



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бојан С. Стојановић

**Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног
панкреатитиса**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Миодраг Ј. Лукић, професор емеритус

Крагујевац, 2019. године

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Бојан С. Стојановић	
Датум и место рођења: 01.01.1986. Призрен	
Садашње запослење: КЦ- Крагујевац, Клиника за општу и грудну хирургију, специјалиста опште хирургије	
Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, истраживач сарадник за ужу научну област Хирургија, Крагујевац, Република Србија.	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса	
Број страница: 157	
Број слика: 7	
Број библиографских података: 372	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу	
Научна област (УДК): медицина	
Ментор: проф др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 13.05.2016.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-834/22 од 13.09.2016.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан3. Доц. др Иван Јовановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан4. Проф. др Драган Чановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан5. Проф. др Јасна Јевђић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан3. Доц. др Александар Цветковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан	
Датум одбране дисертације:	

САЖЕТАК

Увод: Акутни панкреатитис се карактерише аутодигестијом панкреасних ћелија што је потом праћено акутном инфламацијом која доприноси развоју патолошких промена и смртном исходу. У експерименталним условима је показано да галектин 3 експримирају ацинусне ћелије и инфилтришући макрофаги, али је непозната улога овог лектина у развоју акутног панкреатитиса.

Материјал и методе: Акутни панкреатитис је узрокован подвезивањем билио-панкреатиног дуктуса или секвенцијалном и интраперитонеалном применом церулеина и липополисахарида код мишева дивљег соја и мишева са делецијом гена за галектин 3.

Резултати: Делеција галектина 3 је побољшала преживљавање мишева услед смањења тежине инфламације панкреаса што је праћено редукованим леукоцитним инфилтратом, нижим вредностима амилаза у серуму и активношћу трипсина у панкреасу, смањеном инфилтрацијом макрофага и неутрофила који експримирају TLR-4, а посебно про-инфламацијских неутрофила. Галектин 3 и TLR-4 су колокализовани на површини леукоцита у инфилтрату. Примена инхибитора TLR-4, CLI-095, побољшала је преживљавање оболелих мишева. Недостатак галектина 3 је праћен мањом продукцијом TNF- α и IL-1 β из макрофага и дендритских ћелија. Делеција гена за галектин 3 је праћена и мањом продукцијом IFN- γ из Т лимфоцита, NK и NKT ћелија, мања је активација IL-23/IL-17 осовине и повећана је инфилтрација регулаторних Т лимфоцита који продукују IL-10 у панкреасу изолованог из оболелих мишева.

Закључак: Делеција галектина 3 смањује тежину акутног панкреатитиса у два експериментална модела болести утицајем на инфлукс неутрофила и мононуклеарних ћелија урођене и стечене имуности. Ове ињенице указују да примена инхибитора галектина 3 може имати повољан ефекат на прогресију акутног панкреатитиса.

Кљуне речи: Галектин 3, акутни панкреатитис, имунски одговор, TLR-4

ABSTRACT

Introduction: Acute pancreatitis is characterized by autodigestion of pancreatic cells followed by acute inflammation leading to pathology and death. In experimental acute pancreatitis, pancreatic acinar cells and infiltrating macrophages express Galectin-3 but its role in pathology is unknown.

Material and methods: Acute pancreatitis was induced by ligation of bile-pancreatic duct or sequential peritoneal administration of cerulein and lipopolysaccharide to wild-type and Galectin-3 deficient C57BL/6 mice. We determined survival of mice, serum concentrations of amylase, pancreatic pathology, and phenotypic and molecular features of inflammatory cells. Therefore, we studied its role using Galectin-3 deficient mice.

Results: Deletion of Galectin-3 prolonged survival of mice contributed to attenuation of histopathology, reduced leukocytes infiltration, lowered serum amylase concentration and pancreatic trypsin activity, and decreased infiltration of macrophages and neutrophils that express TLR-4, in particular, pro-inflammatory N1 neutrophils. Galectin-3 and TLR-4 are also colocalized on infiltrating cells. Additionally, administration of CLI-095, the specific inhibitor of TLR-4, prolonged survival of diseased animals. Furthermore, lack of Galectin-3 reduced expression of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in F4/80⁺CD11c⁻ macrophages and CD11c⁺F4/80⁻ dendritic cells. Gal-3 deficiency decreased the total number of IFN- γ -producing CD3⁺CD49⁻ T cells, CD3⁻CD49⁺ NK cells, and CD3⁺CD49⁺ NKT cells; downregulated activation of IL-23/IL-17 axis and increased accumulation of IL-10-producing Foxp3⁺ T regulatory cells in pancreata of diseased animals.

Conclusion: Deletion of Galectin-3 ameliorates acute pancreatitis in the two experimental models by attenuating early influx of neutrophils and inflammatory mononuclear cells of innate and acquired immunity. These findings provide the basis to consider Galectin-3 as a therapeutic target in acute pancreatitis.

Keywords: Galectin-3, acute pancreatitis, immune response, TLR-4

Првенствено бих желео да се захвалим ментору Проф др Миодрагу Лукићу, на бројним корисним саветима, за извредни труд и посвећеност коју је уложио током израде ове докторске дисертације. Захваљујући Проф др Миодрагу Лукићу мој циљ је постао реалност, а рад на докторској дисертацији је представљао право задовољство.

Посебно се захваљујем Проф др Небојши Арсенијевићу на конструктивним разговорима и стручним саветима у изради ове докторске дисертације.

Желео бих да се захвалим свим колегама и целокупном тиму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на сарадњи, реализацији експеримената и корисним саветима.

На крају, посебну захвалност дугујем својој породици која је одувек моја највећа снага и покретач. Највећу захвалност на стрпљењу и разумевању, дугујем својој супрузи која је веровала у мене чак и онда када ја нисам.

Ову докторску дисертацију посвећујем мојој Калини и Леони.

САДРЖАЈ

1.	Увод	1
1.1.	Историјат	1
1.2.	Анатомија и физиологија панкреаса	3
1.2.1.	Морфологија и функција ацинусних ћелија	4
1.2.2.	Секреција ензима панкреаса	5
1.3.	АКУТНИ панкреатитис: дефиниција и епидемиологија	6
1.4.	КЛИНИЧКА СЛИКА	8
1.5.	ЕТИОЛОГИЈА АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА	8
1.5.1.	Билијарни акутни панкреатитис	9
1.5.2.	Алкохолни акутни панкреатитис	10
1.5.3.	Јатрогени узроци акутног панкреатитиса	11
1.5.4.	Хередитарни акутни панкреатитис	12
1.5.5.	Тумори	12
1.5.6.	Метаболички узроци	13
1.5.7.	Лекови	13
1.1.1.	Инфекције	14
1.1.1.	Траума	14
1.1.2.	Остали етиолошки фактори	15
1.2.	Патофизиологија акутног панкреатитиса	15
1.2.1.	Аутодигестија панкреаса	15
1.2.2.	Активација ћелија имунског система (слика 2)	19
1.2.3.	TLR-4 и акутни панкреатитис	25
1.2.4.	Поремећај пермеабилности интестиналне баријере	27
1.3.	Структура и класификација галектинских молекула	28
1.3.1.	Експресија и функција галектина	30
1.3.2.	Структура галектина 3	31
1.3.3.	Улога галектина 3 у контроли биолошких процеса	34
1.3.4.	Регулација апоптозе	35
1.3.5.	Утицај галектина 3 на функције ћелија имунског система	36
1.3.6.	Експресија галектина 3 у панкреасу	40
2.	ЦИЉ РАДА	41
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	42
3.1.	Лабораторијске животиње	42

3.1.1.	Поступак добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин 3.....	42
3.2.	Индукција тешке форме акутног панкреатитиса подвезивањем билио-панкреатичног Дуктуса.....	44
3.3.	Индикција акутног панкреатитиса супрамаксималним дозама церулеина и липополисахарида	45
3.4.	Хистолошка анализа ткива панкреаса, плућа и бубрега.....	46
3.4.1.	Бојење хематоксилином и еозином	46
3.4.2.	Процена хистолошког скорa оштећења панкреаса	47
3.4.3.	Процена хистолошког оштећења плућа	47
3.4.4.	Процена хистолошког оштећења бубрега.....	49
3.5.	Колориметријски тест за одређивање активности амилазе у серуму.....	49
3.6.	Колориметријски тест за одређивање активности трипсина у паренхиму панкреаса.....	50
3.7.	Проточна цитометрија.....	51
3.7.1.	Изолација моноклераних ћелија из ткива панкреаса	52
3.7.2.	Обележавање ћелијских мембранских маркера	52
3.7.3.	Интрацелуларно бојење цитокина	54
3.7.4.	Стимулација ћелија	54
3.7.5.	Бојење површинских антигена.....	55
3.7.6.	Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране	55
3.7.7.	Бојење интрацелуларних цитокина	55
3.8.	ИМУНОХИСТОХЕМИЈА	56
3.9.	ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЈА.....	57
3.10.	Апликација CLI-095.....	58
3.11.	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	58
4.	Резултати.....	59
4.1.	Експресија галектина 3 у ткиву панкреаса.....	59
4.2.	Делеција гена за Галектин 3 побољшава преживљавање мишева са акутним панкреатитисом	59
4.3.	Галектин 3 делеција смањује оштећење панкреасног и плућног паренхима	61
4.4.	Дефицит Галектина 3 смањује инфлукс инфламацијских ћелија у панкреас у раној фази АП.....	68
4.5.	Галектин 3 делеција смањује инфилтрацију ћелија урођене имуности које експримирају TLR-4	73
4.6.	Галектин 3 се Везује за TLR-4 и инхибиција TLR-4 побољшава преживљавање мишева са акутним панкреатитисом	77
4.7.	Делеција Галектина 3 значајно атенуира инфлукс N1 неутрофила у паренхим панкреаса.....	80

4.8.	Број макрофага и дендритских ћелија са про-инфламацијским фенотипом је био мању у панкреасу из оболелих Gal-3 ^{-/-} мишева.....	82
	продуковале IL-10 и IL-23 између WT и Gal-3 ^{-/-} мишева са АП не досеже ниво статистичке значајне разлике.	87
4.9.	Аблација гена за галектин 3 повећава заступљеност толерогених дендритских ћелија.....	88
4.10.	Галектин 3 поспешује инфилтрацију NK и NKT ћелија са про-инфламацијским фенотипом у панкреасу мишева након Индукције акутног панкреатитиса.....	89
4.11.	Дефицит Галектина 3 утиче на активацију IL-23/IL-17 осовине у инфламираном панкреасу мишева са тешком формом акутног панкреатитиса.....	92
4.12.	Аблација гена за Галектин 3 смањује број Т лимфоцита који продукују IFN и повећава број ОВИХ ЋЕЛИЈА са имуносупресивним фенотипом.....	97
5.	Дискусија.....	104
5.1.	УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 НА РАЗВОЈ АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА У ДВА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МИШЈА МОДЕЛА БОЛЕСТИ.....	105
5.2.	Утицај галектина 3 на развој про-инфламацијског фенотипа и експресију TLR-4 на ћелијама урођене имуности у ткиву панкреаса.....	111
5.3.	Утицај делеције гена за ГАЛЕКТИН 3 на инфилтрацију регулаторних Т лимфоцита и активацију IL-23/IL-17 осовине у инфламираном панкреасу.....	116
6.	ЗАКЉУЧАК.....	120
7.	Литература:.....	124

1. УВОД

1.1. ИСТОРИЈАТ

Гуштерача је током историје била изузетно проучавана и изложена великој знатижељи анатома. Први описи морфологије и функције панкреаса датирају још из античког доба. *Herophilus* из Калцедона, грчки анатом и хирург, је први описао панкреас и то 300. године п.н.е. (1). Потом, у Талмуду, у временском периоду од 200 г.п.н.е до 200 г.н.е, гуштерачу описују као „прст јетре“ (2). Четири стотина година касније, *Rufus* пореклом из Ефеса, такође грчки анатом и хирург, даје овој жлезди име панкреас од грчких речи *pan*-све и *kreas*-месо, обзиром да овај орган не садржи ни хрскавицу, ни кост (1). *Claudius Galenus*, грчки лекар, хирург и филозоф који је живео и радио у Римском царству, је први описао анатомију и структуру панкреаса на основу дисекција рађених на мајмунима и претпоставио да панкреас игра улогу у заштити великих крвних судова који су смештени иза овог органа. *Jacopo Berengario da Carpi* (1460-1530. године) је италијански лекар који је 1535. године написао књигу „*Anatomia Carpi*“, где је описао жучни канал и панкреас као секреторне структуре. *Andreas Vesalius* (1514-1564. године) је чувени фламански анатом и лекар који је 1543. године приказао прве илустрације панкреаса у петој књизи свог дела „*De Humani Corporis Fabrica*“ (1).

Детаљнија проучавања панкреаса почела су у XVII веку. *Johann Georg Wirsung* (1589-1643. године), немачки лекар у Падови је 1642. године приликом сецирања леша открио вод (канал) у панкреасу, који је по њему касније и добио назив *Wirsung*-ов канал (1, 3). Ни сам *Wirsung* није знао праву функцију овог канала и мислио да припада великом крвном суду панкреаса, али се често питао зашто не садржи крв. *Giovanni Battista Morgagni*, отац модерне патолошке анатомије, дао је 1761. године први опис псеудоцисте панкреаса (4).

Што се функције панкреаса тиче, треба поменути *Sylvius*-а и *de Graaf*-а који су открили улогу панкреаса у дигестији хране (5). *Von Haller* је у XVIII веку приметио да се панкреасни сок излучује на истом месту или у близини места изливања жучи, те претпоставља да је улога панкреасног сока заправо да разблажи жуч. *Giovanni Domenico Santorini* (1681-1737. године) је урадио више стотина дисекција дуодено-панкреатичне регије и описао постојање помоћног панкреасног изводног канала, који је по њему добио и назив *Santorini*-јев канал. У XIX веку откривени су и панкреасни ензими: амилаза, липаза и трипсин; као и њихова улога у разградњи масти, протеина и

угљених хидрата. За ово откриће заслужни су бројни научници међу којима су најзначајнији *Johann Nepomuk Eberle* из Баварске и *Claude Bernard* из Париза (6). У свом раду из 1869. године, *Paul Langerhans* је радећи у бечком Институту за патологију, први описао острвца панкреаса који су касније по њему названа *Langerhans*-ова острвца и представљају компоненте ендокриног дела панкреаса. Поменути научник је дао и први добар опис хистологије панкреаса (7).

У античко време, под термином цироза панкреаса описана је већина инфламацијских обољења овог органа. Акутни панкреатитис је био тежак здравствени проблем још у старом веку о чему сведочи и податак да се смрт Александра Великог (356–323. п.н.е.) повезује са акутним некротизујућим панкреатитисом услед обилног уноса хране и велике количине алкохола. Најранији прикази болесника умрлих од инфламације или тумора панкреаса потичу од *S. Albertija* из 1578. године, *J.Schenka* из 1600. године и *N. Tulpe* из 1641. године (8). Први детаљнији опис акутног панкреатитиса дао је патолог *Reginald Huber Fitz* који је 1889. године детаљно описао клиничке карактеристике 53 болесника оболелих од акутног панкреатитиса. Он је веровао да је болест компликација гастродуоденитиса насталог упалом билијарног стабла, разликујући притом крварење у панкреас, гнојне и гангренозне форме болести. Сматрао је да је рана хируршка интервенција у оболелих од акутног панкреатитиса изразито опасна (9).

Пре више од 100 година, *Chiari* (1896.године) је предложио да интрапанкреатична активација протеолитичких ензима узрокује аутодигестију панкреаса и представља кључни догађај у патогенези ове болести. Године 1901. *Opie* даје своју теорију заједничког канала чиме указује на повезаност билијарних калкулуса и акутног панкреатитиса (10). У овој теорији је описано да је за настанак акутног панкреатитиса неопходан рефлукс жучи у панкреасни канал кроз заједнички канал услед опструкције калкулусом у завршни део овог канала, тј. у пределу *Vater*-ове папиле (11). Ова хипотеза била је прихваћана готово читав век, све док је *Lerch* и сарадници нису касније одбацили као неосновану (12).

Године 1908. *Julius Wolgemuth* је први описао методу за мерење амилазе у серуму и то откриће је пружио могућност дијагностике акутног панкреатитиса пре операције или обдукције (13). Почетком XX века је утврђено да је алкохол важан етиолошки фактор у настанку акутног панкреатитиса (14). Повезаност хиперамилаземије са акутним панкреатитисом је доказана 1929. године (15). Први опис хередиитарног панкреатитиса потиче од *Comforta* и *Steinbergera* из 1921. године (16).

Прво хируршко лечење псеудоцисте панкреаса методом пункције, учинио је *Le Dentu* 1862. године, док су *Lucke* и *Klebs* 1866. године дренирали псеудоцисту панкреаса (17). Током тридесетих и четрдесетих година прошлог века, преовладавали су трендови конзервативног лечења акутног панкреатитиса и компликација ове болести, док се *Pollack* 1959. године залагао за хируршку дренажу свих тешких облика акутног панкреатитиса. Његова препорука је била прихваћена али је код ових интервенција забележен веома висок морталитет >60% (18).

1.2. АНАТОМИЈА И ФИЗИОЛОГИЈА ПАНКРЕАСА

Панкреас је жлезда мекане конзистенције и дужине око 15 cm. Код одрасле особе је тежине између 75 и 110 g и смештена је у задњем делу абдомена, иза желуца и највећим делом се налази у горњем левом делу абдомена. Ембриолошки, панкреас се развија из вентралног и дорзалног дела (19, 20). Вентрални део се формира из ембрионалног пупољака од кога настају јетра, жучна кеса, заједнички билијарни канал и глава панкреаса (19). Дорзални део панкреаса, тело и реп панкреаса настају као директни израштај из дуоденума (21). Глава панкреаса је смештена у десној половини абдомена у раму дванаестопалачног црева (22). Врат, тело и реп панкреаса се налазе у задњем делу абдомена, док се реп протеже до желудачне стране слезине (23).

Артеријска васкуларизација панкреаса потиче из две висцералне артерије које васкуларизују већину интраабдоминалних органа: целијачно стабло и горња мезентерична артерија (24). Из целијачног стабла настаје горња панкреатико-дуоденална артерија која делом васкуларизује панкреас, који је васкуларизован и доњом панкреатико-дуоденалном аркадом насталом из горње мезентеричне артерије (19). Панкреас је жлезда са двоструком функцијом: ендокрином и егзокрином. Део панкреаса са ендокрином функцијом чине бројне ћелијске групе означене као *Langerhans*-ова острвца (25). У оквиру ових острваца се налазе четири главна типа ћелија које се класификују на основу продуката секреције: α -алфа ћелије које излучују глукагон који утиче на повећање вредности гликемије, β -бета ћелије које луче инсулин који смањује ниво глукозе у крви, Δ -делта ћелије које луче соматостатин и PP ћелије, или γ (гама) ћелије, које луче панкреасни полипептид (26). Ендокрини део панкреаса чини приближно 2% укупне тежине ове жлезде. Преосталих 98% је део панкреаса са егзокрином функцијом. Егзокрини део жлезде се састоји од ћелија распоређених у сферичне формације означене као ацинуси (27).

1.2.1. Морфологија и функција ацинусних ћелија

Ацинусне ћелије панкреаса (*acinus* на латинском значи бобице) су основна структура егзокриног дела панкреаса. Ове ћелије су пирамидалног облика и синтетишу бројне протеине (28). Група ацинуса чини лобулусе, док лобулуси даљим груписањем изграђују лобусе ове жлезде. Организација ацинусних ћелија и њихова функција су прилагођене синтези, складиштењу и секрецији велике количине протеина, односно дигестивних ензима. У базалном делу ацинусних ћелија се налази значајна количина гранулираног ендоплазматског ретикулума у коме се синтетишу протеини, док апикални део ћелије садржи зимогене грануле које складиште дигестивне ензиме. На апикалној површини ацинусних ћелија се налазе и микроресице (29, 30). Протеини који су синтетисани у ацинусним ћелијама се складиште у гранулираном ендоплазматском ретикулуму, а потом транспортују до Голџи комплекса где се пост-транслационо обрађују (31). Више од 90% протеина који се синтетишу у ацинусним ћелијама су дигестивни ензими (32). Ови протеини се иницијално синтетишу у неактивном облику као про-ензими или зимогени, а затим се складиште у вакуоле на *trans* страни Голџи комплекса и транспортују ка луминалном делу плазма мембране ацинусних ћелија (32). На плазма мембрани, ове зимогене грануле се стапају са површинском мембраном и ослобађају свој садржај у лумен ацинуса (33).

Егзокрини панкреас секретује јоне и молекуле воде у дуоденум (34). Поред ацинусних ћелија значајне су и дукталне ћелије које синтетишу воду са раствореним бикарбонатним јонима у већој концентрацији него што је у серуму. Секретована вода је неопходна за транспорт дигестивних ензима до лумена црева (34). Наиме, панкреас излучује дневно око 1500-3000 mL изо-осмоларне и алкалне течности ($\text{pH} > 8.0$) са раствореним бројним ензимима (35). Као што је већ наведено, ова течност је алкална услед високе концентрације јона бикарбоната (до 150 mM), који неутралишу ацидитет желудачног садржаја (36, 37).

Чврсте везе у пределу апикалне површине ацинусних и дукталних ћелија играју улогу баријере, тј. спречавају дифузију великих молекула (попут дигестивних ензима) у интерстицијум панкреаса, а потом и у крвоток (38). Оштећење ових веза омогућава пролаз дигестивних ензима у крвоток што представља један од патофизиолошких механизма у акутном панкреатитису.

1.2.2. Секреција ензима панкреаса

Ензими панкреаса, сем амилазе и липазе, се у нормалним условима секретују у неактивном облику и у лумену танког црева се активирају. Наиме, у лумену црева ензими локализовани на површини епитела попут ентерокиназе, уклањају пептид из трипсиногена, активирају га у трипсин који даље активира друге енземе као што су химотрипсин и еластаза (39). Постоје три главне групе ензима панкреаса:

1) амилаза (алфа-амилаза) је ензим који хидролизује скроб у дисахариде (40). Главни извор амилазе је панкреас, мада је амилаза присутна и у усној дупљи (41). Код патолошких процеса панкреаса, пре свега инфламације, амилаза се ослобађа у крвоток и серумски нивои амилазе користе се за постављање дијагнозе акутног панкреатитиса.

2) Протеазе панкреаса, укључујући трипсин и химотрипсин, играју веома важну улогу у деградацији протеина (42). Иако дигестија протеина почиње у желуцу под дејством пепсина, овај процес се доминантно одиграва у танком цреву, под дејством панкреасних протеаза (40). Трипсин је кључни ензим за брзу активацију свих про-ензима, укључујући и трипсиноген (43). Постоје два главна изоензима трипсиногена: трипсиноген-1 и трипсиноген-2. Код здравих особа, однос трипсиногена-1 и трипсиногена-2 у панкреасној течности је скоро четири пута већи у корист трипсиногена-1 (44). Трипсиноген се активира уклањањем пептида означеног као ТАР (енгл. *Trypsinogen activation peptide*, ТАР).

3) Панкреасна липаза је још један ензим који се секретује у панкреасу и игра значајну улогу у дигестији липида (45). Липиди унети храном су триглицериди и не могу се апсорбовати из црева у овом облику. Липаза игра важну улогу у апсорпцији липида тако што их разграђује до масних киселина које се лако апсорбују (46). Нивои липазе су такође повећани током панкреатитиса (40, 47). Осим тога, панкреас синтетише низ других дигестивних ензима, укључујући рибонуклеазу, деоксирибонуклеазу, желатиназу, карбоксипептидазу и еластазу (48).

У нормалним условима, након уноса хране, присуство масти или аминокиселина у лумену дуоденума стимулише ослобађање фактора који је означен као ССК-RF (енгл. *trypsin-sensitive peptide terminal cholecystokinin releasing factor*, ССК-RF) који потом стимулише секрецију холецистокинина из зида дуоденума. Холецистокинин даље стимулише секрецију из ацинусних ћелија (49). Хуморална стимулација секреције егзокриног дела панкреаса је повезана са хормонима и њиховим рецепторима експримираним на ацинусним ћелијама (50). Дакле, холецистокинин стимулише

секрецију ензима панкреаса директно преко типа А рецептора на ацинусним ћелијама и индиректно преко типа Б рецептора који су експримирани на нервима што потом узрокује ослобађање ацетил-холина из ових нерава (51, 52). Други механизми стимулације секреције су неурогени, тј. обухватају активацију аутономног нервног система (51). Поред ациетил-холина, на секрецију из ацинусних ћелија утичу и други неуротрансмитери, попут вазоактивног интестиналног пептида, супстанце Р и пептида који ослобађа гастрин. Соматостатин је главни инхибитор егзокрине секреције панкреаса (53).

Интраћелијско складиштење у везикулама, синтеза ензима у неактивном облику и присуство инхибитора протеаза: интраћелијски (панкреасни секреторни инхибитор трипсина) и у крви (алфа-1-антитрипсин и алфа-2-макроглобулин) су главни протективни механизми који спречавају прерану активацију протеолитичких ензима и аутодигестију панкреаса (54, 55).

1.3. АКУТНИ ПАНКРЕАТИТИС: ДЕФИНИЦИЈА И ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

Акутни панкреатитис (АП) је акутно запаљење панкреаса које настаје као резултат преране активације протеолитичких ензима у паренхим панкреаса што је означено као аутодигестија панкреаса. Након активације ензима настаје оштећење ацинусних ћелија и развија се акутна инфламација различитог интензитета која одређује тежину и исход обољења (56). Лакша форма акутног панкреатитиса је најчешћа форма болести и карактерише се инфламацијом која је ограничена на паренхим панкреаса. Међутим, у око 20% пацијената развија се тешка форма болести која се карактерише синдромом системског инфламацијског одговора или SIRS-ом (енгл. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) са последичним оштећењем бројних удаљених органа и органских система што је праћено неповољним током и исходом болести (56). У 85% болесника се развија интерстицијални облик панкреатитиса, у 15% болесника некротични облик (57-59), док се у 33% болесника са некрозом панкреаса развија инфекција некротичног ткива (60, 61).

Акутни панкреатитис представља једну од најчешћих гастроинтестиналних болести (62). Инциденца АП у свету је различита и зависи од преваленце етиолошких фактора и креће се од 5 до 80 оболелих на 100.000 становника. Ниска стопа инциденце је забележена у Енглеској и Холандији, око 10/100 000 (63); средње висока стопа инциденце је документована у Немачкој и Шкотској и креће се око 15/100 000; док је

висока стопа инциденце забележена у Финској и Сједињеним америчким државама (САД) и износи око 40-80 оболелих на 100 000 становника (64). У земљама где се интензивно конзумира алкохол и то нарочито викендом, као што је то случај у Финској, инциденца АП је висока и износи 47-102 оболела на 100 000 становника (65). Последњих година је забележен тренд пораста инциденце АП у западним развијеним земљама, делом због пораста оболелих од калкулозе билијарног тракта и алкохолизма, а делом и због боље дијагностике болести (66-68). Међу 17 европских земаља, инциденца АП се креће од 4,6 до 100 пацијената на 100 000 становника и највећа је (> 40 на 100 000 особа) у земљама источне и северне европе, док је најнижа у Албанији (68). Високе стопе инциденце (> 40 оболелих на 100 000 особа) су забележене и у Јапану (66) и на Тајвану (69). Поред пораста инциденце АП и број хоспитализација због ове болести је порастао за 20% у току последњих 10 година (70).

Последњих година је забележен пад стопе морталитета оболелих од АП услед бољих дијагностичких и терапијских поступака. Снижење морталитета у последње две деценије је за 2% до 11% (71). Морталитет оболелих од АП данас износи око 5% (72),

и то:

- 3% је код интерстицијумске форме панкреатитиса,
- 17% је код некротичне форме панкреатитиса:
 - 30% у инфицираној некрози,
 - 12 % у стерилној некрози.

Морталитет болесника без органске инсуфицијенције је 0% (73), код оболелих са инсуфицијенцијом једног органа око 3% (0-8%) (74), а код мултипле органске инсуфицијенције је 47% (28-69%) (75). Раније студије су показале да код 80% оболелих смртни исход настаје након неколико недеља од почетка болести и резултат је некрозе панкреаса, док новије студије разликују смртни исход који настаје у раној фази болести (прве две недеље од почетка болести) и смртни исход у касној фази (након две недеље од почетка болести) (76, 77). Смрт у прве две недеље од почетка болести је последица органске инсуфицијенције узроковане SIRS-ом (78), а смрт у касној фази болести је узрокована компликацијама повезаним са развојем стерилне или инфициране некрозе панкреаса (79).

Пол је важан фактор који је повезан са ризиком од настанка АП: инциденца алкохолног панкреатитиса је виша код мушкараца, док је инциденца билијарног панкреатитиса виша код жена. Присутне су расне разлике у инциденци услед различите заступљености етиолошких фактора код различитих раса. Показано је да је годишња

инциденца АП код беле популације у САД-у око 5,7 оболелих на 100.000 становника, док је међу људима црне популације у САД-у инциденца око 20,7 оболелих на 100.000 особа (80). Пушење представља независан фактор ризика за ову болест (56). Показано је да пушење 20 и више цигарета дневно повећава ризик за равој АП за два до три пута. Такође, код пушача који конзумирају преко 400 g алкохола месечно, ризик за развој АП се повећава за више од четири пута. *Diabetes mellitus* тип 2 повећава ризик од АП за два пута (81, 82) и ризик је већи код дијабетичара испод 45 година старости (83).

1.4. КЛИНИЧКА СЛИКА

Акутни панкреатитис је запаљење панкреаса које се манифестује абдоминалним болом и повишеним нивоима панкреасних ензима у серуму, односно плазми или у урину. Клиничка слика је веома варијабилна и обољење се може манифестовати као благи, само-ограничавајући абдоминални поремећај или као акутни абдомен са развојем шока. Мучнина и повраћање су чести симптоми (84). Понекад се АП може манифестовати и без абдоминалног бола са симптомима и знацима инсуфицијенције респираторног система и централног нервног система (ЦНС). Повишена телесна температура која се креће од субфебрилности до умерено повишене телесне температуре није ретка појава у АП. Такође, тахикардија и хипотензија, као и блага жутица могу бити присутни код оболелих од АП (85).

1.5. ЕТИОЛОГИЈА АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

Бројни етиолошки фактори су повезани са развојем АП:

- а.** Калкулоза жучне кесе и жучних путева,
- б.** Конзумација алкохола,
- в.** Хиперлипидемија,
- г.** Хиперкалцемија,
- д.** Херeditарни фактори,
- е.** Траума (спољашња траума абдомена, јатрогене повреде панкреаса у склопу других абдоминалних операција, ендоскопска ретроградна холангиопанкреатографија),

- ж. Ишемија (системска хиперфузија, атероемболијска болест и васкулитис крвних судова који васкуларизују панкреас),
- з. Инфекције (*Mumps* вирус, *Coxsackie* вирус, итд.),
- и. Токсини,
- к. Лекови,
- л. Идиопатски АП.

Од свих наведених етиолошких фактора, најчешћи су:

- билијарни панкреатитис (38%),
- алкохолни панкреатитис (36%),
- идиопатски панкреатитис (10%).

Сви остали фактори чине мање од 10% свих оболелих од АП (86).

Холелитијаза (калкулроза жучне кесе) је преобладајући узрок АП у Великој Британији, Азији, Грчкој, Италији и Норвешкој (87); док алкохолни панкреатитис доминира у САД-у, Финској, Шведској, Мађарској и Мексику (88).

Просечна старост оболелих од АП варира у зависности од етиологије: алкохолизам и лекови узрокују АП код мушкараца у трећој и четвртој деценији живота, док се билијарни АП чешће јавља код жена у шестој и седмој деценији живота (89).

1.5.1. Билијарни акутни панкреатитис

Показано је да је калкулроза билијарног стабла један од најчешћих узрока АП (у 38% оболелих) и повезана је најчешће са женским полом. Наиме, 40% свих билијарних панкреатитиса настаје код жена у старосној доби од 50-60 године (16).

Постоје бројни докази да пролазак калкулуса кроз билијарне путеве узрокује АП. Краткотрајни поремећај хепатограма се детектује на почетку билијарног панкреатитиса као и калкулуси з фецесу у више од 80% пацијената са калкулозом жучне кесе и акутним панкреатитисом (90). Предложена су три вероватна механизма како калкулуси узрокују АП:

- 1) Пролазак малог калкулуса (<5 mm) кроз *ductus cisticus* и његово привремено задржавање у *Oddi*-јев сфинктер узрокује транзијентну опструкцију заједничког канала за панкреасне и жучне путеве што резултира рефлуксом жучи у панкреасни канал.
- 2) Транзијентна инсуфицијенција *Vater*-ове ампуле услед проласка калкулуса кроз *Oddi*-јев сфинктер резултује рефлуксом дуоденалног сока у панкреасни канал.

- 3) Опструкција панкреасног канала калкулусом узрокује дукталну хипертензију. Дуктална хипертензија даље узрокује прекид континуитета зида дуктуса, пролазак панкреасног сока у интерстицијум, а све то поспешује прерану активацију протеолитичких ензима.

Занимљиво је да је инциденца билијарног панкреатитиса обрнуто пропорционална величини жучног калкулуса. Утврђено је да је билијарни панкреатитис чешћи код микролитијазе са калкулусима мањим од 3 mm, него код калкулуса већих од 2 cm (91). Иако се билијарни калкулуси понекад не могу открити дијагностичким претрагама, то не искључује могућност да су микрокалкулуси узрок АП. Наиме, у више од половине случајева идиопатског АП узрок је заправо микролитијаза. Аланин аминотрансфераза (АЛТ) представља значајан параметар за дијагнозу акутног билијарног панкреатитиса и у 95% случајева вредност ензима је повишена преко 150 IU/L, док око 15-20% болесника са АП има уредне вредности јетрених ензима (92).

1.5.2. Алкохолни акутни панкреатитис

Конзумација алкохола је други најчешћи узрок АП (70). Дуготрајна конзумација алкохола (дуже од деценије) узрокује рекурентни акутни панкреатитис и поспешује развој хроничног панкреатитиса код осетљивих особа. Ризик да се развије АП у току живота код алкохоличара са тешких степеном зависности је 2 до 5% (70). Ризик је већи код мушкараца него код жена, услед разлика у навикама конзумације алкохола и услед генетске предиспозиције (70). Врста алкохола је мање важна од количине (обично оболели конзумирају од 100 до 150 g алкохола дневно) и неретко се АП развија након ексцесивне конзумације алкохола.

Алкохол предиспонира развој АП на неколико начина:

- 1) Приликом метаболизма етанола стварају се токсична једињења која директно оштећују ацинусне ћелије;
- 2) Етанол стимулише секрецију из ацинусних ћелија и истовремено узрокује спазам *Oddi*-јевог сфинктера што доприноси повећању интрадукталног притиска у панкреасу;
- 3) Етанол узрокује повећану пропустљивост епителне баријере дуктуса и тако омогућава да прерано активирани протеолитички ензими деградирају паренхим панкреаса;
- 4) Етанол мења садржај панкреасног сока: повећава количину протеина, смањује ниво бикарбоната и концентрацију инхибитора трипсина;

- 5) Етанол поспешује стварање протеинских чепова који потом узрокују опструкцију панкреасних дуктуса.

У последње време је показано да је развој АП резултат деловања спољашњих и генетских фактора. Пушење се сматра независним фактором за развој алкохолног панкреатитиса јер повећава инциденцу обољења, што није случај са развојем билијарног панкреатитиса. Сматра се да пушење у комбинацији са алкохолом повећава стварање слободних кисеоничких радикала и тако доприноси исхемији и оштећењу панкреаса (93).

1.5.3. Јатрогени узроци акутног панкреатитиса

Акутни панкреатитис се може јавити након бројних дијагностичких и терапијских интервенција:

- а. Биопсије панкреаса,
- б. Експлорације екстрахепатичних жучних путева и *Vater*-ове ампуле,
- в. Дисталне гастректомије,
- г. Спленектомије,
- д. Колектомије,
- е. Нефректомије,
- ж. Операције абдоминалне анеуризме,
- з. Ретроперитонеалне лимфаденектомије,
- и. Трансплантације срца,
- к. ERCP (енгл. *Endoscopic retrograde cholangiopancreatography*, ERCP).

У 5-10% пацијената подвргнутих ERCP-у ће се развити АП. Фактори ризика за развој АП након ERCP су: дисфункција *Oddi*-јевог сфинктера и поновљена примена контрастног средства под притиском (94). Обично се ради о благом облику панкреатитиса са добром прогнозом (95). У 1-3% болесника након ERCP може се развити тешка форма болести са фаталним исходом (96). Асимптоматска хиперамилаземија се детектује у 35-70% болесника након ERCP, док се у 3% болесника развија клинички манифестни панкреатитис (97). Дијагноза панкреатитиса узрокованог ERCP-ом поставља се лабораторијским налазом хиперамилаземије уз болове у епигастричном пределу абдомена након ERCP процедуре, праћено мучнином и повраћањем (89).

1.5.4. Херeditарни акутни панкреатитис

Херeditарни АП је ретка болест који се наслеђује аутозомно-доминантно услед мутације гена који кодирају трипсиноген или инхибиторе трипсина. Ова болест се карактерише акутним рекурентним панкреатитисом који је обично лаке форме и временом прелази у хронични панкреатитис (98). Обично се развија код мутација гена за катјонски трипсиноген, PRSS1 (енгл. *Protease Serine 1*, PRSS1), тако да се услед мутација ова форма трипсиногена спонтано и прерано активира у панкреасу. Такође, код пацијената са овом мутацијом присутна је и абнормална секреција из дукталних епителних ћелија што доприноси развоју АП. Аутозомно-доминантне форме херeditарног панкреатитиса су узроковане мутацијама у екзону 2 (N29I) и екзону 3 (R122H) гена за катјонски трипсиноген (98).

