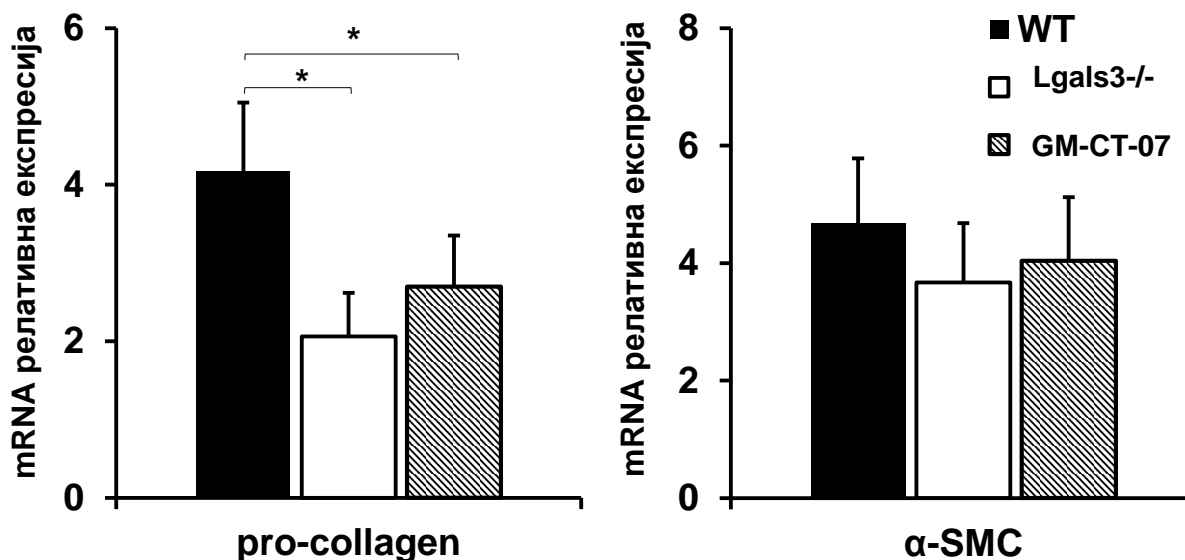
Графикон 8



Графикон 8. Инхибитор галектина-3 значајно смањује проценат ткива јетре захваћен фиброзом у моделу РВС изазваном инфекцијом *N. aromaticivorans*. Приказана су средња вредност+ SE процената (6 мишева у групи) ткива захваћеног фиброзом израчуната анализом исечака јетри 3 месеца после инфекције, третираних методом *Picrosirius red* у *Image J* програму. Статистичка сигнификантност је одређивана *Student*-овим t тестом, \*\*\* $p < 0.001$ .

Такође је у јетрама инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 уочена статистички значајно мања експресија про-фибротског молекула,  $\alpha$ -SMC, и про-колагена у поређењу са групом инфицираних WT мишева (Графикон 9). Мања експресија про-фибротског молекула  $\alpha$ -SMC је забележена и у јетрама инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, али ова разлика у односу на групу инфицираних WT мишева није достигла статистичку значајност (Графикон 9). Нема статистички значајне разлике у експресији про-фибротских молекула између инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3.

Графикон 9

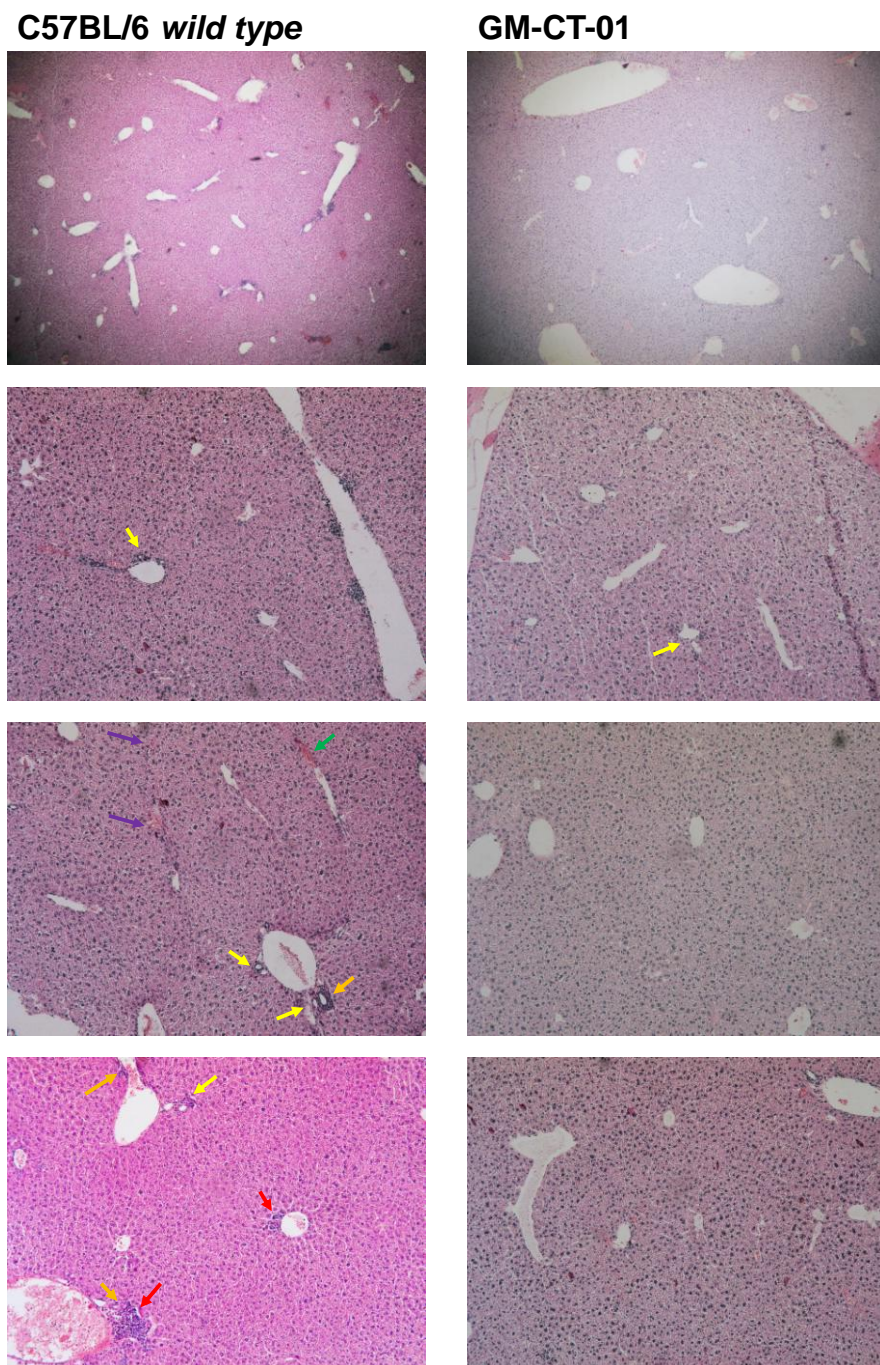


Графикон 9. Инхибитор галектина-3 значајно смањује експресију проколагена у ткивима јетри мишева инфицираних *N. aromaticivorans*. Експресија проколагена и  $\alpha$ -SMC у ткиву јетре одређена је *real-time* qRT-PCR методом 15 недеља после инфекције бактеријом (7 мишева у групи). Приказане су средње вредности + SE. Значајност разлика је утврђена Student-овим t тестом, \* $p < 0.05$ .

С обзиром да је показано да неки од инхибитора галектина-3 редукују фиброзу и да су у фази клиничког испитивања као потенцијални лекови за терапију идиопатске фиброзе плућа (225, 226) даље смо желели да испитамо потенцијални терапијски ефекат GM-CT-01 у моделу PBC изазваном бактеријом. Пошто је показано да C57BL/6 мишеви већ од осме недеље након инфекције развију фиброзу (251), једној групи инфицираних C57BL/6 *wild type* мишева је од девете недеље интрапериотеално апликован GM-CT-01 у дози од 300 $\mu$ g три пута недељно у току четири недеље. Након четири недеље примене GM-CT-01-а мишеви су жртвовани и анализирани су хистолошки и биохемијски параметри болести. Као што се види на Слици 9 примена GM-CT-01 након развоја PBC показује значајни терапијски ефекат. У јетрама C57BL/6 *wild type* мишева третираних GM-CT-01-ом уочава се значајно мања: инфилтрација и оштећење билијарних каналића ( $p < 0.001$ ), фиброза

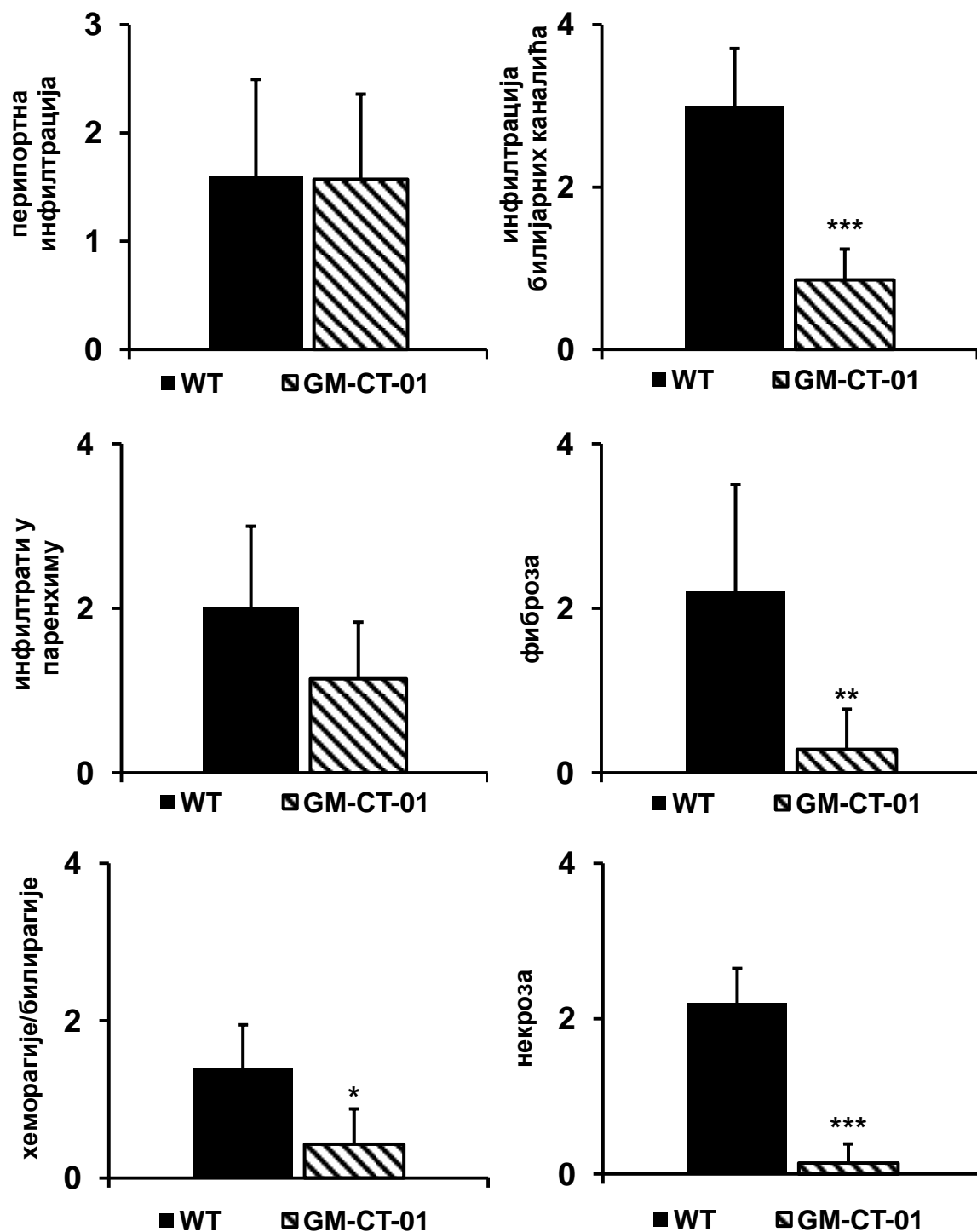
( $p < 0.005$ ), некроза ( $p < 0.05$ ) и хеморагије у паренхиму ( $p < 0.001$ ) у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 10). GM-CT-01 смањује и инфилтрацију у паренхиму јетри инфицираних мишева, али међу групама ипак нема статистички значајне разлике у вредности хистолошког скорa за инфилтрате у паренхиму (Графикон 10). Терапијска примена GM-CT-01 не утиче на смањење инфилтрата у портном простору (Графикон 10).

Слика 9



Слика 9. Терапијска примена GM-CT-01 смањује оштећење јетре инфицираних мишева. Репрезентативни исечци ткива јетри нетретираних WT и WT мишева третираних GM-CT-01 12 недеља по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* обојени техником хематоксилин-еозин, стрелице означавају: жуте: инфилтрат билијарних каналића; црвене: облитерисане жучне каналиће; наранџасте: периваскуларни инфилтрат; зелене: хеморагије; љубичасте: некрозу.

Графикон 10



Графикон 10. GM-CT-01 смањује оштећење билијарних каналића и фиброзу изазване бактеријом. Ткиво јетри WT мишева којима је апликован GM-CT-01 од девете недеље после инфицирања бактеријом *N. Aromaticivorans* изоловано 12 недеља после прве дозе бактеријских ћелија, као и ткиво јетре C57BL/6 WT само инфицираних бактеријом, 12 недеља после инфекције. Исечци дебљине 5µm су бојени хематоксилин-еозином. На графикону су средње вредности

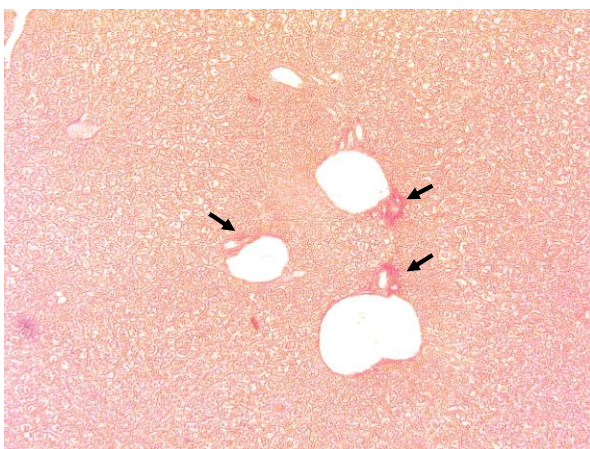


хистолошких скорова за параметре инфламације, фиброзе, некрозе, хеморагије + SE. Значајност је утврђена *Student*-овим *t* тестом, \**p*<0.05, \*\**p*<0.005, \*\*\**p*<0.001.

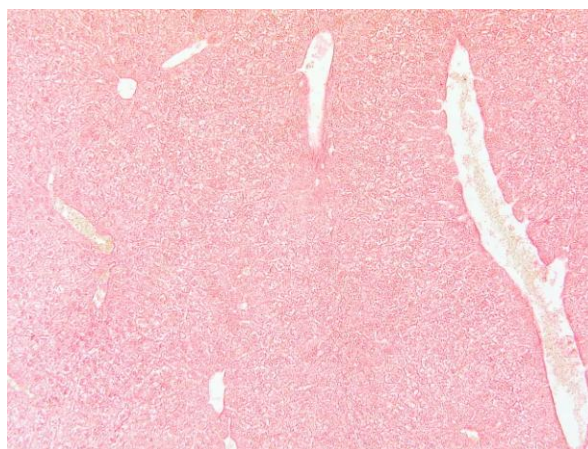
Смањење фиброзе јетри у групи *C57BL/6 wild type* мишева после терапијске примене инхибитора галектина-3, GM-CT-01, је потврђено и бојењем исечака јетре *Picrosirius red* техником (Слика 10). У исечцима јетри мишева *C57BL/6 wild type* мишева 12 недеља после бактеријске инфекције уочавају се поља фиброзе око билијарних каналића, док се у исечцима третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01 фиброза не уочава (Слика 10).

**Слика 10**

### **C57BL/6 *wild type***



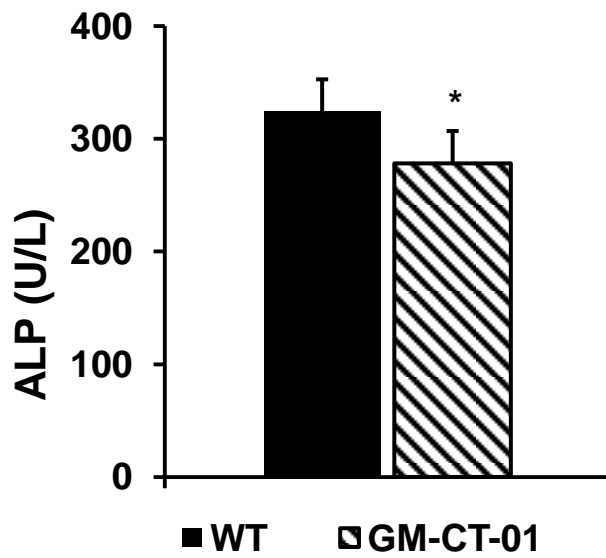
### **GM-CT-01**



**Слика 10.** Репрезентативни примери исечака јетри мишева *C57BL/6 WT* и *C57BL/6 WT* мишева третираних GM-CT-01 12 недеља по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* обојених техником *Picrosirius red*.