Мутације гена који кодира инхибитор трипсина, SPINK1 (енгл. *Serine protease inhibitor Kazal type 1*, SPINK1) узрокују дисфункцију SPINK1 протеина који блокира активно место на трипсину. Мутације ова два гена се налазе у више од 80% пацијената са херeditарним АП. Поред поменутих мутација, описано је да су мутације других гена повезане са настанком и прогресијом АП, попут мутације CFTR гена (енгл. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), гена за химотрипсин С и *claudin-2* (99). Мутације у овим генима могу предиспонирати развој АП. Мутација *claudin-2* заједно са алкохолном доприноси развоју алкохолног панкреатитиса (100).

У 2% до 37% пацијената са хроничним идиопатским и акутним рекурентним панкреатитисом имају мутације барем у једном алелу CFTR гена (100). Није сасвим јасно како CFTR мутације могу узроковати АП. Могући механизам је да ове мутације узрокују продукцију концентрованог, вискозног и киселог панкреасног секрета који потом опструира дуктусе. Поремећај функције ацинусних ћелија настаје као последица смањеног интраћелијског рН и абнормалног мембранског транспорта.

1.5.5. Тумори

Панкреасни и перипанкреасни тумори могу се иницијално манифестовати епизодом акутног панкреатитиса. Препоручено је да се код пацијената са акутним идиопатским панкреатитисом по резолуцији болести спроведе дијагностичка обрада са циљем детекције малигнитета. Приближно у 1% до 2% свих пацијената узрок АП су тумори (89).

1.5.6. Метаболички узроци

Код пацијената са хиперлипидемијом типа I и V и повишеним нивоом триглицерида у серуму преко 11 mmol/L, може се развити акутни панкреатитис. Хиперлипидемични панкреатитис чини око 4% од укупног броја АП (101). Липаза игра значајну улогу у развоју АП који је повезан са хиперлипидемијом, јер овај ензим ослобађа токсичне масне киселине које потом оштећују микроциркулацију панкреаса и узокују исхемију овог органа (102). Такође, масне киселине стимулишу ацинусне ћелије да производе про-инфламацијске цитокине и тиме промовишу регрутацију леукоцита у паренхим панкреаса (103). Хиперлипидемија се као етиолошки фактор јавља код 1,3% до 4,8% пацијената са АП (103).

На присуство хипертриглицеридемије треба посумњати код пацијената са познатим генетским поремећајима метаболизма липопротеина или постојање секундарних фактора као што је неконтролисани дијабетес, алкохолизам, употреба лекова за које се зна да узрокују хипертриглицеридемију и у току трећег триместра трудноће. Ниво триглицерида ≥ 13 mmol/L указује на могућност да је АП узрокован хипертриглицеридемијом (104). Ниво триглицерида треба одредити првог дана по хоспитализацији јер прекид пероралног уноса хране брзо снижава ниво триглицерида.

Хиперкалцемија у склопу хиперпаратиреоидизма може узроковати акутни и хронични панкреатитис. Хиперкалцемија стимулише ацинусне ћелије и доприноси стварању калкулуса који потом опструирају панкреасне дуктусе (105). Хиперкалцемија узрокује мање од 1% свих АП и може се јавити код узимања великих доза витамина Д, фамилијарне хипокалциуричне хиперкалцемије, тоталне парентаралне исхране, итд. (105).

1.5.7. Лекови

Лекови узрокују мање од 2% свих случајева АП (106). Болест узрокована лековима је обично благе форме (70). Карактерише се абдоминалним болом и хиперамилаземијом. Лекови код којих је утврђена дефинитивна или вероватна повезаност са акутним панкреатитисом су приказани у табели 1. АП најчешће настаје као последица идиосинкразије на поједине лекове (нпр. 6-меркаптопурин и сулфонамиде) (107), али и другим механизмима (108):

- директни токсични ефекат (нпр. диуретици),
- алергијска реакција - панкреасни ангиоедем (нпр. АСЕ инхибитори),
- узрокујући хиперлипидемију (бетаблокатори, тамоксифен и др.),

- реакција на прекомерну дозу лека (ацетаминофен, еритромицин).

Интервал између примене лека и појаве АП зависи од самог лека. Тако напр. ацетаминофен може узроковати панкреатитис након само једне дозе лека; док азатиоприн, б-меркаптопурин, метронидазол, аминосалицилати и сулфонамиди могу проузроковати АП и до месец дана након примене. Са друге стране, пентамидин и диданозин могу узроковати болест недељама и месецима након примене лека, вероватно акумулацијом токсичних метаболита (109, 110).

1.1.1. Инфекције

Инфекције су узрок АП у мање од 1% свих случајева и обично се манифестују као лака форма болести. Од вируса најчешћи су узрочници *Coxsackie* вируси, *Citomegalo* вирус и вирус *tumps*-а који се повезује са развојем тешких и хеморагичних форми болести (111). Од бактерија као узрочници АП, најчешће су описане: салмонела, микоплазма и лептоспира. Последњих година као узрок АП спомињу се *Helicobacter pylori* инфекција (112) и инфекција вирусом инфлуенце H1N1 (113).

1.1.1. Траума

Тупа или пенетрирајућа траума абдомена може узроковати пораст амилаза и липаза код 17% повређених, док код 5 % случајева може доћи до развоја тешког облика АП (18).

Табела 1: Списак лекова са доказаном или вероватном повезаношћу са акутним панкреатитиса (114)

Доказана повезаност са АП
Сулфасазалин, стероиди, триметоприм/сулфаметоксазол, симвастатин, пентовалентна једињења антимоноа, пенформин, пентамидин, оксифенбутазон, опијати, оланзапин, октреотид, метронидазол, естрогени, еритромицин, цитарабин, еналаприл, диданозин, циметидин, карбомазепин, капецатабин, бортезомиб, азатиоприн, аспергиназа, ацетаминофен, фуросемид, ламивудин, интерфеон- α , итраконазол, хидрохлортиазид, метилдопа, олсалазин, месалазин, меркаптопурин
Вероватна повезаност са АП
Циклопентиазид, цефтриаксон, доцетаксел, карбоплатина, аторвастатин, доксициклин, фамотидин, ифосфамид, мапротилин, иматиниб, орлистат, оксалиплатина, рифампин, тигециклин, сорафениб, валпроат, тамоксифен, тетрациклин, сулиндак, вилдаглиптин

1.1.2. Остали етиолошки фактори

Остали фактори обухватају азотемију, васкулитисе и ујед шкорпије *Tityus trinitatis*. Наиме, отров шкорпије узрокује појачано ослобађање ацетил-холина из холинергичких нервних завршетака што стимулише масивну продукцију панкреасног сока (89). Слично делују и инхибитори ацетил-холин естеразе. Уколико се етиолошки фактор не може открити, облик АП је означен као идиопатски. Прихватљива стопа идиопатског АП је <20%. Међутим код одређеног броја пацијената са идиопатским панкреатитисом се детектује муљ у жучној кеси и кристали холестерола у жучи и панкреасном соку, тако да је у основи овог панкреатитиса заправо патологија билијарног система (89).

Пропорција пацијената са идиопатским акутним панкреатитисом расте са годинама старости. Бројни потенцијални фактори могу допринети настанку идиопатског панкреатитиса, укључујући неидентификоване генетске полиморфизме, изложеност дуванском диму и другим токсинима, али и уследи коегзистирања болести које се обично повезују са акутним панкреатитисом (нпр. гојазност и дијабетес) (115). Морбидна гојазност је фактор ризика за акутни панкреатитис (116) и за тешку форму ове болести (117).

1.2. ПАТОФИЗИОЛОГИЈА АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

За настанак АП су кључна два догађаја: прерана активација дигестивних ензима и активација ћелија имунског система (118). Тежина АП зависи од степена активације ћелија имунског система, продукције цитокина и осталих инфламацијских медијатора.

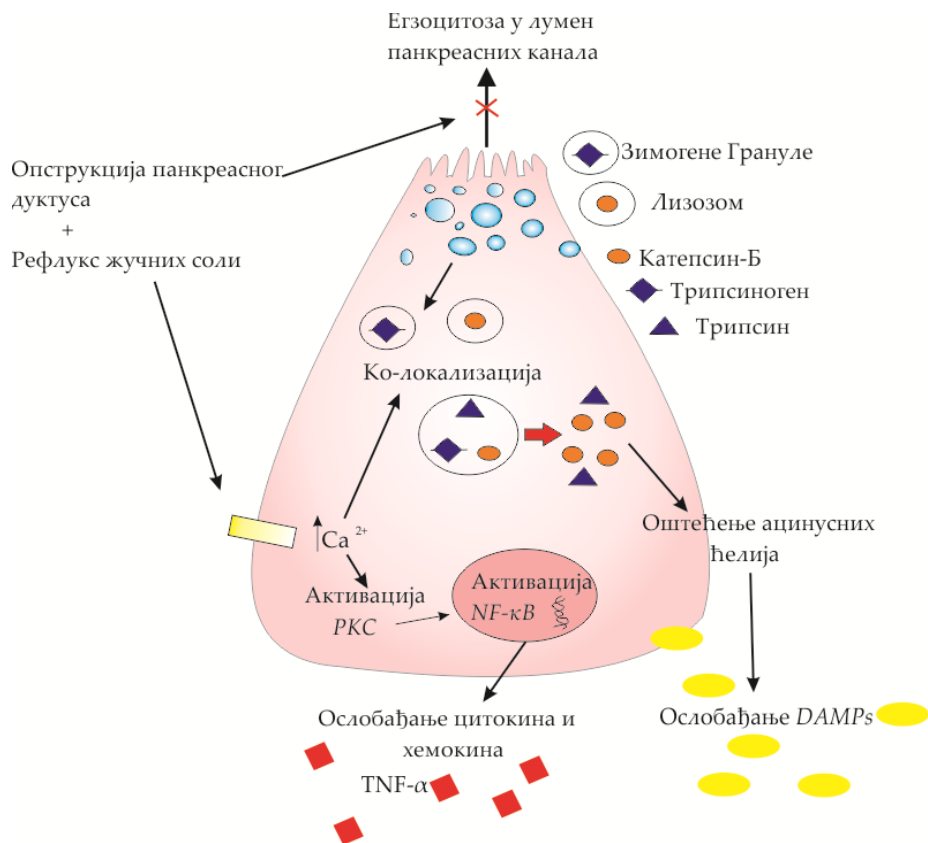
1.2.1. Аутодигестија панкреаса

Иницијални догађај у патогенези АП је интра-ацинусна активација дигестивних ензима, пре свега трипсина (119, 120). У панкреасу постоји неколико механизма који спречавају прерану активацију протеолитичких ензима:

- 1) Ензими се синтетишу у неактивној форми као проензими или зимогени;
- 2) Активирају се у дуоденуму под дејством ентерокиназе, дакле место синтезе и активације су просторно одвојени;

- 3) Након синтезе пакују се у зимогене грануле чиме су одвојени од цитоплазме ацинусних ћелија;
- 4) Поред синтезе протеолитичких ензима, ацинусне ћелије синтетишу и њихове инхибиторе, попут инхибитора трипсина који се затим пакују у зимогене грануле заједно са про-ензимима.

Два фактора доприносе прераној активацији дигестивних проензима, а то су инхибиција секреције из ацинусних ћелија и рефлукс жучних киселина у панкреасне канале (слика 1) (70). Билијарни калкулуси, тумори или протеински чепови узрокују опструкцију панкреасних канала и повећање интрадукталног притиска. Повећан интрадуктални притисак потом оштећује дуктусе и узрокује прекид егзоцитозе са апикалног дела ацинусних ћелија, те тако настаје концентрисање гранула у цитосол ацинусних ћелија и њихово преусмеравање у базолатерални део ћелије (121, 122). У цитосолу ацинусних ћелија се накупљају зимогене грануле и лизозоми. Оно што следи је ко-локализација, односно спајање зимогених гранула и лизозома. За овај корак је неопходно пораст интраћелијске концентрације калцијума. Док је физиолошки пораст концентрације калцијума транзијентан и регулише нормалне функције ацинусних ћелија, патолошко дуготрајно повећање концентрације калцијума у ацинусним ћелијама настаје током ране фазе АП (123, 124). Билијарни рефлукс омогућава да ацинусне ћелије преузимају жучне киселине преко мембранских транспортера и рецептора за жучне киселине, *Gpbar1* (енгл. *G-protein-coupled receptor for bile acids*, *Gpbar1*) (125). Заправо, транспорт жучних киселина иде преко натријум-зависног ко-транспортера или рецептора за жучне киселине-1 који је везан за G- протеин (123, 125). Уједно, ацинусне ћелије могу преузети жучне киселине и из серума или интерстицијума преко бикарбонатно-зависних измењивача жучних киселина који су локализовани на базолатералној мембрани (123).



Слика 1. Аутодигестија панкреаса. Два кључна догађаја резултују у прераној активацији протеолитичких ензима панкреаса: опструкција панкреасног дуктуса и рефлукс соли жучних киселина. Опструкцијом панкреасног дуктуса се блогира егзоцитоза из ацинусних ћелија и зимогене грануле се накопљају у апикалном делу ацинусних ћелија. Ацинусне ћелије долазе у контакт са солима жучних киселина услед билијарног рефлукса и преузимају их. У цитосолу соли жичних киселина повећавају концентрацију јона калцијума што потом стимулише спајање (ко-локализацију) зимогенних гранула и лизозома. Катепсин Б из лизозома активира трипсиноген у трипсин чиме се покреће каскадна реакција активације протеолитичких ензима и аутодеструкција панкреаса.

У цитосолу жучне киселине блокирају Ca^{2+} -АТФ-азу и прекидају транспорт калцијума у ендоплазматски ретикулум што резултује повећањем интраћелијске концентрације Ca^{2+} . Превелика концентрација калцијума покреће процес аутодигестије панкреаса. Уједно, превелика концентрација калцијума узрокује деплецију аденозин-трифосфата, појачан оксидативни стрес и дисфункцију митохондрија што доприноси некрози ацинусних ћелија (126-128).

Калцијум даље активира цитоскелет ацинусних ћелија што доприноси спајању зимогених гранула и лизозома. Показано је да спречавање пораста концентрације калцијума у цитосолу ацинусних ћелија онемогућава ко-локализацију и активацију трипсина (89). Ензим лизозома означен као катепсин Б активира трипсиноген (129). Инхибиција катепсина Б применом фармаколошких агенаса или делецијом гена за катепсин Б спречава се активација трипсиногена и смањује тежина експерименталног АП (130, 131). Активирани трипсиноген даље каскадно активира друге протеолитичке ензиме, деградира мембрану зимогених гранула и тако се ослобађају активирани ензими у цитосолу ћелије. Ослобођени катепсин Б, такође, пермеабелизује мембрану митохондрија и ослобађа цитохром С што покреће апоптозу ацинусних ћелија (132). Са друге стране, ослобођени активирани протеолитички ензими и активирана фосфолипаза деградирају мембрану ацинусне ћелије, настаје некроза и ослобађање алармина, молекула означених као DAMPs (енгл. *Damage-associated molecular patterns*, DAMPS). Рецептори који препознају молекуле DAMPs-а су означени су као рецептори за препознавање молекуларних образаца или PRRs рецептори (енгл. *pattern recognition receptors*, PRRs). Ови рецептори су локализовани на мембрани или у цитосолу, како ћелија имунског система, тако и у не-имунским ћелија. Након везивања DAMPs-а за PRRs рецепторе покреће се нисходна сигнална каскада што резултује настанком стерилне инфламације (133, 134). DAMPs молекули који се ослобађају у току ране фазе АП су DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*, DNA), хистони, АТФ (енгл. *Adenosine triphosphate*, АТФ) и HMGB1 (енгл. *high mobility group box 1*, HMGB1) (135).

Повећана концентрација јона калцијума у цитосолу ацинусних ћелија активира сигналне путеве, попут MAPK (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) и PI3K (енгл. *Phosphatidyl inositol 3-kinase*, PI3K) киназног пута, као и транскрипционе факторе, пре свега NF-κB (енгл. *Nuclear Factor NF-κB*, NF-κB) што даље стимулише синтезу про-инфламацијских медијатора из ацинусних ћелија, укључујући С-Х-С хемокине (CXCL-10), MCP-1 (енгл. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1), IL-33 (енгл. *Interleukin*, IL), фактор активације тромбоцита, TNF-α (енгл. *Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF-α) и IL-1β (енгл. *Interleukin-1β*, IL-1β). Ослобођени медијатори покрећу инфилтрацију ћелија урођене имуности у инфламрани панкреас, попут моноцита и неутрофила (56, 136, 137).

Најновији подаци указују да интра-ацинусна активација NF-κB настаје веома рано у експерименталном АП и независна је од активације трипсиногена (138, 139). Сигнални пут NF-κB је један од кључних инфламацијских путева који регулише експресију

великог број гена за про- и анти-инфламацијске цитокине и тако утиче на тежину болести (140, 141).

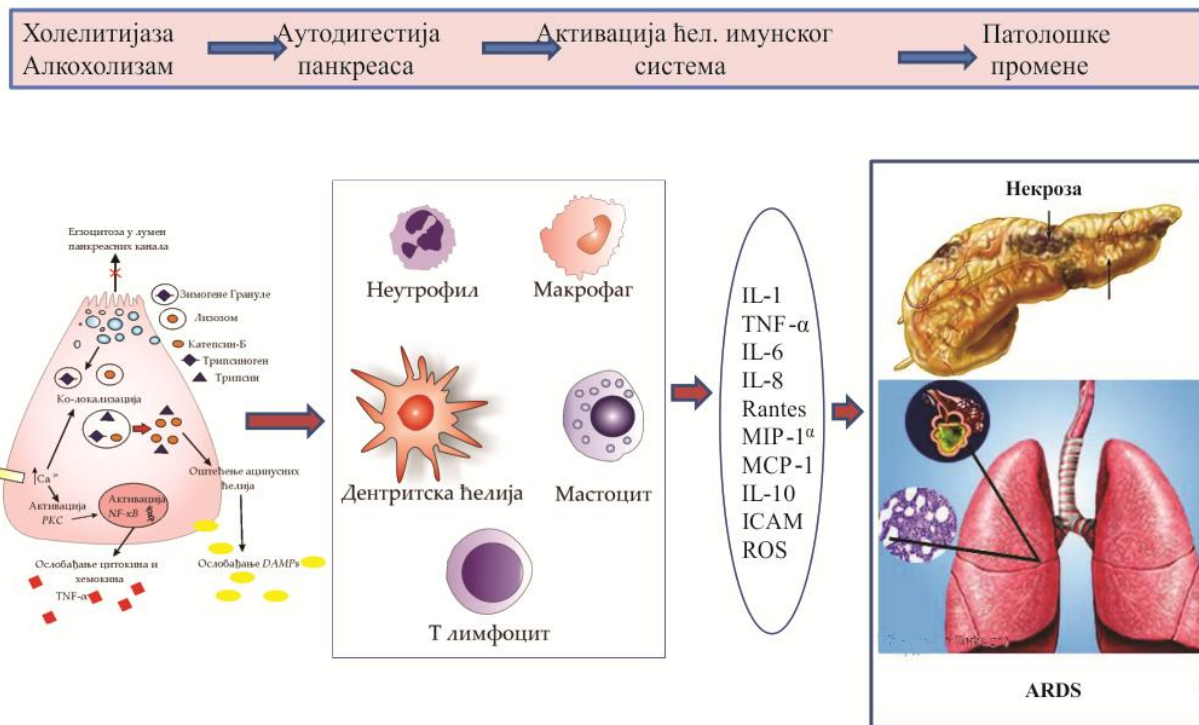
Уједно, услед блокаде апикалне егзоцитозе из ацинусних ћелија, грануле са активираним ензимима се усмеравају у правцу базолатералног дела мембране и ослобађају у интерстицијум, што за последицу има оштећење мембрана суседних ћелија (56). Као последица настаје едем, васкуларно оштећење, хеморагија и некроза панкреаса (142).

Крајњи ефекат преране активације протеолитичких ензима је апоптоза или некроза ацинусних ћелија и ослобађање алармина из некротичних ћелија; или активација ацинусних ћелија које потом секретују про-инфламацијске цитокине и хемокине. Свеукупно, ослобођени алармини и инфламацијски медијатори активирају ћелије имунског система.

1.2.2. Активација ћелија имунског система (слика 2)

Инфламација је прецизно регулисан и комплексан одговор који обухвата различите хуморалне и целуларне компоненте имунског система и представља заштитну реакцију на штетне факторе, инвазију патогена или оштећење ћелија. Крајњи ефекат инфламације је елиминација почетног узрока оштећења ћелија, као и самих оштећених ћелија и стимулација регенерације ткива. Међутим, прекомерни и неконтролисани инфламацијски одговор (попут оног који се развија у тешкој форми АП или у сепси) је штетан за организам домаћина. Иmunски систем се може поделити на урођени и стечени који су међусобно блиско повезани (133).

Ћелије урођеног имунског система препознају конзервисане структуре страних молекула преко PRRs рецептора. Такви молекули садрже молекуларне обрасце (енгл. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) пореклом од патогена. Међутим, PRRs могу препознати и DAMPs молекуле, који су настали као последица оштећења ћелија (143).



Слика 2. Патогенеза акутног панкреатитиса. Два кључна догађаја у патогенези акутног панкреатитиса су прерана и интрапанкреатична активација протеолитичких ензима и активација ћелија имунског система. Активиране ћелије имунског система секретују бројне про-инфламацијске медијаторе и од степена активације ових ћелија зависи тежина болести и развој системских (оштећење плућа) и локалних компликација (некроза панкреаса).

Од свих PRRs рецептора, *Toll-like* рецептори (енгл. *Toll-like receptors*, TLRs) су најбоље проучени. Након активације TLRs прокрећу се сигнални путеви и активирају транскрипциони фактори, као што су NF-κB, MAPK, и STATs (енгл. *Signal Transducers and Activators of Transcription*, STAT); и повећава се продукција про-инфламационих цитокина као што је фактор некрозе тумора (TNF) и интерлеукин (IL)-1 (144).

Ћелије стеченог имунског система препознају специфичне антигене коју су приказани на специјализованим антиген-презентујућим ћелијама. Када се активирају, ћелије стеченог имунског система, односно Т и В лимфоцити, обезбеђују адекватне одговоре усмерене против циљаних патогена.

Инфламација је основна карактеристика АП и од степена инфламацијског одговора зависи тежина АП (145). Код већине болесника, инфламација је ограничена на

паренхим панкреаса, када се ради о лакој форми болести. Међутим, у тешким формама АП настаје прогресија инфламацијског одговора у системски инфламацијски одговор, SIRS.

Ослобођени алармини, хемокини и про-инфламацијски цитокини активирају резидентне ћелије у панкреасу, пре свега резидентне макрофаге. Даље, ови медијатори активирају и регрутују и друге ћелије имунског система, најпре неутрофиле и моноците/макрофаге, а касније дендритске ћелије и Т лимфоците (146).

Атхезија леукоцита за ендотел је иницијалан догађај неопходан за развој акутног панкреатитиса. Миграција ћелија имунског система је вишестепени процес у коме кључну улогу играју хемокини и различити атхезивни молекули (147). Атхезивни молекул који учествује у миграцији неутрофила је интрацелуларни атхезивни молекул, ICAM-1 (енгл. *Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) (148). ICAM-1 је конститутивно експримиран на ендотелним ћелијама панкреаса у физиолошким условима, али је ниво експресије низак. Међутим, у току инфламације, ICAM-1 се појачано експримира што омогућава миграцију неутрофила у паренхим панкреаса. Слично, церулеин, аналог холецистокинина, повећава експресију ICAM-1 у панкреасу миша чиме поспешује развој АП код ових експерименталних животиња (149). Са друге стране, регрутација моноцита у току АП је регулисана хемокинима, попут CCL-2 (енгл. *Chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2), CCL3 и CCL5 (149). Експерија ових хемокина се повећава у првим сатима након индукције болести и у почетку их секретују ацинусне ћелија (149).

1.2.2.1. Неутрофили

У физиолошким условима неутрофили нису присутни у панкреасу (150). Ослобађање инфламацијских медијатора из ацинусних ћелија активира урођене имунске механизме на месту инфламације. Неутрофили су прве ћелије које инфилтришу место упале, након чега следи инфилтрација моноцита / макрофага и лимфоцита (151).

Накупљање неутрофила на место запаљења је један од обележја ране фазе АП (151). Неутрофили настају у коштаном сржи и у нормалним условима циркулишу у крви у току неколико сати, након чега подлежу апоптози. Неутрофиле подлеже апоптози фагоцитију макрофаги и дендритске ћелије. У току инфламацијског одговора, фактор стимулације гранулоцитних колонија или G-CSF (енгл. *Granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) је главни стимулус за производњу неутрофила. Уједно, неутрофили

повећавају и свој животни век у циркулацији на неколико дана у току инфламације (152).

Да би доспели на место инфламације, неутрофили пролазе кроз васкуларни зид. Васкуларни ендотел се активира под дејством про-инфламацијских цитокина, као што су TNF- α , IL-1 β , и IL-17. То резултује појачаном експресијом P- и L-селектина, интегрина и протеина који припадају суперфамилији имуноглобулина попут интрацелуларног атхезионог протеина-1, ICAM-1 и васкуларног атхезионог молекула 1 (енгл. *Vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) (153). Као резултат, настаје постепена атхезија неутрофила (почетно причвршћивање, котрљање, па чврста атхезија неутрофила) на зидове крвних судова и трансендотелна миграција неутрофила (152). Активирани ендотелни зид излучује медијаторе, попут IL-8, који привлачи друге неутрофиле из циркулације (152).

У панкреасу активирани неутрофили доприносе даљем оштећењу стварањем слободних кисеоничких радикала, продукцијом протеолитичких (катепсина, еластазе и колагеназе) и липолитичких ензима (89). Продуковани медијатори из неутрофила доприносе даљој ендотелној дисфункцији и регрутацији других леукоцита (154). Такође, неутрофили продукцијом слободних кисеоничких радикала додатно активирају трипсиноген чиме се ствара *circulus vitiosus* и некрозе панкреаса (155, 156).

Неутрофили играју централну улогу у развоју локалних и системских компликација код тешке форме АП. Продукцијом слободних кисеоничких радикала и протеаза, инфилтришући неутрофили учествују у оштећењу панкреасног и плућног паренхима (155). Показано је да деплеција неутрофила ублажава експериментални АП (155).

Неутрофили доприносе имунском одговору ослобађањем екстраћелијских структура означених као NETs (енгл. *Neutrophil extracellular traps*, NETs). Примарна улога NET-ова је да ограниче инвазију и елиминишу патогене (157). NET-ови се састоје од глатких нити неутрофилне DNA и хистона заједно прекривених гранулираним протеинима (157). У *in vitro* условима, NET-ови се ослобађају током специфичне врсте смрти неутрофила, NET-озе (158); али и из активираних неутрофила (159). NET-ови се формирају као одговор на различите про-инфламацијске стимулусе, као што су TNF- α , IL-8 и LPS (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS) (160).

Прекомерно ослобађање NET-ова узрокује цитотоксичке ефекте. Неколико студија је показало да NET-ови учествују у оштећењу ткива (154, 160). Недавно су NET-ови откривени у инфламираном панкреасу миша и показано је да играју улогу у регрутовању неутрофила и активацији трипсиногена током експерименталног АП (161,

162). У недавној студији, уочено је да неутрофили могу прећи у лумен панкреатичног дуктуса где формирају NET-ове, опструишу дуктусе и поспешују развој панкреатитиса (163).

1.2.2.2. *Макрофаги*

Поред неутрофила, активирани макрофаги играју значајну улогу у АП. Макрофаги су главна ћелијска популација и од степена активације макрофага зависи тежина АП (164). Синтетишу про-инфламацијске цитокине, попут TNF- α , IL-1 и IL-6 (165); ослобађају азот-оксид и оштећују ендотел. Макрофаги регрутују и друге ћелије имунског система на место упале (146).

Резидентни макрофаги су присутни у свим ткивима, где фагоцитују мртве ћелије, ћелијске остатке и страни материјал и регулишу процес инфламације. Током инфламације, циркулишући моноцити пореклом из коштане сржи регрутују се у ткива где диференцирају у макрофаге (166). Макрофаги мигрирају кроз зид крвних судова уз помоћ атхезивних молекула, слично као и код неутрофила (153). Накупљање моноцита у паренхиму панкреаса је регулисано медијаторима које ослобађају оштећене ацинусне ћелије. Хемокини, попут CCL2, CCL3 и CCL5 активирају моноците (150). Као резултат настаје повећана продукција IL-1, IL-6 из активираних макрофага, као и експресија ICAM-1 на васкуларном ендотелу што потпомаже прогресији болести (146).

Друге популације макрофага изван панкреаса играју важну улогу у прогресији АП, посебно у развоју системске инфламације. У тешкој форми АП, перитонеални макрофаги се брзо активирају под дејством ослобађањих панкреасних ензима и цитокина. Затим, активирани перитонеални макрофаги продукују про-инфламацијске медијаторе, попут TNF- α , IL-1 β , IL-6; повећава се активност ензима као што је азот-оксид синтетаза (енгл. *Nitric oxide synthase*, iNOS) у перитонеалним макрофагима са последичним ослобађањем азот-оксида што поспешује развој системског инфламацијског одговора у тешкој форми АП (167, 168).

Активирани алвеоларни макрофаги продукују цитокине, азот-оксид и хемокине, што узрокује регрутацију неутрофила у алвеоларне просторе и настанак акутног респираторног дистрес синдрома (146). У току тешке форме АП се ослобађају инфламацијски медијатори и панкреасни ензими који путем системске циркулације доспевају до јетре где активирају *Kupffer*-ове ћелије, резидентне макрофаге јетре (169). Активиране *Kupffer*-ове ћелије продукују про-инфламацијске цитокине и играју битну

улогу у ширењу инфламације ван панкреаса и настанак системске инфламације. Показано је да изостајањем активације *Kupffer*-ових ћелија, изостаје и оштећење плућног паренхима у експерименталном АП (169).

1.2.2.3. Друге ћелије урођене имуности

Дендритске ћелије су ћелије урођене имуности које могу да промовишу али и да супримирају акутну инфламацију (146). Ове ћелије су најмоћније антиген-презентујуће ћелије и покрећу како урођени, тако и стечени имунски одговор. Незреле дендритске ћелије циркулишу у телу и детектују PAMPs и DAMPs молекуле преко PRRs рецептора експримираних на површини ових ћелија. Након активације, дендритске ћелије мигрирају у оближње лимфне чворове, обрађују антиген и презентују га Т лимфоцитима.

У току експерименталног АП, број дендритских ћелија се значајно повећава у панкреасу где играју двојаку улогу. Наиме, дендритске ћелије поспешују инфламацију панкреаса продукцијом бројних про-инфламацијских медијатора, попут IL-6, TNF- α и CCL2. Са друге стране, показано је да су дендритске ћелије неопходне за вијабилност панкреаса јер елиминишу штетне продукте оштећења ацинусних ћелија, тако да деплеција ове ћелијске популације има за последицу потпуну некрозу егзокриног дела панкреаса (170).

Мастоцити су врста гранулоцита локализованих претежно у кожи, слузокожи и у околини крвних судова. Након активације пролиферишу на месту инфекције и ослобађају вазоактивне медијаторе, као што је хистамин; потом разне про-инфламацијске медијаторе, укључујући хемокине; али и протеолитичке ензиме. Мастоцити су обично укључени у развој алергијских реакција и анафилаксије. Ове ћелије фагоцитују бактерије и играју важну улогу у раном одговору у току бактеријске инфекције секретовањем хемоатрактаната и регрутацијом неутрофила (171). Током експерименталог АП, мастоцити се активирају и узрокују дисфункцију ендотела панкреаса и удаљених органа, пре свега у плућима и колону (172).

NK ћелије (енгл. *Natural killer*, NK) су саставни део урођеног имунског одговора и играју значајну улогу у елиминацији ћелија инфицираних вирусом и туморских ћелија (107). Показано је да се NK ћелије активирају у раној фази SIRS-а у току хуманог АП и ослобађају значајне количине TNF α и IL-6. Описано је да NK ћелије повишено експримирају TLR4 код пацијената са АП који се компликује SIRS-ом, те повишена

експресија овог рецептора узрокује повећану реактивност НК ћелија након контакта са бактеријским ендотоксином (173).

1.2.2.4. Лимфоцити

Код пацијената са тешком формом АП и присутном мултиорганском инсуфицијенцијом, број Т лимфоцита у периферној крви се значајно смањује (174). У експерименталним условима је показано да Т лимфоцити инфилтришу ткиво панкреаса у првим данима након индукције болести (175). Т лимфоцити погоршавају инфламацију панкреаса продукцијом IFN- γ (енгл. *Interferon-gama*, IFN- γ) и додатне активације макрофага (175). Поред активације макрофага и секреције про-инфламацијских медијатора, Т лимфоцити делују директно цитотоксички на ацинусне ћелије интеракцијом Fas лиганда на Т лимфоцитима и Fas рецептора на ацинусним ћелијама и тако поспешују оштећење паренхима панкреаса (175). Деплеција Т лимфоцита смањује тежину експерименталног панкреатитиса што је праћено нижим вредностима хидролаза у серуму, мањим едемом, инфилтратом и некрозом панкреаса (175).

Demols и сарадници су показали да су Т лимфоцити прустни у нормалном панкреасу али да током АП појачано инфилтришу панкреас. Показано је да се број CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у панкреасу повећава током првих сати након индукције експерименталног АП, са преминацијом помагачких CD4⁺ Т лимфоцита (175). Миграција ових лимфоцита је регулисана хемокинима, попут MCP-1 (енгл. *Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), лимфотактина и IP-10 (енгл. *IFN- γ -inducible protein 10*, IP-10) (175). Активирани макрофаги производе IL-1 који даље активира Т лимфоците и узрокује диференцијацију ових ћелија (148, 176).

1.2.3. TLR-4 и акутни панкреатитис

Основна карактеристика имунског система је способност препознавања конзервисаних структура микроорганизама. Имуни систем препознаје структуре есенцијалне за преживљавање микроорганизама, а којих нема у хуманим ћелијама. Класичан пример је липополисхарид (LPS), молекула кога стварају *Gram*-негативне бактерије, али не и еукариотске ћелије.

Структуре микроорганизама детектује имунски систем и покреће имунски одговор против патогена, а уједно се активира и стечени имунски одговор (177). Поменути молекули су означени као молекулски обрасци патогена (PAMPs) и њих препознају рецептори означени као PRRs који припадају урођеном имунском систему. PRRs рецептори су значајне компоненте имунског система и нађени су код свих сисара, бескичмењака и код биљака. PRRs су експримирани на ћелијској мембрани, у интраћелијским одељцима, секретују се у крвоток и екстраћелијски матрикс (177). Међутим, улога PRRs није везана само за PAMPs молекуле, већ ови рецептори препознају и алармине (178). Алармини су ендогени молекули који се ослобађају из активираних или некротичних ћелија као одговор на стрес или оштећење ткива (179). Чак и екстраћелијски молекули су алармини када су појачано експримирани или деградирани након оштећења ткива (180).

Код мишева је до данас идентификовано дванаест TLRs рецептора и то од TLR1 до TLR9, и TLR11 до TLR13. Код људи је присутно десет TLRs (TLR1 до TLR10). Лиганди су идентификовани за све хумане TLRs, сем за TLR10 (178). TLRs припадају типу I трансмембранских гликопротеина и састоје се из екстраћелијског N-терминалног домена који садржи понављајуће секвенце богате леуцином, трансмембранског домена и интраћелијског C-терминалног домена означен као TIR домен (енгл. *Toll/IL-1 receptor*, TIR) (181).

TLR-4 је први идентификован међу члановима TLR фамилије и експримиран је на плазма мембранама бројних ћелија имунског система, пре свега на макрофагима и дендритским ћелијама (182). TLR-4 детектује неколико различитих PAMPs и DAMPs молекула, попут LPS, фибриногена и различитих *heat shock* протеина (177).

Индукцијом експерименталног АП, експресија TLR-4 је повишена на епителним ћелијама дуктуса и у микроциркулацији панкреаса, али не и на ацинусним ћелијама (183). Индукцијом болести код мишева дефицијентних за TLR-4 развија се лакша форма АП, која се карактерише нижим вредностима серумских амилаза и мањом активношћу пероксидазе у панкреасном паренхиму што је знак смањење инфилтрације неутрофила. Некроза ацинусних ћелија, едем и хеморагија панкреаса су значајно смањени код ових мишева (184).

У току АП се ослобађају DAMPs молекули које препознаје TLR-4. То се пре свега односи на панкреасну еластазу која се везује за TLR-4 и као резултат активира NF-κB и појачава секрецију TNF-α (185). У току АП, деградирају се и компоненте екстраћелијског матрикса. Деградацијом хијалурона настају полисахариди мале

молекуске тежине који активирају дендритске ћелије везивањем за TLR-4 и стимулишу продукцију про-инфламацијског цитокина, TNF- α (186).

TLR-4 игра важну улогу и у оштећењу плућа. Након индукције болести, експресија TLR-4 је значајно повишена у плућном паренхиму што је праћено повећаном продукцијом TNF- α (187). TLR-4 учествује у оштећењу плућног паренхима услед ендотоксемије која се развија у току тешке форме АП (188).

Показано је да се експресија TLR-4 повећава на хуманим моноцитима из периферне крви на почетку болести и да се вредности нормализују након недељу дана. Уједно је показано да је пораст експресије у корелацији са повећаном продукцијом TNF- α и IL-6 (189).

Улога TLR-4 је посебно наглашена у развоју алкохолног панкреатитиса (190). Етанол узрокује повећану пропустљивост интестиналног епитела што резултира повећаном транслокацијом бактерија у циркулацију. Следи везивање LPS-а за TLR-4 експримиран у паренхиму панкреаса и активација NLRP3 инфлазома. То све резултира повећаном продукцијом про-инфламацијских цитокина у паренхиму панкреаса, који затим повећавају пермеабилност интестиналног епитела и погоршава ток АП. Полиморфизам TLR-4 гена је идентификован као фактор ризика за развој акутног панкреатитиса (191).

1.2.4. Поремећај пермеабилности интестиналне баријере

Основни патогенетски механизам АП је оштећење ацинусних ћелија узроковано прераном активацијом трипсиногена и ослобађање DAMPs молекула. DAMPs се затим везују за PRRs рецепторе на ћелијама имунског система и стимулишу продукцију цитокина који повећавају пермеабилност зида дигестивног тракта. Настаје транслокација коменсалних микроорганизама из дигестивног тракта у циркулацију и активирање NOD1 рецептора (енгл. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*, NOD1) и TLR-4 на ћелијама имунског система. Као крајњи резултат настаје активација транскрипционог фактора NF- κ B и повећана продукција про-инфламацијских цитокина (192).

Некроза панкреаса је локална компликација болести која повећава ризик инфекције панкреаса и стопу морталитета. Колонизација некротичног ткива панкреаса бактеријама је последица оштећене интестиналне баријере и транслокације интестиналне микрофлоре у сплахничку циркулацију (133).

Акутни панкреатитис карактерише инфламација која брзо мења пермеабилност интестиналног епитела и поспешује транслокацију интралуминалних бактерија у циркулацију. Као резултат настаје експозиција ацинусних ћелија и ћелија имунског система про-инфламацијским продуктима микроорганизама из дигестивног тракта (193). Ово је један од основних механизма за одржавање инфламације панкреаса након почетка болести (193).

Li и сарадници (194) су показали да се полимикробна бактеријска DNA може детектовати у циркулацији код скоро 70% пацијената са акутним панкреатитисом, док је овај проценат и већи код пацијената са тешком формом АП. Већина микроорганизама је слична микроорганизмима из гастроинтестиналног тракта, те се сматра да потичу из лумена црева. У већини случајева бактерије су коменсални микроорганизми, али су код пацијената са тешком формом болести са некрозом панкреаса изоловане и патогене бактерије (194). Механизам повећане пермеабилности интестиналног епитела није довољно проучен, али се претпоставља да је посредован цитокинима ослобођеним током развоја АП, јер се код других инфламацијских болести дигестивног тракта пермеабилност епитела не мења значајно. Осим регулације ћелијске апоптозе, TNF- α повећава интестиналну параћелијску пермеабилност, деловањем на чврсте везе међу ћелијама и олакшава бактеријску транслокацију кроз епител (195, 196).

У експерименталним студијама је показано да ентеричке бактерије детектоване у мезентеричним лимфним нодусима могу инвадирати ткиво панкреаса (197). Стерилизација црева антибиотцима смањује инфламацију и инфекцију панкреаса, као и смртност у различитим експерименталним моделима панкреатитиса (198, 199).

1.3. СТРУКТУРА И КЛАСИФИКАЦИЈА ГАЛЕКТИНСКИХ МОЛЕКУЛА

Фамилија галектина се састоји од 15 чланова специфичних по најмање једном домену којим везују угљене хидрате (енгл. *Carbohydrate recognition domains*, CRDs). Ове молекуле експримирају различите ћелије, а унутар ћелије се налазе у различитим ћелијским одељцима: на ћелијској мембрани, у цитоплазми и једру. Галектини постоје и у секретованом облику у екстраћелијском простору (200). Први пут у су изоловани 1976. године из мишићног ткива кокошке, плућа и срца телета (201) и најпре су означени као лектини који везују галактозид (202) и лектини типа S (203). Именом галектини су први пут означени 1994. године. Галектине експримирају најједноставнији

микроорганизми, али и сложени, све до хуманих ћелија што указује да играју кључну улогу у основним ћелијским процесима неопходним за преживљавање (204). Галектини су укључени и у бројне процесе имунског одговора: поспешују препознавање патогена као и адхезију патогена за ћелије домаћина (205); регулишу секрецију цитокина (206); регулишу миграцију неутрофила, моноцита и дендритских ћелија кроз ендотел и екстраћелијски матрикс (207, 208); регулишу апоптозу Т и В лимфоцита (209).

Галектине карактеришу две кључне особине: везивање за аминокиселине јединице гликана и конзервирана структура домена којим препознају угљене хидрате или CRD домен. CRD домени се састоје од око 130 аминокиселинских остатака (210). Кристалографија ових домена је открила присуство високо конзервираних сендвич навоја који образују две дугачке β набране плоче. Ова β -сендвич структура креира пукотину где се везују гликани (211).

Галектини су подељени у три типа (Слика 3) (212):

Прототип (галектини 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 и 15): нековалентно повезани хомодимери који садрже два домена за препознавање угљених хидрата,

Тандемско поновљени тип (енгл. *Tandem-repeat*) (галектини 4, 6, 8, 9 и 12): поседују два различита домена за препознавање угљених хидрата спојена кратким пептидом,

Химера тип (енгл. *Chimera*) (само галектин 3): поседује само један домен за препознавање угљених хидрата и нелектински домен који је богат пролином, глицином и тирозином и лоциран на N-терминусу (213).

		
Прототип (димер) 2 идентична CRDs Галектин-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15	<i>Tandem-repeat</i> тип 2 различита CRDs Галектин-4, -8, -9, -12,	<i>Chimera</i> тип 1 CRDs или мултипли идентични CRDs Галектин-3

Слика 3. Класификација галектинских молекула. На основу структуре, сви молекули галектини су подељени: 1) *proto*- тип: садрже један CRD регион и могу да димеризују, 2) *tandem-repeat*- тип: садрже по два различита CRD региона, 3) *chimera*-тип галектина: садрже не-лектински сегмент и један CRD регион.

(Модификовано према Chang WA et al. *Oncol Lett.* 2017; 14(5):5077-5084).

1.3.1. Експресија и функција галектина

Поједине галектине експримирају сви типови ћелија, док су други присутни само у појединим органима или ћелијама, при чему је за сваког члана фамилије галектина карактеристичан јединствени образац експресије. Галектин 1 и 3 су експримирани убиквитарно, док је експресија других чланова галектинске фамилије углавном ограничена на ткиво: галектин 2 је присутан само у дигестивном епителу (214), а галектин 7 у епидермису (215). Галектини су експримирани у већини ћелија урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, NK ћелије, $\gamma\delta$ T лимфоцити и B-1 лимфоцити), као и у ћелијама стечене имуности (активирани B и T лимфоцити) (216, 217).

Синтеза галектина почиње на слободним рибозомима у цитоплазми (218, 219). Синтетисани галектини могу остати у цитоплазми где регулишу различите интраћелијске процесе (220). Тако, на пример, интраћелијски галектин 3 спречава ослобађање цитохрома C из митохондрија и тако инхибира апоптозу (221), али може везати и цитоплазматски β -катенин и регулисати Wnt сигнални пут (222).

Основна карактеристика свих галектина је способност везивања галактозе, док су поједини типови галектина специфични и за различите олигосахариде (223, 224). Након везивања галактозе или олигосахарида, CRD домен подлеже конформацијским променама и прилагођава се структури олигосахарида (223, 225). Углавном, галектини повезују два гликопротеина, али понекад могу везати велики број гликопротеина и тако настају мултивалентни комплекси у форми решетке (200). Галектини унакрсним повезивањем трансмембранских рецептора могу покренути сигналну каскадну трансдукцију и тако регулисати основне ћелијске процесе, попут пролиферације, диференцијације, продукције цитокина и апоптозе (210, 213).

Функција екстраћелијских галектина је повезана са ензимима гликозилтрансферазе (226). У различитим фазама диференцијације и активације, ћелије појачано секретују гликозилтрансферазе које потом реагују са гликопротеинима и појачава експресију гликокоњугата на ћелијској мембрани за које се везују галектини (216, 226, 227). Са друге стране, функција интраћелијских галектина не зависи само од повезивања са угљено-хидратним доменима у гликопротеинима. Недавне студије су приказале да се интраћелијски галектини могу директно везати за различите протине који чине део интраћелијских сигнала и тако регулишу различите ћелијске процесе (226).

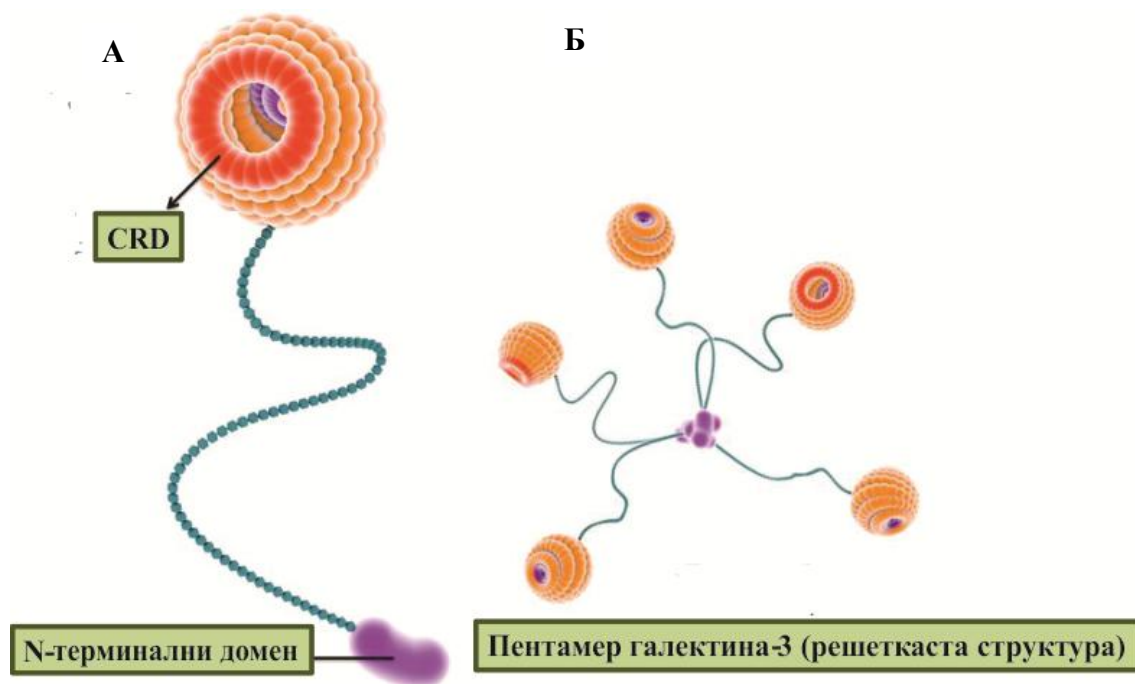
Галектини су укључени у различите биолошке процесе, као што су пост-транскрипциона обрада информационе рибонуклеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*, RNA), ембриогенеза, ћелијска адхезија и пролиферација, модулација апоптозе, колонизација бактерија, вирусне инфекције и регулацију имунског одговора (227). Бројне студије су указале на кључну улогу галектина у бројним патолошким стањима, укључујући улогу у инфламацији, аутоимунским болестима, алергијским реакцијама, атеросклерози, типу 2 *Diabetes mellitus*-а и онкогенези (216).

Експресија галектина је различита у процесу ембриогенезе, приликом диференцијације ћелија, али и у различитим физиолошким или патолошким стањима (228). Показано је да у процесу ембриогенезе галектин 1 и галектин 3 код глодара регулишу развој нотохорде, централног нервног система и мишићног ткива (229). Позната је улога галектина у регулацији урођене и стечене имуности (230).

1.3.2. Структура галектина 3

Галектин 3 (енгл. *Galectin-3*, Gal-3) је лектински молекул и убиквитарно је експримиран. Овај молекул је величине око 29-35-kD. Иницијално је идентификован као површински антиген експримиран на ћелијској мембрани макрофага изолованих из перитонеума миша и означен као Mac-2 протеин. Касније је означен и као CBP-35 протеин (енгл. *carbohydrate-binding protein* величине 35-kDa, CBP-35) изолован из мишићних фибробласта; εBP (енгл. *ε-binding protein*, εBP) изолован из леукемичних ћелија пацова; RL-29 (енгл. *29-kDa lectin in rat lung tissue*); HL-29 (енгл. *29-kDa lectin in human lung tissue*); L-34 (лектин од 34-kDa) и LBP (енгл. *non-integrin laminin binding protein*) (231). Накнадном анализом је откривен висок степен хомологије ових молекула између различитих врста, те је 1994. године коначно означен као галектин 3 (203).

Галектин 3 има јединствену структуру (химера тип галектина) по чему се разликује од осталих галектина код кичмењака (204). На основу структуре, овај лектин се састоји од три различита домена (слика 4): кратког N-терминалног домена који се састоји од 120 аминокиселина и игра улогу у преносу сигнала; други домен је сличан колагену и садржи глицин, пролин и тирозин. Овај део молекула Gal-3 је супстрат за матриксне металопроотеиназе и обезбеђује стабилну структуру молекула галектина 3. C-терминални домен се састоји од 130 аминокиселина у коме се налази место за



Слика 4. Структура галектина 3. А. Молекул галектина 3 карактерише присуство не-лектинског сегмента спојеног са једним CRD регионом. Б. Полимеризација галектина 3 и формирање пентамера.

(Модификовано према *Suthahar N et al. Theranostics. 2018; 8(3):593-609*)

угљених хидрата (CRD домен) (203, 232, 233). У процесу везивања олигосахарида заједно са CRD регионом учествује и N-терминални домен преко тирозина на позицији 102 и суседних аминокиселина (234). Поред тога, N-терминални домен након везивања угљенохидратних лиганата учествује у олигомеризацији молекула галектина 3 и формирање пентамера. На овај начин се повезују гликани на површини ћелије што омогућава активацију сигналних путева у ћелији (235). Молекул Gal-3 деградирају и инактивирају ензими: колагеназе и матрикс металопроотеиназе MMP-2 и MMP-9 (енгл. *Matrix Metalloproteinase*, MMP) (236).

Галектин 3 се везује високим афинитетом за молекуле који садрже поли-N-ацетил-лактозамине (237, 238). Неки од познатих лиганата за Gal-3 на површини ћелије и/или у екстраћелијском матриксу су: фибронектин, интегрини, ламинин, витронектин, еластин и протеин који везује Mac-2 (237, 239, 240). Лиганди галектина 3 у цитоплазми и једру су: Vcl-2, K-Ras и annexin VII (240). Gal-3 везан за екстраћелијске домене интегрин активира или инактивира их и тако мења њихов афинитет за различите екстраћелијске молекуле (241). Потенцијални лиганди за Gal-3 су и мембрански протеини повезани са лизозомима- Lamp 1 и 2 (енгл. *lysosomal associated membrane proteins* 1 и 2, Lamp)

(242). Ови протеини се углавном налазе на мембрани лизозома и ретко се могу наћи на спољашној мембрани нормалних ћелија, док је њихова експресија повећана на површини малигнућих ћелија, посебно код метастаза (242).

Недавне студије су показале да је Gal-3 лиганд за TLR-4 рецептор. У експерименталним моделима неуроинфламације је показано да микроглија ЦНС-а секретује Gal-3 који се паракрино везује за TLR-4 експримиран на површини суседних микроглија и узрокује класичну активацију ових ћелија са појачаном продукцијом про-инфламацијских цитокина (243). Слично је детектовано код трауме мозга где Gal-3 игра улогу алармина, везује се за TLR-4 рецептор и доприноси развоју неуродегенерације (244). Примена антитела против Gal-3 у експерименталном моделу трауме мозга је праћена мањом продукцијом про-инфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) и делује неуропротективно у кортикалним и хипокампаљним регијама ЦНС (244). Gal-3 се везује за TLR-4 рецептор на површини ћелија аденокарцинома плућа узрокујући активацију интраћелијске сигналне каскаде и пролиферацију ових ћелија (245).

Овај лектин је експримиран на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система, при чему може бити присутан у једру, цитоплазми, митохондријама, али се може наћи и на површини ћелија везан за гликокоњугате, док се у секретованом облику може наћи у ткивним течностима. Дистрибуција Gal-3 у ћелијама зависи од бројних фактора: типа ћелије, пролиферативног статуса (246) и малигне трансформације (247). Gal-3 конститутивно експримирају моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, еозинофили и мијелоидне ћелије, док га В и Т лимфоцити експримирају тек након активације (248).

Синтеза Gal-3 почиње на слободним рибозомима у цитоплазми и не транспортује се у ендоплазматски ретикулум (238). Иако пут синтезе Gal-3 не иде преко ендоплазматског ретикулума и Голџијевог апарата, ипак се може наћи екстраћелијски. Gal-3 се секретује непознатим механизмом, највероватније ектоцитозом, процесом који не зависи од транспорта у ендоплазматски ретикулум и Голџи комплекс (238, 249). Један од могућих начина секреције Gal-3 је везивање за липиде мембране и пролазак директно кроз фосфолипидни двослој (250). Са друге стране, показано је да Gal-3 најпре улази у везикуле везан за гликопротеине ових везикула, потом следи фузија ових везикула са ћелијском мембраном и тако Gal-3 доспева у екстраћелијски простор (251).

Ген за Gal-3 се састоји из шест егзона и пет интрона лоцираних на кратком краку хуманог 14. хромозома (252, 253).

Овај протеин је јединствен у фамилији галектина, поред тога што има специфичну химеричку структуру, тиме и што има један додатно дугачак и флексибилан N-терминални домен. Овај домен је састављен од кратких понављајућих аминокиселинских низова (од око 12 аминокиселина) богатих пролином, глицином и тирозином и по структури је сличан колагену- α (238, 252-254). На N-терминусу, и то у пределу прве високо конзервиране секвенце од 12 аминокиселина је лоцирано место за фосфорилацију серина (255). У овом домену се налазе и друга места која су важна за функцију галектина, попут места које учествују у неklasичној секрецији лектина (203). Показано је да делеција првих 11 аминокиселина блокира секрецију Gal-3 (233). Тирозин смештен на позицији 102 и суседне аминокиселине заједно са CRD доменом учествују у препознавању и везивању угљено-хидратних лиганда (234). У присуству мултивалентних лиганда, молекули галектина 3 се, захваљујући својим N терминалним доменима, удружују у пентамере формирајући решеткасту структуру, чиме се активирају интраћелијски сигнали и појачано експримирају различити гени (200). Овај домен је сличан колагену- α и садржи место деловања колагеназа, MMP-2 и MMP-9 и тако деградирају молекул Gal-3 (256). N-терминални домен игра важну улогу у регулацији апоптозе. Уколико се замени серин на позицији 6 (конзервирана позиција) ремети се антиапоптотску активност Gal-3 (257).

C-терминални крај Gal-3 чини, као и код осталих галектина, лектински домен за препознавање угљених хидрата или CRD домен. Овај домена чини 135 аминокиселина које формирају глобуларну структуру. Ова структура се састоји из две анти-паралелне β -плоче са по 5-6 β -ланаца који формирају удубљење за везивање угљених хидрата (258). Након везивања овог дела са гликокоњугатима настају промене конформације молекула Gal-3 у близини везујућег места (210, 259). Такође, овај домен игра важну анти-апоптотску улогу јер садржи високо конзервиран мотив NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) који је структурно сличан VH1 домену V α 1-2 фамилије протеина укључених у процес апоптозе (260).

1.3.3. Улога галектина 3 у контроли биолошких процеса

Галектин 3 је молекул присутан је у бројним ћелијама, али и екстраћелијски. У ћелији је присутан у једру, цитоплазми, митохондријама и на површини ћелије где се налази везан за гликокоњугате. Транслокација Gal-3 из цитоплазме у једро је посредована N-терминалним доменом. За транслокацију из једра у цитоплазму неопходна је

конзервирана секвенца у CRD домену и овај процес се довија се кроз нуклеопорин NP98 (261). Као што је наглашено, секреција Gal-3 у екстраћелијски простор се такође одвија преко N -терминалног домена (262).

Једарни Gal-3 игра улогу у пост-транслацијској обради информационе RNA (енгл. *mRNA splicing*)(263) . Једарни Gal-3 везује рибонуклеопротеине (264), Gemin 4 (енгл. *gem nuclear organelle associated protein 4*, Gemin 4) (265); транскрипционе факторе CREB (енгл. *cAMP response element-binding*, CREB) и Sp1 (енгл. *specificity protein 1*, Sp1) (266); као и β -катенин (267). Gal-3 гради комплексе са рибонуклеопротеинима и протеином Gemin4 у циљу формирања *spliceosome*-а који учествује у обради пре-информационе RNA (268). На тај начин једарни Gal-3 модулише ћелијски циклус и пролиферацију кроз регулацију транскрипције гена (266). Такође, једарни Gal-3 регулише експресију гена тако што олакшава везивање транскрипционе фактора за Sp1 and CRE секвенце генских промотера (240). Показано је да се галектин 3 у једру везује за β -катенин који улази у састав Wnt сигналног пута (269).

У цитоплазми Gal-3 стимулише пролиферацију, регулише ћелијску диференцијацију и инхибира апоптозу везујући се везује за анти-апоптотски Bcl-2 протеин. Уједно, Gal-3 у цитоплазми интерагује са K-Ras протеином што даље активира киназе које припадају Raf-1/MEK/ERK сигналном путу (270).

Екстраћелијски Gal-3 учествује у интеракцији међу ћелијама, као и интеракцији ћелија са екстраћелијским матриксом (241). Укључен је у бројне биолошке процесе попут ћелијске адхезије, миграције, инфламције и канцерогенезе (213).

1.3.4. Регулација апоптозе

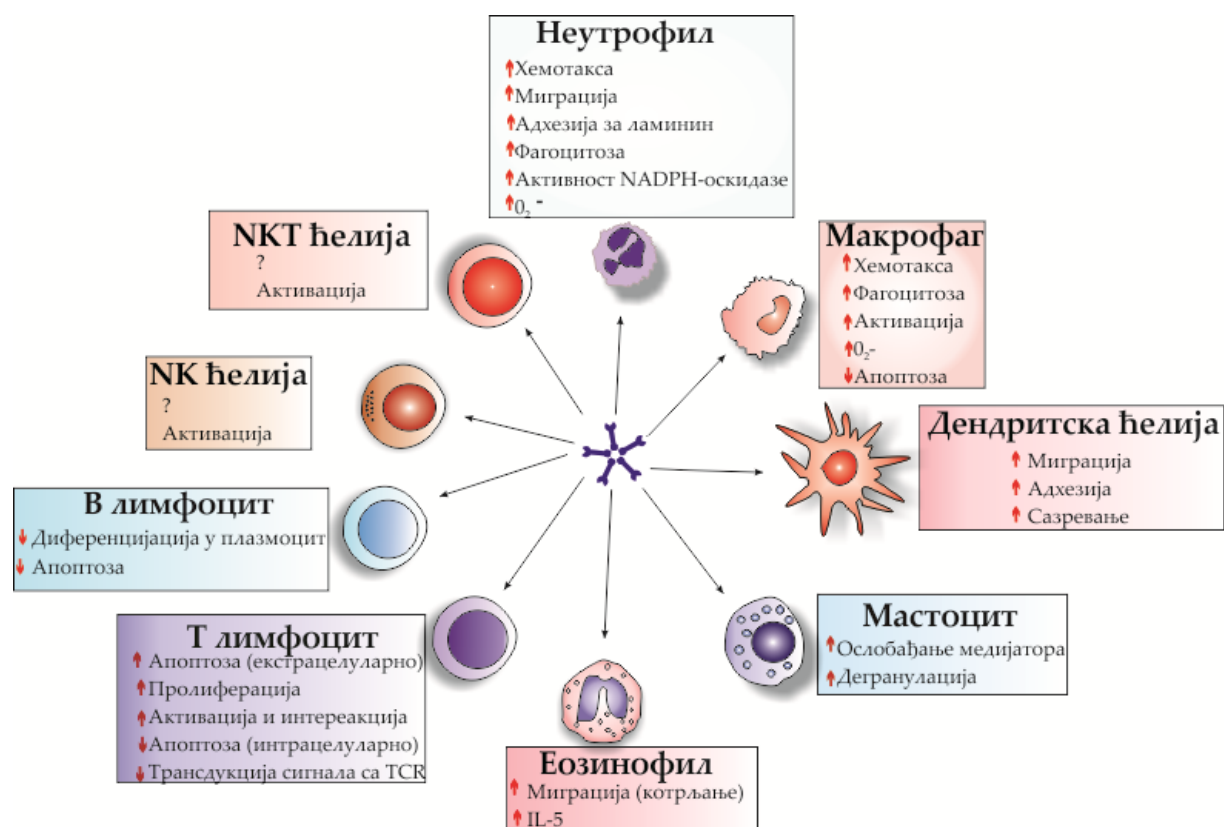
Gal-3 може играти двојаку улогу у регулацији апоптозе у зависности од локализације. Показано је да интраћелијски Gal-3 испољава антиапоптотски ефекат у бројним ћелијама (271, 272). Механизам антиапоптотског ефекта Gal-3 није у потпуности јасан. Сматра се да своју антиапоптотску улогу Gal-3 остварује тек након дејства проапоптотских сигнала када се концентрише у митохондријама уз помоћ протеина *synexin*-а (221). Обзиром да на C-терминусу садржи део хомологан антиапоптоском протеину Bcl-2, верује се да интеракција Gal-3 и Bcl-2 протеина је кључна за анти-апоптотску улогу овог лектина (260). За пуну антиапоптотску функцију неопходна је фосфорилација галектина-3 (257). Са друге стране, екстрацелуларни Gal-3 стимулише апоптозу (240).

1.3.5. Утицај Gal-3 на функције ћелија имунског система

Улога Gal-3 у регулацији бројних функција ћелија урођене и стечене имуности је приказана на слици 5.

1.3.5.1. Gal-3 и неутрофили

Показано је да хумани неутрофили експримирају Gal-3, док су подаци о експресији овог лектина у мишјим неутрофилима контрадикторни (273). У зависности од локализације, екстраћелијски или интраћелијски Gal-3 има различите ефекте на функцију неутрофила. Екстраћелијски Gal-3 се везује за $\alpha 1\beta 1$ интегрин (274) и тако игра улогу у атхезији неутрофила. Показано је да рекомбинантни Gal-3 стимулише атхезију хуманих неутрофила за ламинин (275) и ендотелне ћелије (276), као и



Слика 5. Улога галектина-3 у регулацији функције ћелија имунског одговора.

дегранулацију неутрофила (277). Овај лектин функционише попут моста који повезује неутрофиле међусобно или са различитим компонентама екстраћелијског матрикса (240). Документовано је да Gal-3 поспешује миграцију и инфилтрацију неутрофила на месту инфламације у експерименталном моделу инфекције бактеријом *Streptococcus pneumoniae*, као и протозоом *L. major* (278, 279). У експерименталним инфестацијама паразитима је показано да интраћелијски Gal-3 стимулише стварање и ослобађање слободних кисеоничких радикала из неутрофила са циљем да се ограничи раст паразита у акутној фази болести (280). N-терминални домен молекула Gal-3 је неопходан за активацију NADPH-оксидазе у неутрофилима и продукцију супероксидних радикала (281). Утврђено је да Gal-3 стимулише фагоцитозу неутрофила (282, 283). Gal-3 учествује у опсонизацији апоптотских неутрофила приликом њиховог уклањања (282). Интраћелијски Gal-3 је неопходан неутрофилима да фагоцитују гљивицу *Candida albicans* и *Candida parapsilosis* (283). Gal-3 регулише и процес апоптозе неутрофила. Раније студије су показале да овај молекул промовише апоптозу неутрофила (216, 284). Међутим, у експерименталном моделу инфестације *T. gondii* је уочено да Gal-3 повећава вијабилност неутрофила тако што је уључен у процес одлагања спонтане апоптозе ових ћелија урођене имуности (285). Показано је да се Gal-3 унакрсно везује за CD66 рецептор на површини неутрофила и стимулише секрецију IL-8, хемокина који поспешује инфилтрацију неутрофила на месту инфламације (286). Интеракција Gal-3 и LPS у току бактеријске инфекције важна је за комплетну активацију неутрофила (287).

1.3.5.2. Gal-3 и макрофаги

Иницијално је Gal-3 откривен као маркер за обележававање активираних макрофага (288). Активирани макрофаги експримирају и продукују значајне количине Gal-3 (289). Показано је да експресија овог лектина значајно расте приликом диференцијације моноцита у макрофаге, док је приликом диференцијације моноцита у дендритске ћелије експресија Gal-3 смањена (289, 290). Познато је да Gal-3 учествује у хемотакси и миграцији моноцита и макрофага кроз ендотел капилара и посткапиларних венула (200). Поменути ефекат се вероватно остварује везивањем за рецепторе удружене са G протеином на површини макрофага, што резултује повећањем интрацелуларне концентрације јона Ca^{2+} . Овај лектин посредује у везивању моноцита и макрофага за фибронектин екстраћелијског матрикса, што стимулише миграцију ових ћелија урођене

имуности (291). Gal-3 је неопходан за нормалну фагоцитну активност макрофага и детектован је у фагозомима ових ћелија (292). Gal-3 игра круцијалну улогу у макрофагној фагоцитози апоптотских ћелија и материјала који је опсонизован IgG молекулима (292). Такође је уочено да је формирање фагоцитне капе и фагозома контролисано Gal-3 из цитоплазме (292). У *in vitro* условима је утврђено да Gal-3 стимулише алтернативну активацију макрофага (293). Макрофаги изоловани из коштане сржи Gal-3-дефицијентних мишева након стимулације LPS продукују значајне количине TNF α и IL-6. Са друге стране, макрофаги изоловани из коштане сржи Gal-3-позитивних мишева, а потом стимулирани LPS продукују веће концентрације IL-4 и IL-13, што је карактеристика алтернативно активираних или M2 макрофага (293). Екстраћелијски Gal-3 стимулише макрофаге да секретују IL-1 β , што је карактеристика класично активираних или M1 макрофага (288). Овом лектину се приписује и имуномодулативна функција јер инхибира секрецију IL-12 из макрофага и следствено развој Th1 имуноског одговора (280). Позната је и чињеница да Gal-3 посредује у интеракцији између моноцита и формирање мултинуклеарних цитовских ћелија карактеристичних за хроничне инфламацијске процесе праћене фиброзом (294). Слично као и код неутрофила, Gal-3 се везује за рецепторе на површини макрофага и стимулише продукцију и ослобађање слободних кисеоничких радикала (295). Показано је да су перитонеални макрофаги Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са макрофагима изолованих из мишева дивљег соја подложнији апоптози која је индукована помоћу липополисахарида и IFN- γ (296).

1.3.5.3. Gal-3 и T лимфоцити

Gal-3 је укључен у адхезији лимфоцита за екстраћелијски матрикс интеракцијом L-селектина (297). Екстраћелијски Gal-3, такође, активира T лимфоците и поспешује ослобађање медијатора запаљења, цитокина и супероксидних радикала (298, 299). Познато је да се Gal-3 везује на површини T лимфоцита за T ћелијски рецептор (енгл. *T-cell receptor*, TCR). Наиме, на површини T лимфоцита Gal-3 формира структуру решетке заједно са TCR, чиме повећава праг активације овог рецептора и негативно утиче на трансдукцију сигнала (300). Овај лектин игра значајну улогу и у диференцијацији T лимфоцита. Ефекат Gal-3 на апоптозу T лимфоцита зависи од његове локализације. Тако, ендогени Gal-3 игра анти-апоптотску улогу, док екстраћелијски стимулише апоптозу T лимфоцита (298). Уједно, интраћелијски Gal-3 игра улогу

позитивног регулатора раста Т лимфоцита (301), док егзогено примењен Gal-3 ихибира пролиферацију Т лимфоцита из периферне крви, те тако негативно утиче на раст ових лимфоцита (302).

1.3.5.4. Gal-3 и друге ћелије имунског система

Gal-3 посредује у атхезији дендритских ћелија за протеине екстраћелијског матрикса (297). Екстраћелијски Gal-3 игра улогу у процесу ангиогенезе. Показано је да Gal-3 стимулише стварање капиларне тубе у *in vitro* и *in vivo* условима (297).

Уопштено, Gal-3 је снажан про-инфламацијски стимуланс (240, 303). Екстраћелијски Gal-3 учествује у активацији и вијабилности ћелија имунског система. Gal-3 активира мастоците, неутрофиле, моноците и Т лимфоците што резултује ослобађањем медијатора запаљења, супероксидних анјона и цитокина (216, 284). Међутим, показане су и имуносупресивне улоге овог лектина. Наиме, Gal-3 индукује апоптозу моноцита и Т лимфоцита, супримира продукцију IL-15 и инхибира диференцијацију В лимфоцита у плазмоците (304, 305). Ефекат на диференцијацију В лимфоцита је посредован везивањем Gal-3 за транскрипцијски фактор Blimp-1 (енгл. *B lymphocyte-induced maturation protein 1*, Blimp-1) чиме се смањује активност овог транскрипционог фактора, те В лимфоцити мање диференцирају у плазмоците (306). Поред тога, Gal-3 игра значајну улогу и у диференцијацији макрофага и Т лимфоцита. Током диференцијације макрофага, повећава се експресија Gal-3, док супротно, експресија Gal-3 је смањена приликом диференцијације дендритских ћелија из прекурсора (290).

Gal-3 смањује продукцију IL-5 у хуманим еозинофилима (307). Gal-3 активира фагоците и појачава им фагоцитну и микробицидну способност. Показано је да Gal-3 функционише као опсонин и рецептор који препознаје молекулске обрасце оштећених ћелија (DAMP) и микроорганизама (PAMP) као што су *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* и *Trypanosoma cruzi* (308, 309). Експресија овог молекула у дендритским ћелијама утиче на поларизацију имунског одговора (310, 311). Одсуство Gal-3 појачава и Th1, али и Th2 имунски одговор у зависности од експерименталног модела (312). Gal-3 стимулише продукцију IL-1 β (248) као и кисеоничких радикала у макрофагима (289).

1.3.6. Експресија Gal-3 у панкреасу

Супрамаксималне дозе холецистокининског аналога, церулеина, код мишева узрокују едематозну форму АП и оштећење ацинусних ћелија које углавном подлежу апоптози (313). У физиолошким условима, Gal-3 је експримиран само у дукталним епителним ћелијама, али не и у ацинусним ћелијама (313). Након индукције АП церулеином, Gal-3 се местимично експримира и у ацинусним ћелијама. Током инфламације и регенерације, експресија Gal-3 се повећава у ацинусним ћелијама које подлежу апоптози. Посебно је Gal-3 појачано експримиран у дегенеративним структурама ацинусних ћелија које су означене као тубуларни комплекси, а ове структуре настају 48h након индукције болести (313). У истом временском периоду, експресија Gal-3 је појачана у паренхиму панкреаса и то у инфилтрату макрофага (313). Појачана експресија Gal-3 смањује апоптозу ацинусних ћелија у експерименталном моделу АП (313). Показано је да хумане дукталне и ацинусне ћелије панкреаса у нормалним условима експримирају Gal-3 (314).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је испитати улогу галектина 3 у патогенези акутног панкреатитиса користећи два експериментална модела:

- ❖ АП изазван подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса (БПД),
- ❖ АП изазван секвенцијалном интраперитонеалном применом церулеина и LPS.

У складу са основним циљем постављени су следећи конкретни задаци:

- Испитати утицај галектина 3 на преживљавање мишева са тешком формом АП;
- Утврдити утицај галектина 3 на развој АП на основу хистолошког скорa и биохемијских параметара, у два различита експериментална модела болести;
- Испитати утицај галектина 3 на тежину хистолошких промена у панкреасу, бубрезима и плућима одређивањем хистолошког скорa оштећења паренхима панкреаса, бубрега и плућа у експерименталном моделу АП; као и одређивањем серумских вредности амилаза и активности трипсина у ткиву панкреаса;
- Испитати утицај галектина 3 на састав леукоцитног инфилтрата као и фенотипске карактеристике леукоцита у ткиву панкреаса мишева оболелих од АП који је узрокован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса;
- Испитати утицај галектина 3 на експресију цитокина у моделу АП индукованог подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса;
- Испитати експресију галектина 3 у панкреасу, плућима и бубрезима мишева са АП индукованог подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса;
- Утврдити везу између галектина 3 и TLR-4 као могућег механизма настанка инфламације у панкреасу;
- Испитати утицај инхибитора TLR-4 рецептора на преживљавање мишева са АП индукованог подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ

Ова студија је спроведена на мишевима женског и мушког пола чистог соја C57BL/6 (енгл. *Wild Type*, WT) и на мишевима истог соја са циљаном делецијом гена за галектин 3 (Gal-3^{-/-} C57BL/6), старости 8-12 недеља. Gal-3^{-/-} мишеви су добијени са Универзитета Калифорније захваљујући проф. др Hsu-у (*Daniel K. Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA*). Сви мишеви (*wild type* и Gal-3^{-/-} мишеви) су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Током експеримента животиње су имале слободан приступ храни и води. Спроведену студију је одобрила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу и спроведена је у сагласности са свим међународним смерницама о третирању лабораторијских животиња (број 01-5268 од 26.04.2016. године). Експерименталне животиње су биле усклађене старости и телесне масе између експерименталних група.

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

Мишеви са циљаном аблацијом гена за Gal-3 су добијени поступком хомологе рекомбинације (315). Хомолога рекомбинација је поступак замене гена између пара хомологих секвенци два молекула DNA који садрже сличне или индентичне нуклеотиде (315). Оваквим поступком се „искључује“ функција циљаног гена који се замењује нефункционалним (мутираним) геном (315).