Терапијска примена GM-CT-01 смањује и биохемијске параметре РВС. У серумима мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01, од девете до дванаесте недеље по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* је статистички значајно мања концентрација алклане фосфатазе (Графикон 11).

Графикон 11



Графикон 11. GM-CT-01 смањује концентрацију ALP у серуму мишева којима је инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans* индукован PBC. Концентрације ALP у серуму 12 недеља после инфекције бактеријом представљене су средњим вредностима + SD за 7 мишица у групи. Значајност је утврђена Student-овим t тестом; \* $p < 0.05$ .

#### 4.6. Инхибитор галектина-3 значајно смањује активацију DC бактеријом *N. aromaticivorans*

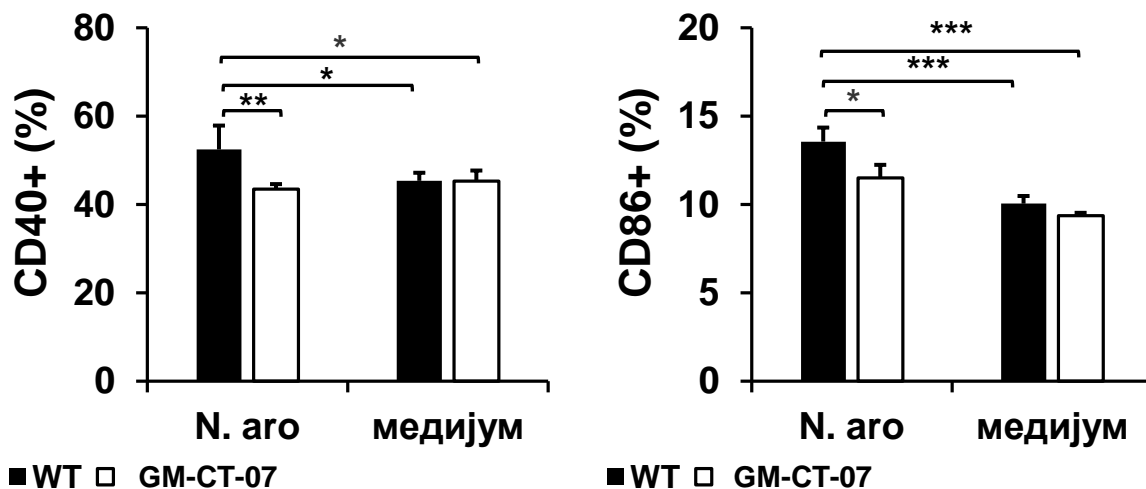
Дендритске ћелије учествују у презентацији антигена, активацији аутореактивних Т лимфоцита и NKT ћелија (254) и појачавају активност НК ћелија (255). У том смислу је проточном цитометријом анализирана заступљеност CD11c+, мијелоидних (CD11c+CD11b+) и CD11c+CD1d+ DC у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева у различитим периодима после инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Показан је статистички значајно мањи проценат CD11c+, CD11c+CD11b+ и CD11c+CD1d+ DC у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева него у јетрама WT мишева, по истеку четврте недеље од апликације бактерије (251). Сем тога, у истом периоду регистрован је и сигнификантно већи проценат активираних, CD86 позитивних, CD11c+, CD11c+CD11b+ и CD11c+CD1d+ DC у јетрама WT мишева у потређењу са процентом ових ћелија у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева (251). Регистрован је и статистички значајно мањи проценат мијелоидних DC које исказују TNF- $\alpha$ , IL-12 и IL-6 и DC које презентују липидне антигене, CD11c+CD1d+, у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева у поређењу са јетрама WT мишевима (251).

Имајући у виду чињеницу да није познато да ли имунски одговор на *N. aromaticivorans*, који за последицу има развој болести сличне примарном билијарном холангитису, започиње у јетри или слезини као и уочену способност *N. aromaticivorans* да директно активира дендритске ћелије, анализиран је фенотип DC из слезина и јетре у раном току инфекције *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева, па је тако нађено да је трећег дана инфекције проценат активираних CD11c+CD86+, CD11c+MHCII+ и инфламацијских IL-12+ DC статистички значајно мањи и у јетрама и у слезинама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева у поређењу са WT мишевима (251). Поред тога је у јетрама WT мишева уочен сигнификантно повећан % CD86+ и инфламацијских IL-1 $\beta$ + DC (251).

Анализа DC екстрахованих из слезина нетретираних мишева стимулираних *in vitro* *N. aromaticivorans*-ом показана је значајно већа активација DC из WT мишева него из *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева (251). Већа експресија маркера активације CD86, цитокина IL-12, IL-4 и NLRP3 компоненте инфлазома забележена је у ћелијама изолованим из WT мишева и стимулираних *in vitro* бактеријом *N. aromaticivorans* у поређењу са DC изолованим из *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева (251).

Пошто смо показали да примена инхибитора галектина-3 од почетка индукције болести, значајно ублажава примарни билијарни холангитис (Слика 8; Графикони 8, 9; (251)) као и да смањује активацију инфламазома у макрофагима јетре рано по бактеријској инфекцији и имајући у виду значајно слабију активацију DC *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева бактеријом *N. aromaticivorans* даље смо анализирали утицај инхибитора галектина-3 на активацију DC бактеријом *in vitro*. Дендритске ћелије изоловане из слезина *C57BL/6 wild type* мишева су *in vitro* излагане бактерији *N. aromaticivorans* са или без додатка инхибитора галектина-3. Након двадесетчетворочасовне инкубације проточном цитомеријом је у стимулираним дендритским ћелијама анализирана експресија маркера активације и цитокина. Као што се види на Графикону 12 стимулација DC бактеријом *in vitro* активира ове ћелије, значајно већи проценат DC стимулираних бактеријом експримира маркере активације CD40 и CD86 у поређењу са ћелијама гајеним само у медијуму. Али нема повећања процента CD40 и CD86 позитивних DC уколико су стимулисане бактеријом у присуству инхибитора галектина-3 (Графикон 12). Процент DC (CD40+ и CD86+) је значајно мањи у културама којима је додат инхибитор у поређењу са процентом ових ћелија стимулираних бактеријом без додавања инхибитора (Графикон 12).

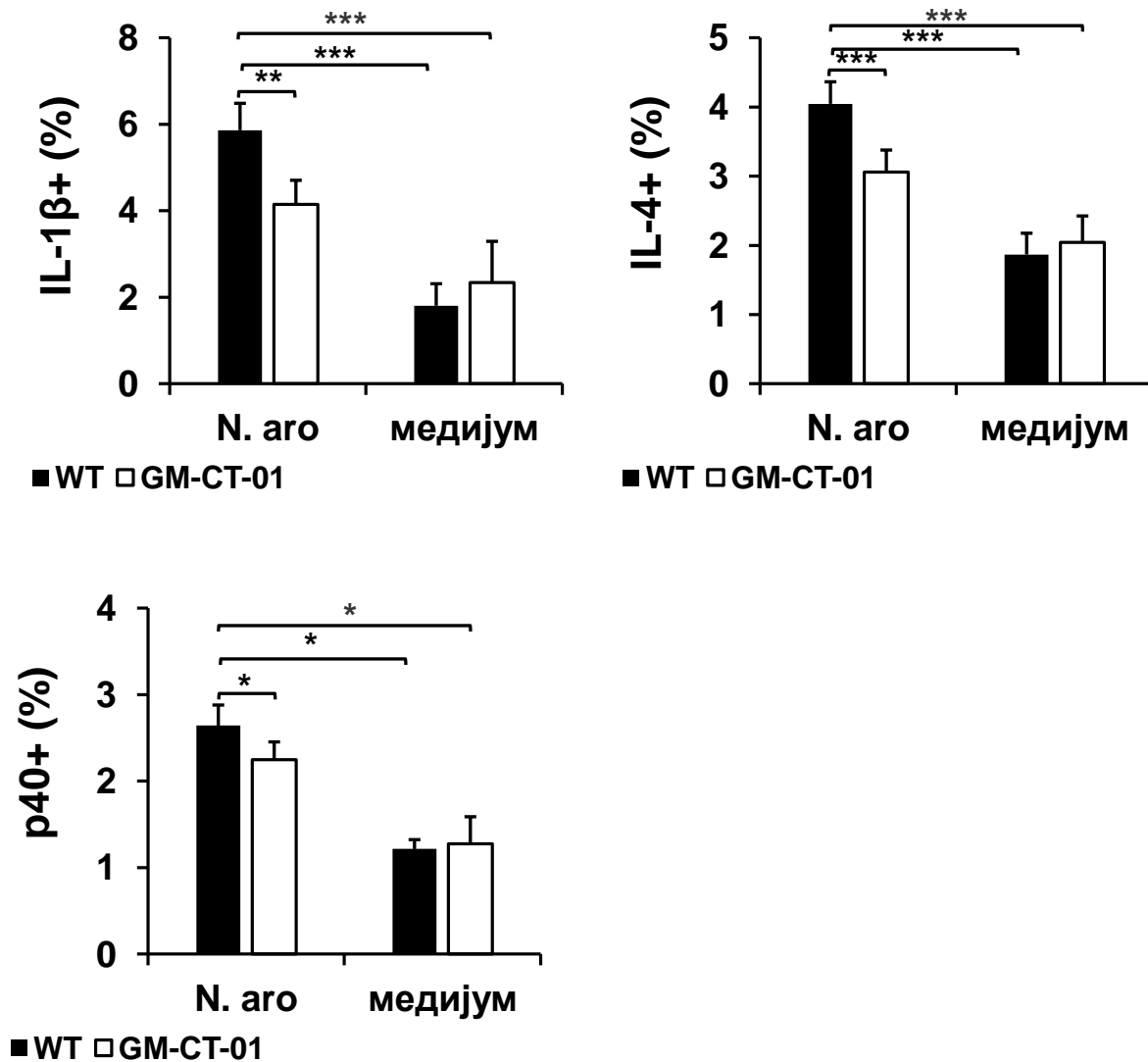
Графикон 12



Графикон 12. Инхибитор галектина-3 смањује активацију DC стимулираних бактеријом *in vitro*. Дендритске ћелије су изоловане из слезина нетретираних C57BL/6 *wild type* мишева магнетном сепарацијом и *in vitro* стимулиране бактеријом *N. aromaticivorans* (однос 1:10) у току 24 сата у присуству GM-CT-01 (100  $\mu$ M), контролне ћелије су стимулиране само бактеријом. Након инкубације је проточном цитометријом анализирана експресија маркера активације CD40 и CD86. Приказане су средње вредности + SD процента CD40 и CD86 позитивних DC (по 5 мишева у групи). Значајност је утврђена Student-овим t тестом. \*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ .

Показано је и да се у дендритским ћелијама C57BL/6 *wild type* мишева након *in vitro* стимулације бактеријом *N. aromaticivorans* повећава експресија цитокина IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-4 (Графикон 13). Слично разлици у проценту активираних DC стимулираних *in vitro* бактеријом и проценат DC које експримирају IL-1 $\beta$  ( $p < 0.005$ ), IL-12 ( $p < 0.05$ ) и IL-4 ( $p < 0.001$ ) је статистички значајно мањи уколико су ћелије у току излагања бактерији третиране и инхибитором галектина-3 у поређењу са ћелијама које нису третиране инхибитором (Графикон 13).

Графикон 13



Графикон 13. Инхибитор галектина-3 смањује експресију IL-1 $\beta$ , IL-4 и p40 (IL-12/IL-23) и у DC стимулираним бактеријом *in vitro*. Дендритске ћелије су изоловане магнетном сепарацијом из слезина нетретираних C57BL/6 *wild type* мишева и *in vitro* стимулиране бактеријом *N. aromaticivorans* (однос 1:10) у току 24 сата у присуству GM-CT-01 (100  $\mu$ M), контролне ћелије су стимулиране само бактеријом. Након инкубације је проточном цитометријом анализирана експресија цитокина IL-1 $\beta$ , p40 (IL-12/IL23) и IL-4. Приказане су средње вредности + SD процента IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-4 позитивних DC (по 5 мишева у групи). Значајност је утврђена Student-овим t тестом. \*\*\*p < 0.0001; \*\*p < 0.005; \*p < 0.05.

#### 4.7. Инхибитор галектина-3 значајно редукује инфлукс T1, T2 и T17 лимфоцита у јетре инфицираних мишева

Како је показано да јетре галектин-3 дефицијентних мишева који развијају значајно слабији облик примарног билијарног холангитиса 8 недеља по инфекцији бактеријом *N. aromaticivorans* садрже значајно мањи проценат IL-17 позитивних CD4+ и CD8+ ћелија (Слика 3, 251) у даљем току су анализиран ефекти инхибиције на проценте запаљенских и антизапаљенских лимфоцита у јетри 4 недеље после инфекције бактеријом. Инфекција мишева *N. aromaticivorans*-ом није статистички значајно утицала на повећање ни процента ни апсолутног броја популација анализираних лимфоцита у групи *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева којима је апликован GM-CT-01 што је поређено са мишевима који нису примали инхибитор (Табела 1). У групи *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева третираних бактеријом је уочено повећање броја инфламацијских CD4+ ћелија у односу на групу *Lgals3<sup>-/-</sup>* нетретираних мишева али без статистичке значајности, док се ни овај минимална пораст броја инфламацијских ћелија није уочио у групи WT мишева третираних инхибитором у односу на групу нетретираних WT мишева (Табела 1). Статистички значајно већи проценат CD4 и CD8 ћелија позитивних на Tbet, ROR $\gamma$ t и IL-17, као и CD4+IFN- $\gamma$ + ћелија, четири недеље после инфекције *N. Aromaticivorans*-ом забележен је у јетрама WT мишева у поређењу су процентом наведених ћелија у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 (Табела 1). Апсолутни бројеви CD4 и CD8 позитивних на факторе транскрипције и цитокине карактеристичне за: тип 1 (Tbet и IFN- $\gamma$ ), тип 17 (ROR $\gamma$ t и IL-17) и тип 2 (GATA3, IL-4, IL5 и IL-13), осим CD8+IL-5+ ћелија, је статистички значајно већи у јетрама инфицираних WT него у инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева којима је апликован инхибитор (Табела 1). Није детектован пораст апсолутног броја испитиваних популација у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT којима је даван инхибитор после инфицирања бактеријом него у контролним групама. Међу испитиваним групама нема разлике у проценту и апсолутном броју Treg ћелија (Foxp3 и IL-10 позитивних) (Табела 1).