Затим следи избор погодних ћелија где би се хомолога рекомбинација одиграла. Пре него што се пренесе у матичне ћелије ембриона, фрагмент DNA са „искљученим“, односно мутираним геном најпре се угради у циљани вектор који садржи и два кључна гена за контролу рекомбинације: ген који регулише резистенцију на неомицин (Neo ген) и ген који кодира вирусну тимидин киназу (ТК ген) (316). Neo ген је ген који се

увек уграђује у геном ембрионалне ћелије, док се ТК ген губи само након успешне хомологе рекомбинације. Циљани вектор се убацује у културу ћелија, а медијум за културу садржи неомицин, као и *ganciklovir* или FIAU (енгл. *1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil*) које метаболише тимидин-киназа до токсичних продуката. Уколико је фрагмент DNA са мутираним геном насумице уграђен у ћелију, ћелија је резистентна на неомицин, али ће бити уништена под дејством токсичних метаболита *ganciklovir*-а или FIAU (316). Све ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација су резистентне и на неомицин и на *ganciklovir* или FIAU и такве ћелије ће преживети (316, 317).

Описано је да се ген за галектин 3 код миша састоји од шест егзона: егзони 2 и 3 кодирају N-терминални крај, егзони од 4 до 6 кодирају C-терминални крај где се и налази домен који препознаје угљене хидрате (318). У лабораторији проф. др Hsu-а у циљу добијања Gal-3^{-/-} мишева је направљен прекид гена за Gal-3 код ембрионалних матичних ћелија (296). У те сврхе је коришћен вектор који садржи фрагмент клониране DNA за Gal-3 при чему у овом фрагменту постоји прекид региона гена који кодира домен за препознавање угљених хидрата. Кратак сегмент DNA (од 0.5 кило база) са интроном-4 и егзоном-5 је промењен геном за резистенцију на неомицин. Овај сегмент мишијег гена за Gal-3 је уграђен у рMC1Neo Poly(A) вектор (*Stratagene, La Jolla, CA*) и то на горњем крају генома, у близини промотера за тимидин киназу-Neo касета. Други сегмент који обухвата егзон-5 и егзон-6 је уграђен низводно од Neo касете, док је спој интрона-4 и егзона-5 прекинут Neo геном. Циљани вектор је потом уграђен у матичне ћелије миша, D3 ћелије, а затим су трансфектоване ћелије селектоване помоћу G418, док је хомолога рекомбинација у овим ћелијама детектована помоћу две технике: PCR (енгл. *Polimerase Chain Reaction*, PCR) уз помоћ прајмера специфичних за Neo ген, као и *Southern*- блот хибридизацијом (296).

Један клон ембрионалних матичних ћелија код којих се одиграла хомолога рекомбинација је пропагиран, а онда и убризган у бластоцисте C57BL/6 мишева, старе 3,5 дана. Следећи корак је имплантација ових бластоциста у лажно гравидне CD1 женке (означене као сурогат мајке). На тај начин су прво добијени химерични мишеви, а затим укрштањем химеричних мужјака са C57BL/6 женкама најпре су добијени хетерозиготни *knock-out* мишеви (Gal-3^{+/-} мишеви). Инбредним укрштањем оваквих хетерозиготних мишева након девет генерација добијени су хомозиготни *knock-out* мишеви који су дефицијентни у експресији молекула галектина 3 (Gal-3^{-/-} мишеви) (296).

Из Gal-3^{-/-} мишева су изоловани различити органи (надбубрежна жлезда, мозак, срце, јетра, плућа, лимфни чворови, слезина, тимус итд.) који су били без хистолошки уочених промена. Такође, број ћелија у крви између Gal-3^{-/-} и WT мишева се није разликовао. Анализирани су и субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини и лимфним чворовима и показано је да је укупан број лимфоцита као и однос CD4⁺/CD8⁺ ћелија приближно исти код Gal-3^{-/-} и WT мишева (296).

3.2. ИНДУКЦИЈА ТЕШКЕ ФОРМЕ АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА ПОДВЕЗИВАЊЕМ БИЛИО-ПАНКРЕАТИЧНОГ ДУКТУСА

Експериментални акутни панкреатитис је индукуван подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, при чему се код миша развија тешка и летална форма болести и имитира тешку форму хуманог акутног панкреатитиса узрокованог билијарним калкулусима (319). Мишеви са делецијом гена за Gal-3 и WT C57BL/6 мишеви мушког пола старости 8-12 недеља најпре су анестезирани уз помоћ раствора кетамина (у концентрацији 70ml/kg телесне масе миша) и ксилазина (у концентрацији од 10ml/kg телесне масе миша). Раствори за анестезију су примењени интраперитонеално. Након тога се, у асептичним условима, начини рез по средини трбушног предела, од ксифоидног наставка грудне кости вертикално наниже у дужини од 1-1,5cm, тзв. медијална лапаротомија. Пажљиво се испрепаришу сви слојеви предњег трбушног зида и отвори трбушна марамица. Следи препарација билио-панкреатичног дуктуса до његовог исходишта у дуоденум где се подвезује ланеним концем величине 3/0 у групи експерименталних животиња. У контролној групи мишева (енгл. *Sham-operated controls*) билио-панкреатични дуктус се само испрепарише, али се не подвезује. Након тога следи затварање предњег трбушног зида нересоптивним концем величине 3/0. Након буђења, мишеви су имали слободан приступ храни и води. Два пута дневно им је супкутано апликован аналгетик, трамадол, у концентрацији од 20 mg/kg телесне масе миша. Након 72h од подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, односно код присутних изразитих знакова дистреса у студијама преживљавања (смањење рефлекса, смањена активност и поспаност мишева, не узимање хране и воде) или најкасније након 15 дана од почетка експеримента, мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром (*BETAHEM*, Београд, Србија). Након жртвовања изоловани су панкреас, плућа и бубрези за даљу анализу. Пункцијом абдоминалне аорте је скупљена крв уз

помоћ шприца са антикоагулантним средством. Након центрифугирања (20 минута на 3000 rpm) издвојена је плазма и замрзнута на -20°C за даљу анализу. Дакле, експерименталне групе животиња са АП су биле:

- 1) Gal-3^{-/-} C57BL/6 мишеви код којих је билио-панкреатични дуктус испрепарисан и подвезан,
- 2) WT C57BL/6 мишеви код којих је билио-панкреатични дуктус испрепарисан и подвезан,

док су контролне групе животиња биле:

- 1) Gal-3^{-/-} C57BL/6 мишеви код којих је билио-панкреатични дуктус само испрепарисан али не и подвезан,
- 2) WT C57BL/6 мишеви код којих је билио-панкреатични дуктус само испрепарисан али не и подвезан.

3.3. ИНДИКЦИЈА АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА СУПРАМАКСИМАЛНИМ ДОЗАМА ЦЕРУЛЕИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Церулеин је синтетски аналог холецистокинина, хормона дигестивног тракта који у физиолошким концентрацијама регулише нормалну секрецију из панкреаса (296). У супрамаксималним концентрацијама, церулеин прекида секрецију из ацинусних ћелија, акумулира секреторне грануле и повећава интраацинусне концентрације јона калцијума, што доприноси развоју акутног панкреатитиса. Примена липополисахарида (LPS) након вишеструких инјекција церулеина имитира развој секундарне бактеријске инфекције чиме се појачава инфламацијски одговор у панкреатитису.

Да би се елиминисао ефекат евентуалне бактеријске контаминације на развој акутног панкреатитиса, коришћен је други експериментални модел болести, тзв. хемијски модел. За овај модел су коришћени Gal-3^{-/-} и WT C57BL/6 мишеви женског пола, старости 8-12 недеља. Најпре је експерименталним животињима онемогућен приступ храни 18 сати пре прве инјекције церулеина, са циљем да се значајно смањи стимулација панкреаса узрокована храном и обезбеди максимална акумулација секреторних гранула у ацинунсим ћелијама. Затим се апликује шест интраперитонеалних инјекција церулеина (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у супрамаксималним концентрацијама (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесне масе миша), са размаком између инјекција од једног сата. Након последње, шесте инјекције церулеина

интраперитонеално је апликован LPS (изолован из бактерије *Escherichia coli* 0111: B4, *Sigma Aldrich*) у концентрацији од 10mg/kg телесне масе миша. Контролној групи животиња је апликовано шест доза физиолошког раствора, а потом LPS у дози од 10mg/kg. Након апликације церулеина и LPS-а животиње су имале слободан приступ води и храни. Дванаест сати након последње апликације мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром (*BETANEM*). Након жртвовања је изолован панкреас за даљу анализу. Пункцијом абдоминалне аорте, скупљена је крв уз помоћ шприца са антикоагулантним средством. Након центрифугирања (20 минута на 3000 rpm) издвојена је плазма и замрзнута на -20°C за даљу анализу.

3.4. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ПАНКРЕАСА, ПЛУЋА И БУБРЕГА

Мишеви су жртвовани трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, односно дванаест сати након последње инјекције церулеина и LPS-а, а за хистопатолошку анализу коришћена су ткива панкреаса, плућа и бубрега калупљена у формалину. За процену инфламацијске инфилтрације коришћени су исечци бојени техником хематоксилин-еозин. Након жртвовања животиња исечци ткива испитиваних органа су фиксирани у 4% неутрално пуферисаном раствору формалина, у временском периоду од 24 часа, на собној температури и након тога уграђени у парафин. Блокови парафина су на собној температури сечени на ротирајућем микротому (*Leica RM2135*), дебљине 4 μm , затим су потапани у воду на 40°C и потом стављени на стаклене микроскопске плочице.

3.4.1. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци су најпре загрејани у термостату на +56°C у току 45 минута, а потом су потапани у ксилол. Следи поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: два пута у трајању од 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Након испирања препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich*) 10 минута, а затим су испрани дестилованом и текућом водом 5 минута. Након бојења препарата еозином (*Sigma Aldrich*) у трајању од два минута, урађен је поступак дехидратације и

просветљивања препарата. За процес дехидратације су коришћене растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након дехидратације препарати су просветљени потапањем један минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом два пута по један минут само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Centrohem*, Србија) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног сушења, препарати су анализирани светлосним микроскопом (*Olympus BX51*) опремљеним дигиталним фотоапаратом.

3.4.2. Процена хистолошког скорa оштећења панкреаса

На хистолошким препаратима одређиван је едем, оштећење ацинуса и инфилтрација инфламацијским ћелијама у паренхиму панкреаса према претходно описаном скору (Табела 2) (320). Препарати су, након бојења хематоксилиом и еозином посматрани под светлосним микроскопом (увечање 100×) и фотографисани дигиталним апаратом (*BX51, Olympus, Japan*).

3.4.3. Процена хистолошког оштећења плућа

Дистрибуција алвеоларне конгестије, хеморагије и неутрофилне инфилтрације у плућном ткиву је одређена микроскопирањем исечака плућа обојених хематоксилин-еозином, употребом светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*) са припадајућом дигиталном камером, а на основу претходно описаног скорa (28). Сваки параметар, тј. степен неутрофилне инфилтрације, алвеоларне конгестије и хеморагије је подељен у пет скорова и то:

- скор 1= без патолошких промена
- скор 2= патолошке промене до 25% препарата
- скор 3= патолошке промене до 50% препарата
- скор 4= патолошке промене до 75% препарата
- скор 5= дифузне патолошке промене.

Скор	Налаз
Едем	
0	Без едема
1	Интерлобарни едем
2	Интерлобарни и благ интралобарни едем
3	Интерлобарни едем и тежак интралобарни едем
Леукоцитна инфилтрација	
0	Без леукоцитне инфилтрације
1	Ретка периваскуларна инфилтрација
2	Осредња периваскуларна и оскудна дифузна инфилтрација
3	Дифузна инфилтрација
Вакуолизација	
0	Одсутна
1	Мање од 25% ацинусних ћелија
2	25–50% ацинусних ћелија
3	Више од 50% ацинусних ћелија
Некроза	
0	Без некрозе
1	Мање од 15% захваћених панкреасних ћелија
2	15–35% захваћених панкреасних ћелија
3	Више од 35% захваћених панкреасних ћелија
Хеморагија	
0	Без хеморагије
1	1-2 фокуса хеморагије по пресеку
2	3–5 фокуса хеморагије по пресеку
3	Више од 5 фокуса хеморагије по пресеку

Табела 2. Хистолошки скор за процену тежине оштећења панкреаса

3.4.4. Порцена хистолошког оштећења бубрега

На хистолошким препаратима бубрега, након бојења хематоксилин-еозином, је одређен едем, акутна тубуларна некроза, хиперемија и дилатација паренхимских и корпускуларних капиlara бубрега према претходно публикованом скору (Табела 3) (321).

3.5. КОЛОРИМЕТРИЈСКИ ТЕСТ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЕ У СЕРУМУ

Концентрација ослобођене амилазе је одређивана у серуму 72 сата након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса уз помоћ ELISA теста (*Abcam, Cambridge, UK*) према упутству произвођача. Принцип теста је да детектује активност α -амилазе уз помоћ реакције у два корака. Најпре, α -амилаза разлаже супстрат етилиден-*p*NP-G7 и настају мањи фрагменти које потом модификују α -глюкозидазе при чему се ослобађају хромофоре чији се интензитет боје читава спектрофотометријски на таласној дужини 450 nm, на *Microplate reader*-у (*Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor, Anthos, Austria*). У циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити прерачунате концентрације α -амилазе, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска, двоструко растућа разблажења у 6 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Assay Buffer*). Узоркована крв је најпре центрифугирана 10 минута на 1500 rpm. Ензимска реакција неопходна за одређивање активности α -амилазе је настала у микротитар плочи са 96 бунарчића који поседују равно дно и која је адекватна за касније читавање абсорбанце. У свако бунарче је додато по 10-25 μ l узорака (у зависности да ли је коришћено разблажење 1:5 или 1:2), као и по 25-40 μ l дестиловане воде да би се добила запремина од 50 μ l разблаженог узорка по бунарчету. Потом је у свако бунарче додато по 100 μ L *Reaction Mix*-а који се састојао од 50 μ l *Assay Buffer* и 50 μ l *Substrate Mix*. Након тога је очитана абсорбанца у ELISA читачу на таласној дужини од 405 nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда је направљена стандардна крива и помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Концентрација амилазе за сваки узорак је мерена у дуплику.

Хистопатолошке промене оштећења бубрега	Резултат	Скор
Едем	Без едема	0
	Благ	1=+
	Средње тежак	2=++
	Тежак	3=+++
Акутна тубуларна некроза	Без некрозе	0
	Блага	1=+
	Средње тешка	2=++
	Тешка	3=+++
Хиперимија и дилатација паренхимских капилара	Без промена	0
	Блага	1=+
	Средње тешка	2=++
	Тешка	3=+++
Хиперимија и дилатација корпускуларних капилара	Без промена	0
	Блага	1=+
	Средње тешка	2=++
	Тешка	3=+++

Табела 3. Хистолошки скор за процену тежине оштећења бубрега

3.6. КОЛОРИМЕТРИЈСКИ ТЕСТ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА У ПАРЕНХИМУ ПАНКРЕАСА

Активност трипсина у паренхиму панкреаса је одређена 72 сата након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, односно 18 сати након индукције болести церулеином и LPS-ом, уз помоћ ELISA теста (*Abcam, Cambridge, UK*) према упутству произвођача. Принцип теста је да детектује активност трипсина помоћу реакције у којој трипсин

разлаже супстрат и настаје *p*-нитроанилин чији се интензитет боје читава спектрофотометријски на таласној дужини 450 nm, на *Microplate reader*-у (*Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor*). У циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити израчунате концентрације трипсина, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска двоструко растућа разблажења у 6 тачака у комерцијалном растварачу. Узоркује се 10-100 mg паренхима панкреаса и исецка се у мале делове. Након тога се додаје по 500-1,000 μL *Trypsin Assay Buffer* и ткиво се хомогенизује. Потом следи центрифугирање у тајању од 2-5 минута на највећој брзини и температури од 4°C да би се уклонио нерастворени материјал. Супернатант се узоркује и преноси у чисту епрувету. Ензимска реакција за одређивање активности трипсина се десила у микротитар плочи са 96 бунарчића и равним дном, адекватној за касније читавање апсорбанце. У свако бунарче је додато 10-25 μl супернанта (у зависности да ли је коришћено разблажење 1:5 или 1:2), као и 25-40 μl *Trypsin Assay Buffer* да би се иницијално добила радна запремина од 50 μl разблаженог узорка по бунарчету. Потом је у свако бунарче додато по 1 μL инхибитора химотрипсина и по 50 μL *Reaction Mix*-а који се састојао од 48 μl *Trypsin Assay Buffer* и 2 μl *Trypsin Substrate*. Након тога је прочитана апсорбанца у ELISA читачу на 450 nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Активност трипсина за сваки узорак је одређена у дупликату.

3.7. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА

Инфламацијске ћелије су изоловане из ткива панкреаса и анализирани методом проточне цитометрије. Анализирана је процентуална заступљеност, фенотипске и функционалне карактеристике различитих популација инфламацијских ћелија: неутрофила, макрофага, дендритских ћелија, NK и NKT ћелија и Т лимфоцита након 3 дана од почетка експеримента.

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

3.7.1. Изолација моноклераних ћелија из ткива панкреаса

Ткиво панкреаса је уситњено у 5ml HBSS-а (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich*) са 10% FBS-а у Петри шољи и додатно је испрано у истом медијуму. Уситњено ткиво је затим дигестирано уз помоћ 5 ml раствора HBSS са 10% FBS-а и 2 mg/ml колагеназе тип V (*Sigma Aldrich*) 15 минута на 37°C у шејкеру на 100 rpm и раствори су стављени у епрувете од 50 ml (322). Након дигестије, ткиво је механички пропуштено кроз 40 μ m-ско ћелијско сито (*BD Biosciences*) у епрувету од 10 ml и два пута опрано у HBSS-у са 10% FBS-а, 10 минута на 1500 rpm. Добијени пелет је ресуспендован у 2 ml дилуције лизинг пуфера. Након 3 мин на 37°C додат је медијум (HBSS са 10% FBS-а) и ћелије су центрифугиране 10 минута на 1500 rpm. Добијена ћелијска суспензија је додатно пропуштена кроз ћелијско сито (40 μ m) и испрана у истом медијуму. Пелет је ресуспендован у 0.5 ml HBSS-а са 10% FBS-а и ћелије су избројане у разблажењу 10x.

3.7.2. Обележавање ћелијских мембранских маркера

За идентификацију мембранских маркера, неопходних за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација леукоцита изолованих из панкреаса, су примењена анти-мишја моноклонска антитела специфична за циљане мембранске маркере који су обележени различитим флуоресцентним бојама (Табела 4). На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*) је додата одговарајућа количина примарно коњугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација ћелија леукоцитног инфилтрата панкреаса и обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама. Испитивани леукоцитни инфилтрат је такође инкубиран и са одговарајућим изотипским контролама.

Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле, су коришћена у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији буду 1:100. Затим су ћелије инкубиране у мраку на температури од +4°C у трајању 20 минута. Након тога, ћелије су „опране“ додавањем 2ml хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD*), а затим центрифугиране у трајању од 5 минута на 1500 rpm. Након центрифугирања, супернатант је одливен, а талог ћелија је ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење.

Назив	Клон	Произвођач
<i>FITC Anti mouse CD11b</i>	M1/70	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse Ly-6G</i>	RB6-8C5	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CXCR4</i>	REA107	<i>MACS Miltenyl Biotec, Germany</i>
<i>PE Anti mouse FasL</i>	MFL3	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD3</i>	REA641	<i>MACS Miltenyl Biotec, Germany</i>
<i>Per CP Anti mouse CD49b</i>	DX5	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse IFN-γ</i>	XMG1.2	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse IL-17</i>	TC11- 18H10.1	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse IL-10</i>	JESS-16E3	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse F4/80</i>	REA126	<i>MACS Miltenyl Biotec, Germany</i>
<i>APC Anti mouse CD11c</i>	HL3	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse TNF-α</i>	MP6-XT22	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse IL-1β</i>	166931	<i>R&D Systems, Minneapolis, MN, USA</i>
<i>FITC Anti mouse IL-10</i>	JESS-16E3	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse IL-23</i>	320244	<i>R&D Systems, Minneapolis, MN, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD54</i>	REA171	<i>MACS Miltenyl Biotec, Germany</i>
<i>APC Anti mouse IL-10</i>	JES5-16E3	<i>MACS Miltenyl Biotec, Germany</i>
<i>PE Anti mouse TLR-4</i>	UT41	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse FoxP3</i>	MF23	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse Isotype control</i>	eBR2a	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse Isotype control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse Isotype control</i>	A95-1	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse Isotype control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>

Табела 4. Моноклонска антитела и изотипске контроле коришћене у проточној цитометрији

Непосредно након процедуре бојења, ћелије су анализирани на проточном цитометру (*FACS Calibur, BD*). Граничник (енгл. *gate*), је направљен у FSC/SSC плоту као регион вијабилних моноклеарних ћелија. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу софтвера *FlowJo (Tree Star)*.

3.7.3. Интрацелуларно бојење цитокина

Бојење интрацелуларних цитокина је спроведено по *BD Cytofix/Cytoperm™* методи. Најпре се ћелије стимулишу уз помоћ форбол миристат ацетата (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma*) и јономицина (енгл. *Ionomycin; Sigma*), који стимулишу протеин киназу C (енгл. *Protein kinase C, PKC*) и поспешују инфлукс јона калцијума у ћелију. На овај начин се повећава експресија цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима (286). Трајање инкубације је од 4 до 6 часова што је оптимално за већину цитокина. Дужа инкубација узрокује оштећење ћелије услед ефеката поменутих активатора. У току стимулације ћелија, користе се инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgiStop™* (који садржи моненсин) и *BD GolgiPlug™* (који садржи брефелдин А). Блокада интрацелуларног транспорта резултује накупљањем веће количине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџијевом комплексу. Све то повећава вероватноћу детекције ћелија које продукују цитокине.

3.7.4. Стимулација ћелија

Суспензија појединачних леукоцита изолованих из панкреаса ($1 \times 10^6/\text{ml}$) и припремљена у комплетном медијуму (медијум са 10% FBS-ом) је инкубирана на 37°C у атмосфери засићеној 5% CO₂. Ћелије су стимулисане додавањем PMA (*Sigma*; 50ng/ml) и јонофора (*Ionomycin, Sigma*; 500ng/ml). У суспензију је додаван и *BD GolgiStop™* (0,7μl/ml) чиме је блокирана секреција цитокина и повећана интрацелуларна акумулација цитокина. После 4 сата инкубације, ћелије су опране и ресуспендоване у комплетном медијуму. Након тога, ћелије су пребачене у пластичне епрувете (*FALCON round-bottom test tubes, BD*) за имунофлуоресцентно бојење. Током бојења и чувања, ћелије су држане на +4°C, у мраку.

3.7.5. Бојење површинских антигена

Најпре је урађено бојење мембранских маркера јер процеси фиксације и пермеабилитације ћелија могу да оштете епитопе површинских антигена. Тако је на 1×10^6 леукоцита ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додавана одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене. Ћелије су такође инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела за површинско бојење коришћена су у концентрацијама тако да њихова финална разблажења у суспензији ћелија буду 1:100. Инкубација ћелија је трајала 30 минута на +4°C, у мраку.

3.7.6. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране

Након инкубације са примарно конјугованим антителима за површинске антигене, леукоцити су опрани два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 290 μ l *Cytofix/CytoPermTM* раствора (BD *Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на +4°C. Пре и после додавања раствора за фиксацију и пермеабилитацију, сви узорци су добро вортексовани. Затим су ћелије опране два пута у *Perm/WashTM* пуферу (BD *Pharmingen*; 1ml/епрувети; 300G).

3.7.7. Бојење интрацелуларних цитокина

Ћелијски талог је ресуспендован у 50 μ l *Perm/WashTM* пуфера и додата су примарно конјугована моноклонска антитела специфична за цитокине (Табела 4). Сва антитела су коришћена у концентрацијама тако да њихова финална разблажења буду 1:100. Ћелије су инкубиране 20 минута на +4°C, у мраку. Након истека инкубације ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење и центрифугиране (1500 rpm, 5 минута). Ћелијски талог је ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру.

3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака ткива панкреаса урађено је коришћењем зечијег специфичног конјугата (*ZytoChem Plus HRP Kit*; Zytomed, Берлин, Немачка) и специфичног коњугата пацова *rat-specific HRP-conjugated antibody (HAF005, R&D Systems, D Systems, Минеаполис, САД)* према препорученом протоколу. Експресије F4/80 у ткиву панкреаса, као и Gal-3 молекула у ткиву панкреаса, бубрега и плућа испитиване су имунохистохемијски, коришћењем зечјег поликлонског анти-F4/80 антитела (енгл. *rabbit anti-mouse F4/80, Abcam, ab100790*) и зечјег поликлонског анти-Gal-3 антитела (енгл. *rabbit anti-mouse Gal-3, Abcam, ab53082*). Експресија Ly-6G/Ly-6C је одређена поликлонским антителом порекла пацова (енгл. *rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C, RB6-8C5, Novusbio, Littleton, САД*). Ткиво је током 24 часа фиксирано у 4%-тном неутралном, пуферизованом формалдехиду и калупљено у парафин. Резови дебљине 5 μ m су монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost®* и сушени на температури од 56°C у току једног сата. Исечци су депарафинизовани провлачењем кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Процес ослобађања антигена је обављен „кувањем“ у микроталасној пећи на 560W у у 10mM Na-цитрату у трајању од 21 минута. После тога су плочице испиране текућом водом 5 минута, а након хлађења интензивно испрани три пута у PBS-у. На ткивне исечке је потом додато 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block*-а са циљем да се инактивишу ендogene пероксидазе и након инкубације 10 минута на собној температури, препарати су два пута опрани у PBS-у. Затим је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block*-а и после 10 минута инкубације су једном испрани у PBS-у. Након тога, плочице су постављене на носач у влажној комори и њих је додато по 100 μ l примарног антитела. Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Након инкубације у трајању од 60 минута у влажној комори и на собној температури, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у, а затим је на њих нането секундарно антитело и инкубирани су 30 минута на собној температури у присуству секундарног антитела. Након инкубације, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у и на ткивне исечке је апликована *Streptavidin Peroxidase*-а. Након 10 минута инкубације са пероксидазом и на собној температури, исечци су испрани три пута по 5 минута у PBS-у и на њих је апликовано по 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20 μ l *DAB Chromagen*-а у 1ml DAB супстрат пуфера. Након развијања боје препарати су испрани три пута у дестилованој води и обојени хематоксилином по Мауер-у два минута, а затим интензивно опрани

текућом водом. Обојени исечци су покривени воденим медијумом за покривање и покровном љуспицом. Позитивне ћелије су обојене браон. Хистолошки пресеци су визуелизовани и фотографисани дигиталном камером на светлосном микроскопу (*Olympus BX5*).

3.9. ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЈА

За бојење техником имунофлуоресценције коришћени су парафински исечци ткива панкреаса дебљине 5 μm . Исечци су депарафинизовани провлачењем кроз серију алкохола опадајућих концентрација. После тога плочице су интензивно испране три пута у PBS-у. Могуће неспецифично везивање антитела је блокирано уз помоћ 200 μl 10% нормалног козјег серума у PBS-у. Препарати су поново испрани у PBS-у и апликована су примарна зечја анти-мишја F4/80 и Gal-3 антитела (*Abcam*). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA у разблажењу 1:800 за F4/80 и 1:500 за Gal-3 и додата су у запремини од по 200 μl по препарату. Након инкубације 1h на собној температури у влажној комори, препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим је апликовано одговарајуће секундарно козје анти-зечје IgG антитело (*Abcam*) у разблажењу 1:150 у волумену 200 μl и инкубирано 45 минута у влажној комори. За одређивање експресије Ly-6G/Ly-6C методом имунофлуоресценције је коришћено примарно пацовско анти-мишје Ly-6G/Ly-6C антитело (*Novus Biologicals, CO, USA*), у разблажењу 1: 500 и у запремини од по 200 μl , инкубирано 1 сат на собној температури. Након инкубације, препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим је апликовано одговарајуће секундарно зечје анти-пацовско анитело коњуговано са биотином (*Abcam*) у разблажењу 1:500 у волумену 200 μl и инкубирано 45 минута у влажној комори. Да би се визуелизовао овај комплекс, исечци су инкубирани са FITC коњугованим козјим анти-биотин антителом (*Abcam*) у разблажењу 1:500 у волумену 200 μl и инкубирани 45 минута у влажној комори. У циљу двоструког имунофлуоресценског бојења, сви препарати су испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у, а затим је апликовано примарно пацовско анти-мишје TLR-4 (*R&D Systems*) у разблажењу 1:10 и у волумену 200 μl , све је то инкубирано 1 сат на собној температури. Након инкубирања, препрати су испрани PBS-у и на обојене пресеке ткива је апликован медијум који садржи DAPI за визуелизацију нуклеуса (енгл. *mounting medium, ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Анализа

имунофлуоресценције је урађена уз помоћ имунофлуоресценског микроскопа (*Olympus BX51*)

3.10. АПЛИКАЦИЈА CLI-095

CLI-095 (*InvivoGen, San Diego, CA*), означен и као TAK-242, је инхибитор TLR-4 који спречава интраћелијско везивање адаптерских молекула за TLR-4 (323). Овај молекул је, у складу са упутством, најпре растворен у 40%-тном раствору ди-метил сулфоксида (енгл. *Dimethyl sulfoxide, DMSO*), а потом је растворен у 0,9% NaCl-у. Појединачна доза коришћена у експериментима је била 3 mg/kg телесне масе миша. Мишеви дивљег соја су груписани случајним узорковањем у две групе и једна група мишева је примала интраперитонеално CLI-095 од првог дана експеримента, тј. након сат времена пре подвезивања БПД, 24 сата и 48 сати након подвезивања БПД; док је другој групи у истим временским интервалима интраперитонеално апликован разблажен DMSO. Пратили смо преживљавање мишева у трајању од 15 дана.

3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка анализа добијених података је изведена коришћењем статистичког програма SPSS, верзија 22. Најпре је испитана нормалност расподеле уз помоћ *Shapiro-Wilk* теста. Уколико су вредности пратиле нормалну расподелу, коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле, коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев U тест. Резултати експеримента су изражени као вредност \pm стандардна грешка (енгл. *Standard error/Mean, SEM*). Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности $p < 0.05$, а статистички веома значајним означене су оне вредности за које је $p < 0.01$. Добијени резултати су приказани графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

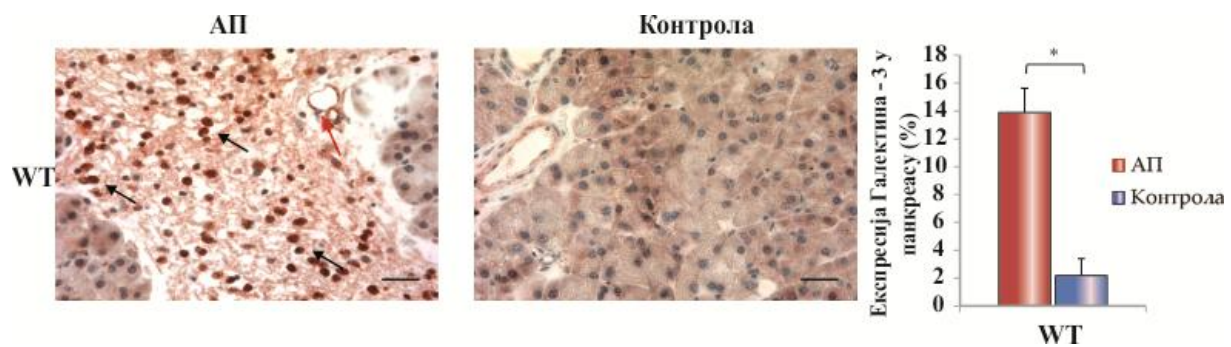
4.1. ЕКСПРЕСИЈА ГАЛЕКТИНА 3 У ТКИВУ ПАНКРЕАСА

Галектин 3 регулише бројне процесе акутне инфламације где углавном игра про-инфламацијску улогу. Познато је да у физиолошким условима само дукталне епителне ћелије експримирају овај лектин. Након индукције експерименталног АП вишеструким инјекцијама церулеина у супрамаксималним концентрацијама, ацинусне ћелије панкреаса миша почињу да експримирају Gal-3, као и ћелије инфилтрата, пре свега инфилтришући макрофаги. Није документована експресја Gal-3 у другом моделу болести, односно АП индукованог подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Уједно, није испитвана улога овог лектина у патогенези акутног панкреатитиса.

Да би се испитала потенцијална улога Gal-3 у развоју АП, најпре је анализирана експресија овог молекула у узорцима ткива панкреаса. Имунохистохемијским бојењем исечака панкреаса показана је значајна експресија Gal-3 у у цитоплазми и једру ћелија инфилтрата панкреаса 72 сата након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса (Фигура 1А). Такође је утврђена повећана експресија овог молекула у дукталним епителним ћелијама (Фигура 1А). Након квантификације позитивног бојења уз помоћ *J image* програмског пакета, добијени резултати су показали да је експресија Gal-3 била статистички значајно већа у групи C54BL/6 мишева трећег дана након индукције болести у односу на контролну групу животиња код којих је начињена лапаротомија, али без подвезивања билио-панкреатичног дуктуса (Фигура 1Б).

4.2. ДЕЛЕЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 ПОБОЉШАВА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ МИШЕВА СА АКУТНИМ ПАНКРЕАТИТИСОМ

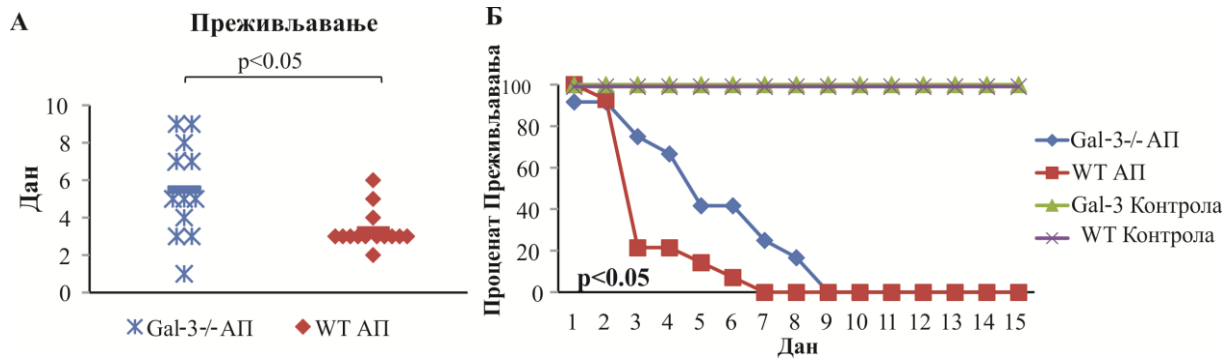
У циљу испитивања ефеката Gal-3 на развој акутног панкреатитиса, мишевима Gal-3^{-/-} и WT соја C57BL/6 је подвезан билио-панкреатични дуктус, док је код контролних мишева дуктус само испрепарисан, али не и подвезан (тзв. *Sham-operated* контроле). Тежина акутног панкреатитиса је одређена праћењем преживљавања оболелих мишева, анализом патохистолошких промена у исечцима ткива панкреаса, плућа и бубрега који су добијени након жртвовања експерименталних и контролних животиња.



Фигура 1. Анализа експресије галектина 3 у паренхиму панкреаса C54BL/6 WT мишева трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса. **А.** Експресија галектина 3 у паренхиму панкреаса је детектована методом имунохистохемије коришћењем анти-Gal-3 антитела уз визуелизацију DAB супстратом. Репрезентативне фотографије указују на значајно већу експресију Gal-3 у инфилтрату панкреаса (црне стрелице) и дукталним епителним ћелијама панкреаса (црвена стрелица) оболелих мишева након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, у односу на контролне мишеве. **Б.** Статистички значајно већа експресија Gal-3 у панкреасу оболелих мишева након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса (* $p < 0,05$) је потврђена компарацијом средњих вредности експресије уз помоћ *Student*-ов Т теста.

За експериментални модел АП индукованог подвезивањем БПД се користе C57/BL6 мишеви мушког пола, старости 8-12 недеља. У строгим асептичким условима, најпре се начини медијална лапаротомија у општој анестезији која је индикована и одржавана коктелом ксилазина и кетамина. Постоперативно, мишеви су се брзо опоравили и на 12 сати им је апликован аналгетик, трамадол, у дози 20mg/kg. Све време трајања експеримента мишеви су имали слободан приступ храни и води. Два пута дневно је праћена активност и преживљавање мишева. Код мишева је праћен степен физичке активности, спровођење рутинских радњи, степен будности и реакције на спољашне стимулације попут звука (319).

Галектин 3 дефицијенти мишеви који су оболели од тешке форме АП, најдуже су преживели до 9. дана након операције, док је медијана преживљавања била 5. дан (Графикон 1А). Затим, оболели WT мишеви су најдуже преживели до 6. дана након интервенције, а медијана преживљавања је 3. дан након интервенције (Графикон 1А). Обзиром да је медијана преживљавања код WT мишева трећи дан након индукције болести, одабрали смо овај временски период након интервенције за детаљније проучавање могућих механизма како галектин 3 утиче на развој тешке форме АП



Графикон 1. Преживљавање мишева након индукције тешке форме акутног панкреатитиса подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Дијаграм преживљавања (А) и Карпан-Мејер крива (Б) приказују боље преживљавање Gal-3^{-/-} мишева након индукције болести.

и настанак смртног исхода. Као што је и очекивано, обе контролне групе мишева су преживеле након интервенције. Gal-3 дефицијентни мишеви живе значајно дуже у односу на WT мишеве оболеле од тешке форме АП (Графикон 1А). Као што је приказано у Графикону 1Б, 20% WT мишева је преживело трећи дан након индукције болести, док је ситуација са Gal-3^{-/-} мишевима сасвим другачија, односно 80% оболелих мишева су живи трећег дана након индукције болести. Уз помоћ *Kaplan-Meier*-ове криве смо приказали значајно дуже преживљавање Gal-3^{-/-} мишева са тешком и леталном формом АП (Графикон 1Б).

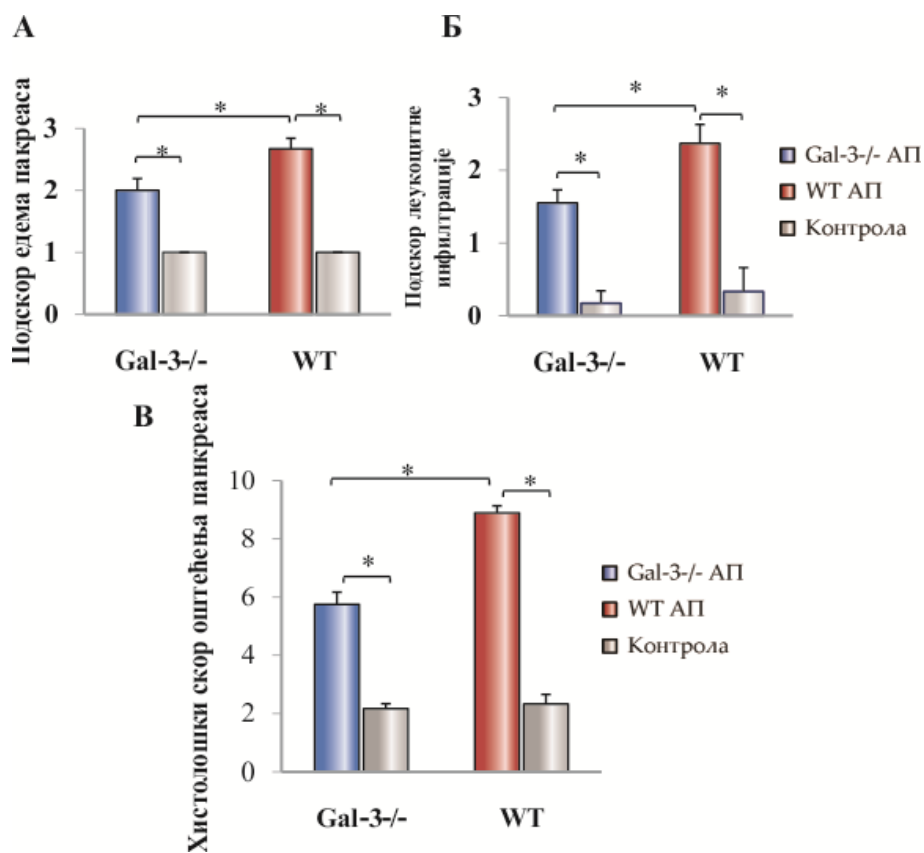
4.3. ГАЛЕКТИН 3 ДЕЛЕЦИЈА СМАЊУЈЕ ОШТЕЋЕЊЕ ПАНКРЕАСНОГ И ПЛУЋНОГ ПАРЕНХИМА

Пошто смо утврдили да Gal-3^{-/-} мишеви живе значајно дуже, у даљем раду смо одредили тежину АП на основу степена оштећења панкреаса. Трећег дана након подвезивања БПД, животиње су жртвоване и у исечцима ткива панкреаса анализиран је хистолошки скор оштећења панкреаса. Наиме, семиквантитативно су одређени хистолошки параметри инфламације: едем панкреаса, инфилтрација паренхима панкреаса, некроза панкреаса, вакуолизација и поремећај архитектонике панкреаса (комплентан хистолошки скор је детаљно описан у поглављу 3.3).

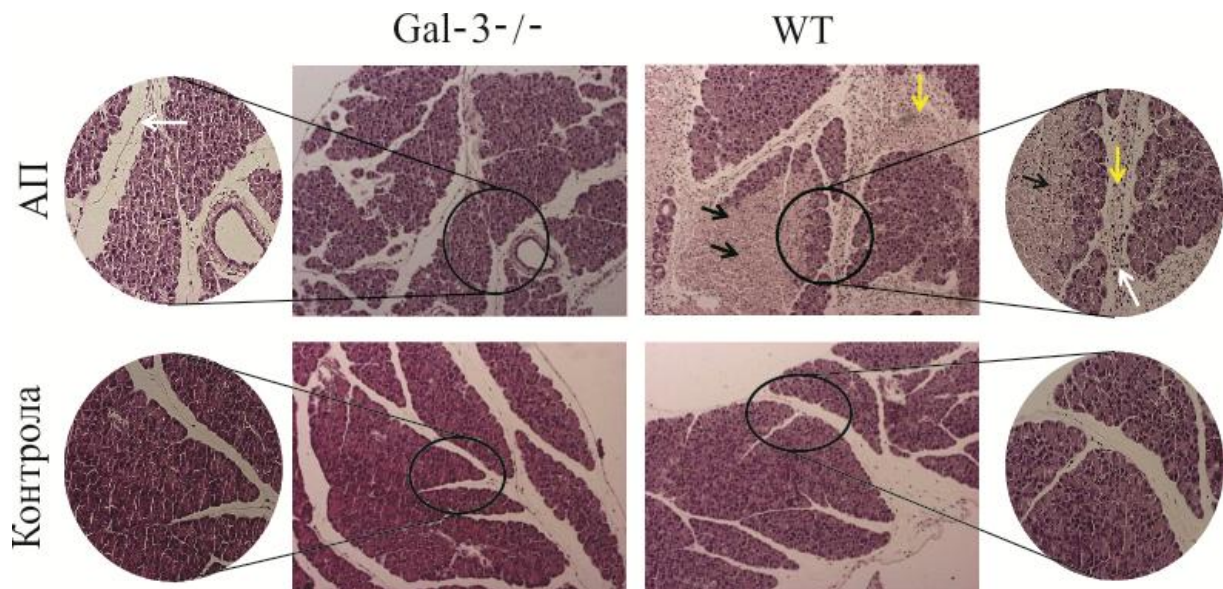
Хистолошким анализом панкреасних препарата који су обојени хематоксилином и еозином је показано да је укупни хистолошки скор АП значајно мањи код Gal-3^{-/-}

мишева са АП у поређењу са оболелим WT мишевима (Графикон 2). Код WT мишева оболелих од тешке форме АП је био присутан значајно већи едем панкреаса, израженији леукоцитни инфилтрат (Графикон 2А и 2Б), распрострањенија поља некрозе панкреаса и вакуолизације панкреатичног паренхима (Слика 6). За разлику од јасно видљивих, дифузних и изражених инфилтрата инфламацијских ћелија код WT мишева, инфилтрат инфламацијских ћелија и некроза је значајно мање присутна код оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишевима.

Параметри оштећења паренхима панкреаса експерименталних животиња су испитивани мерењем активности амилаза у серуму и трипсина у панкреасу након 3 дана од подвезивања билио-панкреатичног дуктуса. Будући да се дијагноза АП поставља и на

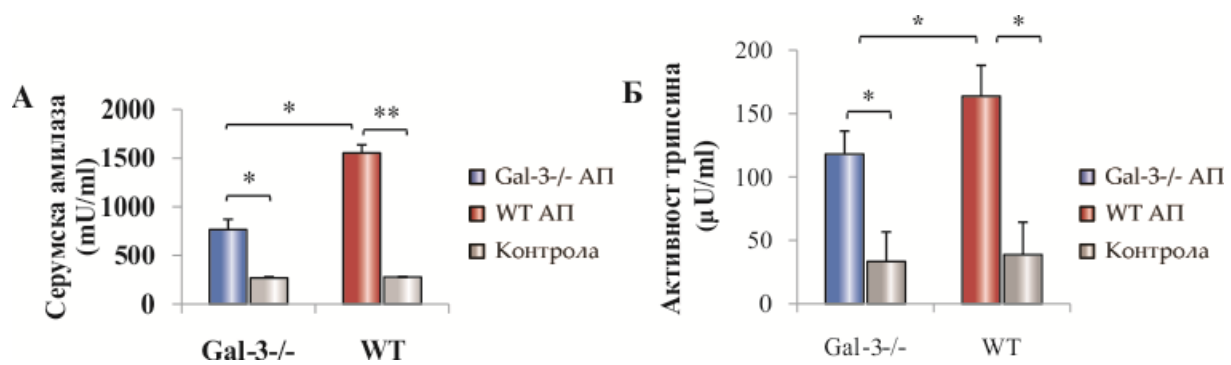


Графикон 2. Деленија гена за молекул Gal-3 значајно смањује тежину акутног панкреатитиса. Приказан је подскор едема панкреаса (А) и леукоцитне инфилтрације (Б), као и укупни хистолошки скор акутног панкреатитиса (В) трећег дана након индукције болести. Приказани резултати су из два поновљена експеримента и приказани су као средња вредност ± SE (експерименталне групе са АП: 20 мишева по групи; контролне групе: 10 мишева по групи) (*p<0.05, Student-ов Т тест).



Слика 6. Патохистолошке промене у панкреасу након индукције АП код C57BL/6 Gal-3^{-/-} и C57BL/6 WT мишева. Ткиво панкреаса C57BL/6 WT и Gal-3^{-/-} мишева је изоловано трећег дана након индукције болести, а исечци дебљине 5 μ m су обојени хематоксилином и еозином. Горе десно је приказана репрезентативна слика панкреаса изолованог из C57BL/6 WT мишева где доминира масивна некроза панкреаса (црне стрелице), масивна инфилтрација инфламацијских ћелија (жута стрелица) и значајан степен интралобуларног едема (бела стрелица). Горе лево приказана је репрезентативна слика панкреаса изолованог из C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева код којих се оштећење панкреаса карактерише само са интралобуларним и интерацинусним едемом (беле стрелице). У доњем делу су приказане слике контролних C57BL/6 WT и Gal-3^{-/-} без присутних патолошких промена у панкреасу.

основу повећаних вредности амилаза у серуму, колориметријском методом је одређена концентрација ових ензима у серуму C57BL/6 WT и Gal-3^{-/-} мишева трећег дана по индукцији болести. Индукција АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса је праћена повећањем вредности серумских амилаза у обе експерименталне групе животиња у односу на контролне животиње код којих је билио-панкреатични дуктус само испрепарисан, али не и подвезан (Графикон 3А). Утврђено је значајно смањење концентрације амилаза у серуму код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са оболелим C57BL/6 WT мишевима (Графикон 3А), што је у складу са тежином оштећења панкреаса одређеним патохистолошким скором.

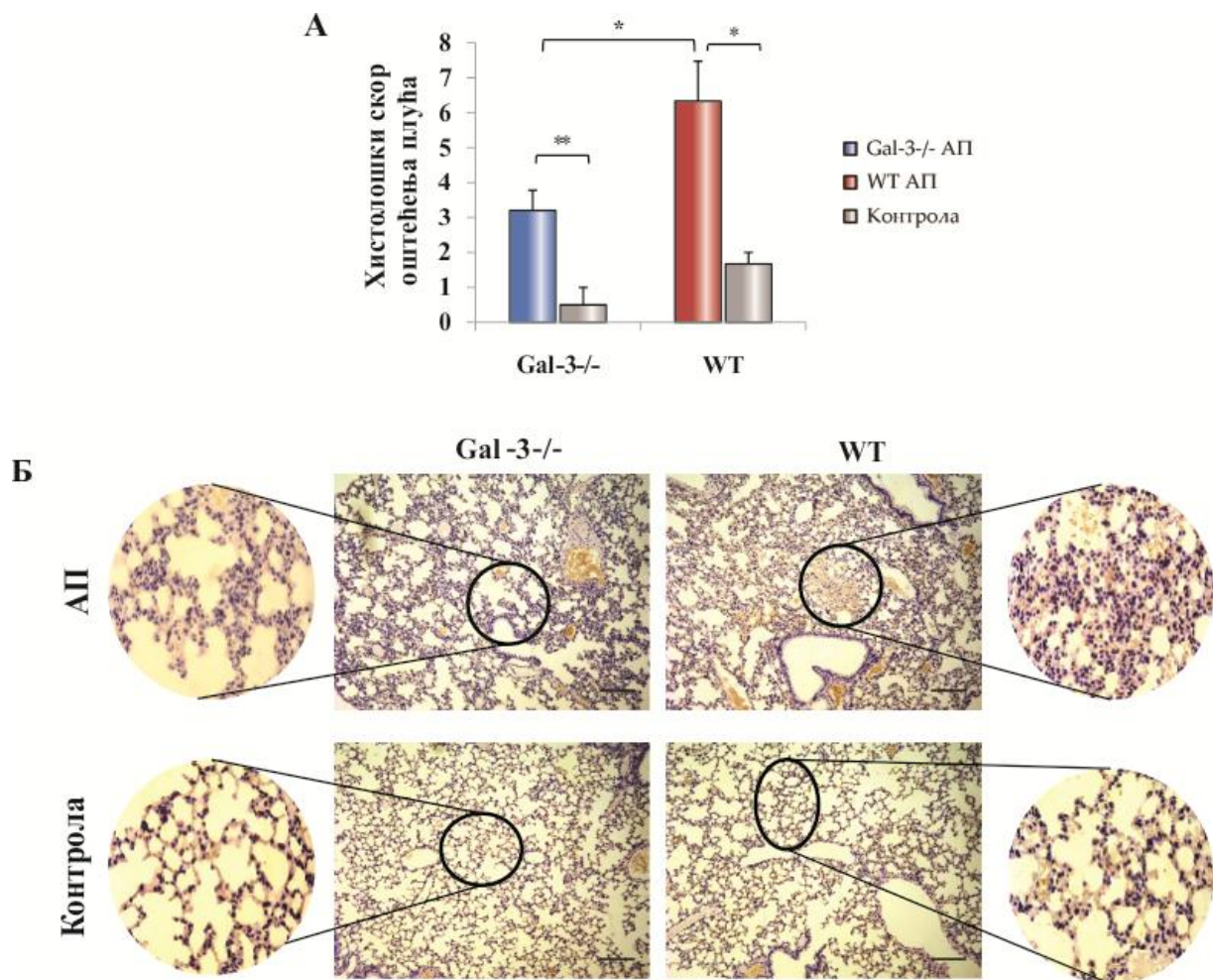


Графикон 3. Параметри оштећења панкреаса у серуму и паренхиму панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након 3 дана од индукције акутног панкреатитиса. Концентрације амилазе у серуму (А) и трипсина у паренхиму панкреаса (Б) мерене су ELISA методом. Добијене вредности су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је одређена независним *Student*-овим Т тестом (*p<0.05, **p<0.01).

Даљом колориметријским анализом испитана је активност трипсина у панкреасу оболелих мишева. Активност трипсина у паренхиму панкреаса значајно расте трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног канала код обе експерименталне групе мишева у односу на контролне животиње (Графикон 3Б). Анализа је показала да је у C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева, такође, активност трипсина статистички значајно мања у поређењу са мишевима дивљег соја трећег дана након индукције болести подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса (Графикон 3Б).

Тешка форма АП се карактерише поремећајем функције и патохистолошким променама у удаљеним органима, попут плућа и бубрега. У даљем току истраживања смо анализирали промене у хистологији бубрега и плућа. Трећи дан након индукције болести нису запажене значајне патолошке промене у бубрезима, како код група оболелих мишева у односу на контролне мишеве, тако ни између оболелих Gal-3^{-/-} и WT мишева.

У наставку смо анализирали хистолошке параметре који указују на инфламацију и оштећење плућа у склопу тешке форме АП. Анализирани сваки хистолошки параметар за оштећење плућног паренхима је статистички значајно израженији у групи оболелих мишева у односу на контролне мишеве. Хистолошки скор за сваки од испитиваних хистолошких параметара оштећења плућног паренхима, као и укупни хистолошки скор је статистички значајно већи (p<0.001) у групи оболелих C57BL/6 WT мишева у поређењу са C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишевима (Фигура 2А). Репрезентативне слике исечака плућног паренхима обојених хематоксилином и еозином указују на значајнији инфуек



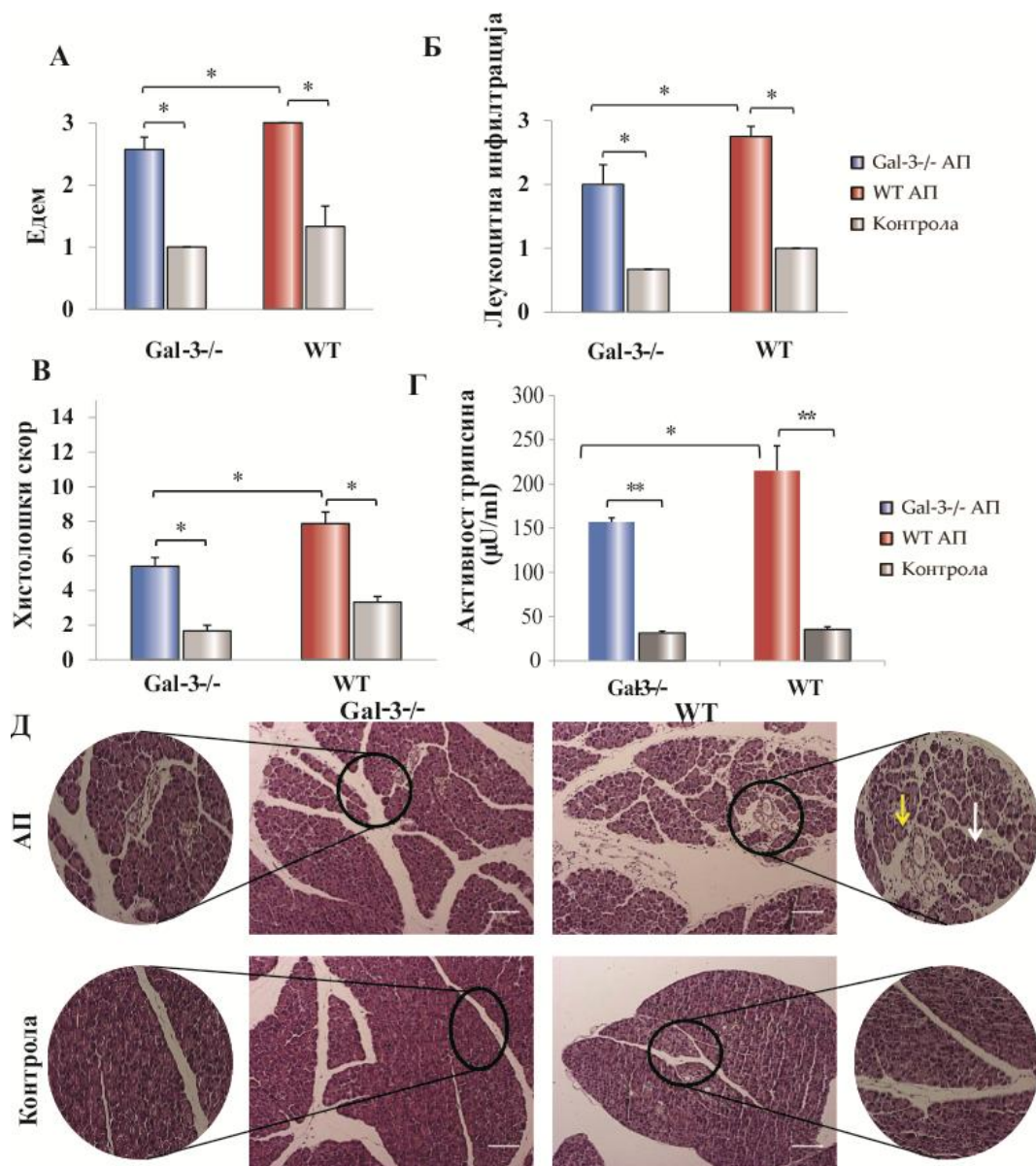
Фигура 2. Смањена инфилтрација, едем и хеморагија плућног паренхима код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције тешке форме АП. Методом хистохемијског Н&Е бојења показали смо да оболели C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишеви имају мањи степен инфилтрације, мањи едем алвеоларних преграда и поља хеморагије у поређењу са оболелим C57BL/6 WT мишевима. А. Приказан је укупан хистолошки скор оштећења плућа. Добијене вредности су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност је одређена независним *Student*-овим Т тестом (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Б. Репрезентативне слике Н&Е бојење приказују значајно мање интерстицијалног едема, поља хеморагије, задебљања алвеоларног септума и инфилтрације запаљенских ћелија у плућима оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са оболелим C57BL/6 WT мишевима. Плућа изолована из контролних група животиња су без едема, инфламације и инфилтрације запаљенским ћелијама.

леукоцита са већим пољима хеморагије у плућима који су присутни код оболелих WT мишева, као што је илустровано у Фигури 2Б. Експериментални акутни панкреатитис

индукован церулеином је најзаступљенији модел за проучавање АП (324). Холецистокински аналог, церулеин, везивањем за холецистокиненске рецепторе тип 1 и 2 повећава продукцију, али смањује секрецију дигестивних ензима који се складиште у апикалном делу ацинусних ћелија при чему се стварају услови за активацију дигестивних проензима и тако се иницира оштећење ацинусних ћелија (324). Потом, стимулација TLR-4 интраперитонеалном применом LPS поспешује развој тешке форме АП. LPS везивањем за TLR-4 активира ћелије урођене имуности, неутрофиле и макрофаге. Активирани неутрофили и макрофаги повећано продукују протеолитичке ензиме и слободне кисеоничке радикале, што узрокује некрозу паренхима панкреаса. Уједно, ћелије урођене имуности повећано синтетишу про-инфламацијске цитокине што узрокује развој системског инфламацијског одговора и оштећење плућног паренхима (324).

Да би се елиминисао евентуални ефекат контаминације перитонеалне шупљине на развој АП приликом отварања трбушне дупље и повезивања БПД, у даљем току истраживања АП је узрокован применом 6 инјекција церулеина који су апликовани интраперитонеално у сатном интервалу, а потом једном дозом LPS. Дванаест сати након последње дозе церулеина и LPS-а мишеви су жртвовани. Анализирали смо параметре оштећења панкреаса: хистолошки, анализом исечака обојених хематоксилином и еозином и колориметријски, одређивањем активности трипсина. Хистолошки параметри који указују на инфламацију у ткиву панкреаса, попут едема панкреаса, леукоцитног инфилтрата и поремећаја архитектонике панкреаса, статистички су значајано израженији ($p < 0.05$) код експерименталних мишева, дванаест сати након последње апликације церулеина, у односу на контролну групу животиња код којих је интраперитонеално апликован физиолошки раствор и LPS (Фигура 3А-3В). Хистолошки скор за сваки од испитиваних параметара, као и укупан хистолошки скор оштећења панкреаса су статистички значајно већи ($p < 0.05$) у групи C57BL/6 WT мишева у поређењу са C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишевима (Фигура 3А-3В). Репрезентативне слике панкреасног паренхима са препарата бојених хематоксилином и еозином приказују израженији интралобуларни и интраацинусни едем, као и значајну инфилтрацију ћелијама имунског система код C57BL/6 WT дванаест сати након апликације церулеина и LPS-а (Фигура 3Д).

На фигури 3Г, приказана је активност трипсина у паренхиму панкреаса која је одређена колориметријским тестом. Активност трипсина, такође, значајно расте



Фигура 3. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају лакши степен оштећења ткива панкреаса након индукције АП интраперитонеалном применом церулеина и LPS. Ткиво панкреаса C57BL/6 WT и Gal-3^{-/-} мишева је изоловано дванаест сати након индукције болести, а исечци дебљине 5µm су обојени хематоксилином и еозином. Приказани су хистолошки подскор едема (А), леукоцитна инфилтрација (Б), као и укупни хистолошки скор (В) и активност трипсина (Г) као средња вредност + SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом. *p<0.05, **p<0.01. Д. Репрезентативни исечци ткива панкреаса обојени стандарним патохистолошким бојењем. Беле стрелице показују израженији интралобуларни едем, док жуте стрелице показују масивну инфилтрацију ћелија имунског система у панкреас изолованог из оболелих C57BL/6 WT мишева.

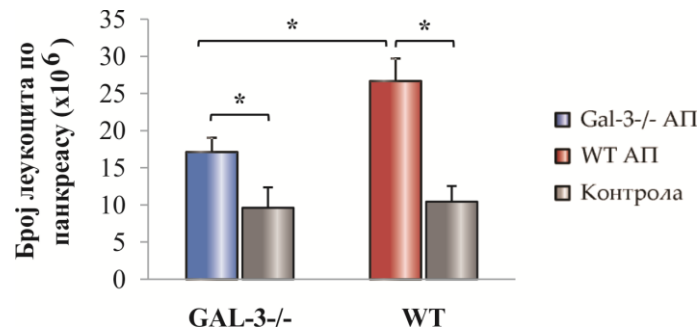
дванаест сати након апликације церулеина и LPS-а, у односу на контролну групу животиња код којих је примењен само физиолошки раствор и LPS. Утврђена је значајно мања активност трипсина у панкреасу изолованог из Gal-3^{-/-} мишева дванаест сати након апликације церулеина и LPS у односу на оболеле C57BL/6 WT мишеве (Фигура 3Г), што потврђује да је код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева присутни мањи степен оштећења паренхима панкреаса.

4.4. ДЕФИЦИТ ГАЛЕКТИНА 3 СМАЊУЈЕ ИНФЛУКС ИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЋЕЛИЈА У ПАНКРЕАС У РАНОЈ ФАЗИ АП

Обзиром да је код Gal-3^{-/-} мишева уочено значајно боље преживљавање, значајно мање оштећење ткива панкреаса и мањи инфилтрат у ткиву панкреаса Gal-3^{-/-} мишева, у даљем току истраживања је испитано да ли су ове разлике у тежини акутног панкреатитиса последица разлике у степену активације ћелија урођеног и стеченог имунског система, као и секреције про-инфламацијских и анти-инфламацијских цитокина.

Сличан је степен оштећења панкреаса у моделу АП индукованог подвезивањем БПД и у хемијском моделу АП, док модел узрокован подвезивањем БПД имитира билијарни панкреатитис код људи (319), те је овај модел коришћен за даљу анализу инфилтата инфламацијских ћелија. Присуство и природа инфламацијског одговора у панкреасу експерименталних животиња испитани су анализом фенотипских карактеристика изолованих ћелија методом проточне цитометрије трећег дана након подвезивања БПД. Претходно приказани резултати, који су показали на значајано смањење инфилтрата у панкреасу Gal-3 дефицијентних мишева са АП, потврђени су и анализом укупног броја леукоцита изолованих из панкреаса. Трећег дана након подвезивања БПД присутан је значајно већи број леукоцита који инфилтришу панкреас у поређењу са анализом панкреаса изолованог из контролних животиња, код којих је отворена трбушна дупља и испрепарисан БПД, али без подвезивања (Графикон 3). Број леукоцита по панкреасу је значајно већи код C57BL/6 WT мишева са АП ($p < 0,05$) у поређењу са C57BL/6 Gal-3^{-/-} са АП (Графикон 3).

Даљом анализом је испитана процентуална заступљеност неутрофила у панкреасу након индукције АП. Проточном цитометријом је показано да је процентуална заступљеност неутрофила значајно већа трећег дана након индукције АП подвезивањем БПД у обе експерименталне групе у односу на контролне групе мишева. Процентуална

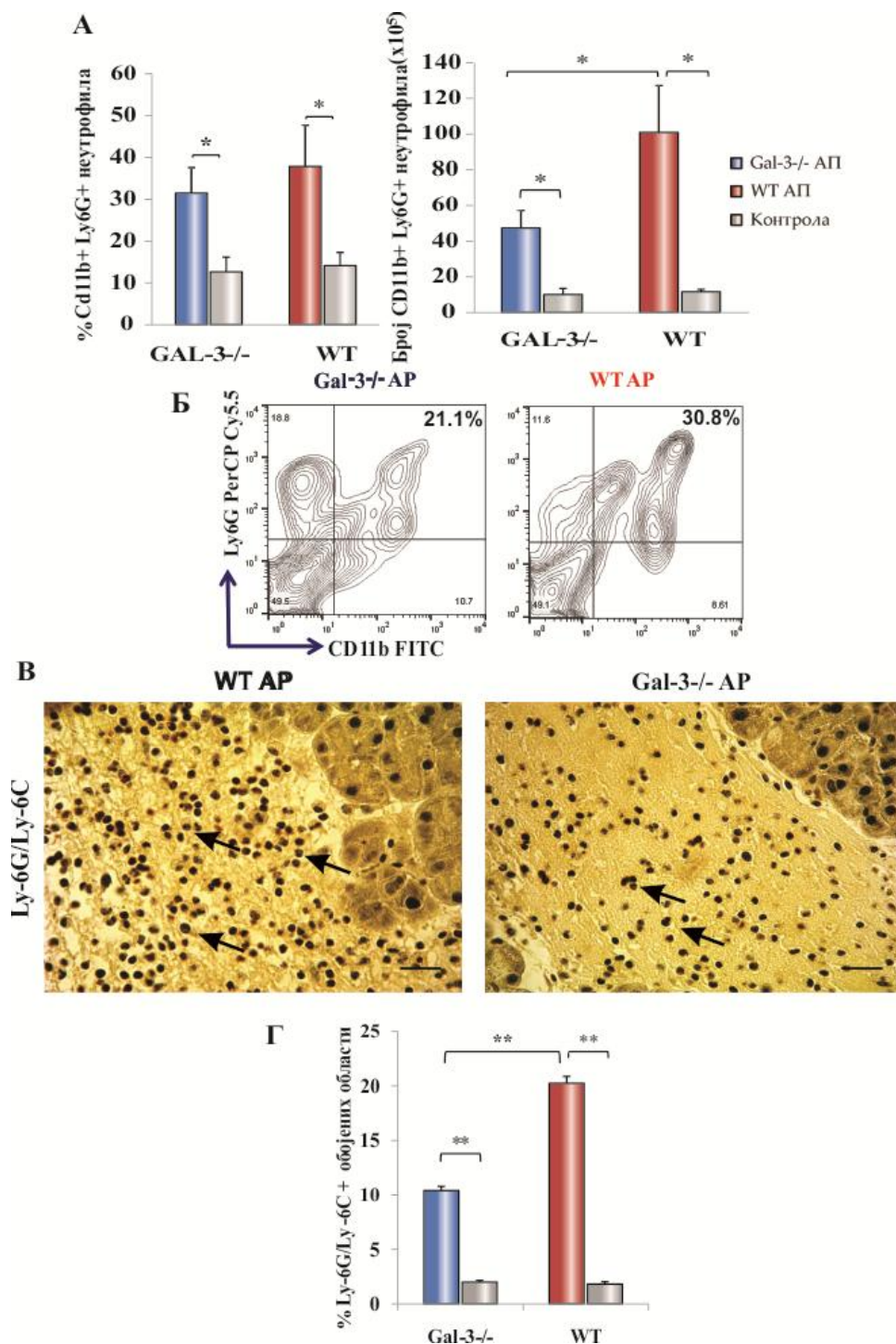


Графикон 3. Већи број леукоцита у инфилтрату је изолован из панкреаса WT мишева кон индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Панкреас C57BL/6 WT и Gal-3^{-/-} мишева је изолован трећег дана после индукције болести. Укупан број леукоцита по панкреасу је израчунат на основу формуле за пропорцију. Приказана је средња вредност броја изолованих леукоцита по групи +SE из два експеримента са 14 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, *p<0.05, **p<0.005.

заступљеност неутрофила је мања код оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у односу на C57BL/6 WT мишове, међутим разлика не досеже ниво статистичке значајности (Фигура 4А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених CD11b⁺ Ly6G⁺ неутрофила који су изоловани из панкреаса оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 4Б).

Даље смо испитали апсолутан број неутрофила изолованих из панкреаса оболелих и контролних животиња. Значајно повећан инфлукс неутрофила у панкреас је забележен код обе групе оболелих животиња у поређењу са контролним животињама (Фигура 4А). Иако нема разлике у процентуалној заступљености неутрофила у панкреасу из групе оболелих мишева, апсолутни број неутрофила је највећи у групи оболелих C57BL/6 WT мишева и статистички је значајно већи (p<0.05) у поређењу са бројем ових ћелија у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 4А).

Имунохистохемијским бојењем исечака панкреаса је анализирана експресија Ly-6G/Ly-6C⁺ као маркера неутрофила. Трећег дана након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, повећана је инфилтрација Ly-6G/Ly-6C⁺ неутрофила у односу на групу контролних мишева код којих је билио-панкреатични дуктус само испрепарисан, али без подвезивања (Фигура 4Г). Имунохистохемијском анализом показано је да је инфилтрација Ly-6G/Ly-6C⁺ неутрофила значајно мања (p<0.05) у исечцима панкреаса из групе C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 4В). Уз помоћ *Image J* софтверског про-



Фигура 4. Процент и број неутрофила у ткиву панкреаса је значајно мањи код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева. **А.** Број и проценат CD11b+ Ly6G+ неутрофила је био статистички значајно мањи у ткиву панкреаса у C57BL/6 Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 WT мишевима. **Б.** Репрезентативни dot plot-ови проточне цитометријске анализе. Први dot plot показује проценат CD11b+ Ly6G+ неутрофила панкреаса који су изоловани из C57BL/6 WT миша, а други dot plot приказује проценат ових неутрофила изолованих из C57BL/6 Gal-3^{-/-} миша. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05). **В.** Имунохистохемијским бојењем показана је израженија

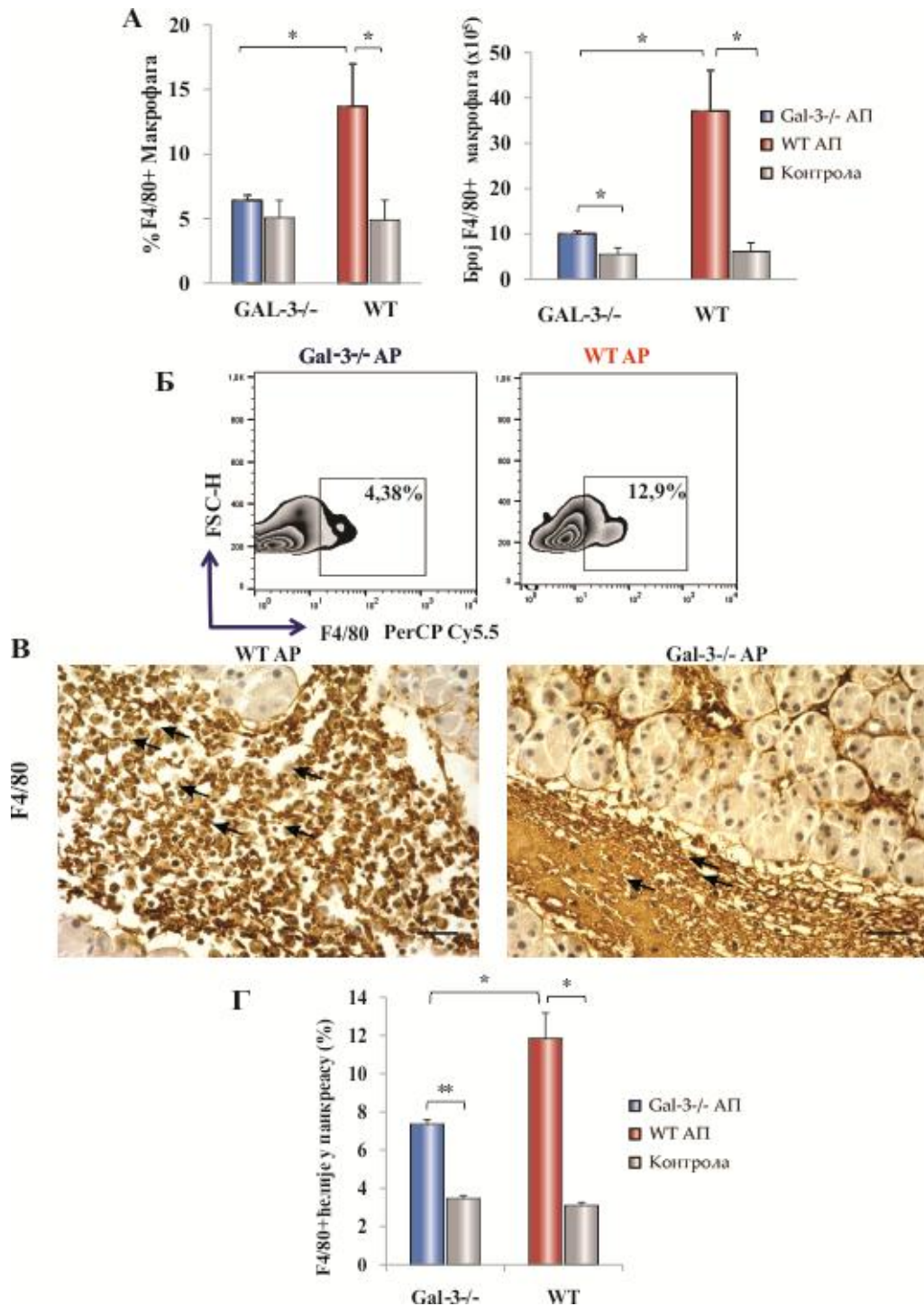
инфилтрација Ly6G/Ly6C ћелија (DAB) панкреаса изолованих из C57BL/6 WT мишева. Г. Уз помоћ *Image J* софтверског програма квантификована је експресија Ly6G/Ly6C маркера. Приказана је средња вредност процентуалне експресије Ly6G/Ly6C у односу на површину паренхима панкреаса. За процену статистичке значајности коришћен је *Student*-ов Т тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

грама је учињена квантификација позитивног бојења и добијени резултати су показали да експресија Ly-6G/Ly-6C као маркера инфилтрације неутрофила значајно расте трећег дана након подвезивања БПД, као и да је експресија Ly-6G/Ly-6C статистички значајно мања у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на групу C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 4Г).