**Табела 1**

	ПРОЦЕНТИ					АПСОЛУТНИ БРОЈ X 10 <sup>4</sup>				
	WT untreated (n=8)	LGASL3 <sup>+</sup> untreated (n=8)	WT N. aro (n=8)	LGASL3 <sup>-</sup> N. aro (n=8)	WT N. aro Gal-3 inh (n=8)	WT untreated (n=8)	LGASL3 <sup>-</sup> untreated (n=8)	WT N. aro (n=8)	LGASL3 <sup>-</sup> N. aro (n=8)	WT N. aro Gal-3 inh (n=8)
CD4+Tbet+	1,19±0,76	2,05±0,51	8,16±2,42*	3,41±0,75	2,68±0,49	6,64±4,91	9,20±2,00	96,27±38,84**	17,51±8,17	8,53±4,55
CD4+IFN-γ+	0,82±0,53	0,77±0,63	5,49±1,88*	1,74±0,96	0,92±0,62	4,53±3,02	3,42±2,92	62,68±22,68**	8,65±5,05	3,18±2,94
CD8+Tbet+	0,51±0,22	1,09±0,15	4,05±0,82*	1,23±0,24	1,89±0,80	2,77±1,38	5,01±1,18	46,47±10,58*	6,40±3,08	5,40±2,34
CD8+IFN-γ+	1,10±0,88	0,99±0,96	3,41±1,68	1,76±1,06	1,15±0,89	5,99±4,88	4,29±4,27	39,59±21,08*	8,69±5,46	3,99±4,22
CD4+RORγt+	1,48±0,57	1,39±0,48	3,49±0,62*	2,08±0,33	1,92±0,65	8,33±4,39	6,66±2,91	41,69±11,09*	18,44±3,18	6,77±4,5
CD4+IL-17+	1,09±0,81	1,70±0,87	7,14±2,08*	2,65±0,55	1,42±0,46	6,06±5,13	7,88±4,43	82,36±21,57***	11,15±4,39	4,74±3,01
CD8+RORγt+	1,07±0,29	0,82±0,23	2,57±0,34**	1,46±0,23	0,96±0,29	6,00±2,55	3,74±1,20	30,05±1,94**	12,94±2,35	3,10±1,34
CD8+IL-17+	1,24±0,55	1,73±0,70	5,01±1,31*	1,52±0,49	1,76±0,31	7,00±3,84	8,04±3,60	58,24±21,19**	7,96±4,74	5,67±2,99
CD4+GATA3+	1,33±0,41	1,65±0,64	2,66±0,81	1,89±0,48	1,54±0,55	7,41±3,27	7,16±1,39	31,42±13,22*	9,93±5,50	4,54±1,78
CD4+IL-4+	1,24±0,71	1,66±0,40	3,17±0,87	1,66±0,57	1,89±0,71	7,10±4,75	7,83±2,73	36,71±11,72*	8,29±3,55	6,02±3,30
CD4+IL-5+	1,08±0,94	1,26±1,48	4,15±2,17	1,24±0,73	1,21±0,86	6,96±6,90	6,02±7,52	49,63±32,17*	5,51±2,58	4,31±3,92
CD4+IL-13+	1,08±0,94	1,69±0,63	3,38±0,88	1,73±0,55	1,49±0,62	6,07±3,68	7,99±3,56	38,81±12,04*	8,75±4,50	4,90±3,27
CD8+GATA3+	0,87±0,49	0,85±0,47	1,06±0,37	0,69±0,18	0,84±0,27	4,74±2,97	3,89±2,45	12,15±4,38*	3,56±1,96	2,50±1,05
CD8+IL-4+	0,65±0,32	0,98±0,59	1,19±0,36	0,61±0,28	0,80±0,34	3,68±2,18	4,63±2,79	13,45±3,25*	3,18±2,07	2,50±1,40
CD8+IL-5+	0,36±0,40	0,46±0,77	0,77±0,96	0,31±0,31	0,48±0,53	2,41±2,97	2,23±3,88	9,65±12,94	1,27±1,19	1,74±2,06
CD8+IL-13+	0,83±0,27	1,04±0,33	1,89±0,36	0,96±0,36	1,00±0,16	4,72±2,12	4,99±2,26	21,98±6,22*	4,89±2,59	2,60±1,90
CD4+Foxp3+	1,04±0,72	1,82±1,48	1,96±0,64	1,61±1,16	1,88±1,35	6,15±4,94	8,69±8,83	23,23±7,72	12,71±5,74	6,22±4,74
CD4+IL-10+	1,30±0,81	2,47±0,50	1,91±1,51	0,89±0,65	1,36±1,56	7,68±5,37	11,12±2,19	22,14±17,84	4,17±3,26	5,14±6,72
CD8+Foxp3+	0,35±0,31	0,69±1,07	0,65±0,58	0,55±0,77	0,71±1,00	2,13±2,06	3,34±5,39	7,30±6,09	4,14±3,49	2,10±2,89
CD8+IL-10+	1,51±0,75	1,51±0,59	1,67±1,74	0,66±0,43	1,77±2,21	8,83±5,22	11,64±7,19	21,22±24,26	3,10±2,01	6,80±9,66

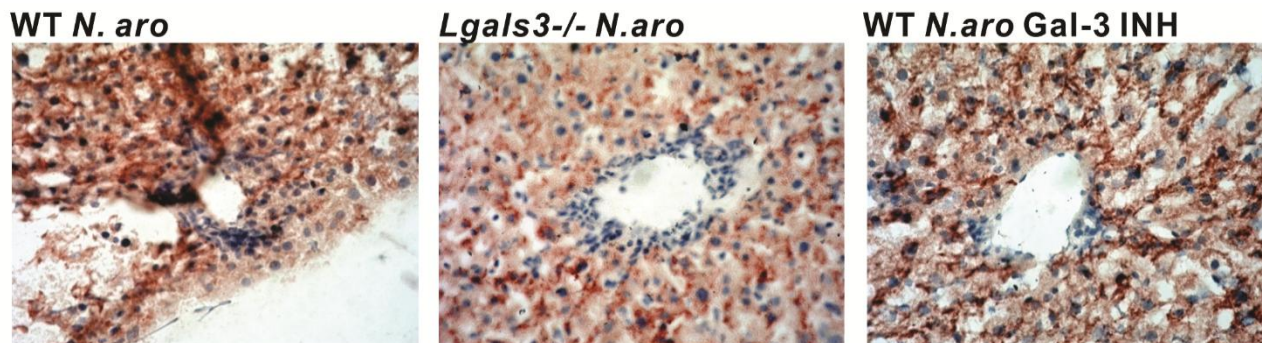
**Табела 1. Фенотипске разлике CD4+ и CD8+ лимфоцита присутних у јетрама WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева који су примали инхибитор, GM-CT-01, у четвртој недељи након индукције болести.** Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетри нетретираних као и мишева 4 недеље после инфекције и анализирани су наведене популације CD4+ и CD8+ ћелија проточном цитометријом. Вредности процента и апсолутног броја испитиваних популација су приказане као средње вредности ± SD, \* значајност разлике (p<0.05) WT N. aro vs. *Lgals3*<sup>-/-</sup> N. aro и WT N. aro GM-CT-01; \*\* значајност разлике (p<0.005) WT N. aro vs. *Lgals3*<sup>-/-</sup> N. aro и WT N. aro GM-CT-01; \*\*\* значајност разлике (p<0.001) WT N. aro vs. *Lgals3*<sup>-/-</sup> N. aro и WT N. aro GM-CT-01. Статистичка значајност разлика је одређена ANOVA t тестом .



#### **4.8. Експресија компоненте инфламазома NLRP3 и инфламацијског цитокина IL-1 $\beta$ је мања у јетрама инфицираних *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних GM-CT-01-ом**

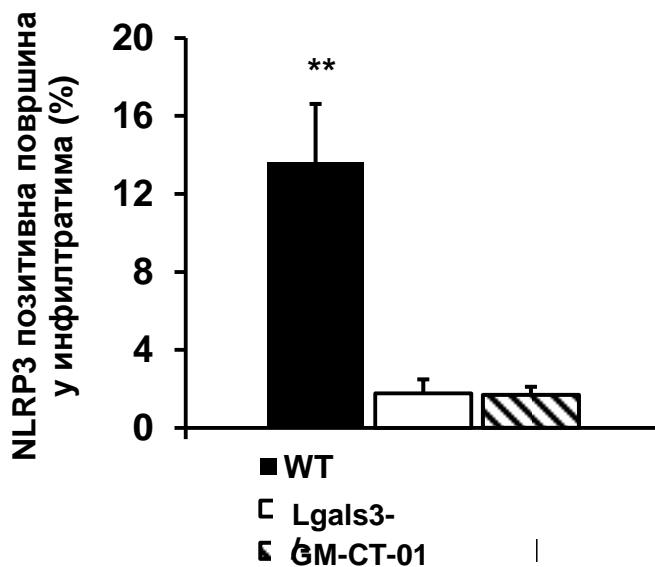
Показано је да је Gal-3 апсолутно незаобилазан у активацији инфламазома макрофага у условима *in vitro* стимулације *N. aromaticivorans*-ом, да у галектин-3 дефицијентним макрофагима након стимулације бактеријом нема повећања експресије NLRP3 компоненте инфламазома, нема активације каспазе-1, ни повећане продукције IL-1 $\beta$  (Слика 7, Графикони 5-7). Да би се потврдио овакав ефекат галектина-3 на активацију инфламазома бактеријом и *in vivo*, анализирана је експресија компоненте инфламазома NLRP3 и продукција IL-1 $\beta$ , цитокина чија продукција директно зависи од активације инфламазома, у инфилтратима јетри нетретираних WT, *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, седам дана после инфицирања бактеријом *N. aromaticivorans*. Имунохистохемијском анализом исечака јетри 7 дана после бактеријске инфекције показана је већа експресија NLRP3 у инфилтратима јетри инфицираних WT мишева у поређењу са инфицираним *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишевима третираним инхибитором галектина-3 (Слика 11). Процент NLRP3 позитивне површине у инфилтратима јетре је сигнификантно већи у групи инфицираних WT него у инфицираним *Lgals3<sup>-/-</sup>* и WT мишевима третираним инхибитором галектина-3 (Графикон 14).

Слика 11



Слика 11. Експресија NLRP3 и у јетри WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, седам дана после инфицирања. Приказани су репрезентативни исечци експресије NLRP3 у инфилтратима јетри WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 7 дана након инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*. NLRP3 позитивне мононуклеарне ћелије су присутне у јетри WT мишева.

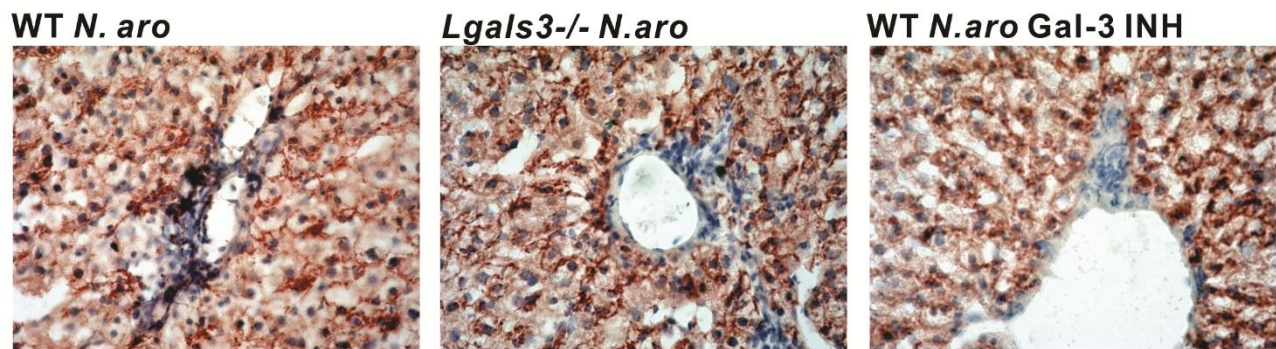
Графикон 14



Графикон 14. Примена GM-CT-01 сигнификантно умањује проценат ћелија које су позитивне на NLRP3 у инфилтратима јетри. Седам дана после инфицирања WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 (7 мишева по групи) израчунат проценат NLRP3 позитивних ћелија у инфилтратима јетри анализом у *ImageJ* програму исечака јетре обојених имунохистохемијском методом. Приказане су средње вредности + SE. Значајност је утврђена Student-овим t тестом; \*\* $p < 0.005$ .

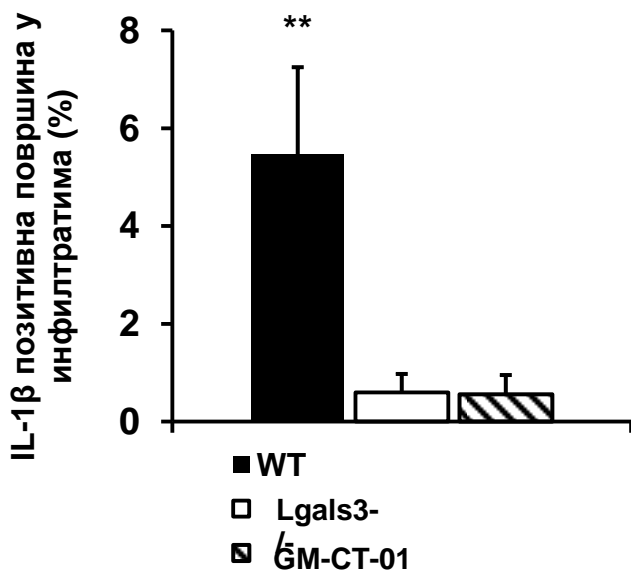
Такође, забележена је експресија IL-1 $\beta$  у инфилтратима јетри WT мишева док у инфилтартима јетри инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишевима третираних инхибитором галектина-3 готово да нема IL-1 $\beta$  позитивних ћелија (Слика 12). Квантитативном анализом исечака јетре је показано да је проценат IL-1 $\beta$ -позитивне површине у инфилтратима јетри инфицираних WT мишева статистички значајно већи у поређењу са групама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишевима третираних инхибитором галектина-3 (Графикон 15).

Слика 12



Слика 12. Експресија IL-1 $\beta$  у јетри WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, седам дана после инфицирања. Приказани су репрезентативни исечци експресије IL-1 $\beta$  у инфилтратима јетри WT и WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 7 дана након инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*. IL-1 $\beta$  позитивне мононуклеарне ћелије су присутне у јетри WT мишева.

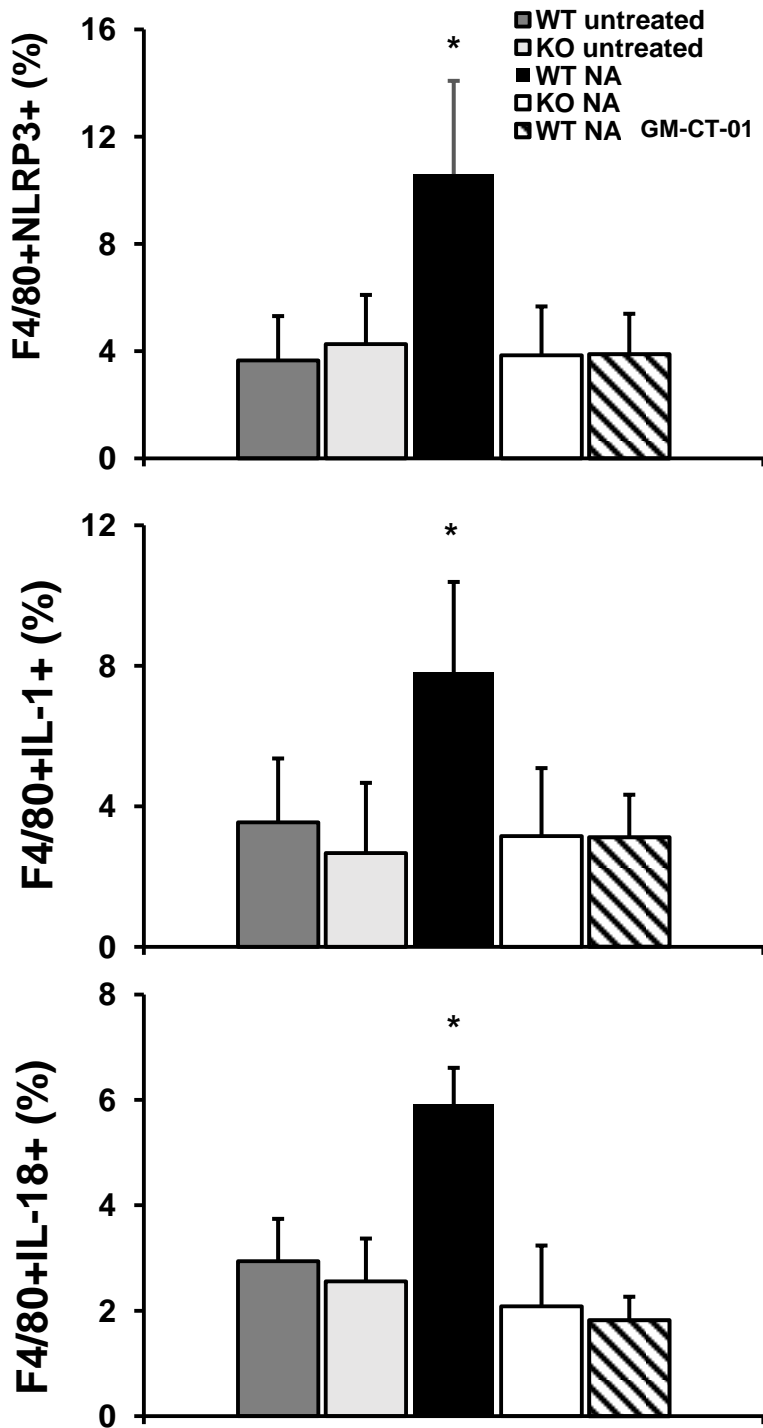
Графикон 15



Графикон 15. Примена GM-CSF-01 сигнификантно умањује проценат IL-1 $\beta$  позитивних ћелија које инфилтришу јетру. Седам дана после инфицирања WT, Lgals3<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3 (7 мишева по групи) израчунат проценат IL-1 $\beta$  позитивних ћелија у инфилтратима јетри анализом у *ImageJ* програму исечека јетре обојених имунохистохемијском методом. Приказане су средње вредности + SE. Значајност је утврђена Student-овим t тестом; \*\*p<0.005.