Проточном цитометријом је показано да индукцијом тешке и леталне форме АП значајно расте апсолутни број макрофага у панкреасу оболелих мишева из обе експерименталне групе у односу на контролну групу мишева (Фигура 5А). Процентуална заступљеност макрофага је значајно мања ($p < 0,05$) у панкреасу изолованог из C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на C57BL/6 WT мишеве са АП (Фигура 5А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених F4/80+ макрофага у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 5Б). Детектоване разлике у процентуалној заступљености макрофага присутне су и када је анализиран апсолутни број ових ћелија у узорцима панкреаса, па је у складу са тим и број макрофага у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева статистички значајно мањи ($p < 0,05$) у поређењу са C57BL/6 WT мишевима са АП (Фигура 5А).

У току даљег истраживања учињена је имунохистохемијска анализа експресије F4/80 као маркера инфилтрације макрофага. Имунохистохемијским бојењем је показано да је инфилтрација F4/80+ макрофага значајно већа трећег дана након индукције АП подвезивањем БПД у обе групе експерименталних животиња у односу на групе контролних животиња (Фигура 5Г). Након квантификације позитивног бојења, добијени резултати су показали да је експресија F4/80+ као маркера инфилтрације макрофага статистички значајно мања у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 5В и 5Г).

Након три дана од индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, апсолутан број Т лимфоцита у узорцима панкреаса је значајно већи код мишева са АП у односу на контролне групе животиња (Фигура 6А). Процентуална заступљеност Т лимфоцита је мања код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева него код C57BL/6 WT мишева са АП,



Фигура 5. Сnižена заступљеност макрофага у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из панкреаса су анализирани методом проточне цитометрије. Мононуклеарне ћелије су обележене мембранским анти-F4/80 антителом. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна грешка. Статистичка значајност је одређена *Student*-ов Т тестом (**p*<0.05). **Б.** Репрезентативни *dot plot*-ови приказују процентуалну заступљеност F4/80+ макрофага у ткиву панкреаса

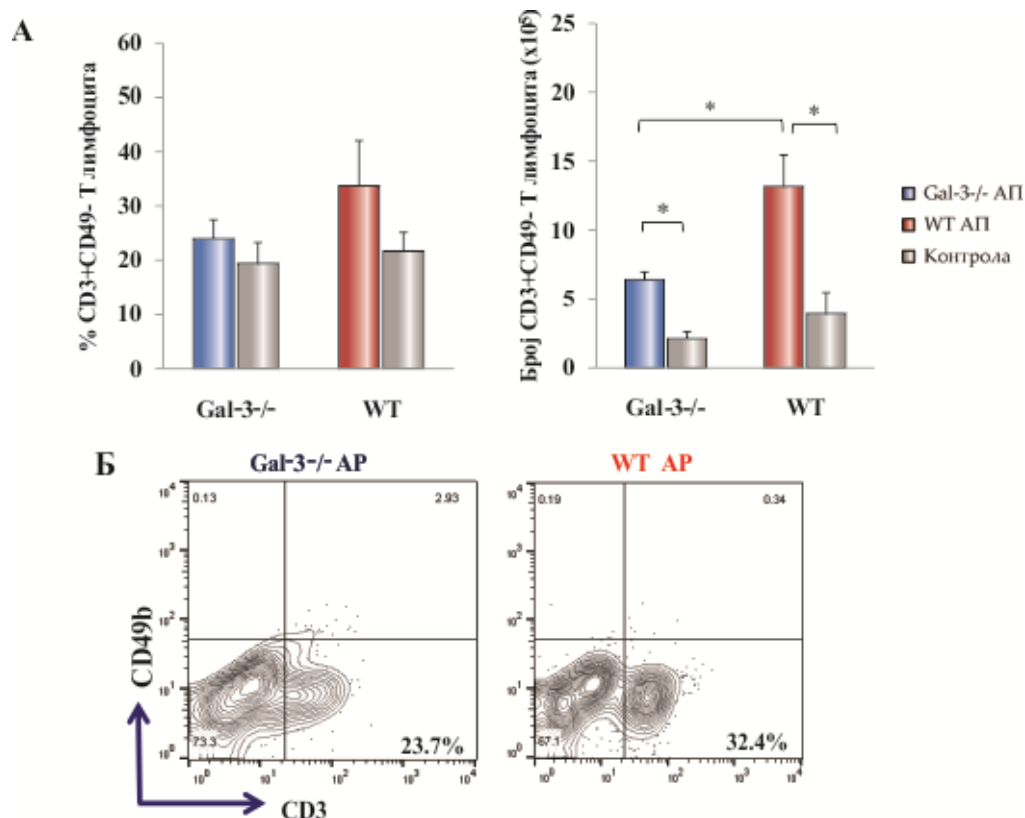
C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести. В. Имунохистохемијским бојењем показана је инфилтрација F4/80+ ћелија (DAB) панкреаса изолованих из C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева. Г. Уз помоћ *Image J* софтверског програма квантификована је експресија F4/80 маркера. Приказана је средња вредност процентуалне експресије F4/80 у односу на површину паренхима панкреаса. За процену статистичке значајности коришћен је *Student*-ов Т тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

међутим разлика не досеже статистичку значајност (Фигура 6А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених CD3+CD49- Т лимфоцита у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 6Б). Иако нема разлике у процентуалној заступљености CD3+CD49- Т лимфоцита, апсолутни број ових ћелија је значајно мањи ($p < 0.05$) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 6А).

Даљом анализом је испитана процентуалана заступљеност и апсолутни број ћелијских популација CD3-CD49+ NK и CD3+CD49+ NKT ћелија, као и CD11c+ дендритских ћелија која се не разликује значајно међу групама експерименталних и контролних мишева.

4.5. ГАЛЕКТИН 3 ДЕЛЕЦИЈА СМАЊУЈЕ ИНФИЛТРАЦИЈУ ЋЕЛИЈА УРОЂЕНЕ ИМУНОСТИ КОЈЕ ЕКПРИМИРАЈУ TLR-4

Акутни панкреатитис је инфламацијска болест панкреаса која се карактерише повећаном пропустљивошћу зида црева што поспешује транслокацију интралуминалних бактерија у циркулацију и паренхим панкреаса. Све то омогућава експозицију ацинусних ћелија и ћелија имунског система про-инфламацијским ефектима микроорганизмима из дигестивног тракта (325). Наиме, један од основних продуката бактерија, LPS, је лиганд за TLR-4 рецептор кога експримирају ћелије урођене имуности, али и ацинусне ћелије. Ово је главни механизам који одржава инфламацију панкреаса након почетка болести.



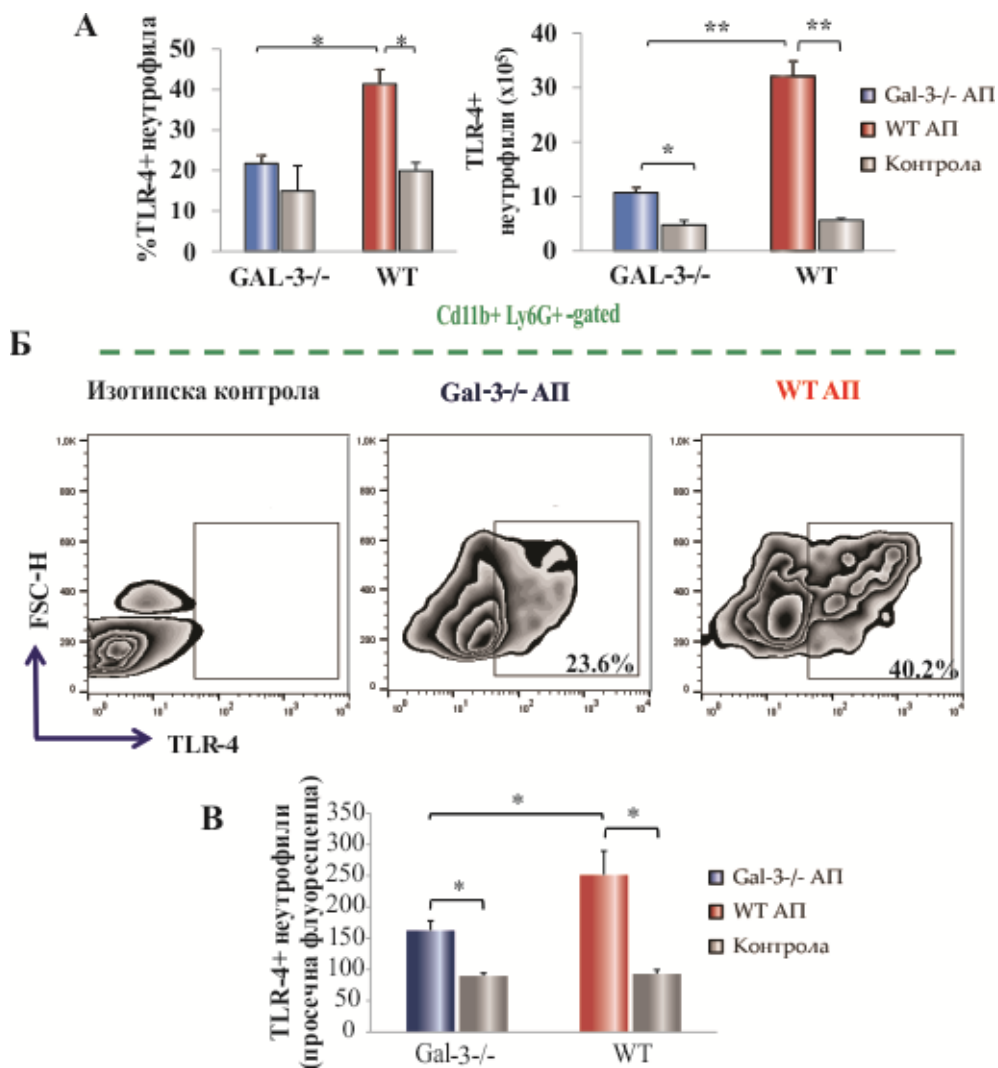
Фигура 6. Снижен проценат и број Т лимфоцита у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева. А. Мононуклеарне ћелије изоловане из панкреаса су анализирани методом проточне цитометрије. Мононуклеарне ћелије су обележене мембранским анти-CD3 и анти-CD49 антителима. Број и проценат Т лимфоцита је био статистички значајно већи у ткиву колоне у C57BL/6 Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 WT мишевима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. За процену статистичке значајности коришћен је Student-ов Т тест (*p<0.05). **Б.** Репрезентативни dot plot-ови приказују процентуалну заступљеност CD3+ CD49- Т лимфоцита у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и C57BL/6 WT мишева након индукције болести.

Поред LPS, недавне студије су показале да је и Gal-3 лиганд за рецептор TLR-4 у експерименталном моделу неуроинфламације (244). Везивањем Gal-3 за TLR-4 на површини микроглија, резидентних макрофага у možданом паренхиму, резултује развојем M1 фенотипа ових ћелија са повећаном продукцијом про-инфламацијских цитокина, TNF- α и IL-1 β (243).

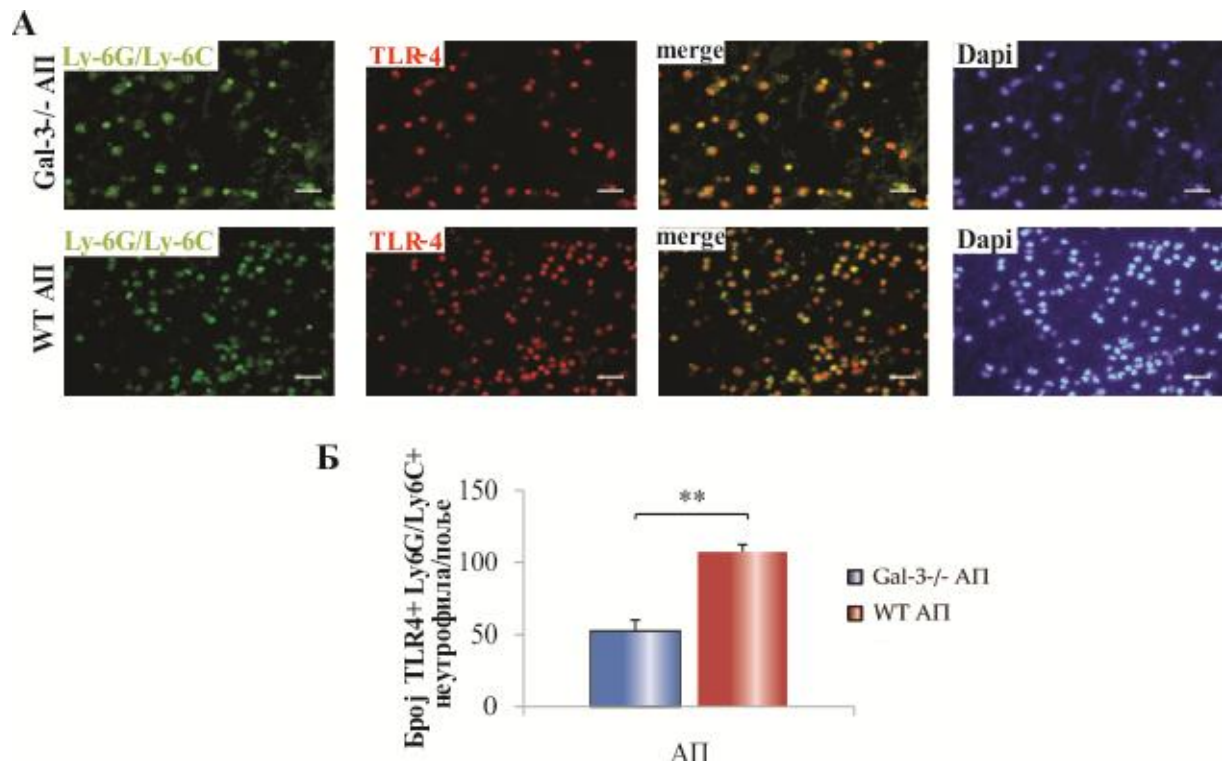
Како бисмо анализирали додатни механизам настанка инфламације панкреаса активацијом Gal-3/TLR-4 осовине, најпре смо испитали експресију TLR-4 на ћелијама урођење имуности, а потом ко-локализацију Gal-3 и TLR-4 на инфилтришућим леукоцитима у исечцима панкреаса из оболелих C57BL/6 WT мишева. Проточном цитометријом је показано да је апсолутни број неутрофила који су експримирали TLR-4

значајно већи ($p < 0.05$) у групи оболелих мишева трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса у односу на контролну групу мишева (Фигура 7А). Потом, процентуална заступљеност неутрофила који су експримирали TLR-4 је значајно мања ($p < 0.01$) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП трећег дана након подвезивања БПД у поређењу са C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 7А). Разлике у процентуалној заступљености су се одразиле и на апсолутне бројеве субпопулација неутрофила издвојених из панкреаса, па је тако апсолутни број неутрофила који су експримирали TLR-4 значајно мањи у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на групу C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 7Б). Анализом просечне вредности интензитета имунофлуоресценције је испитана експресија TLR-4 на неутрофилима изолованих из панкреаса оболелих мишева. Проточном цитометријом је показано да је експресија TLR-4 на површини неутрофила значајно мања ($p < 0.05$) код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 7В). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених Cd11b+Ly6G+ неутрофила који експримирају TLR-4 у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 7Б).

У складу са претходно добијеним резултатима који указују на значајно мању инфилтрацију неутрофила који експримирају TLR-4 у паренхиму панкреаса Gal-3^{-/-} мишева након индукције АП, у даљем току истраживања испитана је експресија TLR-4 на ћелијама урођене имуности. Крио-исечци ткива панкреаса Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције АП су испитани техником имунофлуоресценције и то двоструким бојењем на F4/80 (FITC) и TLR-4 (PE). Добијени резултати указују да је експресија TLR-4 на неутрофилима (Фигура 8А) и макрофагама (Фигура 9А) значајно мања у паренхиму панкреаса Gal-3^{-/-} у поређењу са WT мишевима након индукције АП. Након квантификације позитивног бојења, добијени резултати су показали да је експресија TLR-4 на Ly-6G/Ly-6C+ неутрофилима (Фигура 8Б) и на F4/80+ макрофагама (Фигура 9Б) статистички значајно мања ($p < 0.05$) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП.



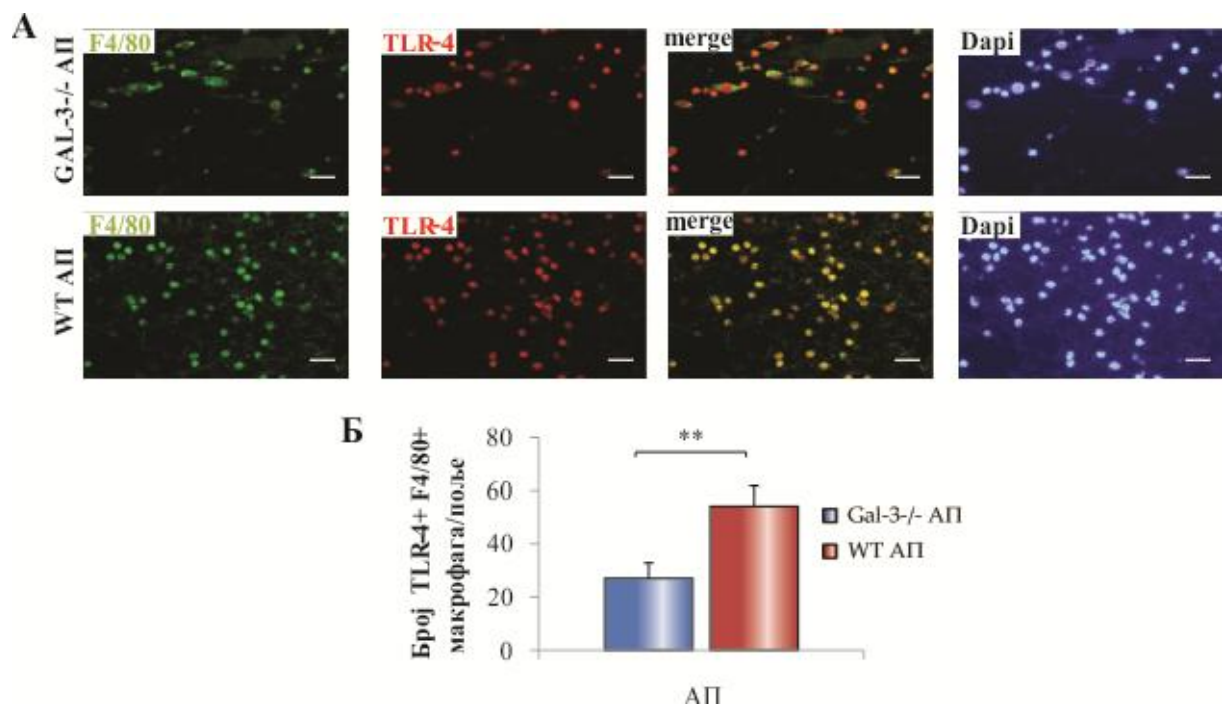
Фигура 7. Смањена заступљеност неутрофила који експримирају TLR-4 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса. **А.** Процент и број CD11b+ Ly6G+ неутрофила који експримирају TLR-4 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно мањи у поређењу са субпопулацијом неутрофила у C57BL/6 WT мишева трећег дана након индукције болести. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност TLR-4+ неутрофила у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести. **В.** Неутрофили оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева експримирају значајно мање TLR-4 у поређењу са неутрофилима изолованих из панкреаса оболелих C57BL/6 WT мишева. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, *p<0.05, **p<0.005.



Фигура 8. Сnižена експресија TLR-4 на инфилтришућим неутрофилима у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. А. Парафински исечци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC конјугованим анти-Ly6G/Ly6C антителом и PE конјугованим анти-TLR4 антителом. За визуализацију једра коришћен је DAPI *mounting* медијум. Приказане су репрезентативне слике имунофлуоресценце (FITC, PE и спојене ове две боје (енгл. merge), као и DAPI слике за приказ једра). **Б.** Према унапред утврђеним критеријумима за квантификацију, а на основу препарата бојених методом имунофлуоресценције, квантификована је експресија TLR-4. Приказана је средња вредност експресије TLR-4 у односу на површину сваког од исечака панкреаса. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.6. ГАЛЕКТИН 3 СЕ ВЕЗУЈЕ ЗА TLR-4 И ИНХИБИЦИЈА TLR-4 ПОБОЉШАВА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ МИШЕВА СА АКУТНИМ ПАНКРЕАТИТИСОМ

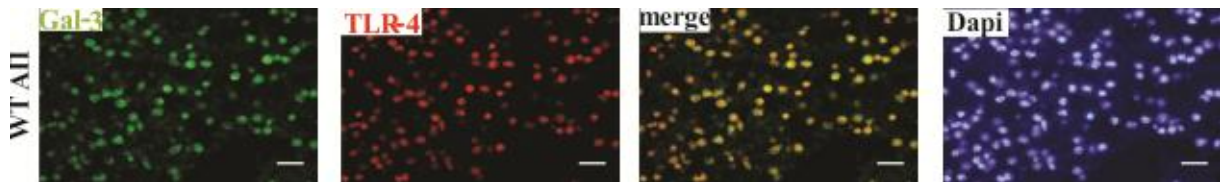
Двоструким имунофлуоресценским бојењем је испитана истовремена експресија, односно ко-локализација Gal-3 и TLR-4 на инфилтришућим леукоцитима у панкреасу



Фигура 9. Снижена експресија TLR-4 на инфилтришућим макрофагима у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Парафински исечци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC конјугованим анти-F4/80 антителом и PE конјугованим анти-TLR4 антителом. За визуализацију једра коришћен је DAPI *mounting* медијум. Приказане су репрезентативне слике имунофлуоресценце (FITC, PE, и спојене ове две боје (енгл. merge), као и DAPI слике за приказ једра). **Б.** Према унапред утврђеним критеријумима за квантификацију, а на основу препарата бојених методом имунофлуоресценције, квантификована је експресија TLR-4. Приказана је средња вредност процентуалне експресије TLR-4 у односу на површину сваког од исечака панкреаса. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

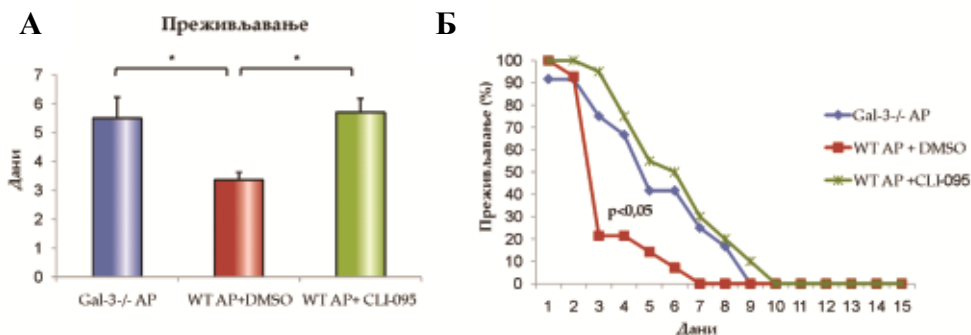
оболелих животиња. Као што је приказано на слици 7, на инфилтришућим леукоцитима у паренхиму панкреаса је присутна ко-локализација молекула Gal-3 и TLR-4 рецептора. У циљу додатне потврде активације осовине Gal-3/TLR-4 као могућег механизма настанка инфламације, WT мишеве смо третирали са инхибитором TLR-4, и то 24 сати пре подвезивања БПД, и три узастопна дана након подвезивања.

У групама мишева које су примиле CLI-095, инхибитор TLR-4, уочава статистички значајно дуже преживљавање у односу на нетретирани C57BL/6 WT са AP (Графикон 5А и 5Б). Третирани C57BL/6 WT мишеви са AP који је индикован подвезивањем БПД



Слика 7. Колокализација TLR-4 и Gal-3 на инфилтришућим леукоцитима у панкреасу C57BL/6 WT мишева након индукције акутног панкреатитиса. Парафински исечци панкреаса су бојени методом имунофлуоресценце FITC коњугованим анти-Gal-3 антителом и PE коњугованим анти-TLR4 антителом. За визуализацију једра коришћен је DAPI mounting медијум. Приказане су репрезентативне слике имунофлуоресценције (FITC, PE, и спојене ове две боје (енгл. merge), као и DAPI слике за приказ једра).

су најдуже живели десет дана након интервенције, са медијаном преживљавања шестог дана (Графикон 5А). Као што је приказано у Графикону 5Б, *Kaplan-Meier*-овом кривом је приказано значајно дуже преживљавање ($p < 0.05$) оболелих C57BL/6 WT мишева са AP који су третирани са CLI-095, у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева код којих није апликован инхибитор TLR-4.



Графикон 5. Примена инхибитора TLR-4 значајно продужава преживљавање C57BL/6 WT мишева након индукције тешке и леталне форме акутног панкреатитиса. Дијаграм преживљавања (А) и *Kaplan-Meier* крива (Б) приказују боље преживљавање оболелих C57BL/6 WT мишева након индукције болести и примене инхибитора TLR-4 рецептора.

4.7. ДЕЛЕЦИЈА ГАЛЕКТИНА 3 ЗНАЧАЈНО АТЕНУИРА ИНФЛУКС N1 НЕУТРОФИЛА У ПАРЕНХИМ ПАНКРЕАСА

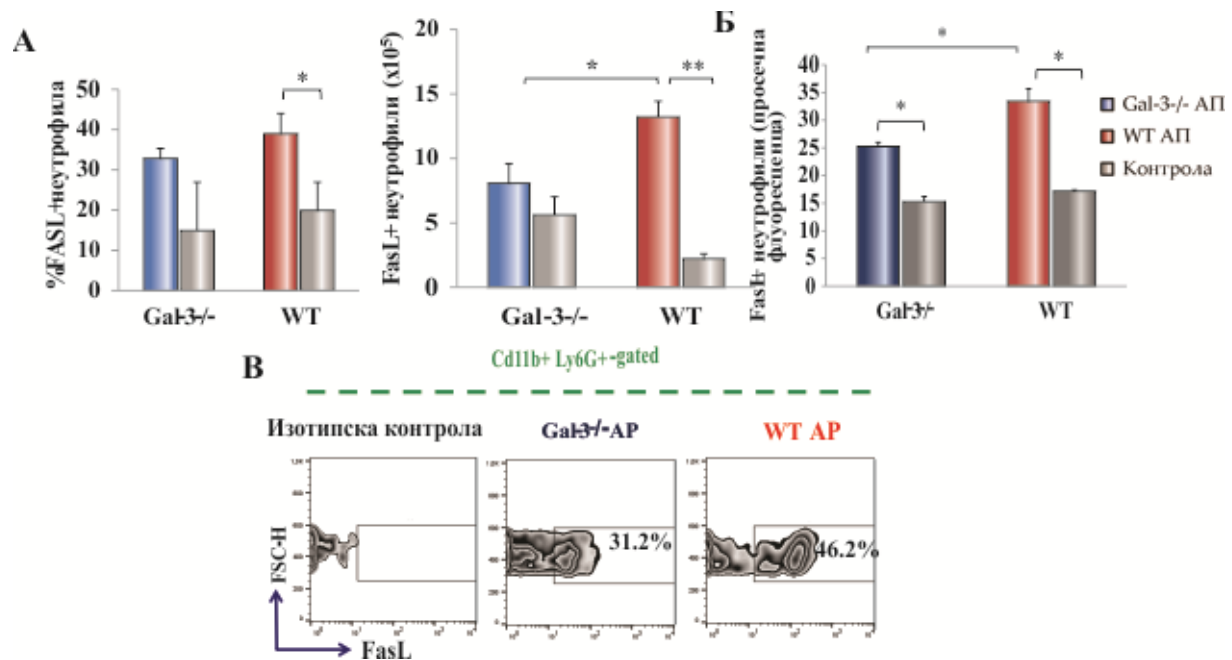
Раније студије су показале да неутрофили играју значајну улогу у патогенези акутног панкреатитиса (151). Испитивали смо улогу Gal-3 у активацији неутрофила у овом моделу болести.

Трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, апсолутан број неутрофила је био значајно мањи ($p < 0.05$) у паренхиму панкреаса издвојеног из оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 4).

У наставку анализе смо испитали фенотипске карактеристике инфилтришућих неутрофила. У инфилтрату тумора, показана је двострука поларизација неутрофила, тј. постојање N1 и N2 неутрофила (326). N1 неутрофили су означени као антитуморски или про-инфламацијски неутрофили и продукују значајне количине про-инфламацијских цитокина и хемокина, попут TNF- α и IL-1 β ; активирају цитотоксичке Т лимфоците и поседују већи капацитет уништавања туморских ћелија. На молекулском нивоу ови неутрофили експримирају FasL (енгл. *Fas ligand*, FASL). Поларизација у правцу N2 неутрофила је регулисана цитокином TGF- β (енгл. *Transforming Growth Factor beta*, TGF- β) те су ови неутрофили означени као про-туморски. На молекулском нивоу, N2 неутрофили експримирају CXCR-4 (енгл. *C-X-C motif chemokine receptor*, CXCR-4), VEGF и STAT-3 (326).

Проточном цитометријом смо одредили процентуалну заступљеност неутрофила који експримирају FasL и продукују IL-1 β , као две карактеристике N1 неутрофила. Уједно, смо испитали и експресију рецептора за хемокин, CXCR-4, као маркера N2 неутрофила. Процент селектованих неутрофила који експримирају FasL значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након индукције болести у групи оболелих C57BL/6 WT мишева у односу на групу контролних животиња код којих је учињено отварање трбушне дупље и препарација билио-панкреатичног дуктуса (Фигура 10А). У истом временском периоду, и апсолутан број неутрофила који експримирају FasL је значајно већи ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 WT мишева у односу на контролне C57BL/6 WT мишове (слика 10Б). У одсуству галектина 3, показано је да је проценат селектованих неутрофила који експримирају FasL мањи у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева, међутим разлика не досеже ниво статистичке значајности. Иако нема разлике у процентуалној заступљености неутрофила који

експримирају FasL, апсолутан број ових ћелија је значајно мањи ($p < 0.05$) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП индукованог подвезивањем билио-панкреатичног



Фигура 10. Смањена заступљеност неутрофила који експримирају FasL у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса. А. Процент и број CD11b+ Ly6G+ неутрофила који експримирају FasL у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно мањи у поређењу са оболелим C57BL/6 WT мишева трећег дана након индукције болести. **Б.** Неутрофили оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева експримирају значајно мање FasL у поређењу са неутрофилима изолованих из панкреаса оболелих C57BL/6 WT мишева. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **В.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност FasL+ неутрофила у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

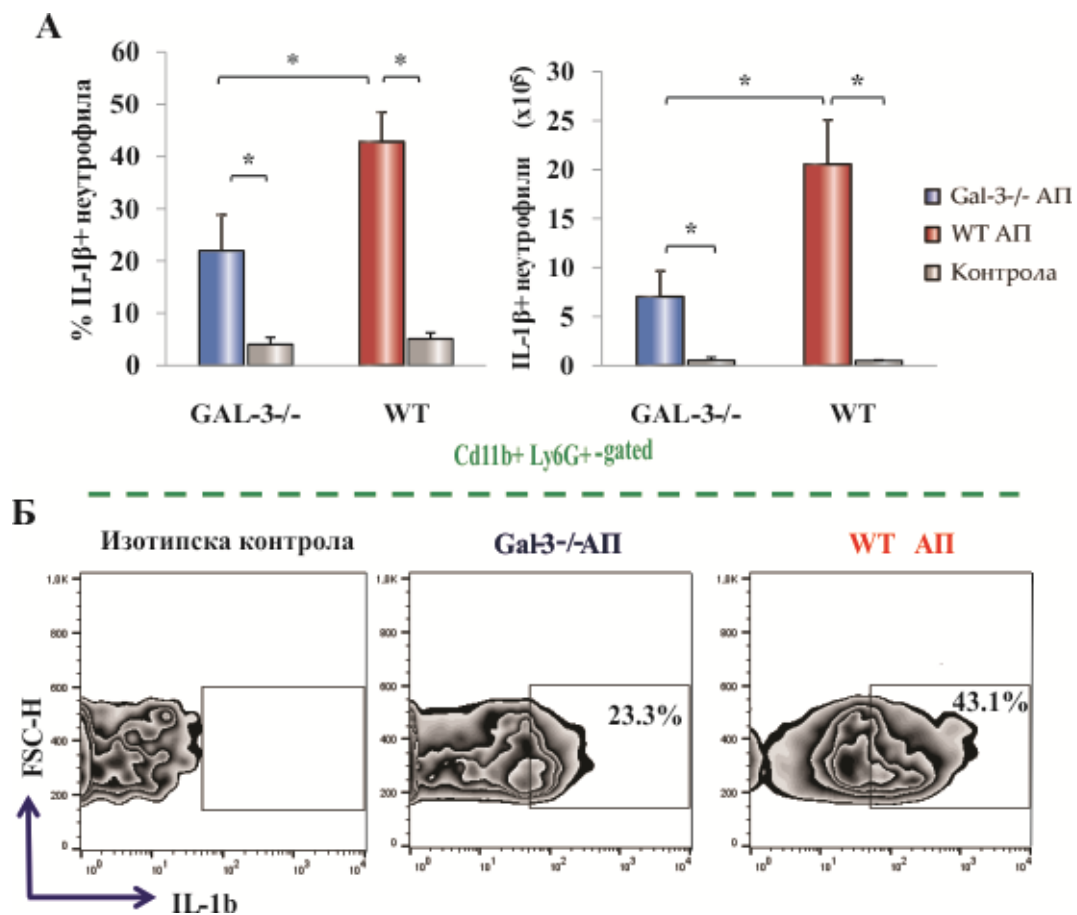
дуктуса у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 10А). Проточном цитометријом је показано да је експресија FasL на површини појединачних неутрофила значајно мања ($p < 0.05$) код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 10Б). Репрезентативни dot-plot-ови приказују процент заступљености CD11b+Ly6G+ неутрофила који експримирају FasL у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 10В).

У току даље анализе смо испитали утицај делеције гена за галектин 3 на продукцију IL-1 β из неутрофила изолованих из панкреаса оболелих и контролних мишева. Проточном цитометријом је утврђено да проценат селектованих CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују IL-1 β значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса (Фигура 11А). Апсолутан број CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују IL-1 β је значајно већи ($p < 0.05$) код оболелих мишева у односу на контролне мишеве, како у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева, тако и у групи C57BL/6 WT мишева. Процентуална заступљеност селектованих CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују IL-1 β је значајно мања ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 11А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљености CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују IL-1 β у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и C57BL/6 WT мишева (Фигура 11Б).

Проточном цитометријом није утврђена разлика у процентуалној заступљености CD11b+Ly6-G+ неутрофила који експримирају CXCR-4 или CD54, ко ни у проценту селектованих CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују TNF- α . Исто тако, делеција гена за молекул галектин 3 није утицала на апсолутан број CD11b+Ly6-G+ неутрофила који експримирају CXCR-4 или CD54, или који продукују TNF- α .

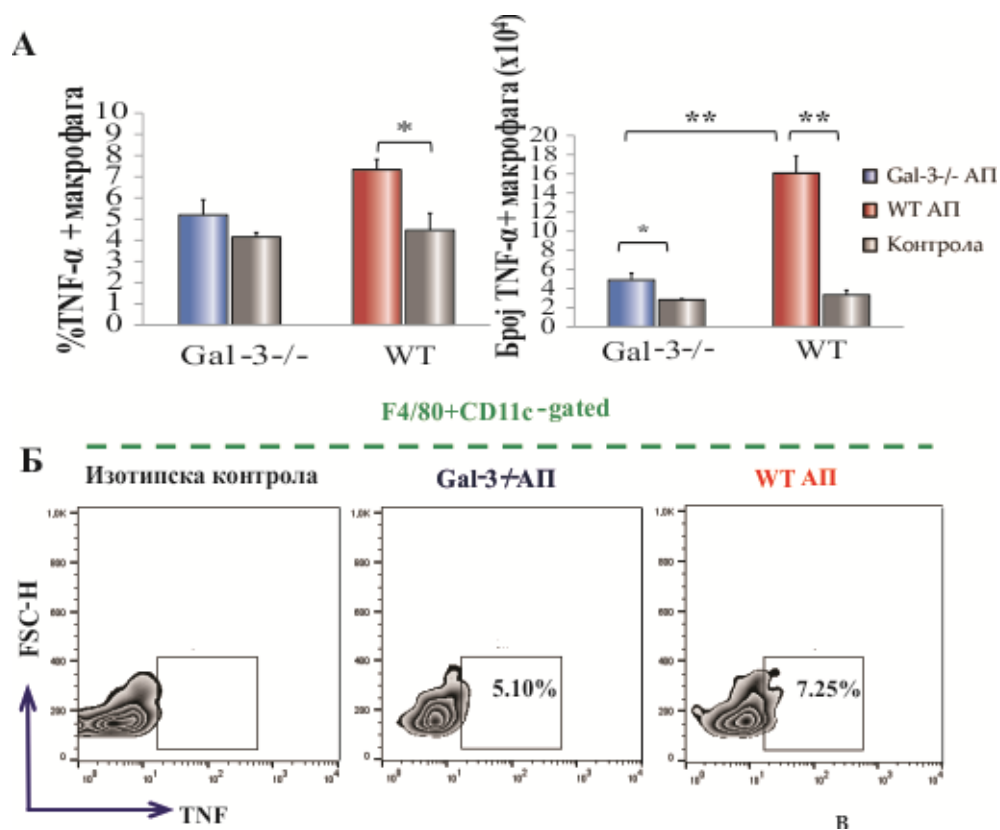
4.8. БРОЈ МАКРОФАГА И ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА СА ПРО-ИНФЛАМАЦИЈСКИМ ФЕНОТИПОМ ЈЕ БИО МАЊУ У ПАНКРЕАСУ ИЗ ОБОЛЕЛИХ GAL-3^{-/-} МИШЕВА

У циљу даљег испитивања локалног инфламацијског одговора у току акутног панкреатитиса, методом проточне цитометрије у ткиву панкреаса је анализирана инфилтрација и фенотип макрофага. Макрофаги играју централну улогу у прогресији АП, а степен активације ћелија урођене имуности је главна детерминанта тежине АП и развоја системског инфламацијског одговора (146). У складу са тим, методом проточне цитометрије испитали смо ефекат делеције гена за молекул Gal-3 на степен активације макрофага. Инфламацијску природу макрофага испитали смо анализом експресије про-инфламацијских цитокина, TNF- α и IL-1 β . Трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, апсолутан број селектованих F4/80+ CD11c- макрофага који продукују TNF- α значајно расте ($p < 0.01$) у односу на контролну групу животиња код које је билио-панкреатични дуктус само испрепарисан, али није подвезан (Фигура 11А).