Поред тога, анализом, проточном цитометријом, мононуклеарних ћелија изолованих из јетри 7 дана после инфекције бактеријом, забележен је и статистички значајно већи проценат F4/80+ макрофага који експримирају NLRP3, IL-1 $\beta$  и IL-18 међу мононуклеарним ћелијама изолованим из јетри инфицираних WT мишева у поређењу са ћелијама изолованим из јетри инфицираних Lgals3<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CSF-01 (Графикон 16).

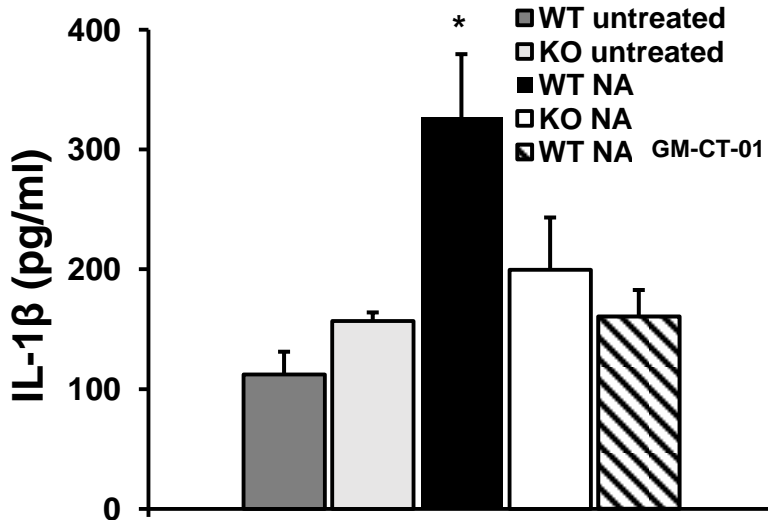
Графикон 16



Графикон 16. Примена GM-CT-01 сигнификантно умањује проценат NLRP3, IL-1 $\beta$  и IL-18 позитивних макрофага у јетрама. Седам дана после инфицирања WT, Lgals3<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3 (7 мишева по групи) проточном цитометријом је одређен проценат F4/80 макрофага који експримирају и NLRP3, IL-1 $\beta$  и IL-18. Приказане је средње вредности + SE. Статистичка сигнификантност је одређивана *Student*-овим t тестом; \* $p < 0.05$ .

Даље, статистички значајно већа продукција IL-1 $\beta$  у јетрама инфицираних WT мишева него у инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева који су примали инхибитор GM-CT-01, као и у поређењу са контролним нетретираним мишевима, је потврђена ELISA анализом хомогената ткива јетри добијених седмог дана после инфицирања бактеријом *N. aromaticivorans* (Графикон 17).

Графикон 17

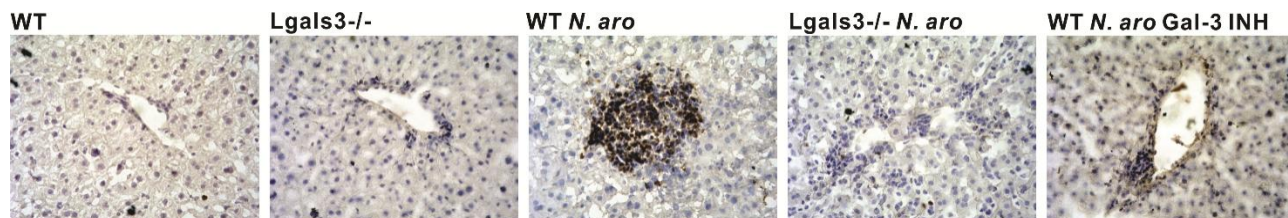


Графикон 17. Инхибитор галектина-3 значајно смањује продукцију IL-1 $\beta$  у јетри. Седам дана после инфицирања WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 (7 мишева по групи) у ткивном хомогенату јетри су ELISA методом одређене концентрације IL-1 $\beta$ . Приказане су средње вредности + SD. Значајност је утврђена Student-овим t тестом; \* $p < 0.05$ .

#### 4.9. GM-CT-01 смањује и продукцију галектина-3 у јетри мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans*

Познато да различита патолошка стања утичу на повећање експресије галектина-3 у јетри. Како би се испитало да ли инхибитор галектина-3 утиче и на продукцију галектина-3 у јетри имунохистохемијском методом је анализирана експресија галектина-3 у јетрама 7 дана после инфекције бактеријом. У јетри нетретитаних и неинфицираних, контролних, WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup>, као и инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева није детектован галектин-3, али је значајно повећање експресије детектовано у мононуклеарним инфилтратима у јетри WT мишева 7 дана после инфекције *N. aromaticivorans* (Слика 13). У јетрама инфицираних WT мишева третираних инхибитором галектина-3 детектована је занемарљива експресија галектина-3 је (Слика 13).

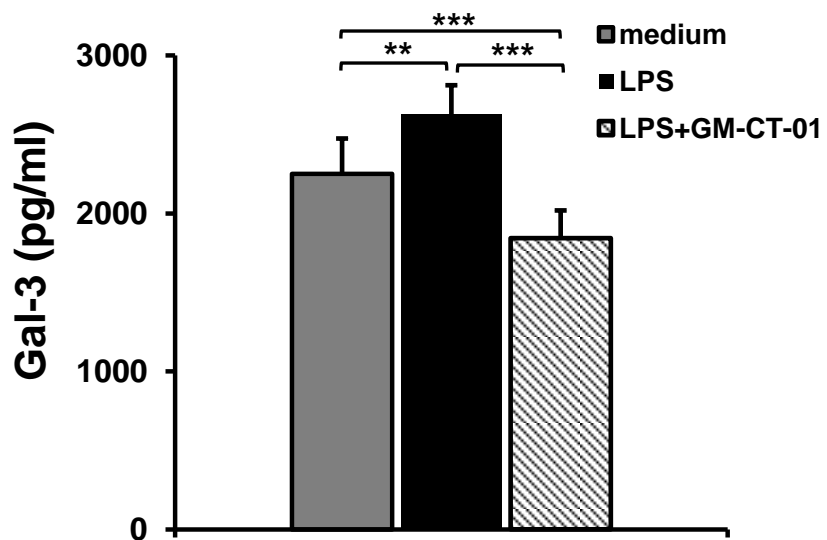
Слика 13



Слика 8. Експресија галектина-3 у јетрама нетретираних и WT и *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева и WT, *Lgals3*<sup>-/-</sup> и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, седам дана после инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*.

Како би се потврдило смањење експресије галектина-3 после примене инхибитора, ELISA методом су анализирани концентрације галектина-3 у супернатантима култура спленочита стимулираних липополисахаридом са и без инхибитора галектина-3. Третирање мишјих спленочита инхибитором галектина-3 пре стимулације липополисахаридом статистички значајно смањује концентрацију продукованог галектина-3 (Графикон 18).

Графикон 18



Графикон 18. Инхибитор галектина-3 значајно смањује продукцију галектина-3 у у култури спленцита третираних липолисахаридом. Концентрација галектина-3 у супернатанту културе спленцита добијених из нетретираних WT мишева, стимулисане *in vitro* LPS-ом (1 $\mu$ g/ML) 24 сата; третиране инхибитором галектина-3 у току 2 сата пре стимулације LPS-ом; нетретиране. Резултати су приказани као средње вредности + SD, \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



## 5. ДИСКУСИЈА

Досадашње студије у којима су испитивани ефекти Gal-3 у патогенези РВС-а су документовале различите, супротне улоге овог молекула у развоју РВС-а. У два модела РВС у којима нема јаке стимулације имунског система адјувансима већ се имунски одговор на аутоантиген активира бактеријама које могу да буду, или јесу део нормалне микрофлоре, показана је инфламацијска улога галектина-3 (241, 242). У нашој ранијој студији (251) је показано да галектин-3 делује проинфламацијски у патогенези РВС изазваног инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans* и да јетре *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева који развију болест садрже већи проценат DC које експримирају компоненту инфламазома NLRP3.

У овој студији је детаљније испитана улога галектина-3 у активацији инфламазома током инфекције бактеријом *N. aromaticivorans* као и потенцијални терапијски ефекат инхибитора галектина-3, GM-CT-01, у моделу РВС изазваном инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans*.

### 5.1. Делесија *Lgals3<sup>-/-</sup>* и фармаколошка инхибиција галектина-3 ублажавају манифестације примарног билијарног холангитиса

Резултати овог истраживања јасно показују да одсуство гена за галектин-3 код C57BL/6 мишева значајно ублажава аутоимунски холангитис индукован инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans*. Слабије оштећење жучних каналића у групи *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* удружено је са смањењем биохемијских параметра болести, ослабљеним имунским одговором типа 17 у јетри и ослабљеном активацијом инфламазома у јетри и слезини.

Показано је да фармаколошка инхибиција галектина-3 GM-CT-01-ом у периоду индукције болести значајно смањује тежину аутоимунског холангитиса. Поред тога показано је и да GM-CT-01 примењен терапијски значајно смањује оштећење жучних каналића и фиброзу

јетре. Примена GM-CT-01 у прве четири недеље од почетка индукције болести значајно смањује вредности имуноглобулина А класе специфичног за PDC-E2, концентрацију AST и ALT у серуму, експресију NLRP3 инфламазома у јетри, продукцију IL-1 $\beta$  (Графикони 14-17; Сlike 7 и 8) и инфлукс T1, T2 и T17 ћелија у јетру 8 (Табела 1) и на концу фиброзу јетре (Слика 8; Графикони 8 и 9). А терапијски примењен GM-CT-01 смањује фиброзу и некрозу јетре, смањује оштећење билијарних каналића и биохемијске параметре примарног билијарног холангитиса (Сlike 9 и 10; Графикони 10 и 11).

Резултати недавног истраживања указују да GM-CT-01 своје ефекте у *in vivo* системима вероватно не остварује инхибицијом канонског места за везивања угљених хидрата (231) што је довело у питање селективност деловања овог инхибитора. *Stegmayr* и сарадници су тестовима индукције хемаглутинације којима се индиректно сазнаје о способности инхибиције галектина-3 показали да GM-CT-01 не инхибира галектин-3 (231). Даље, *Miller* је са сарадницима показао да GM-CT-01 примарно интерреагује са неканонским местом за везивање угљених хидрата на F-страни галектина-3 (228). Насупрот резултатима претходно наведених студија у којима је тестирано везивање GM-CT-01 и галектина у растворима методом флуоресцентне анизотропије и способност GM-CT-01 да инхибира хемаглутинацију, у неколико студија је показано да GM-CT-01 мења функцију ћелија третираних овим инхибитором *in vitro* као и да мења ток неколико инфламацијских болести. Показано је да третирање хуманих лимфоцита, који инфилтришу туморе (енгл. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TIL) изолованих из асцитеса који су се развили услед захватања перитонеума тумором, инхибитором GM-CT-01 појачава цитотоксичност CD8+T лимфоцита у оквиру популације TIL-а и повећава продукцију IFN- $\gamma$  у овим ћелијама. Описани ефекат GM-CT-01 молекула на лимфоците који инфилтришу туморе је дозно зависан (228). Налази неколико студија указују да GM-CT-01 остварује имуномодулацијске ефекте *in vivo* у неколико различитих инфламацијских болести. У моделу масне јетре која није изазвана алкохолом и оштећењу јетре изазваном тиоацетамидом показано је да терапија GM-CT-01-ом смањује запаљенски инфилтрат и фиброзу јетре (256, 257). У моделу колитиса мишева изазиваног декстран натријум сулфатом примена мезенхимских матичних ћелија гајених у присуству GM-CT-01, смањује концентрацију галектина-3 у серуму (258), а примена GM-CT-01 мишевима у време индукције колитиса ублажава болест (259).

Налази ове студије о смањењу експресије галектина-3 у инфилтратима јетре мишева који су инфицирани бактеријом *N. aromaticivorans* и третирани инхибитором GM-CT-01 (Слика 13) и смањене концентрације галектина-3 у супернатантима ћелијске културе *in vitro* третиране овим инхибитором (Графикон 18) указују да GM-CT-01, иако се не везује за канонско место за везивање угљених хидрата на молекулу галектина-3, инхибише експресију галектина-3.

Мишји модел аутоимунског холангитиса изазваног инфекцијом *N. aromaticivorans* је у поређењу са болешћу изазваном ксенобиотикима, сличнији природном развоју примарног билијарног холангитиса код људи, јер је познато да микроорганизми који могу да буду део нормалне микрофлоре црева доприносе развоју спонтане инфламације жучних путева код мишева (260). *N. aromaticivorans*, свеприсутна  $\alpha$ -протеобактерија која може да се детектује у слuzници дигестивног тракта код људи, садржи конзервирани PDC-E2 епитоп, метаболише ксенобиотике и омета ентерохепатичку циркулацију жучних киселина (261). У овој студији смо показали да делеција *Lgals3* атенуише PBC изазван бактеријом *N. aromaticivorans* тако што утиче на урођени и стечени имунски одговор. Ћелијски зид *N. aromaticivorans* садржи гликофинголипиде који презентовани у склопу CD1d комплекса на DC активирају NKT ћелије (102). Цитокини које продукују активирани антиген презентујуће ћелије, као што су мијелоидне DC и Купферове ћелије, појачавају активацију NKT ћелија (262). Активирани NKT ћелије продукују цитокине који стимулишу даљу активацију DC и на тај начин имају критичну улогу у одржавању имуности на микроорганизме као што је *N. aromaticivorans*, али и у активирању аутореактивних помагачких Т лимфоцита (263). Присуство NKT и DC које експримирају CD1d се значајно повећава у јетрама особа оболелих од PBC (264, 265, 266). Наша студија је показала мању заступљеност NKT ћелија у јетри *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans*, који скоро да и нису развили знаке PBC (Графикони 3 и 4).

Кључне патолошке промене у јетри, карактеристичне за примарни билијарни холангитис: инфилтрација жучних каналића и стварање гранулома, који су раније показани у први пут описаном моделу холангитиса изазваног инфекцијом 1101 NOD мишева бактеријом *N. aromaticivorans*, детектовани су и у јетрама инфицираних C57BL/6 мишева (109). Са друге стране у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева уочена је само блага инфилтрација жучних канала без прекида континуитета билијарног епитела (251). Штавише у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева

седам месеци после инфекције није уочен никакав патолошки налаз (Слика 2, Графикон 2).

Међутим, за разлику од налаза који су приказани у моделу болести изазване код 1101 NOD мишева, у јетри C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* детектована је фиброза јетре како три (Слика 1, Графикон 1) тако и седам (Слика 3, Графикон 2) месеци после инфекције. У исечцима јетре су уочени значајни депозити влакана колагена (слике 1 и 3), као и повећана експресија колагена и  $\alpha$ -SMC у ткиву јетре (Графикон 9). За развој фиброзе ткива неопходна је повећана продукција Th2 цитокина (267). Код NOD мишева је Th2 имунски одговор значајно атенуиран (268), док се код C57BL/6 WT мишева након различитих облика стимулације Т лимфоцита увек поред Th1/Th17 цитокина продукују и Th2 цитокини, иако мање него код BALB/c мишева (269). Дендритске ћелије изоловане из WT мишева и потом *in vitro* стимулисане *N. aromaticivorans*-ом у већем проценту експримирају IL-4 (Графикон 13)- цитокин неопходан за диференцијацију у Th2 ћелије. Такође, значајан прилив CD4+ и CD8+ ћелија које експримирају профибротске цитокине, IL-4 и IL-13, примећен је у јетрама WT мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* (Табела 1). Значајна активација Th2 имунског одговора изазвана инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans* и повећана продукција профибротских цитокина може да објасни налаз фиброзе јетре у моделу PBC изазваном овом бактеријском инфекцијом. Познато је да галектин-3 активира факторе који делују профибротски као што су FGF и TGF- $\beta$  стимулишући уз то и стварање колагена у различитим експерименталним моделима болести и болестима (270). Дефицијенција или фармаколошка блокада галектина-3 праћена је редукцијом фиброзе бубрега (271), срца (272, 273), јетре (274, 275). У складу са овим налазима је и резултат ове студије у којој је показано скоро одсуство фиброзе у групи *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева којима је PBC индукован инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans*. Поред тога детектована је и редукција фиброзе у јетрама WT мишева који су примали инхибитор GM-CT-01, и то и у групама третираним инхибитором од почетка индукције болести (Графикон 8) као и у групама мишева који су инхибитор примали од девете недеље након инфекције (Графикон 10, Слика 10). Редукција фиброзе јетре након третмана инхибитором галектина-3 је потврђена је налазом да третирање DC са GM-CT-01 током *in vitro* стимулације *N. aromaticivorans*-ом, значајно смањује експресију профибротског цитокина, IL-4, у самим ћелијама (Графикон 13).

## 5.2. Делеција *Lgals3*<sup>-/-</sup> и фармаколошка инхибиција галектина-3 у јетри мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* смањују заступљеност Т, НК и НКТ ћелија које експримирају ИЛ-17

Иако се углавном сматра да је РВС аутоимунска болест посредована Th1 лимфоцитима, у литератури су присутни и налази који говоре у прилог значајне улоге Th17 ћелија у отпочињању и развоју болести. Тако је показано и значајно накупљање Th17 ћелија као и повећана експресија CCL20, хемокина који привлачи Th17 ћелије, у јетрама оболелих од примарног билијарног холангитиса (276). Друго истраживање показује значајно присуство моноклеарних ћелија које експримирају ИЛ-23 и ИЛ-17 у портним путевима у касним фазама РВС (277). Јетре ИЛ-2R $\alpha$  *knockout* мишева који спонтано развијају болест налик примарном билијарном холангитису садрже агрегате ИЛ-17+ лимфоцита у портном тракту (278). Присуство у јетри ћелија које продукују ИЛ-17 је типично за касније фазе примарног билијарног холангитиса и јасно говори у прилог значаја конверзије Th1 у Th17 у овој болести (279).

Усклађено са осталим параметрима болести (хистолошки скор, параметри серума) нађен је значајно мањи % ИЛ-17+ ћелија у јетрама инфицираних *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева (Слика 3, Графикон 4, Табела 1). Такође, значајно мањи проценат и број ћелија које експримирају цитокине карактеристичне и за T1, T17 и T2 имунски одговор примећен је и у јетри мишева који су третирани инхибитором галектина-3 (Табела 1). Највећи апсолутни број CD4 и CD8 ћелија које синтетишу ИЛ-17 био детектован је у јетрама WT мишева инфицираних бактеријом *N. aromaticivorans* (Табела 1). Узимајући у обзир наше резултате и претходне извештаје (279), може се претпоставити да главну улогу у развоју примарног билијарног холангитиса индукованог код C57BL/6 мишева бактеријом *N. aromaticivorans* играју ИЛ-17 продукујући лимфоцити. Такође, у нашем истраживању је откривена већа експресија ИЛ-17 у НК и НКТ ћелијама код заражених C57BL/6 мишева који развијају болест (Графикон 4) што је у складу са претходним открићем да микроокружење јетре потенцира производњу ИЛ-17 (278). Имајући у виду показан значај ИЛ-17 за развој системске склерозе (280) и фиброзе јетре (281, 282), фиброза јетре детектована код инфицираних C57BL/6 мишева може се објаснити и повећаном експресијом ИЛ-17 и у лимфоцитима и у НК и НКТ ћелијама у јетри.

### 5.3. Делетија *Lgals3<sup>-/-</sup>* и фармаколошка инхибиција галектина-3 смањују активацију DC изазвану *N. aromaticivorans*

Фенотипизација DC јетре и слезине након трећег дана од инфицирања *N. aromaticivorans*-ом указала је на сигнификантно смањење % активисаних и ћелија које експримирају инфламацијски цитокин IL-1 $\beta$  у слезинама и мањи проценат DC које експримирају инфламацијски цитокин у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева у поређењу са WT мишевима (251). Даље, у фази развијене болести, у јетрама *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева је откривен значајно мањи проценат активираних и инфламацијских мијелоидних CD11b<sup>+</sup> и CD1d<sup>+</sup> DC које презентују липиде (251). Ови резултати су супротности нашим резултатима утврђеним у моделу РВС-а изазваном имунизацијом ксенобиотиком, где галектин-3 експримиран у ћелијама билијарног епитела игра најважнију улогу у укупном ефекту галектина-3 на развој и тежину болести (9), али су у складу са претходним извештајима да смањење експресије галектина-3 у DC инхибише производњу инфламацијских цитокина у овим ћелијама (36). У складу са овим налазима је и значајно смањење експресије маркера активације CD86 и CD40 (Графикон 12) и цитокина IL12/23, IL-4 и IL-1 $\beta$  (Графикон 13) у дендритским ћелијама *in vitro* третираним бактеријом *N. aromaticivorans* у присуству инхибитора галектина-3, GM-CT-01.

Значајно мањи проценат IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> DC третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01 у току стимулације бактеријом *N. aromaticivorans* (Графикон 13) може, обзиром на значај IL-1 $\beta$  за диференцијацију Th17 ћелија и продукцију IL-17 (283), да објасни смањен проценат CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> ћелија у јетри ових мишева. Атенуација инфламацијског потенцијала DC када недостаје Gal-3 је у складу са студијама о улози галектина-3 у патогенези других инфламацијских обољења јетре (245, 275, 284) и акутног колитиса (259). Слабија активација и неадекватан развој инфламацијских DC када недостаје Gal-3 је на вероватнији узрок неадекватне активације NKT ћелија, апсолутно неопходних за развој РВС изазваног инфекцијом *N. aromaticivorans*-ом (109). Сличан ефекат галектина-3 је

раније показан у другим моделима оштећења јетре (284) и највероватније је слабија осетљивост, готово резистенција, *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева на развој РВС изазван инфекцијом *N. aromaticivorans*-ом последица немогућности адекватног активисања DC микроорганизмом када недостаје Gal-3, чиме се блокира иницијални корак у патогенези ове болести.

#### **5.4. Делеција *Lgals3<sup>-/-</sup>* и фармаколошка инхибиција галектина-3 смањују активацију инфламазома изазвану *N. aromaticivorans***

У литератури недостају подаци о претпостављеној интеракцији Gal-3 и *N. aromaticivorans*-а. Међутим, узимајући у обзир интеракцију галектина-3 и различитих бактеријских гликоконјугата и гликосфинголипида на хуманим ћелијама (285), врло је вероватно да галектин-3 може директно да веже гликосфинголипиде бактерије *N. aromaticivorans*. Стимулисање DC екстрахованих из здравих WT мишева *N. aromaticivorans*-ом *in vitro* резултовала је појачаном експресијом маркера активације и инфламацијских цитокина (Графикони 12 и 13). Стимулисање DC из *Lgals3<sup>-/-</sup>* животиња, на исти начин, није имала претходно наведене ефекте, као и стимулација WT DC у присуству инхибитора галектина-3, GM-CT-01, јер није уочена повећана експресија маркера активације ни инфламацијских цитокина (251). Ови резултати указују на то да *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишеви не развијају болест после инфекције *N. aromaticivorans* по свему судећи због инсуфицијентног активисања DC када недостаје Gal-3, што последично омета адекватну активацију NKT и аутореактивних Т ћелија. Овај закључак је у складу са претходним извештајима да галектин-3 повећава стимулаторну способност DC у активацији ефекторских функција NKT ћелија која доказано оштећује јетру у хепатитису изазваном  $\alpha$ -галактозилцерамидом (284).

Активисани инфламазом у јетриним макрофагама има значајно место у настанку и развоју обољења јетре (286). У јетри трансгених мишева који конститутивно експримирају активни NLRP3 покзана је значајна пироптоза хепатоцита, инфламација и фиброза (287). За активацију NLRP3 инфламазома у макрофагима неопходан је галектин-3 који аутокриним механизмом појачава имунски одговор у којем се продукује IL-17 (242). Знатно већи проценат NLRP3+ DC и макрофага, већа продукција IL-1 $\beta$  и већа експресија

NLRP3 и ASC у јетри, рано након инфекције бактеријом *N. aromaticivorans*, детектовани су у јетрама WT мишева у поређењу са групом *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишевима (Слике 11 и 12, Графикони 14-16).

Даље *in vitro* стимулација DC бактеријом *N. aromaticivorans* значајно повећава експресију NLRP3 у ћелијама изолованим из галектин-3 позитивних мишева (251), док *in vitro* стимулација перитонеалних макрофага WT животиња овом бактеријом резултује повећаном експресијом NLRP3 инфламазома, повећаном продукцијом IL-1 $\beta$  и повећањем активности каспазе-1 (Слика 7, Графикони 6 и 7). Ови резултати су у складу са резултатима претходне студије у којима је показано да делеција *Lgals3* код dnTGF- $\beta$ RII мишева резултује слабијом активацијом инфламазома, атенуацијом Th17 имунског одговора и значајним побољшањем холангитиса (242).

Активација инфламазома игра важну улогу у патогенези обољења јетре (метаболичких и инфламацијских) које су покренуте slabим али понављајућим стимулусима. С друге стране, снажни стимулуси имунског система који се користе у индукцији аутоимунског хепатитиса активирају првенствено рецепторе урођене имуности (288). Различити начини стимулације ћелија урођене имуности у моделу примарног билијарног холангитиса индукованих ксенобиотиком и инфекцијом бактеријом *N. aromaticivorans* могу да објасне супротан ефекат галектина-3 у ова два модела РВС. *N. aromaticivorans* има атипичан ћелијски зид који садржи гликосфинголипиде, молекуле сличне молекулима у мембрани еукариота, који углавном не изазива инфламацију и оштећење ткива, иако се детектује у слузници дигестивног тракта (111).

Стога може да се претпостави да се активација урођене имуности бактеријом и инфламацијски одговор на *N. aromaticivorans* код мишева покрећу активацијом инфламазома односно интегрисањем појединачно недовољних сигнала што ствара услове за последично активисање имунских ћелија и развиће холангитиса. Одсуство болести код *Lgals3<sup>-/-</sup>* мишева и значајно атенуисана болест код WT који су примали инхибитор су у складу са претходним подацима о улози галектина-3 у активацији инфламазома (259, 242). У моделу примарног билијарног холангитиса индукованог имунизацијом ксенобиотиком ћелије урођене имуности, углавном дендритске, се углавном активирају компонентама комплетног *Freund's* адјуванса који стимулише TLR 4 (288) што умањује улогу инфламазома у активацији урођене имуности.



Могуће је и да се DC WT и галектин-3 дефицијентних мишева скоро подједнако активирају мешавином ксенобиотика и адјуванса, чиме се смањује значај галектина-3 као модулятора иницијалне фазе примарног билијарног холангитиса. Такође, на основу нашег претходног налаза да дефицијенција галектина-3 подстиче развој инфламацијског фенотипа DC у јетри мишева имунизованих ксенобиотиком и адјувансом (241) и имајући у виду познату улогу галектина-3 у атенуацији инфламације изазване агонистима TLR (289) може да се претпостави да галектин-3 атенуише активацију DC изазвану имунизацијом смешом ксенобиотика и адјуванса и тако доприноси атенуацији примарног билијарног хооангитиса изазваног ксенобиотиком.

Могуће објашњење проинфламацијске улоге галектина-3 у аутоимунском холангитису индукованом инфекцијом мишева бактеријом *N. aromaticivorans* је вероватно последица доминантне улоге инфламазома у активацији DC и макрофага бактеријом *N. aromaticivoran*, што резултује активацијом и диференцијацијом и других ћелија које играју кључну улогу у патогенези примарног билијарног холангитиса, посебно NK, NKT и T ћелија које продукују IL-17. Из наведеног је јасно да инхибиција сигнализације у којој учествује галектин-3 може да буде потенцијална терапијска стратегија за лечење примарног билијарног холангитиса.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Галектин-3 игра проинфламацијску улогу у развоју примарног билијарног холангитиса изазваног инфицирањем C57BL/6 животиња *Novosphingobium aromaticivorans*-ом. Фармаколошка инхибиција галектина-3 у току индукције болести има исти ефекат на испољавање РВС као и делеција *Lgals3* гена, а терапијска примена инхибитора значајно смањује фиброзу јетре, оштећење билијарних каналића и биохемијске параметре болести. Галектин-3 остварује инфламацијску улогу у моделу РВС изазваном бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* барем на два начина: 1. омогућава адекватну активацију DC након ове бактеријске инфекције које онда могу да активирају NKT НК и Т ћелије неопходне за развој РВС; 2. подстиче активацију инфламазома и тако појачава инфламацију у јетри.

Закључци проистичу из наведених експерименталних налаза:

- 1) Дефицијенција Gal-3 и фармаколошка инхибиција галектина-3 удружене су са значајно мањим оштећењем билијарних каналића и мањом фиброзом јетре.
- 2) Јетре *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева инфицираних бактеријом садрже значајно мањи проценат активираних, као и IL-17 позитивних НК и NKT ћелија.
- 3) Јетре *Lgals3*<sup>-/-</sup> као и мишева који су у фази индукције болести примали инхибитор галектина-3, GM-CSF-01, садрже значајно мањи број CD4 и CD8 лимфоцита који синтетишу запаљенске (IFN- $\gamma$  и IL-17) и профибротске цитокине (IL-4 и IL-13).
- 4) Галектин-3 је неопходан за активацију инфламазома у макрофагима стимулираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Већа је активност каспазе и продукција IL-1 $\beta$  у WT макрофагима излаганих бактерији *in vitro* и већи проценат WT макрофага излаганих бактерији *in vitro* експримира NLRP3 и IL-1 $\beta$ . Инфилтрати јетре инфицираних WT мишева садрже већи проценат ћелија које синтетишу NLRP3 и IL-1 $\beta$ .

- 5) Галектин-3 је неопходан за адекватну активацију DC бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Излагање инхибитору галектина-3, GM-CT-01, у време *in vitro* стимулације бактеријом смањује проценат активираних CD40 и CD86 позитивних као и DC које експримирају цитокине p40 (IL12/23), IL-1 $\beta$  и IL-4.
- 6) Инхибитор галектина-3, GM-CT-01, примењен терапијски значајно смањује оштећење билијарних каналића и фиброзу јетре и смањује концентрацију алкалне фосфатазе у серуму.
- 7) Инхибитор галектина-3, GM-CT-01, значајно смањује експресију галектина-3 у јетри инфицираних мишева и ослобађање галектина-3 из спленоцита стимулираних *in vitro* LPS-ом.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 2013;24(8):303-30.
2. Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1481-96.
3. Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2015;386(10003):1565-75.
4. Ulrich Beuers, M Eric Gershwin, Robert G Gish, Pietro Invernizzi, David E J Jones, Keith Lindor, Xiong Ma, Ian R Mackay, Albert Parés, Atsushi Tanaka, John M Vierling, Raoul Poupon. Changing Nomenclature for PBC: From 'Cirrhosis' to 'Cholangitis'. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(11):1536-8.
5. Webb GJ, Hirschfield GM. Primary biliary cholangitis in 2016: High-definition PBC: biology, models and therapeutic advances. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(2):76-78.
6. Gulamhusein AF, Hirschfield GM. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019: 10.1038/s41575-019-0226-7.
7. Rong G, Wang H, Bowlus CL, Wang C, Lu Y, Zeng Z, Qu J, Lou M, Chen Y, An L, Yang Y, Gershwin ME. Incidence and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2015;48(2-3):132-41.
8. Lammers WJ, van Buuren HR, Hirschfield GM, Janssen HL, Invernizzi P, Mason AL, Ponsioen CY, Floreani A, Corpechot C, Mayo MJ, Battezzati PM, Parés A, Nevens F, Burroughs AK, Kowdley KV, Trivedi PJ, Kumagi T, Cheung A, Lleo A, Imam MH, Boonstra K, Cazzagon N, Franceschet I, Poupon R, Caballeria L, Pieri G, Kanwar PS, Lindor KD, Hansen BE; Global PBC Study Group. Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: an international follow-up study. *Gastroenterology.* 2014;147(6):1338-49.e5.
9. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1978;379(2):103-12.