Фигура 11. Смањена заступљеност неутрофила који продукују IL-1β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције болести. **А.** Процент и број CD11b+Ly6-G⁺ неутрофила који продукују IL-1β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно мањи у поређењу са C57BL/6 WT мишева трећег дана након индукције болести. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, *p<0.05. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност неутрофила који продукују IL-1β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

Проточном цитометријом је показано да је процентуална заступљеност F4/80⁺ CD11c- макрофага који продукују TNF-α мања у панкреасу издвојеног из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева, мада разлика не досеже ниво статистичке значајности (Фигура 12А). Иако нема разлике у процентуалној заступљености, апсолутан број F4/80⁺ CD11c- макрофага који продукују TNF-α је значајно мањи (p<0.05) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева трећег дана након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 12А).



Фигура 12. Смањена заступљеност M1 макрофага који продукују TNF- α у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. А. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- TNF антители. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност макрофага који продукују TNF- α у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

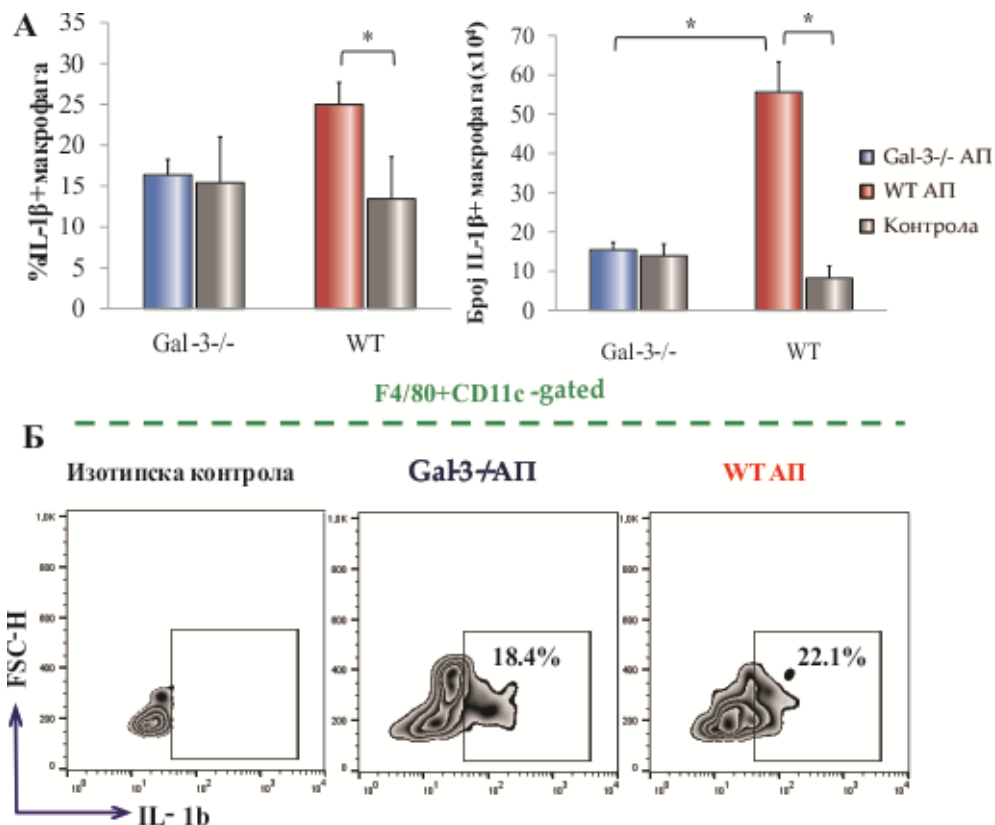
Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљености селектованих F4/80+ CD11c- макрофага који продукују TNF- α у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 12Б).

На Фигури 13 је приказана процентуална заступљеност селектованих F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-1 β , 72 сата након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Апсолутан број F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-1 β значајно расте ($p < 0.05$) након индукције АП. Иако нема значајне разлике у

процентуалној заступљености селектованих F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-1 β између групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева, апсолутан број проинфламацијских макрофага који продукују IL-1 β је значајно мањи (p<0.05) у панкреасу издвојеног из оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 13А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат F4/80+ CD11c- макрофага који експримирају IL-1 β у исечцима панкреаса изолованих из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева (Фигура 13Б).

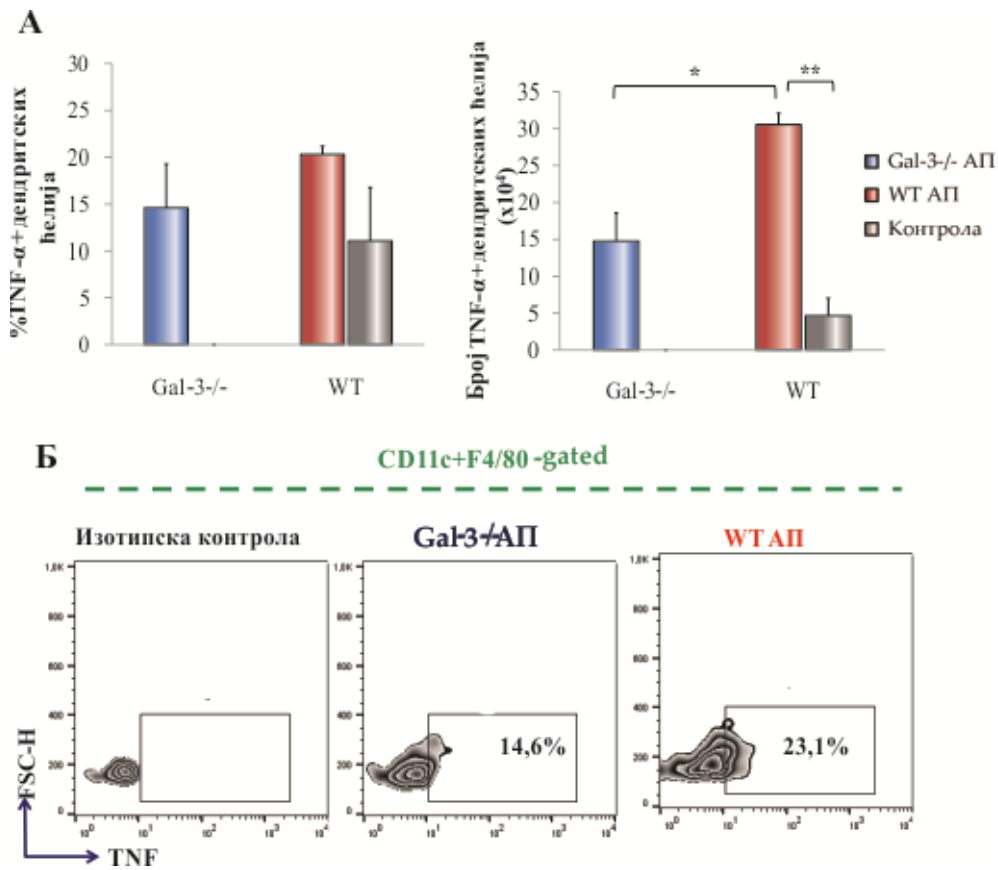
Проточном цитометријом није уочена разлика у процентуалној заступљености F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-10- и IL-12 између група оболелих и контролних експерименталних животиња.

Као што је већ наведено, статистички значајно већи проценат и апсолутан број F4/80+ макрофага, као и проценат и број макрофага који продукују инфламацијске цитокине: TNF- α и IL-1 β је био мањи у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева трећег дана након индукције АП подвезивањем БПД. Такође, уочена је статистички значајно мања процентуална заступљеност инфламацијских дендритских ћелија у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на C57BL/6 WT мишева са АП. Наиме, трећег дана након повезивања БПД значајно расте апсолутан број CD11c+F4/80- који експримирају TNF- α (Фигура 14А) и IL-1 β (Фигура 15А) у поређењу са групом контролних животиња код којих није подвезан БПД. Методом проточне цитометрије је показано да процентуална заступљеност CD11c+F4/80- дендритских ћелија које продукује TNF- α и IL-1 β је мањи у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са оболелим C57BL/6 WT мишевима, међутим без статистички значајне разлике (Фигура 14А и 15А). Иако нема разлике у процентуалној заступљености селектованих CD11c+F4/80- дендритских ћелија које експримирају TNF- α , апсолутан број ових ћелија је значајно мањи (p<0.01) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 14А).



Фигура 13. Сnižена заступљеност M1 макрофага који продукују IL-1 β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-1 антителимо. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност макрофага који продукују IL-1 β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

Исто тако, апсолутан број CD11c+F4/80- дендритских ћелија које експримирају IL-1 β , је значајно мањи у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 15А). У току даље анализе испитана је експресија IL-10 и IL-23 у изолованим дендритским ћелијама из панкреаса оболелих и контролних мишева. Процентуална заступљеност и апсолутан број дендритских ћелија које су

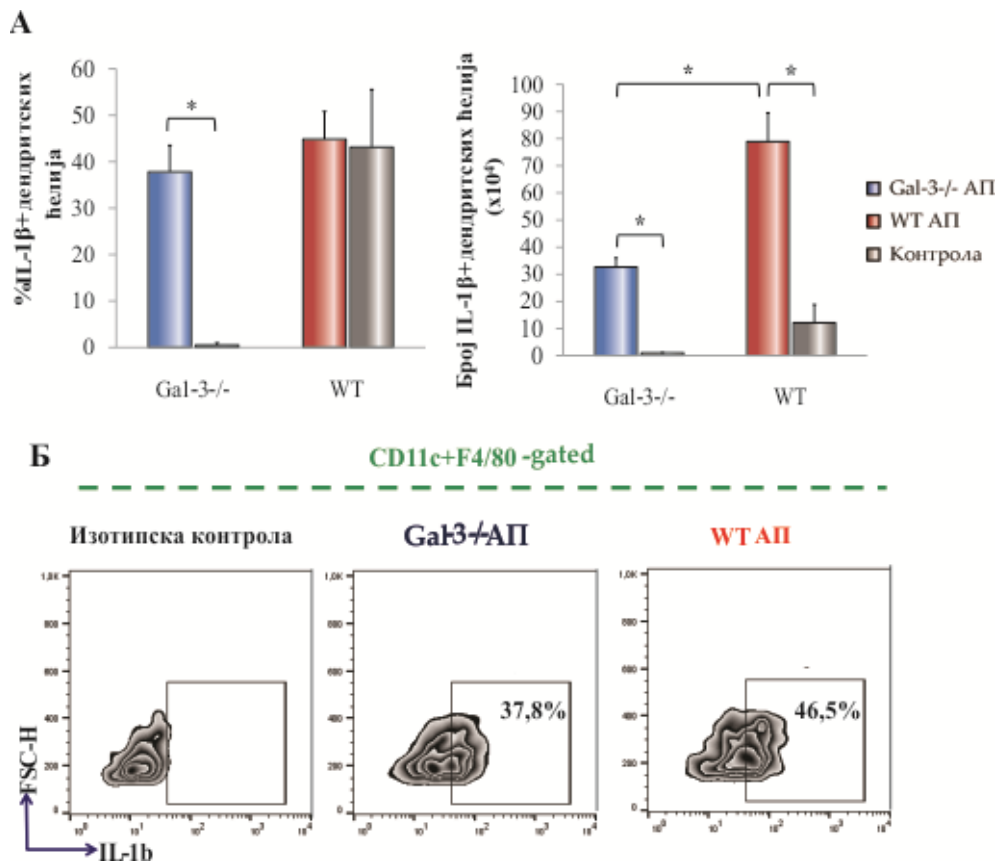


Фигура 14. Снижена заступљеност дендритских ћелија које продукују TNF- α у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- TNF антителимо. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност дендритских ћелија које продукују TNF- α у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

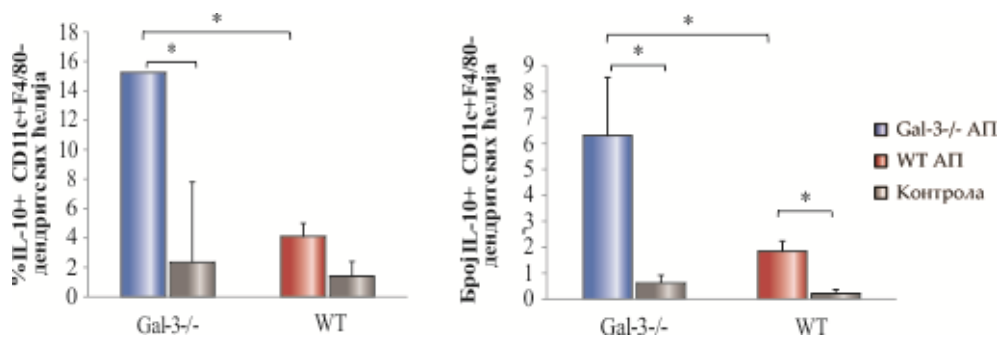
продуковале IL-10 и IL-23 између WT и Gal-3^{-/-} мишева са АП не досеже ниво статистичке значајне разлике.

4.9. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 ПОВЕЋАВА ЗАСТУПЉЕНОСТ ТОЛЕРОГЕНИХ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА

У даљем току истраживања пратили смо продукцију анти-инфламацијског цитокина, IL-10, као маркера толерогених дендритских ћелија. Индукција АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса је праћена повећањем процента и броја дендритских ћелија које продукују IL-10 у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева (Графикон 6).



Фигура 15. Снижена заступљеност дендритских ћелија које продукују IL-1β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-1 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, *p<0.05. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност дендритских ћелија које продукују IL-1β у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.



Графикон 6. Повећана заступљеност толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. А. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-10 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, *p<0.05.

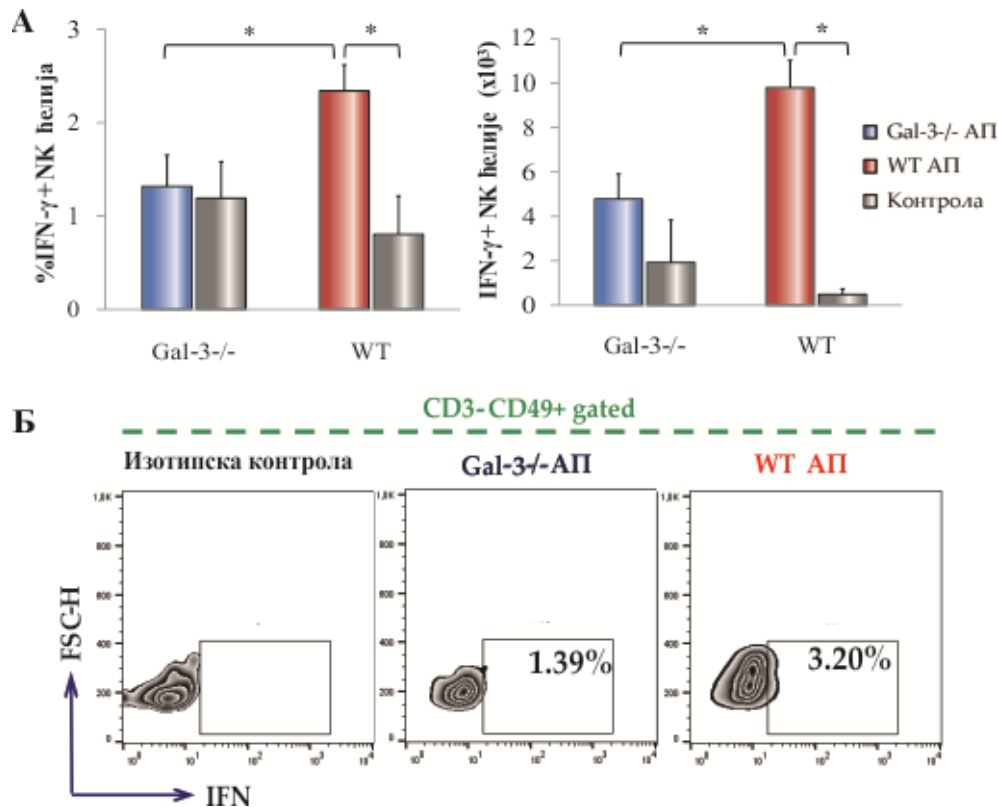
Процентуална заступљеност IL-10-продукујућих дендритских ћелија је значајно већа (p<0.05) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса у поређењу са оболелим и C57BL/6 WT мишевима (Графикон 6). Уочене разлике у процентуалној заступљености различитих популације дендритских ћелија које продукују IL-10 запажене су и када је анализиран апсолутан број ових ћелија у узорцима панкреаса, те је број дендритских ћелија које продукују IL-10 у ткиву панкреаса оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева значајно већи у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Графикон 6).

4.10. ГАЛЕКТИН 3 ПОСПЕШУЈЕ ИНФИЛТРАЦИЈУ НК И НКТ ЋЕЛИЈА СА ПРО-ИНФЛАМАЦИЈСКИМ ФЕНОТИПОМ У ПАНКРЕАСУ МИШЕВА НАКОН ИНДУКЦИЈЕ АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

Након испитивања улоге неутрофила и макрофага у акутном панкреатитису изазаваног подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, наметнуло се испитивање других ћелија урођене имуности, пре свега популација НК и НКТ ћелије. Тако је у изолатима панкреаса одређиван проценат и број CD3-CD49⁺ НК ћелија и CD3+CD49⁺ НКТ

ћелија, а унутар тих популације је одређиван проценат и број ћелија које продукују IFN- γ .

Трећег дана након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, повећава се проценат и број CD3-CD49+ NK ћелија и CD3+CD49+ NKT ћелија, међутим разлике не досежу ниво статистичке значајности. Анализа фенотипа NK ћелија је показала да проценат CD3-CD49+ NK ћелија које продукују IFN- γ (Фигура 16А) значајно расте ($p < 0.05$) након индукције АП у групи оболелих C57BL/6 WT

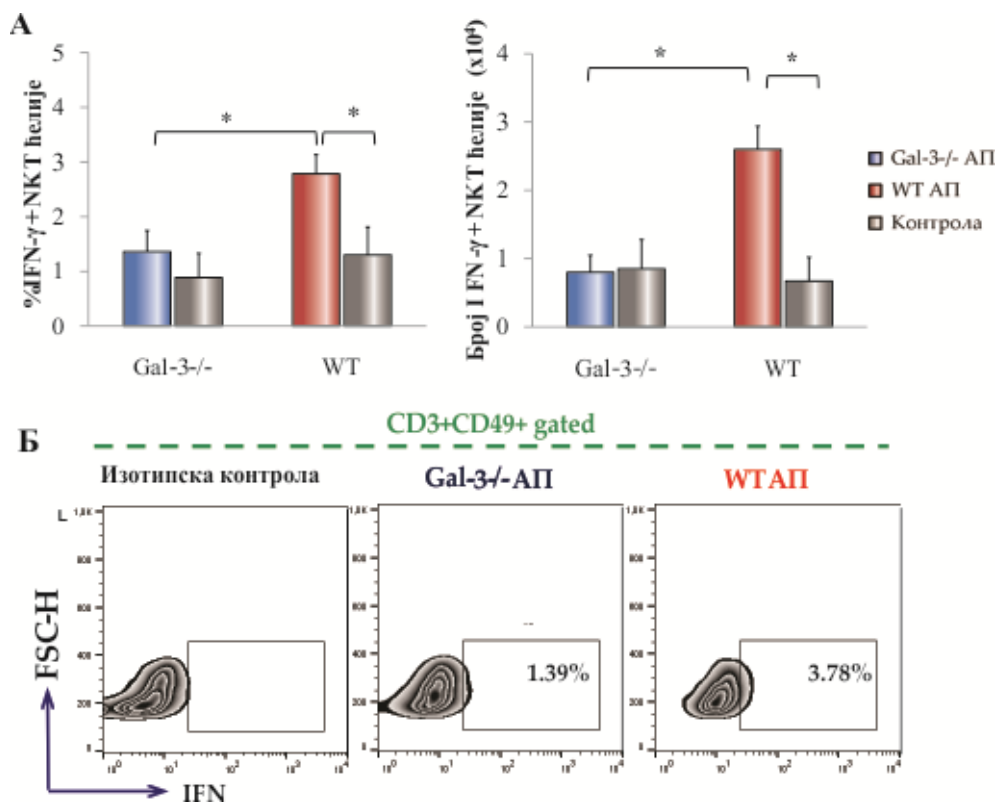


Фигура 16. Сnižена заступљеност про-инфламацијских NK ћелија које продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. А. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- IFN- γ антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$. Б. Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност про-инфламацијских NK ћелија које продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

мишева у односу на групу контролних животиња (Фигура 16А). Разлике у проценту су се одразиле и код апсолутних бројева, тако да индукција АП значајно повећава апсолутни број CD3-CD49+ NK ћелија које продукују IFN- γ у групи оболелих C57BL/6 WT мишева у односу на групу контролних животиња (Фигура 16А). Процентуална заступљеност селекованих CD3-CD49+ NK ћелија које продукују IFN- γ је значајно мања у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} животиња са АП у поређењу са C57BL/6 WT мишева са АП индикован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса (Фигура 16А). У изолатима панкреаса регистрован је и значајно мањи ($p < 0.05$) апсолутни број CD3-CD49+ NK ћелија које продукују IFN- γ у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} животиња са АП у поређењу са C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 16А). Сnižена процентуална заступљеност проинфламацијских NK ћелија у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције АП је приказана и репрезентативним *dot-plot*-овима (Фигура 16Б).

У даљем току истраживања испитан је ефекат делеције гена за молекулу галектина 3 на инфламацијску природу CD3+CD49+ NKT које продукују IFN- γ . Проточном цитометријом показано је да проценат и апсолутни број CD3+CD49+ NKT које продукују IFN- γ значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса у групи оболелих C57BL/6 WT мишева у односу на групу контролних животиња (Фигура 17А). Заступљеност CD3+CD49+ NKT ћелија које продукују IFN- γ је значајно мања у панкреасу изолованог из групе оболелих ($p < 0.05$) C57BL/6 Gal-3^{-/-} у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 17А). Уочене разлике у процентуалној заступљености популација CD3+CD49+ NKT ћелија које продукују IFN- γ запажене су и када је анализиран апсолутни број те ћелијске популације, па је апсолутни број CD3+CD49+ NKT ћелија које продукују IFN- γ је значајно мањи ($p < 0.05$) у панкреасу изолованог из групе оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 17А). Значајна разлика у проценту про-инфламацијских NKT ћелија у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције АП је приказана и репрезентативним *dot-plot*-овима (Фигура 17Б).

Проточном цитометријом је анализиран имуносупресивни фенотип CD3-CD49+ NK и CD3+CD49+ NKT ћелија, тј проценат и апсолутан број NK и NKT ћелија које експримирају транскрипциони фактор Foxp3 и продукују IL-10, међутим нису уочене статистички значајне разлике.



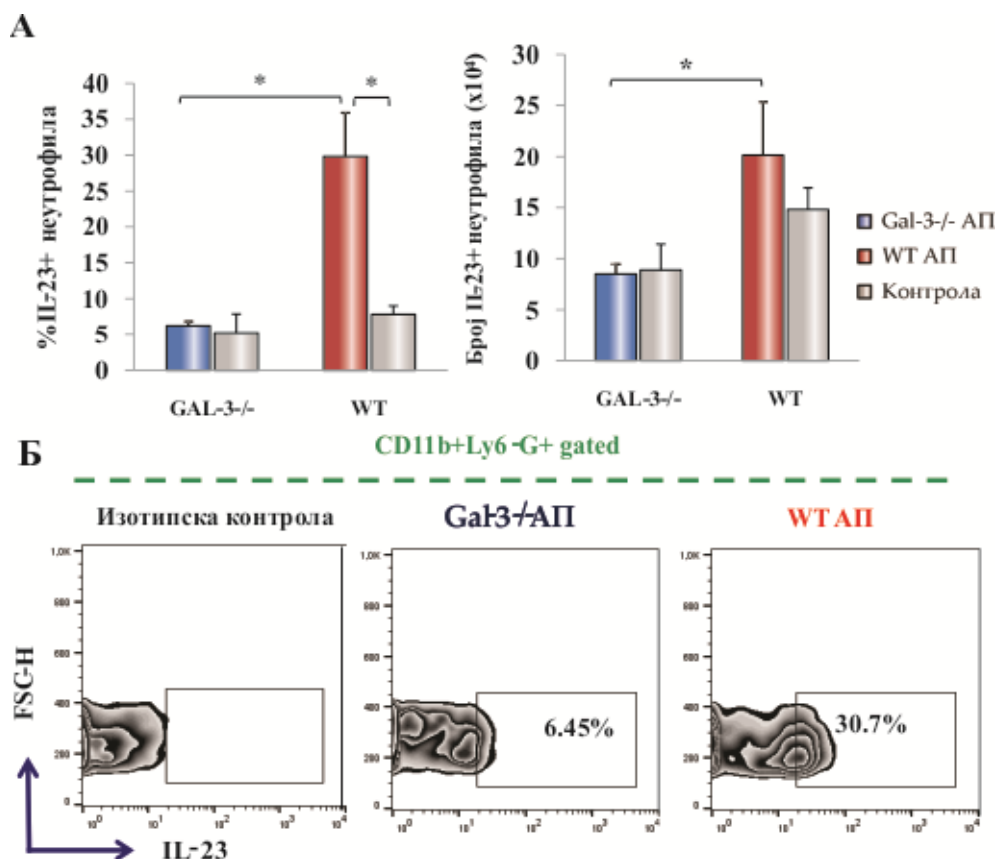
Фигура 17. Снижена заступљеност про-инфламацијских NKT ћелија које продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- IFN- γ антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност про-инфламацијских NKT ћелија које продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

4.11. ДЕФИЦИТ ГАЛЕКТИНА 3 УТИЧЕ НА АКТИВАЦИЈУ IL-23/IL-17 ОСОВИНЕ У ИНФЛАМИРАНОМ ПАНКРЕАСУ МИШЕВА СА ТЕШКОМ ФОРМОМ АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА

Једна од основних карактеристика акутног панкреатитиса је инфилтрација неутрофила у паренхиму панкреаса. Инфилтрација је олакшана ослобађањем хемокина из

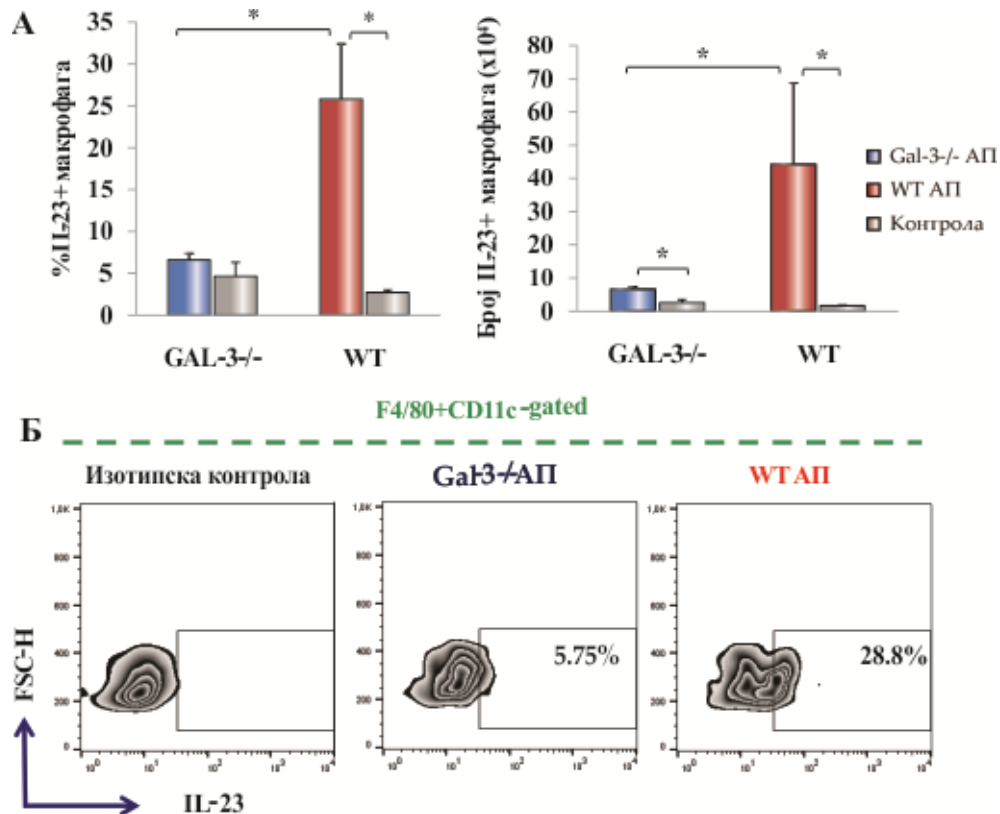
оштећених ацинусних ћелија, али и из активираних ћелија урођене имуности. Поред хемокина, секреција цитокина IL-23 и IL-17 и активација Th17 лимфоцита као дела стечене имуности доприноси повећању броја неутрофила у инфламираном подручју. Сходно са тим, наметнуло се питање да ли делеција гена за галектин 3 утиче на активацију IL-23/IL-17 осовине и да ли је то један од механизма мање инфламације детектоване у панкреасима изолованих из оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева.

Процентуална заступљеност селектованих CD11b+Ly6-G⁺ неутрофила који секретују IL-23 значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након индукције АП (Фигура 18А) у групи



Фигура 18. Смањена заступљеност неутрофила који продукују IL-23 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса **А.** Процент и број неутрофила који продукују IL-23 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно мањи у поређењу са овим ћелијама у C57BL/6 WT мишева трећег дана након индукције болести. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност неутрофила који продукују IL-23 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

оболелих C57BL/6 WT мишева у поређењу са групом контролних C57BL/6 WT мишева (Фигура 18А). Потом, заступљеност CD11b+Lyb-G+ неутрофила који продукују IL-23 је значано мања ($p < 0.05$) у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} са АП у односу на групу оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 18А). Попут значајне разлике у проценту и апсолутни број ове ћелијске популације је значајно мањи ($p < 0.05$) код оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} у односу са одговарајућом групом C57BL/6 WT мишева (Фигура 18А).



Фигура 19. Сnižена заступљеност макрофага који продукују IL-23 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Изоловане мононуклеране ћелије су обележене мембранским маркерима анти-F4/80 и анти-CD11c антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-23 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност макрофага који продукују IL-23 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

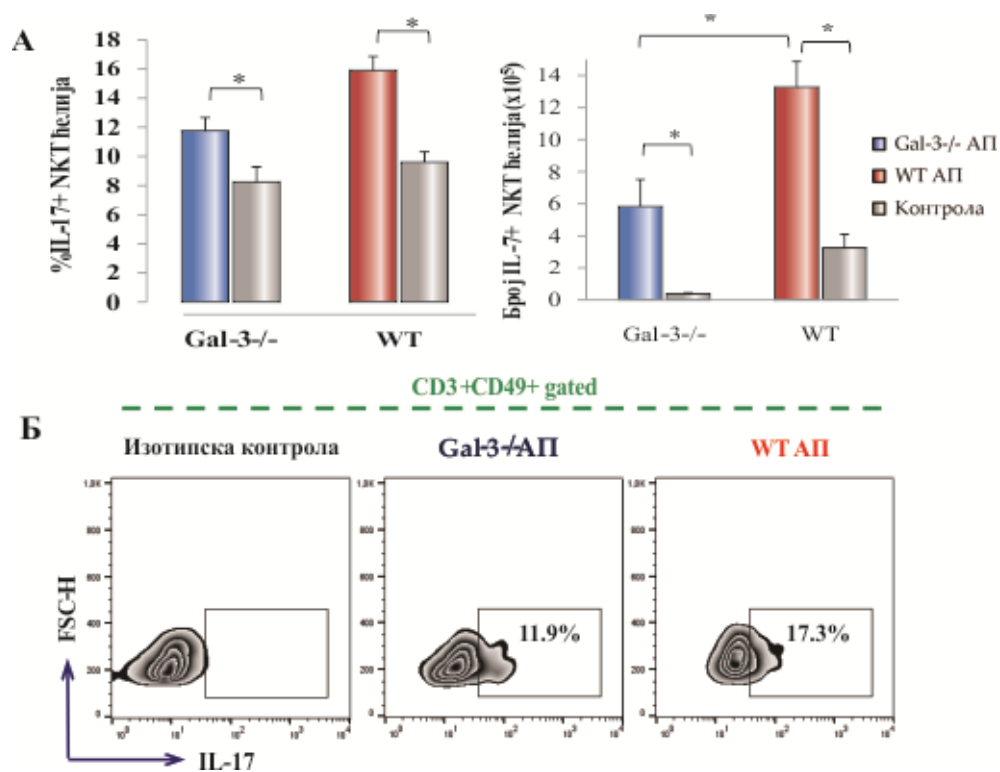
Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат CD11b+Ly6-G+ неутрофила који продукују IL-23 изолованих из ткива панкреаса у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције АП (Фигура 18Б).

Након испитивања популације неутрофила као извор секреције IL-23, уследило је испитивање ћелијске популације макрофага које продукују IL-23, као главни извор овог цитокина у инфламацијском процесу. Као што је приказано у Фигури 19А, проценат селектованих F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-23 значајно расте ($p < 0.05$) након индукције АП у групи оболелих C57BL/6 WT и ове разлике су биле присутне и код апсолутног броја ове ћелијске популације. Процентуална заступљеност F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-23 је значајно мања ($p < 0.05$) у изолату панкреаса добијеног из C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT (Фигура 19А). Добијена разлика се одразила и на апсолутни број ове ћелијске популације, те број F4/80+ CD11c- макрофага који продукују IL-23 је значајно мањи у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 WT мишева након индукције АП (Фигура 19А). Значајна разлика у процентуалној заступљености поменуте ћелијске популације је приказана и репрезентативним *dot-plot*-овима (Фигура 19Б).

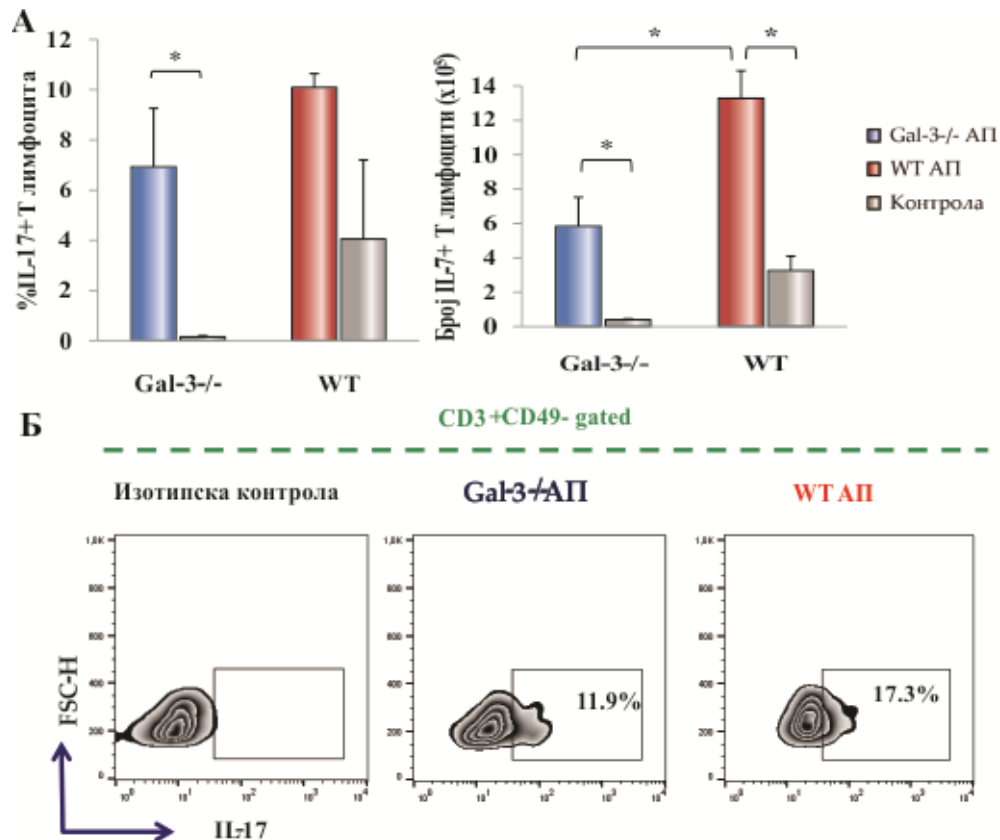
Процентуална заступљеност селектованих CD3+CD49+ НКТ ћелија које продукују IL-17 значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након индукције АП у поређењу са групом контролних животиња (Фигура 20А). Добијене разлике су присутне и код апсолутних бројева популације CD3+CD49+ НКТ ћелија које продукују IL-17 који су значајно веће ($p < 0.05$) код групе оболелих мишева од АП у односу на групу контролних мишева. Процент CD3+CD49+ НКТ ћелија које продукују IL-17 је мањи код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП трећег дана након подвезивања БПД, у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева са АП, међутим разлика не досеже ниво статистичке значајности (Фигура 20А). Иако нема разлике у процентуалној заступљености CD3+CD49+ НКТ ћелија које продукују IL-17, апсолутан број ове ћелијске популације је значајно мањи ($p < 0.05$) код оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 20А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених CD3+CD49+ НКТ ћелија које продукују IL-17 изолованих из панкреаса у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП и C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 20Б).