10. Scheuer P. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med.* 1967;60(12):1257-60.
11. Warnes T, Roberts S, Smith A, Haboubi N, McMahon RF. Liver biopsy in primary biliary cholangitis: is sinusoidal fibrosis the missing key? *J Clin Pathol.* 2019;72(10):669-676.
12. Lazaridis KN, Juran BD, Boe GM, Slusser JP, de Andrade M, Homburger HA, Ghosh K, Dickson ER, Lindor KD, Petersen GM. Increased prevalence of antimitochondrial antibodies in first-degree relatives of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007;46(3):785-92.
13. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, Gordon SC, Wright HI, Zweiban B, Podda M, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology.* 2004;127(2):485-92.
14. Gulamhusein AF, Lazaridis KN. Primary biliary cholangitis, DNA, and beyond: The Relative contribution of genes. *Hepatology.* 2018;68(1):19-21.
15. Invernizzi P, Selmi C, Poli F, Frison S, Floreani A, Alvaro D, Almasio P, Rosina F, Marzioni M, Fabris L, Muratori L, Qi L, Seldin MF, Gershwin ME, Podda M / Group., Italian PBC Genetic Study. Human leukocyte antigen polymorphisms in Italian primary biliary cirrhosis: a multicenter study of 664 patients and 1992 healthy controls. *Hepatology.* 2008;48(6):1906-12.
16. Invernizzi P. Human leukocyte antigen in primary biliary cirrhosis: an old story now reviving. *Hepatology.* 2011;54(2):714-23.
17. Onishi S, Sakamaki T, Maeda T, Iwamura S, Tomita A, Saibara T, Yamamoto Y. DNA typing of HLA class II genes; DRB1\*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1994;21(6):1053-60.
18. Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2011;43(4):329-32.
19. Gulamhusein AF, Juran BD, Lazaridis KN. Genome-Wide Association Studies in Primary Biliary Cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2015;35(4):392-401.
20. Cordell HJ, Han Y, Mells GF, Li Y, Hirschfield GM, Greene CS, et al International genome-wide meta-analysis identifies new primary biliary cirrhosis risk loci and targetable pathogenic pathways. *Nat Commun.* 2015;6:8019.
21. Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, Gu X, Walker EJ, Jing K, Juran BD, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Coltescu C, Atkinson EJ, Heathcote EJ,

- Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2544-55.
22. Wang L, Wang FS, Chang C, Gershwin ME. Breach of tolerance: primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2014;34(3):297-317.
23. Oo YH, Banz V, Kavanagh D, Liaskou E, Withers DR, Humphreys E, Reynolds GM, Lee-Turner L, Kalia N, Hubscher SG, Klenerman P, Eksteen B, Adams DH. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol*. 2012;57(5):1044-51.
24. Williams IR. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:52-61.
25. Lin YL, Ip PP, Liao F. CCR6 Deficiency Impairs IgA Production and Dysregulates Antimicrobial Peptide Production, Altering the Intestinal Flora. *Front Immunol*. 2017;8:805.
26. Hamlyn AN, Macklon AF, James O. Primary biliary cirrhosis: geographical clustering and symptomatic onset seasonality. *Gut*. 1983;24(10):940-5.
27. Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the United States. *Hepatology* 2001;33:16-21.
28. Corpechot C, Chretien Y, Chazouilleres O, Poupon R. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:162-169.
29. Wang JJ, Yang GX, Zhang WC, Lu L, Tsuneyama K, Kronenberg M, et al. Escherichia coli infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice. *Clin Exp Immunol* 2014;175:192-201.
30. Juran BD, Lazaridis KN. Environmental factors in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2014;34(3):265-72.
31. Tanaka A, Leung PS, Gershwin ME. Environmental basis of primary biliary cholangitis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(2):184-189.
32. Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Yoshida K, Yang GX, Hibi T, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology*. 2008;48(2):531-40.

33. Padgett KA, Lan RY, Leung PC, Lleo A, Dawson K, Pfeiff J, Mao TK, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):246-53.
34. Rodrigues PM, Perugorria MJ, Santos-Laso A, Bujanda L, Beuers U, Banales JM. Primary biliary cholangitis: A tale of epigenetically-induced secretory failure? *J Hepatol.* 2018;69(6):1371-1383.
35. Banales JM<sup>1</sup>, Sáez E, Uriz M, Sarvide S, Urribarri AD, Splinter P, Tietz Bogert PS, Bujanda L, Prieto J, Medina JF, LaRusso NF. Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2012;56(2):687-97.
36. Erice O, Munoz-Garrido P, Vaquero J, Perugorria MJ, Fernandez-Barrena MG, Saez E, Santos-Laso A, Arbelaiz A, Jimenez-Agüero R, Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Torrano V, Carracedo A, Ananthanarayanan M, Marzioni M. MicroRNA-506 promotes primary biliary cholangitis-like features in cholangiocytes and immune activation. *Hepatology.* 2018;67(4):1420-1440.
37. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005;37(7):766-70.
38. Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL, Gaspar MM, Carvalho T, Borralho P, Bañales JM, Castro RE, Rodrigues CMP. miRNA-21 ablation protects against liver injury and necroptosis in cholestasis. *Cell Death Differ.* 2018;25(5):857-872. .
39. Ando Y, Yang GX, Kenny TP, Kawata K, Zhang W, Huang W, Leung PS, Lian ZX, Okazaki K, Ansari AA, He XS, Invernizzi P, Ridgway WM, Lu Q, Gershwin ME Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- $\beta$  receptor type II mouse. *J Autoimmun.* 2013;41:111-9..
40. Invernizzi P, Lleo A, Podda M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis.* 2007;27(2):161-72.
41. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, Gores GJ, Ansari AA, Van de Water J, Gershwin ME. Apoptosis and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2009;49(3):871-9.

42. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet*. 1988;1(8594):1067-70.
43. Lleo A, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: apotopes and epitopes. *J Gastroenterol*. 2011;46 Suppl 1:29-38.
44. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, Ansari AA, Coppel RL, Worman HJ, Gores GJ, Gershwin ME. Biliary apotopes and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52(3):987-98.
45. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):965-75.
46. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, Luketic V, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195(1):113-23.
47. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, Niino H, Arinobu Y, Ono N, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2008;31(2):110-5.
48. Ma HD, Ma WT, Liu QZ, Zhao ZB, Liu MZ, Tsuneyama K, Gao JM, Ridgway WM, Ansari AA, Gershwin ME, Fei YY, Lian ZX. Chemokine receptor CXCR3 deficiency exacerbates murine autoimmune cholangitis by promoting pathogenic CD8+ T cell activation. *J Autoimmun*. 2017;78:19-28.
49. Ueno Y, Ambrosini YM, Moritoki Y, Ridgway WM, Gershwin ME. Murine models of autoimmune cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(3):274-9.
50. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(4):345-50.
51. Ueno H. T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2016;43:24-31.
52. Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, Zhu Y, Lu H, Zhang S, Wang P, Zhang B, Zhong R. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with



primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(2):217-25.

53. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:211-21. .

54. Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, Li Y, Xu X, Jin L, Yang T, Li Z, Sun Y, Zhang JY, Lv S, Chen L, Li B, Gershwin ME, Wang FS. CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2015;61(2):627-38.

55. Zheng J, Wang T, Zhang L, Cui L. Dysregulation of Circulating Tfr/Tfh Ratio in Primary biliary cholangitis. *Scand J Immunol.* 2017;86(6):452-461.

56. Selmi C, Lleo A, Pasini S, Zuin M, Gershwin ME. Innate immunity and primary biliary cirrhosis. *Curr Mol Med.* 2009;9(1):45-51.

57. Shimoda S, Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010;51(2):567-75.

58. Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, Mori T, Fujiwara S, Koyabu M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsushashi H, Ishibashi H. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. *Liver Int.* 2006;26(4):467-76.

59. Zhang H, Lian M, Zhang J, Bian Z, Tang R, Miao Q, Peng Y, Fang J, You Z, Invernizzi P, Wang Q, Gershwin ME, Ma X. A functional characteristic of cysteine-rich protein 61: Modulation of myeloid-derived suppressor cells in liver inflammation. *Hepatology.* 2018;67(1):232-246.

60. . Lleo A, Invernizzi P. Apoptosis and innate immune system: novel players in the primary biliary cirrhosis scenario. *Dig Liver Dis.* 2013;45(8):630-6.

61. Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006;26(4):232-40.

62. Shimoda S, Hisamoto S, Harada K, Iwasaka S, Chong Y, Nakamura M, Bekki Y, Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Maehara Y, He XS, Gershwin ME, Akashi K. Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2015;62(6):1817-27.

63. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*. 2003;422(6928):164-9.
64. Al-Dury S, Wahlström A, Wahlin S, Langedijk J, Elferink RO, Ståhlman M, Marschall HU. Pilot study with IBAT inhibitor A4250 for the treatment of cholestatic pruritus in primary biliary cholangitis. *Sci Rep*. 2018;8(1):6658.
65. Acharya C, Sahingur SE, Bajaj JS. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI Insight*. 2017;2(19).
66. Hartmann P, Hochrath K, Horvath A, Chen P, Seebauer CT, Llorente C, Wang L, Alnouti Y, Fouts DE, Stärkel P, Loomba R, Coulter S, Liddle C, Yu RT, Ling L, Rossi SJ, DePaoli AM, Downes M, Evans RM, Brenner DA, Schnabl B. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*. 2018;67(6):2150-2166.
67. Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, Peng L, Zhao G, Downes M, Yu RT, Shelton JM, Richardson JA, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3920-5.
68. Inamine T, Schnabl B. Immunoglobulin A and liver diseases. *J Gastroenterol*. 2018;53(6):691-700.
69. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189.
70. Ohtani N, Kawada N. Role of the Gut-Liver Axis in Liver Inflammation, Fibrosis, and Cancer: A Special Focus on the Gut Microbiota Relationship. *Hepatol Commun*. 2019;3(4):456-470.
71. Hamoud AR, Weaver L, Stec DE, Hinds TD. Bilirubin in the Liver-Gut Signaling Axis. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(3):140-150.
72. Sato K, Hall C, Glaser S, Francis H, Meng F, Alpini G. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury. *Am J Pathol*. 2016;186(9):2238-47.
73. Treiner E. Mucosal-associated invariant T cells in inflammatory bowel diseases: bystanders, defenders, or offenders? *Front Immunol*. 2015;6:27.

74. Jeffery HC, van Wilgenburg B, Kurioka A, Parekh K, Stirling K, Roberts S, Dutton EE, Hunter S, Geh D, Braitch MK, Rajanayagam J, Iqbal T, Pinkney T, Brown R, Withers DR, Adams DH, Klenerman P, Oo YH. Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *J Hepatol.* 2016;64(5):1118-1127.
75. Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, Roccarina D, Rosselli M, Hall A, Luong T, Tsochatzis EA, Thorburn D, Pinzani M. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. *Hepatology.* 2018;68(1):172-186.
76. Atif M, Warner S, Oo YH. Linking the gut and liver: crosstalk between regulatory T cells and mucosa-associated invariant T cells. *Hepatol Int.* 2018;12(4):305-314.
77. Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R. Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J Hepatol.* 2017;67(5):1084-1103.
78. Floreani A, Baragiotta A, Pizzuti D, Martines D, Cecchetto A, Chiarelli S. Mucosal IgA defect in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(2):508-10.
79. Campisi L, Barbet G, Ding Y, Esplugues E, Flavell RA, Blander JM. Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive TH17 cells. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1084-92.
80. Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Shiratori K, Yagi J. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab Invest.* 2010;90(4):577-88.
81. Chang JC, Go S, Verhoeven AJ, Beuers U, Oude Elferink RPJ. Role of the bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase in cholangiocyte apoptosis in primary biliary cholangitis; a new hypothesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1232-1239.
82. Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na<sup>+</sup>-independent SLC4 anion exchangers. *J Exp Biol.* 2009;212(Pt 11):1672-83.
83. Geng W, Wang Z, Zhang J, Reed BY, Pak CY, Moe OW. Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(6):C1305-16.
84. Kleinboelting S, Diaz A, Moniot S, van den Heuvel J, Weyand M, Levin LR, Buck J, Steegborn C. Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(10):3727-32.

85. Chang JC, Go S, de Waart DR, Munoz-Garrido P, Beuers U, Paulusma CC, Oude Elferink R. Soluble Adenylyl Cyclase Regulates Bile Salt-Induced Apoptosis in Human Cholangiocytes. *Hepatology*. 2016;64(2):522-34.
86. Salas JT, Banales JM, Sarvide S, Recalde S, Ferrer A, Uriarte I, Oude Elferink RP, Prieto J, Medina JF. Ae2a,b-deficient mice develop antimitochondrial antibodies and other features resembling primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1482-93.
87. Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Nakada S, Nakanuma Y. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology*. 2008;48(1):186-95.
88. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2010;53(2):318-25.
89. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S25-37.
90. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004;40(3):539-51.
91. Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A. Farnesoid X receptor modulators 2014-present: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2018;28(5):351-364.
92. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol*. 2013;58(1):155-68.
93. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004;126(1):322-42.
94. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. 1999;3(5):543-53.
95. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 1995;81(5):687-93.
96. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6(3):517-26.

97. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28857-65.
98. Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2020-30.
99. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*. 2005;2(4):217-25.
100. Kim I, Ahn SH, Inagaki T, Choi M, Ito S, Guo GL, Kliewer SA, Gonzalez FJ. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2664-72.
101. Triantis V, Saeland E, Bijl N, Oude-Elferink RP, Jansen PL. Glycosylation of fibroblast growth factor receptor 4 is a key regulator of fibroblast growth factor 19-mediated down-regulation of cytochrome P450 7A1. *Hepatology*. 2010;52(2):656-66.
102. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. 2002;277(4):2908-15.
103. Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, Ono T, Besnard P. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem*. 1999;274(42):29749-54.
104. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology*. 2001;121(1):140-7.
105. Epub 2010 Dec 17. Yang GX, Wu Y, Tsukamoto H, Leung PS, Lian ZX, Rainbow DB, Hunter KM, Morris GA, Lyons PA, Peterson LB, Wicker LS, Gershwin ME, Ridgway WM. CD8 T cells mediate direct biliary ductule damage in nonobese diabetic autoimmune biliary disease. *J Immunol*. 2011;186(2):1259-67.

106. Bae HR, Leung PS, Tsuneyama K, Valencia JC, Hodge DL, Kim S, Back T, Karwan M, Merchant AS, Baba N, Feng D, Park O, Gao B, Yang GX, Gershwin ME, Young HA. Chronic expression of interferon-gamma leads to murine autoimmune cholangitis with a female predominance. *Hepatology*. 2016;64(4):1189-201.
107. Bae HR, Hodge DL, Yang GX, Leung PSC, Chodisetti SB, Valencia JC, Sanford M, Fenimore JM, Rahman ZSM, Tsuneyama K, Norman GL, Gershwin ME, Young HA. The interplay of type I and type II interferons in murine autoimmune cholangitis as a basis for sex-biased autoimmunity. *Hepatology*. 2018;67(4):1408-1419.
108. MaHD, Zhao ZB, Ma WT, Liu QZ, Gao CY, Li L, Wang J, Tsuneyama K, Liu B, Zhang W, Zhou Y, Gershwin ME, Lian ZX. Gut microbiota translocation promotes autoimmune cholangitis. *J Autoimmun*. 2018;95:47-57.
109. Mattner J, Savage PB, Leung P, Oertelt SS, Wang V, Trivedi O, Scanlon ST, Pendem K, Teyton L, Hart J, Ridgway WM, Wicker LS, Gershwin ME, Bendelac A. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe*. 2008;3(5):304-15.
110. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005;353(12):1261-73.
111. Kawahara K, Moll H, Knirel YA, Seydel U, Zähringer U. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur J Biochem*. 2000;267(6):1837-46.
112. Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, Leung PS, Balkwill DL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2005;24(3):209-19.
113. de Waard A, Hickman S, Kornfeld S. Isolation and properties of  $\beta$ -galactoside binding lectins of calf heart and lung. *J Biol Chem*. 1976;251(23):7581-7.
114. 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(4):597-8.
115. Popa SJ, Stewart SE, Moreau K. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;83:42-50.

116. Kim BW, Hong SB, Kim JH, Kwon DH, Song HK. Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun.* 2013;4:1613.
117. Li S, Wandel MP, Li F, Liu Z, He C, Wu J, Shi Y, Randow F. Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy. *Sci Signal.* 2013;6(261):ra9.
118. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR, Rabinovich GA. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry.* 2011;50(37):7842-57.
119. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):433-40.
120. 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(2-3):232-54.
121. Kamili NA, Arthur CM, Gerner-Smidt C, Tafesse E, Blenda A, Dias-Baruffi M, Stowell SR. Key regulators of galectin-glycan interactions. *Proteomics.* 2016;16(24):3111-3125.
122. Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, Oberg CT, Sundin A, Nilsson R, Nordberg-Karlsson E, Nilsson UJ, Karlsson A, Rini JM, Leffler H. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *J Biol Chem.* 2010;285(45):35079-91.
123. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):29-41.
124. Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9(5):578-84.
125. Ippel H, Miller MC, Vértesy S, Zheng Y, Cañada FJ, Suylen D, Umemoto K, Romanò C, Hackeng T, Tai G, Leffler H, Kopitz J, André S, Kübler D, Jiménez-Barbero J, Oscarson S, Gabius HJ, Mayo KH. Intra- and intermolecular interactions of human galectin-3: assessment by full-assignment-based NMR. *Glycobiology.* 2016;26(8):888-903.
126. 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(20):14167-74.
127. Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry.* 1993;32(1):260-7.

128. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e17.
129. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993;3(4):297-304.
130. 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(2-3):143-58.
131. 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(13):1679-700.
132. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 1999;9(10):979-84.
133. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1982;128(3):1221-8.
134. Roff CF, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 1983;258(17):10657-63.
135. 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):10649-52.
136. Cerra RF, Gitt MA, Barondes SH. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *J Biol Chem*. 1985;260(19):10474-7.
137. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem*. 1987;262(15):7383-90.
138. Raz A, Meromsky L, Zvibel I, Lotan R. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer*. 1987;39(3):353-60.
139. 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(13):7097-9.
140. 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(7):1177-87.



141. 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(27):18250-8.
142. 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 proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacteria and tissue collagenase. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26704-11.
143. 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(24):6239-45.
144. Lin YH, Qiu DC, Chang WH, Yeh YQ, Jeng US, Liu FT, Huang JR. The intrinsically disordered N-terminal domain of galectin-3 dynamically mediates multisite self-association of the protein through fuzzy interactions. *J Biol Chem.* 2017;292(43):17845-17856.
145. 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(11):1201-8.
146. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):29-41.
147. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):527-35.
148. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):575-81.
149. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15819-27.
150. 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(1):97-106.
151. 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(2):569-76.

152. 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(9):6852-7.
153. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1047-54.
154. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(31):10913-8.
155. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6737-42.
156. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(2):305-28.
157. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1473(1):172-85.
158. Domic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(4):616-35.
159. Thijssen VL, Poirier F, Baum LG, Griffioen AW. Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood.* 2007;110(8):2819-27.
160. Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(18):6452-6.
161. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2000;255(2):278-90.
162. Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, Mercurio AM. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(8):3466-70.
163. Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A, Kubo T. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4635-40.

164. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett.* 2004;212(2):233-9.
165. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):263-73.
166. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene.* 2001;20(51):7486-93.
167. 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(16):7292-300.
168. Koch A, Poirier F, Jacob R, Delacour D. Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 2010;21(2):219-31.
169. Clare DK, Magescas J, Piolot T, Dumoux M, Vesque C, Pichard E, Dang T, Duvauchelle B, Poirier F, Delacour D. Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia. *Nat Commun.* 2014;5:4888.
170. Magescas J, Sengmanivong L, Viau A, Mayeux A, Dang T, Burtin M, Nilsson UJ, Leffler H, Poirier F, Terzi F, Delacour D. Spindle pole cohesion requires glycosylation-mediated localization of NuMA. *Sci Rep.* 2017;7(1):1474.
171. 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 U S A.* 2009;106(34):14496-501.
172. Liu W, Hsu DK, Chen HY, Yang RY, Carraway KL 3rd, Isseroff RR, Liu FT. Galectin-3 regulates intracellular trafficking of EGFR through Alix and promotes keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2012;132(12):2828-37.
173. Wang SF, Tsao CH, Lin YT, Hsu DK, Chiang ML, Lo CH, Chien FC, Chen P, Arthur Chen YM, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. *Glycobiology.* 2014;24(11):1022-35.
174. 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(9):3535-7.
175. Harazono Y, Nakajima K, Raz A. Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: a solution. *Cancer Metastasis Rev.* 2014;33(1):285-94.

176. Harazono Y, Kho DH, Balan V, Nakajima K, Zhang T, Hogan V, Raz A. Galectin-3 leads to attenuation of apoptosis through Bax heterodimerization in human thyroid carcinoma cells. *Oncotarget*. 2014;5(20):9992-10001.
177. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(4):1213-7.
178. Laing JG, Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*. 1988;27(14):5329-34.
179. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21(52):8001-10.
180. Jones JL, Saraswati S, Block AS, Lichti CF, Mahadevan M, Diekman AB. Galectin-3 is associated with prostasomes in human semen. *Glycoconj J*. 2010;27(2):227-36.
181. Paz I, Sachse M, Dupont N, Mounier J, Cederfur C, Enninga J, Leffler H, Poirier F, Prevost MC, Lafont F, Sansonetti P. Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell Microbiol*. 2010;12(4):530-44.
182. Maier O, Marvin SA, Wodrich H, Campbell EM, Wiethoff CM. Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape. *J Virol*. 2012;86(19):10821-8.
183. Flavin WP, Bousset L, Green ZC, Chu Y, Skarpathiotis S, Chaney MJ, Kordower JH, Melki R, Campbell EM. Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol*. 2017;134(4):629-653.
184. Jiang P, Gan M, Yen SH, McLean PJ, Dickson DW. Impaired endo-lysosomal membrane integrity accelerates the seeding progression of  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Sci Rep*. 2017;7(1):7690.
185. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):172-85.
186. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, poly-lactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem*. 1992;267(10):6983-90.
187. 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(4):2156-64.

188. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1434-44.
189. 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.
190. Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(4):845-50.
191. Stechly L, Morelle W, Dessein AF, André S, Grard G, Trinel D, Dejonghe MJ, Leteurtre E, Drobecq H, Trugnan G, Gabius HJ, Huet G. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic.* 2009;10(4):438-50.
192. Straube T, von Mach T, Hönig E, Greb C, Schneider D, Jacob R. pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic.* 2013;14(9):1014-27.
193. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, André S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol.* 2005;169(3):491-501.
194. Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol.* 2006;16(4):408-14.
195. Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD, Stowell SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol Biol.* 2015;1207:1-35.
196. Gordon-Alonso M, Hirsch T, Wildmann C, van der Bruggen P. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. *Nat Commun.* 2017;8(1):793.
197. Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol.* 2016;34:243-64.
198. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):583-91.
199. Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(2):181-9.
200. Cooper DN, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol.* 1990;110(5):1681-91.

201. Landegren U, Al-Amin RA, Björkesten J. A myopic perspective on the future of protein diagnostics. *N Biotechnol.* 2018;45:14-18.
202. Gehlken C, Suthahar N, Meijers WC, de Boer RA. Galectin-3 in Heart Failure: An Update of the Last 3 Years. *Heart Fail Clin.* 2018;14(1):75-92.
203. Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, Howes MT, Benzing C, Arumugam S, Sales S, Ariotti N, Chambon V, Lamaze C, Loew D, Shevchenko A, Gaus K, Parton RG, Johannes L. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol.* 2014;16(6):595-606.
204. Li P, Liu S, Lu M, Bandyopadhyay G, Oh D, Imamura T, Johnson AMF, Sears D, Shen Z, Cui B, Kong L, Hou S, Liang X, Iovino S, Watkins SM, Ying W, Osborn O, Wollam J, Brenner M, Olefsky JM. Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell.* 2016 3;167(4):973-984.e12.
205. Blidner AG, Méndez-Huergo SP, Cagnoni AJ, Rabinovich GA. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3407-18.
206. Schneider D, Greb C, Koch A, Straube T, Elli A, Delacour D, Jacob R. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur J Cell Biol.* 2010;89(11):788-98.
207. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect.* 2007;20(7):455-60.
208. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995;147(4):1016-28.
209. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications during *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol.* 2004;172(1):493-502.
210. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasić R, Vuk-Pavlović S. Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Studied by Microarray Hybridization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275(3):731-8.
211. 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.

212. 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):1902-7.
213. 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(10):649-62
214. 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):17663-70.
215. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2007;170(2):546-56.
216. 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):1167-73.
217. Forsman H, Islander U, Andréasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlström A, Sävman K, Magnusson M, Brown KL, Karlsson A. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(2):445-54.
218. 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. *Clin Immunol.* 2009;130(1):83-8.
219. 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(11):5148-57.
220. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, Liu FT. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 2009;174(3):922-31.

221. 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(23):8302-11.
222. 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):555-64.
223. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T cell functions. *Immunol Rev* 2009;230:114–127.
224. Leffler H, Barondes SH. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J Biol Chem.* 1986;261(22):10119-26.
225. Chen WS, Cao Z, Leffler H, Nilsson UJ, Panjwani N. Galectin-3 Inhibition by a Small-Molecule Inhibitor Reduces Both Pathological Corneal Neovascularization and Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(1):9-20.
226. Delaine T, Collins P, MacKinnon A, Sharma G, Stegmayr J, Rajput VK, Mandal S, Cumpstey I, Larumbe A, Salameh BA, Kahl-Knutsson B, van Hattum H, van Scherpenzeel M, Pieters RJ, Sethi T, Schambye H, Oredsson S, Leffler H, Blanchard H, Nilsson UJ. Galectin-3-Binding Glycomimetics that Strongly Reduce Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Modulate Intracellular Glycan Recognition. *Chembiochem.* 2016;17(18):1759-70. .
227. Zetterberg FR, Peterson K, Johnsson RE, Brimert T, Håkansson M, Logan DT, Leffler H, Nilsson UJ. Monosaccharide Derivatives with Low-Nanomolar Lectin Affinity and High Selectivity Based on Combined Fluorine-Amide, Phenyl-Arginine, Sulfur- $\pi$ , and Halogen Bond Interactions. *ChemMedChem.* 2018;13(2):133-137.
228. Demotte N, Bigirimana R, Wieërs G, Stroobant V, Squifflet JL, Carrasco J, Thielemans K, Baurain JF, Van Der Smissen P, Courtoy PJ, van der Bruggen P. A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1823-33.
229. Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res.* 2009;344(14):1788-91.
230. Inohara H, Raz A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconj J.* 1994;11(6):527-32.



231. Stegmayr J, Lepur A, Kahl-Knutson B, Aguilar-Moncayo M, Klyosov AA, Field RA, Oredsson S, Nilsson UJ, Leffler H. Low or No Inhibitory Potency of the Canonical Galectin Carbohydrate-binding Site by Pectins and Galactomannans. *J Biol Chem*. 2016;291(25):13318-34.
232. Miller M1, Ippel 2, Suylen 2, Klyosov AA, Traber PG, Hackeng T, Mayo KH. Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. *Glycobiology*. 2016;26(1):88-99.
233. Miller MC, Klyosov A, Mayo KH. The alpha-galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. *Glycobiology*. 2009;19(9):1034-45.
234. Zhang T, Miller MC, Zheng Y, Zhang Z, Xue H, Zhao D, Su J, Mayo KH, Zhou Y, Tai G. Macromolecular assemblies of complex polysaccharides with galectin-3 and their synergistic effects on function. *Biochem J*. 2017;474(22):3849-3868.
235. Miller MC, Ribeiro JP, Roldós V, Martín-Santamaría S, Cañada FJ, Nesselova IA, André S, Pang M, Klyosov AA, Baum LG, Jiménez-Barbero J, Gabius HJ, Mayo KH. Structural aspects of binding of  $\alpha$ -linked digalactosides to human galectin-1. *Glycobiology*. 2011;21(12):1627-41.
236. Blanchard H, Yu X, Collins PM, Bum-Erdene K. Galectin-3 inhibitors: a patent review (2008-present). *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24(10):1053-65.
237. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38:1098-1111.
238. Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripan B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci*. 2009;100:2077-2084.
239. 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 U S A*. 2006;103:5060-5065.
240. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, Delucchi F, Serino M, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Galectin-3 ablation protects mice from

- diet-induced NASH: A major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol.* 2011;54(5):975-83.
241. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 enhances xenobiotic induced murine primary biliary cholangitis by facilitating apoptosis of BECs and release of autoantigens. *Sci Rep.* 2016;6:23348.
242. Tian J, Yang G, Chen HY, Hsu DK, Tomilov A, Olson KA, et al. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J.* 2016;30:4202–13.
243. 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(3):1073-83.
244. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2009;32(1):43-51.
245. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* (2012) 55:1954–64. doi: 10.1002/hep.25542. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al.
246. Davies JM, Sheil B, Shanahan F. Bacterial signalling overrides cytokine signalling and modifies dendritic cell differentiation. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e805-15.
247. Dixon GL, Newton PJ, Chain BM, Katz D, Andersen SR, Wong S, van der Ley P, Klein N, Callard RE. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect Immun.* 2001;69(7):4351-7.
248. 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):1932-44.
249. Donaldson JG. Immunofluorescence Staining. *Curr Protoc Cell Biol.* 2015;69:4.3.1-4.3.7.
250. Day PEL, Chambers KF, Winterbone MS, García-Blanco T, Vauzour D, Kroon PA. Validation of control genes and a standardised protocol for quantifying gene expression in the livers of C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):8081.

251. Арсенијевић А. (2017), Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева. Докторска дисертација, Крагујевац: Факултет медицинских наука.
252. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):751-8.
253. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(12):1012-1021.
254. Sáez de Guinoa J, Jimeno R, Gaya M, Kipling D, Garzón MJ, Dunn-Walters D, Ubeda C, Barral P. CD1d-mediated lipid presentation by CD11c+ cells regulates intestinal homeostasis. *EMBO J.* 2018;37(5).
255. Ferlazzo G, Morandi B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2014;5:159.
256. Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI, Friedman SL. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PLoS One.* 2013;8(10):e75361.
257. Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS One.* 2013;8(12):e83481.
258. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, et al. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in mesenchymal stem cells enhances their capacity to promote alternative activation of macrophages in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2640746.
259. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, et al. Galectin-3 Plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 $\beta$  in macrophages. *J Crohns Colitis.* 2016;10:593–606.
260. Schrupf E, Kummen M, Valestrand L, Greiner TU, Holm K, Arulampalam V, et al. The gut microbiota contributes to a mouse model of spontaneous bile duct inflammation. *J Hepatol.* 2017;66:382–9.

261. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology*. (2003) 38:1250–7. . Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, et al.
262. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 2005;435:598–604.
263. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005;434:520–5.
264. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology*. 2002;123:1031–43.
265. Harada K, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Accumulating CD57 + CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 2003;23:94–100.
266. Tsuneyama K, Yasoshima M, Harada K, Hiramatsu K, Gershwin ME, Nakanuma Y. Increased CD1d expression on small bile duct epithelium and epithelioid granuloma in livers in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1998;28:620–3.
267. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214:199–210.
268. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997;7:727–38.
269. Zhang BB, Yan C, Fang F, Du Y, Ma R, Li XY, et al. Increased hepatic Th2 and Treg subsets are associated with biliary fibrosis in different strains of mice caused by *Clonorchis sinensis*. *PLoS ONE*. 2017;12:e0171005.
270. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351(2):336-43.
271. Martinez-Martinez E, Ibarrola J, Calvier L, Fernandez-Celis A, Leroy C, Cachofeiro V, Rossignol P, Lopez-Andres N. Galectin-3 Blockade Reduces Renal Fibrosis in Two Normotensive Experimental Models of Renal Damage. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166272.
272. Nguyen MN, Ziemann M, Kiriazis H, Su Y, Thomas Z, Lu Q, Donner DG, Zhao WB, Rafahi H, Sadoshima J, McMullen JR, El-Osta A, Du XJ. Galectin-3 deficiency ameliorates fibrosis and remodeling in dilated cardiomyopathy mice with enhanced Mst1 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;316(1):H45-H60.

273. Vergaro G, Prud'homme M, Fazal L, Merval R, Passino C, Emdin M, Samuel JL, Cohen Solal A, Delcayre C. Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol-Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice. *Hypertension*. 2016;67(3):606-12.
274. de Oliveira FL, Carneiro K, Brito JM, Cabanel M, Pereira JX, Paiva LA, Syn W, Henderson NC, El-Cheikh MC. Galectin-3, histone deacetylases, and Hedgehog signaling: Possible convergent targets in schistosomiasis-induced liver fibrosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005137.
275. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mol Med*. 2015;21:453-65.
276. Shi T, Zhang T, Zhang L, Yang Y, Zhang H, Zhang F. The distribution and the fibrotic role of elevated inflammatory Th17 cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Medicine*. 2015;94:e1888.
277. Qian C, Jiang T, Zhang W, Ren C, Wang Q, Qin Q, et al. Increased IL-23 and IL-17 expression by peripheral blood cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Cytokine*. 2013;64:172–80.
278. Yang CY, Ma X, Tsuneyama K, Huang S, Takahashi T, Chalasani NP, et al. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy. *Hepatology*. 2014;59:1944–53.
279. Chen SS, Sun LW, Brickner H, Sun PQ. Downregulating galectin-3 inhibits proinflammatory cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells via RNA interference. *Cell Immunol*. 2015;294:44–53.
280. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, Jung KA, Kim EK, Kim DS, Lee JH, Kwok SK, Min JK, Park SH, Cho ML. IL-1-IL-17 Signaling Axis Contributes to Fibrosis and Inflammation in Two Different Murine Models of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:1611.
281. Tedesco D, Thapa M, Chin CY, Ge Y, Gong M, Li J, Gumber S, Speck P, Elrod EJ, Burd EM, Kitchens WH, Magliocca JF, Adams AB, Weiss DS, Mohamadzadeh M, Grakoui A. Alterations in Intestinal Microbiota Lead to Production of Interleukin 17 by Intrahepatic  $\gamma\delta$  T-Cell Receptor-Positive Cells and Pathogenesis of Cholestatic Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018;154(8):2178-2193.

282. Zepeda-Morales AS, Del Toro-Arreola S, García-Benavides L, Bastidas-Ramírez BE, Fafutis-Morris M, Pereira-Suárez AL, Bueno-Topete MR. Liver fibrosis in bile duct-ligated rats correlates with increased hepatic IL-17 and TGF- $\beta$ 2 expression. *Ann Hepatol.* 2016;15(3):418-26.
283. Mills KH, Dungan LS, Jones SA, Harris J. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *J Leukoc Biol.* 2013;93(4):489-97.
284. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol.* 2015;45(2):531-43..
285. Collins PM, Bum-Erdene K, Yu X, Blanchard H. Galectin-3 interactions with glycosphingolipids. *J Mol Biol.* 2014;426:1439–51.
286. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology.* 2014;59:898–910.
287. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12:387–400.
288. Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3:31–8.
289. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol.* 2008;181:2781–9.

## 8. БИОГРАФИЈА

Др Александар Арсенијевић је рођен 30.11.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршио у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу уписао 2005/2006. и успешно завршио 2012. године са просечном оценом 9,65. Активно се бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. У мају 2013. године учествовао је у мултидисциплинарној школи „5<sup>th</sup> Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

## 9. БИБЛИОГРАФИЈА

### 9.1. Научни радови објављени у целини у часописима категорије М20:

1. Zdravkovic ND, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Arsenijevic AN, Zdravkovic ND, Mitrovic SLj, Arsenijevic NN. Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma. [Int J Med Sci 2014;11\(9\):936-47. M22; IF=2,003 \(2014\)](#)
2. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. [Sci Rep 2016;6:23348. M21; IF=4,847 \(2016\)](#)
3. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(ii) terpyridine complexes. [Dalton Trans 2016;45\(11\):4633-46. M21; IF=4,029 \(2016\)](#)
4. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus



- Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. [Front Immunol 2017;8:192. M21; IF=6,059 \(2017\)](#)
5. Milosavljevic N, Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between IL-17 producing and regulatory NKT cells. [Liver Transpl 2017;23\(8\):1040-1050 M21a; IF=4,005 \(2017\)](#)
  6. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic A, Erceg S, Moreno-Manzano V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Stem Cells and Labeling for Spinal Cord Injury. [Int J Mol Sci 2016;18\(1\). M22; IF=3,482 \(2016\)](#)
  7. Nikolic MV, Mijajlovic MZ, Jevtic VV, Ratkovic ZR, Novakovic SB, Bogdanovic GA, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Trifunovic SR, Radic GP. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. [Journal of Molecular Structure 2016;1116:264-271. M23; IF=1,753 \(2016\)](#)
  8. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd(1,2-dpheddp)] complex. [Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering 2016; 35\(1\):79 – 86. M23; IF=0,612 \(2016\)](#)
  9. Gazdic M, Arsenijevic A, Markovic BS, Volarevic A, Dimova I, Djonov V, Arsenijevic N, Stojkovic M, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases. [Int J Biol Sci 2017;13\(9\):1109-1117. M21; IF=4,950 \(2017\)](#)
  10. Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Jeremic J, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in iNOS-Dependent Manner. [Stem Cells Int 2017;2017:1315378. M22; IF=3,989 \(2017\)](#)
  11. Potočňák I, Drweesh SAi, Farkasová V, Lüköová A, Sabolová D, Radojević ID, Arsenijevic A, Djordjevic D, Volarevic V. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part IX: Synthesis, structures, spectra, in vitro antimicrobial and anti-tumor activities and DNA binding of Pd(II) complexes with 7-bromo-quinolin-8-ol. [Polyhedron 2017; 135:195-205. M22; IF= 2,067 \(2017\)](#)

12. Arsenijevic A, Harrell CR, Fellabaum C, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Agents for the Treatment of Primary Biliary Cholangitis. [\*Anal Cell Pathol \(Amst\)\* 2017;2017:7492836. M23; IF= 1,574 \(2017\)](#)
13. Zdravkovic N, Pavlovic M, Radosavljevic G, Jovanovic M, Arsenijevic A, Zdravkovic N, Maric V, Loncarevic S, Srzentic Z, Jovanovic I. Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma. [\*JBUON\* 2017; 22\(5\): 1-8 M23; IF=1,766 \(2017\)](#)
14. Acovic A, Simovic Markovic B, Gazdic M, Arsenijevic A, Jovicic N, Gajovic N, Jovanovic M, Zdravkovic N, Kanjevac T, Harrell CR, Fellabaum C, Dolicanin Z, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expansion of T-regulatory cells maintains mucosal healing in ulcerative colitis. [\*Therap Adv Gastroenterol\* 2018;11:1756284818793558. M21; IF= 4,234 \(2018\)](#)
15. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, Poljarevic J, Sabo T, Vojvodic D, Radosavljevic GD, Arsenijevic N. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. [\*Oncotarget\* 2018;9\(46\):28195-28212.](#)
16. Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Jovicic N, Acovic A, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Crosstalk between mesenchymal stem cells and T regulatory cells is crucially important for the attenuation of acute liver injury. [\*Liver Transpl\* 2018;24\(5\):687-702. M21a; IF=4,254 \(2018\)](#)
17. Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Jovicic N, Jetic I, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells - an experimental study. [\*Transpl Int\* 2018;31\(1\):102-115. M21; IF= 3,526 \(2018\)](#)
18. Jakovljevic J, Harrell CR, Fellabaum C, Arsenijevic A, Jovicic N, Volarevic V. Modulation of autophagy as new approach in mesenchymal stem cell-based therapy. [\*Biomed Pharmacother\* 2018;104:404-410 M21; IF= 3,743 \(2018\)](#)
19. Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C, Arsenijevic A, Djonov V, Volarevic V. Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes. [\*J Biomed Sci\* 2018;25\(1\):21. M21; IF=5,203 \(2018\)](#)

20. Konovalov B, Živković MD, Milovanović JZ, Djordjević DB, Arsenijević AN, Vasić IR, Janjić GV, Franich A, Manojlović D, Skrivanj S, Milovanović MZ, Djuran MI, Rajković S Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(ii) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(ii) complexes in relation to the complex structure. *Dalton Trans* 2018;47(42):15091-15102. [M21; IF=4,052 \(2018\)](#)
21. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, Jurisevic M, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A, Jovanovic I. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators Inflamm* 2018;2018:8031328. [M21; IF=4,184 \(2018\)](#)
22. Harrell CR, Simovic Markovic B, Fellabaum C, Arsenijevic A, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Treatment of Eye Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1089:47-57. [M22; IF= 2,148 \(2018\)](#)
23. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- $\alpha$ -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol* 2019;10:185. [M21; IF= 4,840 \(2018\)](#)
24. Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother* 2019;109:2318-2326. [M21; IF= 3,743 \(2018\)](#)
25. Jurišević M, Jagić N, Gajović N, Arsenijević A, Jovanović M, Milovanović M, Pantić J, Jovanović I, Tibor S, Radosavljević GD, Arsenijević N. O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride enhances influx of effective NK and NKT cells in murine breast cancer. *Vojnosanit Pregl* 2019 doi. 10.2298/VSP180723149J [M23; IF= 0,418 \(2018\)](#)
26. Harrell CR, Jankovic MG, Fellabaum C, Volarevic A, Djonov V, Arsenijevic A, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Anti-inflammatory and Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Factors. *Adv Exp Med Biol* 2019;1084:187-206. [M22; IF= 2,148 \(2018\)](#)
27. Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Milovanovic M. Gal-3 Deficiency Suppresses

Novosphynobium aromaticivorans Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. [Front Immunol 2019 7;10:1309. M21; IF= 5,789 \(2018\)](#)

28. Franich AA, Živković MD, Ćočić D, Petrović B, Milovanović M, Arsenijević A, Milovanović J, Arsenijević D, Stojanović B, Djuran MI, Rajković S. New dinuclear palladium(II) complexes with benzodiazines as bridging ligands: interactions with CT-DNA and BSA, and cytotoxic activity. [J Biol Inorg Chem 2019;24\(7\):1009-1022 M21; IF=2,876 \(2018\)](#)

## **9.2. Научни радови објављени у целини у часописима категорије M50:**

1. Arsenijević A, Milovanovic J, Stojanovic B, Milovanovic M, Gershwin EM, Leung P, Arsenijević N, Lukic M L. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. [Ser J Exp Clin Res 2014; 15 \(3\): 145-150. M52](#)
2. Milovanovic J, Arsenijević A, Stojanovic B, Milovanovic M, Popovic B, Jonjic S, Arsenijević N, Lukic ML. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. [Ser J Exp Clin Res 2014; 15 \(4\): 183-190. M52](#)
3. Besser Silconi Ž, Benazic S, Milovanovic J, Arsenijević A, Stojanovic B, Milovanovic M, Kanjevac T. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. [Ser J Exp Clin Res 2015; 16 \(3\): 181-186. M51](#)
4. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijević A, Milovanovic M, Lukic M L. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. [Ser J Exp Clin Res 2016; 17 \(2\): 4-9. M51](#)
5. Benazic S, Besser Silconi Z, Milovanovic J, Arsenijević A, Stojanovic B, Milovanovic M, Kanjevac T. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. [Ser J Exp Clin Res 2016; 17 \(1\): 55-60. M51](#)

6. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. [\*Ser J Exp Clin Res\* 2016; 17\(4\): 285-295.](#) [M51](#)
7. Tomović DLj, Bukonjić AM, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Arsenijević AN, Milovanović JZ, Stojanović B, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. [\*Ser J Exp Clin Res\* 2017; 18 \(1\): 13-18.](#) [M51](#)
8. Simovic Markovic B, Milosavljevic N, Arsenijevic A, Gazdic M, Lukic ML, Volarevic V. Bacterial flora play important roles in acute dextran sulphate sodium-induced colitis but are not involved in Gal-3 dependent modulation of colon inflammation. [\*Ser J Exp Clin Res\* 2017; 18 \(3\): 213-220](#) [M51](#)
9. Harrell C.R, Fellabaum C, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Volarevic V. Therapeutic potential of “exosomes derived multiple allogeneic proteins paracrine signaling: exosomes D-MAPPS” is based on the effects of exosomes, immunosuppressive and trophic factors. [\*Ser J Exp Clin Res\* 2019; 20\(3\): 189-97](#) [M51](#)

**ПРИЛОГ**  
**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:** Александар Арсенијевић  
**АУ**

**Ментор/коментор:** проф. др Марија Миловановић  
**МН**

**Наслов рада:** Примарни билијарни холангитис  
**НР** мишева изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*: улога галектина-3 у активацији инфламазома

**Језик публикације:** српски (ћирилица)  
**ЈП**

**Језик извода:** српски/енглески  
**ЈИ**

**Земља публиковања:** Србија  
**ЗП**

**Уже географско подручје:** Србија  
**УГП**

**Година:** 2020.  
**ГО**

**Издавач:** Ауторски репринт  
**ИЗ**

**Место и адреса:** Крагујевац 34000, Светозара  
**МС** Марковића 69

**Физичи опис рада:** Дисертација има 133 стране, 18  
**ФО** графикана, 8 слика, 1 табелу, 289 референци

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина:** Имунологија

ДИ

Предметна одредница/ кључне речи  
ПО

РВС, галектин-3, *Novosphingobium aromaticivorans*, инфламазом, галектин-3 инхибитор

УДК

Чува се:  
ЧУ

Библиотеци Факултета  
медицинских наука у Крагујевцу

Важна напомена:  
МН

Извод:  
ИД

Значајно слабије изражен примарни билијарни холангитис изазван инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, са мањим оштећењем билијарних каналића и врло слабо израженом фиброзом, детектован је у групама *Lgals3*<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01. У јетрама *wild type* мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* детектована је већа заступљеност инфламацијских макрофага, NK, NKT и Т ћелија у инфилтратима. У инфилтратима јетре *Lgals3*<sup>-/-</sup> и мишева третираних инхибитором галектина-3, GM-CT-01, је након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, у инфилтратима јетре забележена мања експресија инфламазома NLRP3 и мања продукција IL-1 $\beta$  у поређењу са групом *wild type* мишева. *In vitro* стимулација *wild type* перитонеалних макрофага бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* за последицу има већу експресију NLRP3, активност каспазе-1 и продукцију IL-1 $\beta$  у поређењу са стимулираним перитонеалним макрофагима *Lgals3*<sup>-/-</sup> мишева. GM-CT-01 такође редукује активацију DC и експресију цитокина IL-4, IL-1 $\beta$  и p40, заједничке субјединице IL-12 и IL-23 у DC *in vitro* стимулираним бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

Наши резултати указују на значај галектина-3 у стимулацији инфламације у РВС изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, а који се огледа у активацији DC и инфламазома NLRP3 и последичној продукцији IL-1 $\beta$ , и указују да галектин-3 може да буде мета деловања потенцијалних нових лекова. Галектин-3 је вероватно укључен у инфламацијски одговор на коменсалне бактерије црева што може да буде инцијални окидач за развој примарног билијарног холангитиса.



**Датум прихватања теме од стране ННВ:**

12.12.2019.

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

1. **Проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник
2. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, члан
3. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

## 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

Aleksandar Arsenijević

**Menthor/co-mentor**

MN

Prof. Marija Milovanović

**Title:**

TI

Primary biliary cholangitis induced by  
*Novosphingobium aromaticivorans* infection of  
mice: the role of galectin-3 in inflammasome

activation

**Language of text:** Serbian (Cyrilic)  
**LT**

**Language of abstract:** Serbian/English  
**Country of publication:** Serbia  
**CP**

**Locality of publication:** Serbia  
**LP**

**Publication year:** 2020.  
**PY**

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** Kragujevac 34000, Svetozara Markovića 69  
**PP**

**Physical description** Thesis has 133 pages, 18 charts, 8 pictures, 1 table, 289 references  
**PD**

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Immunology  
**SD**

**Subject/key words:** PBC, galectin-3, *Novosphingobium aromaticivorans*, inflammasome, galectin-3 inhibitor  
**SKW**

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences,  
Kragujevac

**Note:**  
**N**

**Abstract:****AB**

Marked attenuation of primary biliary cholangitis (PBC), manifested by the absence of bile duct damage and fibrosis, is detected in *Lgals3*<sup>-/-</sup> and Galectin-3 inhibitor, GM-CT-01, treated mice. Liver infiltrates of *Novosphingobium aromaticivorans* infected wild type mice had higher incidence of pro-inflammatory macrophages, NK, NKT, and T cells. *Lgals3* deletion and treatment with Galectin-3 inhibitor, GM-CT-01, reduced liver damage and fibrosis, inflammatory mononuclear cell infiltrate, expression of NLRP3 inflammasome in the liver infiltrates and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production in the livers of *Novosphingobium aromaticivorans* infected mice. *In vitro* stimulation of wild type peritoneal macrophages with *Novosphingobium aromaticivorans* caused increased NLRP3 expression, caspase-1 activity and IL-1 $\beta$  production, compared with *Lgals3*<sup>-/-</sup> cells. GM-CT-01 reduced activation of dendritic cells and expression of IL-4, IL-1 $\beta$ , and p40, common subunit of IL-12 and IL-23 in dendritic cells *in vitro* stimulated with *Novosphingobium aromaticivorans*. Our data highlight the importance of Galectin-3 in promotion of inflammation in *Novosphingobium aromaticivorans* induced PBC by enhancing the activation of dendritic cells and NLRP3 inflammasome leading to enhanced production of IL-1 $\beta$ , and indicate Galectin-3 as possible therapeutic target in autoimmune cholangitis. Galectin-3 appears involved in inflammatory response to gut commensals leading to PBC

**Accepted by the Scientific Board on:**

12.12.2019.

**ASB****Defended on:****DE****Thesis defended board****(Degree/name/surname/title/faculty)****DB**

1. **Prof. dr Gordana Radosavljević**, Associate Professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president
2. **Prof. dr Ivan Jovanović**, Associate Professor of Microbiology and Immunology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member
3. **Prof. dr Danilo Vojvodić**, Full Professor of Immunology, Medical Faculty, University of Military Academy Belgrade, member

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Александар Арсенијевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

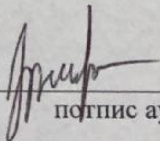
Примарни епифарти коронарски синдром изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* у поља галектина-3 у активацију интеракциону

која је одбрањена на Филозофском факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 27.02.2020 године,

  
\_\_\_\_\_ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александар Арсенијевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Примарни биморфни холангитис мишова изазван бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* из рода *Galaxiella* и активацију инфламација

која је одбрањена на Факултету медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

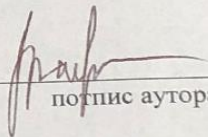
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

у Београду, 17.02.2010 године,

  
\_\_\_\_\_ потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>

## Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације

1. **Arsenijevic A**, Milovanovic J, Stojanovic B, Djordjevic D, Stanojevic I, Jankovic N, Vojvodic D, Arsenijevic N, Lukic ML, Milovanovic M. Gal-3 Deficiency Suppresses *Novosphingobium aromaticivorans* Inflammasome Activation and IL-17 Driven Autoimmune Cholangitis in Mice. *Front Immunol.* 2019;10:1309. M21; IF= 5,789
2. **Arsenijevic A**, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep* 2016; 6:23348. M21; IF=5,228 (2015)
3. **Arsenijevic A**, Harrell CR, Fellabaum C, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells as New Therapeutic Agents for the Treatment of Primary Biliary Cholangitis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2017;2017:7492836. M23; IF= 1,574 (2017)
4. **Arsenijevic A**, Milovanovic J, Stojanovic B, Milovanovic M, Gershwin EM, Leung P, Arsenijevic N, Lukic ML. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15(3):145-150. M52