Апсолутни број CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IL-17 значајно расте ($p < 0.05$) трећег дана након подвезивања БПД као експерименталног модела АП (Фигура 21А). У исто време, процентуална заступљеност CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IL-17

је мања код оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева са АП, међутим разлика не досеже ниво статистичке значајности (Фигура 21А). Мада нема разлике у проценту, апсолутан број поменуте ћелијске популације је значајно мањи ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 21А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IL-17 изолованих из панкреаса у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП и C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 21Б).



Фигура 20. Сnižена заступљеност NKT ћелија које продукују IL-17 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- IL-17 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност NKT ћелија које продукују IL-17 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.



Фигура 21. Снижена заступљеност Т лимфоцита који продукују IL-17 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-17 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност Т лимфоцита који продукују IL-17 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

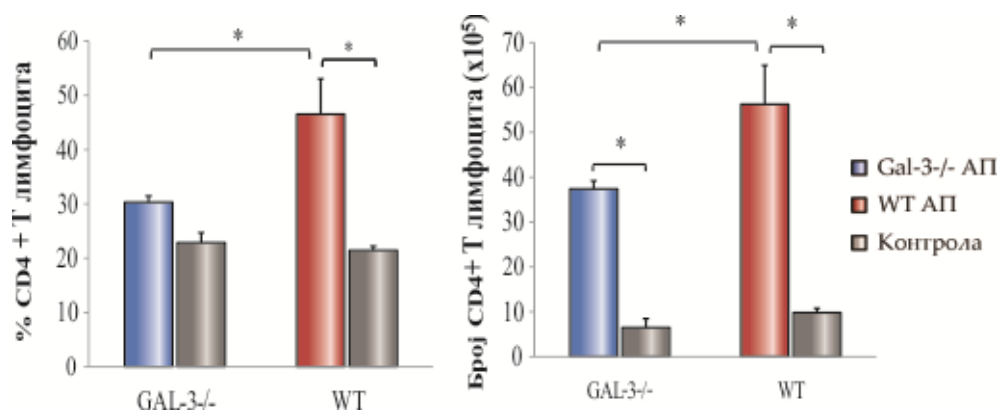
4.12. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 СМАЊУЈЕ БРОЈ Т ЛИМФОЦИТА КОЈИ ПРОДУКУЈУ IFN И ПОВЕЋАВА БРОЈ ОВИХ ЋЕЛИЈА СА ИМУНОСУПРЕСИВНИМ ФЕНОТИПОМ

Обзиром да ћелије стечене имуности играју битну улогу у активацији макрофага и посредно утичу на степен системског инфламацијског одговора у АП, методом

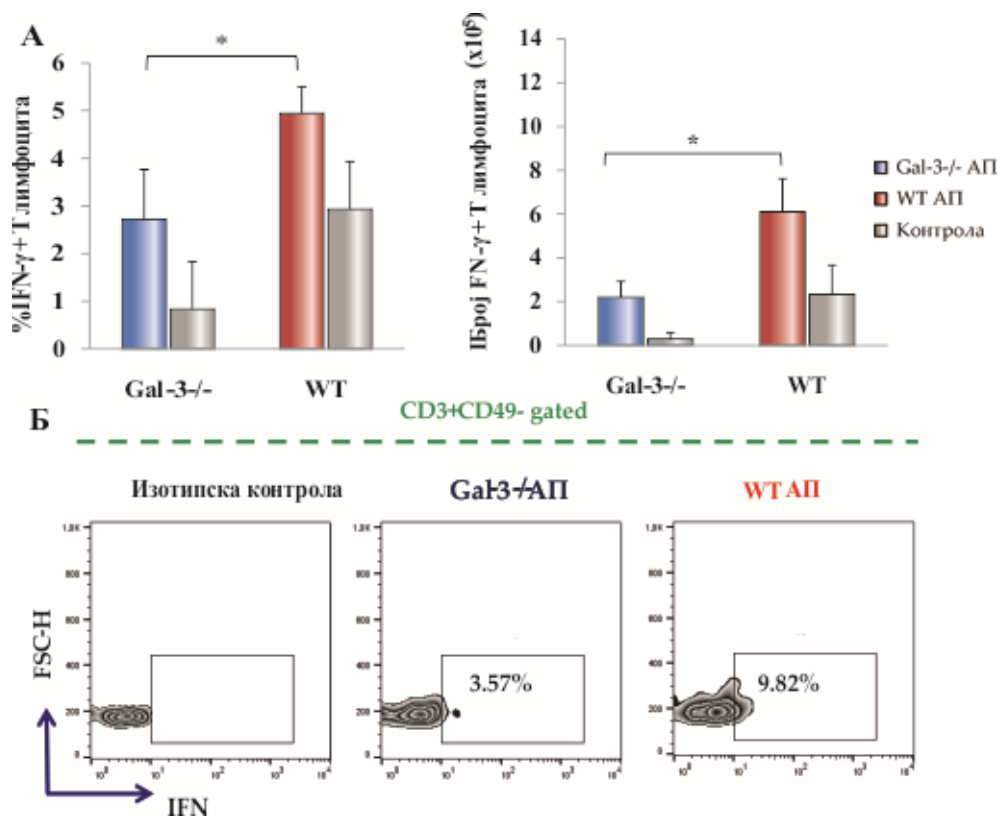
проточне цитометрије су анализирани инфилтрација и фенотипске карактеристике Т лимфоцита и помагачких Т лимфоцита. Про-инфламацијски фенотип Т лимфоцита је потврђен експерисијом IFN- γ , док је имуносупресивни фенотип Т лимфоцита и помагачких Т лимфоцита потврђен одређивањем експерисије Foxp3 (енгл. *forkhead box P3*, Foxp3), CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*, CTLA-4) и продукцијом IL-10.

Као што је приказано у Фигури 6, број CD3+CD49- Т лимфоцита је значајно већи код C57BL/6 WT трећег дана експеримента у поређењу са групом C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева. У складу са овим налазима, су и резултати који се односе на заступљеност помагачких CD4+ Т лимфоцита. Индукцијом АП значајно расте број CD4+ Т лимфоцита трећег дана након подвезивања БПД у поређењу са контролном групом мишева (Графикон 7). Процентуална заступљеност CD4+ Т лимфоцита који инфилтришу ткиво панкреаса је значајно мања ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Графикон 7). У исто време, апсолутан број ових ћелија је значајно мањи ($p < 0.05$) код C57BL/6 Gal-3^{-/-} са АП трећег дана експеримента (Графикон 7).

У даљем току експеримента, проточном цитометријом је одређен проценат CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IFN- γ . Процентуална заступљеност CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IFN- γ је значајно мањи ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 22А).



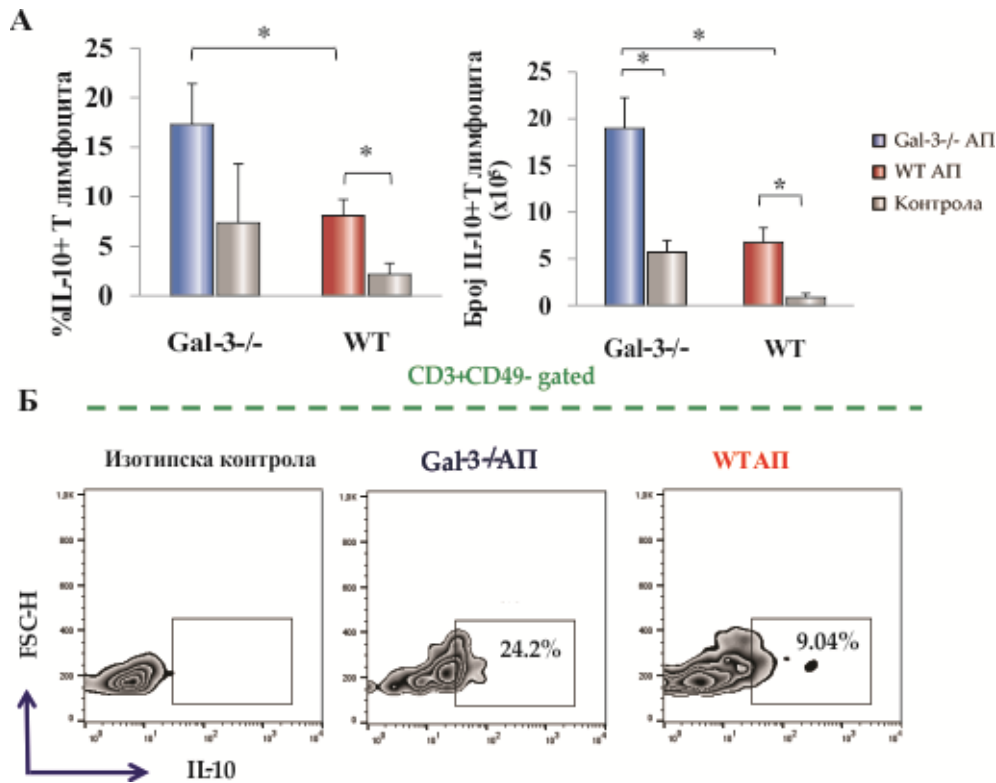
Графикон 7. Снижена заступљеност помагачких Т лимфоцита у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. А. Изоловане мононуклеарне ћелије су обележене мембранским маркером анти- CD4 анителом. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом, * $p < 0.05$.



Фигура 22. Сnižена заступљеност Т лимфоцита који продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IFN- γ антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност Т лимфоцита који продукују IFN- γ у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

Разлике у процентуалној заступљености су се одразиле и на апсолутне бројеве ове ћелијске популације, те је број CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IFN- γ значајно мањи ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 22А). Значајна разлика у проценту CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IFN- γ у панкреасу оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева је приказана и репрезентативним *dot-plot*-овима (Фигура 22Б).

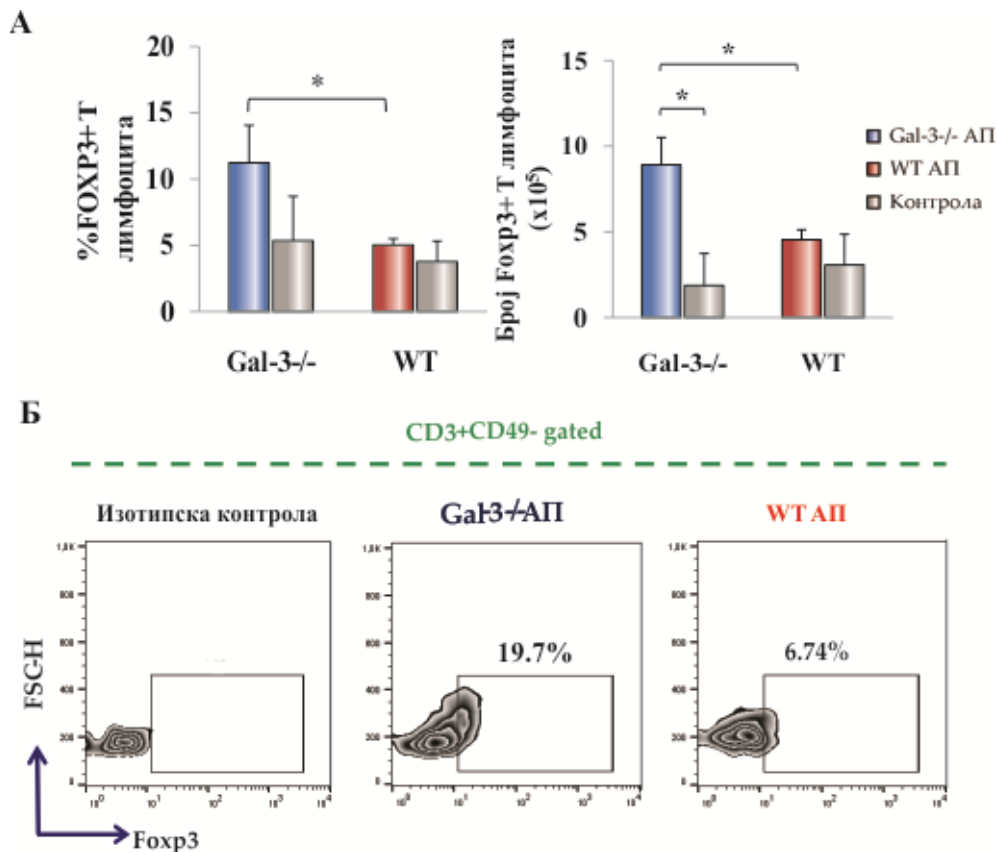
Испитивани су и процентуални и нумерички односи субпопулација регулаторних CD3+CD49- Т лимфоцита који експримирају Foxp3 и/или продукују IL-10 у панкреасу. Процентуална заступљеност CD3+CD49- Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 23) је значајно већа ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са групом C57BL/6 WT мишева са АП. Разлике у процентуалној заступљености су се одразиле и на укупне бројеве субпопулација ових ћелија, па је тако број Т лимфоцита



Фигура 23. Сnižена заступљеност Т лимфоцита који продукују IL-10 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива панкреаса трећег дана експеримента су анализирани методом проточне цитометрије. Мембрански ћелијски маркери су обележени анти-CD3 и анти-CD49 антителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти-IL-10 антитело. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни dot-plot-ови приказују процентуалну заступљеност Т лимфоцита који продукују IL-10 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

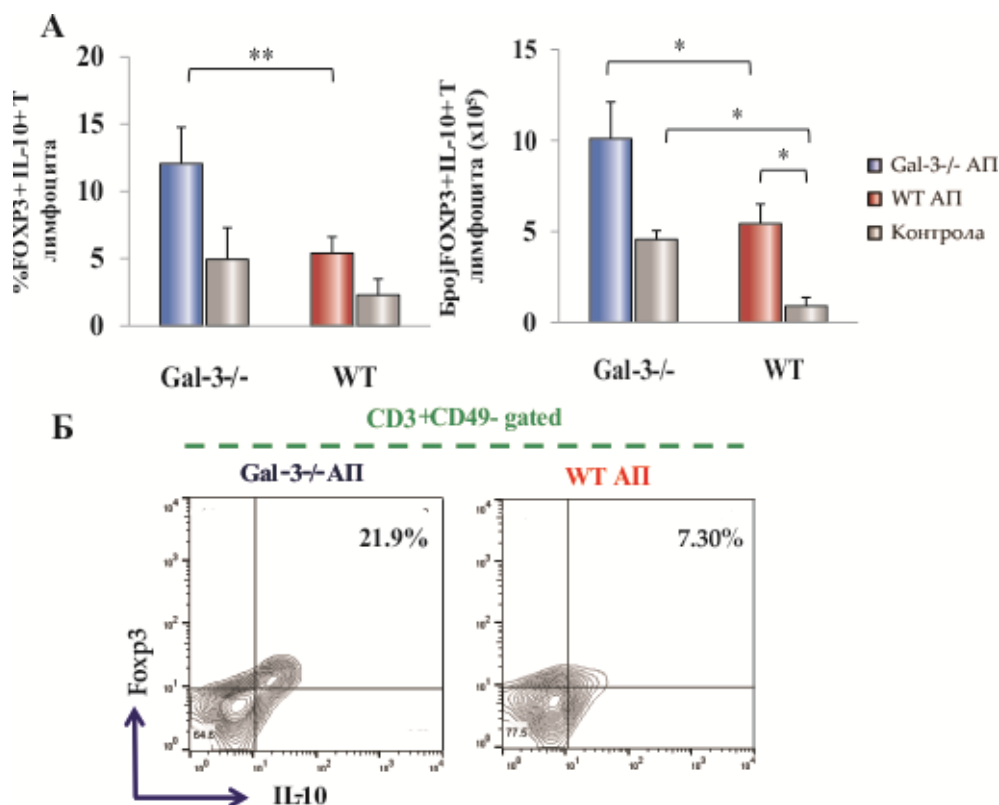
који продукују IL-10 значајно већи ($p < 0.05$) у групи оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева трећег дана експеримента.

У исто време, проценат CD3+CD49⁻ Т лимфоцита који експримирају Foxp3 је значајно већи ($p < 0.05$) код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са контролном групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 24). Такође, број ове популације Т лимфоцита је значајно већи код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 24).



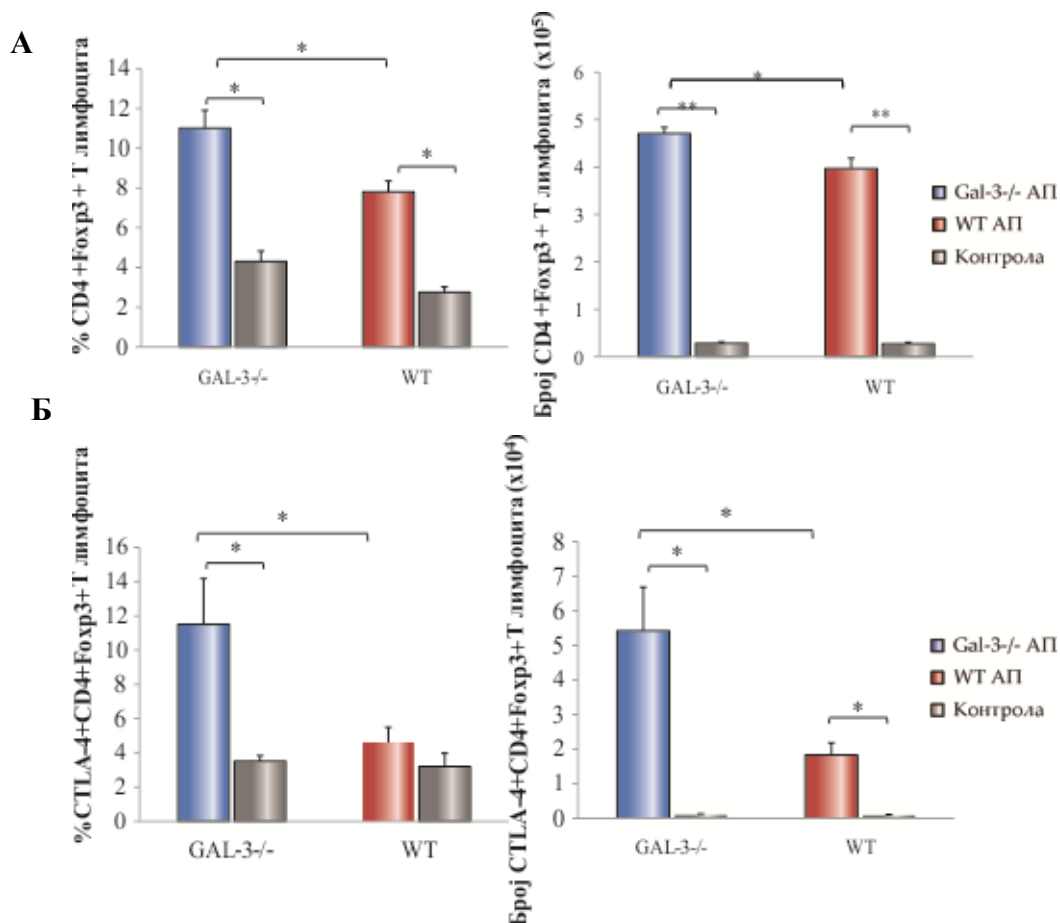
Фигура 24. Снижена заступљеност регулаторних Т лимфоцита у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Изоловане мононуклеране ћелије су обележене мембранским маркерима анти-CD3, анти-CD49 антителима и анти- Foxp3 анителом. Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност регулаторних Т лимфоцита који експримирају Foxp3 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

У панкреасу галектин 3 дефицијентних мишева је забележен пораст процентуалне заступљености регулаторних Т лимфоцита са имуносупресивним карактеристикама, тј. Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 25А). У исто време, апсолутан број поменуте ћелијске популације је био значајно већи ($p < 0.05$) код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП у поређењу са групом оболелих C57BL/6 WT мишева (Фигура 25А). Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују проценат заступљених CD3+CD49⁻ Т лимфоцита који експримирају Foxp3 и продукују IL-10, изолованих из панкреаса у групи C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са АП и C57BL/6 WT мишева са АП (Фигура 25Б).



Фигура 25. Сnižена заступљеност имуносупресивних регулаторних Т лимфоцита у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Изоловане мононукларне ћелије су обележене мембранским маркерима анти-CD3, анти-CD49 и анти- Foxp3 анителима, док је за интрацелуларно бојење коришћено анти- IL-10 антитело. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, * $p < 0.05$. **Б.** Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују процентуалну заступљеност регулаторних Т лимфоцита који експримирају Foxp3 у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} и WT мишева након индукције болести.

У складу са претходним резултатима, методом проточне цитометрије је потврђена повећана заступљеност регулаторних помагачких Т лимфоцита код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева трећег дана након подвезивања БПД (Графикон 8). Даља анализа фенотипа помагачких Т лимфоцита у панкреасу експерименталних животиња је указала да је одсуство галектина 3 праћено повећаним процентом и апсолутним бројем помагачких Т лимфоцита са имуносупресивним фенотипом који експримирају Foxp3 и CTLA-4 поређењу са оболелим мишевима дивљег соја (Графикон 8).



Графикон 8. Сnižена заступљеност регулаторних CD4+ Т лимфоцита са имуносупресивним фенотипом у ткиву панкреаса C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након индукције акутног панкреатитиса. **А.** Изоловане мононуклеарне ћелије су обележене мембранским маркером анти- CD4, анти- Foxp3 (**А**) и истовремено са анти- Foxp3 и анти- CTLA-4 анителима (**Б**). Приказана је процентуална заступљеност и број ћелија у инфилтрату. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим Т тестом, *p<0.05, **p<0.01.

5. ДИСКУСИЈА

Галектин 3 је део фамилије лектина који везују β -галактозид. Овај лектин експримирају бројне ћелије имунског система, али и епителне и друге паренхимске ћелије бројних органа. У зависности од локализације, Gal-3 игра различите улоге у регулацији инфламације која је основна карактеристика акутног панкреатитиса. Утицај Gal-3 на патогенезу акутног панкреатитиса до сада није проучен, а резултати овог истраживања недвосмислено указују да Gal-3 игра про-инфламацијску улогу у АП.

Основни закључак спроведеног истраживања се односи на чињеницу да делеција гена за Gal-3 значајно смањује степен инфламације у панкреасу што је праћено дужим преживљавањем мишева са тешком формом акутног панкреатитиса који је индукован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Делеција гена за Gal-3 праћена је и мањим едемом, некрозом и инфилтрацијом у паренхиму панкреаса у два експериментална модела акутног панкреатитиса (модел болести узрокован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса и модел болести узрокован применом церулеина и LPS). Уједно, аблација гена за Gal-3 је праћена већом инфилтрацијом и распрострањенијим пољима хеморагије у плућима оболелих мишева након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса.

Наша студија је показала да су Gal-3 дефицијентни мишеви имали значајно мању инфилтрацију леукоцита у паренхим панкреаса након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса. Леукоцитна инфилтрација сматра се кључним догађајем за настанак инфламације панкреаса и утиче на тежину АП. Додатно смо показали да су оболели Gal-3 дефицијентни мишеви имали значајно мању инфилтрацију про-инфламацијских N1 неутрофила, макрофага и дендритских ћелија са мањом продукцијом инфламацијских цитокина, TNF- α и IL-1 β . Један од значајних налаза актуелне студије је да је делеција гена за Gal-3 праћена повећаним бројем толерогених дендритских ћелија које продукују анти-инфламацијски цитокин, IL-10 и утичу на развој регулаторних Т лимфоцита са анти-инфламацијским фенотипом.

Познато је да АП је инфламацијска болест абдомена праћена транслокацијом бактерија из дигестивног тракта у мезентеријалне лимфне нодусе, панкреас и системску циркулацију. Активација PRRs рецептора на ћелијама имунског система, пре свега TLR-4, бактеријским молекулима представља круцијални механизам за одржавање инфламације панкреаса. Међутим, ендогени молекули ослобођени након оштећења ћелије такође активирају TLR-4. Наша студија је показала да се Gal-3 ко-локализује са

TLR-4 на површини инфилтришућих леукоцита. Експресија TLR-4 на неутрофилима и макрофагима је значајно мања код Gal-3 дефицијентних мишева, а примена инхибитора TLR-4 има сличан ефекат на преживљавање мишева као и делеција гена за Gal-3.

Истовремено, инфилтрација других ћелија урођене имуности, NK и NKT ћелија које продукују IFN- γ је мања у панкреасу оболелих Gal-3 дефицијентних мишева. Иако ћелије урођене имуности играју доминантну улогу у настанку инфламације панкреаса, документовано је да и T лимфоцити значајно инфилтришу паренхим панкреаса, што је праћено смањењем броја ових ћелија у периферној крви. У складу са овим налазима, актуелна студија је показала да је индукција АП праћена значајним инфлуksom T лимфоцита у панкреас и да аблација гена за Gal-3 резултује у мањем броју T лимфоцита које продукују про-инфламацијски цитокин IFN- γ , што је у корелиацији са мањом активношћу про-инфламацијских макрофага. Уједно, број имуносупресивних T лимфоцита који продукују IL-10 је значајно већи код оболелих Gal-3 дефицијентних мишева. Показано је да је активација IL-23/IL-17 осовине мања код мишева са аблацијом гена за Gal-3 што доприноси мањем инфлуксу неутрофила у панкреас.

Сумарно, резултати указују на то да Gal-3 игра веома важну улогу у развоју акутног панкреатитиса, да се везује за TLR-4 и промовише про-инфламацијски фенотип ћелија урођене и стечене имуности. Уједно, показано је да Gal-3 учествује у регулацији IL-23/IL-17 осовине у процесу инфламације у ткиву панкреаса.

5.1. УТИЦАЈ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 НА РАЗВОЈ АКУТНОГ ПАНКРЕАТИТИСА У ДВА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МИШЈА МОДЕЛА БОЛЕСТИ

Gal-3 је јединствени члан фамилије лектина који везују β -галактозид. Садржи домен за препознавање угљених хидрата и N-терминални домен који је богат глицином преко кога олигомеризује и унакрсно повезује лиганде (303). Приближно је величине око 30 kDa. Локализација овог лектина у ћелији је различита: може се наћи у једру, цитоплазми или изван ћелије. Gal-3 је специфични регулатор многих биолошких процеса, укључујући и инфламацију (303). Укључен је у регулацију бројних процеса акутне инфламације: активација и адхезија неутрофила (275), хемотакса моноцита и макрофага (327), опсонизација апоптотских неутрофила (282) и активација мастоцита (328). Gal-3 значајно експримирају и продукују активирани макрофаги (289). Секретовани Gal-3 може унакрсно повезати површинске гликопротеине и тако стимулише важне сигналне путеве чиме регулише бројне процесе урођеног имунског

система, попут оксидативног стреса у нетрофилима (285) и дегранулације мастоцита (328).

Досадашња истраживања су показала да је код људи у физиолошким условима Gal-3 експримиран у цитоплазми и нуклеарном региону код око 50% дукталних епителних ћелија панкреаса (314). Слични резултати су добијени праћењем експресије овог лектина у панкреасу изолованог из миша у физиолошким условима и након индукције АП (313). Наиме, у физиолошким условима само дукталне епителне ћелије експримирају Gal-3 у панкреасу миша. Након примене супрамаксималних доза церулеина, поједине ацинусне ћелије почињу да експримирају Gal-3. Експресија овог молекула је повишена у леукоцитном инфилтрату, преодоминантно у инфилтришућим макрофагима (313). У експерименталним моделима панкреатитиса, дегенеративне ацинусне ћелије које изграђују тубуларне комплексе повишено експримирају Gal-3 (329). Панкреасне стелатне ћелије играју круцијалну улогу у патогенези хроничног панкреатитиса, али и онкогенези карцинома панкреаса (330). Показано је да Gal-3 активира панкреасне стелатне ћелије да продукују инфламацијске цитокине чиме се поспешује интеракција туморских ћелија панкреаса и строме тумора, инвазија туморских ћелија и метастазе тумора панкреаса (330). Ћелије хуманог аденокарцинома панкреаса повишено експримирају Gal-3 што је праћено повећаном пролиферацијом и инвазијом карциномских ћелија (331). До сада нема информација о улози Gal-3 у патогенези АП.

Акутни панкреатитис је инфламацијски процес и настаје као последице комплексне каскаде догађаја која почиње оштећењем ацинусних ћелија, ослобађањем DAMPs молекула што потом узрокује активацију и миграцију леукоцита у паренхим панкреаса (156). Активирани леукоцити, који инфилтришу паренхим панкреаса, продукују различите цитокине и друге про-инфламацијске медијаторе што појачава стерилну инфламацију панкреаса и узрокује појаву системске инфламацијске реакције са оштећењем удаљених органа, попут плућа, јетре и слезине (332). Бројни про-инфламацијски цитокини и медијатори, попут TNF- α , IL-1 β и IL-6, играју кључну улогу у прогресији локализоване инфламације панкреаса у системску инфламацију, тј. инфламацију бројних удаљених ткива и органа (333). Про-инфламацијски медијатори стимулишу инфилтрацију ћелија имунског система у паренхим панкреаса, пре свега неутрофила и моноцита који потом повећавају оштећење панкреасних ацинусних ћелија продукцијом слободних кисеоничких радикала и ензима лизозома. Лака форма болести се карактерише инфламацијом која је ограничена на панкреасни паренхим. Ослобођени инфламацијски медијатори могу прећи у системску циркулацију када

узрокују генерализовану инфламацијску реакцију на разним удаљеним местима, што је означено као синдром системског инфламацијског одговора или SIRS (334). Са циљем одржавања имунске равнотеже, иницијални про-инфламацијски одговор након оштећења панкреасних ацинусних ћелија је праћен активацијом синдрома компензаторног анти-инфламацијског одговора или CARS-а (енгл. *compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS) који се карактерише повећаном продукцијом IL-10 што узрокује имунодефицијенцију и повећану инциденцу секундарних бактеријских инфекција, пре свега инфекције некротичних поља панкреаса (333).

Код око трећине пацијената са акутним панкреатитисом, развија се тешка форма АП са перзистентном мултиорганском инсуфицијенцијом, локалним компликацијама и високом стопом морталитета (135).

Тежина АП је одређена степеном инфламацијског одговора, а не величином оштећења панкреаса. Према тренутној теорији, локална активација NF-κB у ацинусним ћелијама и ацинусна ћелијска смрт узрокована прераном активацијом трипсина су два рана паралелна догађаја након почетка АП који покрећу локалну инфламацију панкреаса (138, 140). NF-κB сигнални пут регулише продукцију про-инфламацијских цитокина, као што је TNF-α и IL-1β у панкреасу, који затим активирају друге сигналне путеве, као што је STAT1, STAT3 и ERK1/2 MAPK (335, 336). Ацинусна ћелијска смрт резултује ослобађањем DAMPs молекула који потом, везивањем за PPRs рецепторе, активирају сигналне путеве у ћелијама имунског система, што узрокује повећану транскрипцију инфламацијских гена и производњу про-инфламацијских цитокина (144).

Ослобађањем про-инфламацијских цитокина и хемокина, активира се ендотел и циркулишуће инфламацијске ћелије, пре свега неутрофили, а затим и моноцити/макрофаги и лимфоцити. Ћелије имунског система инфилтришу панкреас, посебно макрофаги и производе додатну количину цитокина што резултује регрутовањем додатног броја леукоцита у панкреас, а потом и у удаљене органе као што су плућа (337). Про-инфламацијски цитокини, такође, активирају и резидентне ткивне макрофаге у удаљеним органима (као што су перитонеум, јетра и плућа), који потом производе про-инфламацијске медијаторе, тако поспешују системску прогресију инфламације панкреаса (332).

У тешкој форми АП, системски инфламацијски одговор је сличан као и код бактеријске сепсе, са сличним клиничким симптомима и обрасцима продукције инфламацијских медијатора (218, 338). Ослобођени протеолитички ензими и медијатори потом активирају NF-κB и промовишу прекомерну инфилтрацију неутрофила у удаљеним ткивима и органима (140, 339). Прекомерна и неконтролисана инфилтрација

неутрофила праћена је продукцијом токсичних производа који узрокују ћелијску смрт и оштећење васкуларних ендотелних ћелија. Пермеабилност ендотела се повећава, што резултује накупљањем ткивне течности и едемом (339). Заједно са микроваскуларним поремећајима (вазоконстрикција, неадекватна перфузија и повећана вискозност крви), накупљена течност узрокује хипоксију, што резултује дисфункцијом и оштећењем органа са терминалном циркулацијом, какви су бубрези (340). Иако је АП у раној фази стерилни поремећај (341), повећана пропустљивост интестиналног тракта омогућава транслокацију бактерија и ендотоксина у циркулацију што погоршава инфламацијски одговор. Све то доприноси развоју некрозе панкреаса и сепси (342).

Експериментални модел акутног панкреатитиса који је индукован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса код миша је модел сличан тешкој форми билијарног панкреатитиса код људи (319). Наиме, погодни експериментални модели билијарног АП у оквиру кога настаје системска инфламација и последични морталитет су малобројни. У поређењу са другим експерименталним моделима АП, модел болести индукован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса је сличан хуманом билијарном панкреатитису у оквиру кога импакција билијарних калкулуса у пределу *Vater*-ове ампуле узрокује АП. Други експериментални модели попут едематозне форме АП узроковане церулеином, обично нису праћене значајном инфламацијом плућног паренхима, системском инфламацијом, мултиорганском дисфункцијом и леталним исходом (319). АП индукован подвезивањем БПД је модел тешке и леталне форме акутног панкреатитиса са 100% морталитетом унутар 5 дана од индукције болести (319). Показано је да је смртни исход у овом експерименталном моделу последица развоја некротичне форме панкреатитиса, али и акутног оштећења плућног паренхима и мултиорганске инсуфицијенције. Абнормалности у плућном паренхиму обухватају функционалне промене попут смањене комплијансе плућа, али и морфолошке промене попут инфилтрације неутрофила и промене у бронхо-алвеоларном лавату где доминираја инфилтрација неутрофила и повишене концентрације секретованог IL-1 β (319). У актуелној студији је показано да C57BL/6 WT мишеви са акутним панкреатитисом који је узрокован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса најдуже живе пет дана након интервенције, док је медијана преживљавања трећи дан што је и у складу са резултатима из раније публиковане студије (319). Са друге стране, Gal-3^{-/-} мишеви са тешком формом акутног панкреатитиса који је индикуван подвезивањем билио-панкреатичног канала живе до деветога дана након интервенције, док је медијана преживљавања пети дан након интервенције. *Kaplan–Meier*-ова крива преживљавања је,

такође, показала да оболели C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишеви значајно дуже живе у односу на оболеле C57BL/6 WT мишеве.

Познато је да у физиолошким условима само дукталне епителне ћелије експримирају Gal-3, док поједине ацинусне ћелије панкреаса експримирају овај лектин тек након активације, односно, након индукције експерименталног модела болести супрамаксималним дозама церулеина (313). Уједно, експресија Gal-3 се повећава у леукоцитима који инфилтришу паренхим панкреаса. Резултати претходних истраживања су у складу са резултатима овде приказане студије где је уочено да се трећег дана након узроковања тешке форме АП, повећава експресија Gal-3 у инфилтришућим леукоцитима у паренхиму панкреаса као и експресија Gal-3 унутар цитоплазме и једра. У складу са наведеним резултатима актуелне студије, ранија истраживања су показала повишену експресију Gal-3 у другим инфламацијским болестима, попут експерименталног аутоимунског енцефалитиса, у моделу мултипле склерозе, али и у моделима акутног хепатитиса, перитонитиса и акутног колитиса (296, 310, 343, 344).

Вероватно да је дуже преживљавање Gal-3^{-/-} мишева повезано са блажим инфламацијским одговором. Наиме, код Gal-3 дефицијентних мишева је присутна лакша форма болести која се карактерише: нижим вредностима серумских амилаза, мањом активношћу трипсина у паренхиму панкреаса, мањим едемом панкреаса, инфилтрацијом леукоцита, мањим пољима некрозе и вакуолизације. Са друге стране, показано је да се АП код C57BL/6 WT мишева карактерише ширим пољима некрозе, израженијом инфилтрацијом и дифузним промена архитектоники панкреаса. Резултати наше студије су сагласни са подацима из претходних истраживања где је показано да је подвезивање билио-панкреатичног дуктуса праћено оштећењем панкреаса које се карактерише интерстицијалним и интерацинарним едемом, неутрофилном инфилтрацијом, васкуларном конгестијом и хеморагијом (319).

Најчешћа системска компликација код пацијената са тешком формом АП је акутно оштећење плућа или адултни респираторни дистрес синдром (енгл. *Acute respiratory distress syndrome*, ARDS) (345). Инциденца плућних компликација код тешке форме АП се креће од 15% до 55% оболелих (56). Плућне манифестације настају као последица снажне системске инфламацијске реакције са повећаном пермеабилношћу ендотелне и епителне баријере и накупљањем ексудата у интерстицијалном и алвеоларном простору (345). Тежина плућних компликација варира од благе хипоксемије без клиничких и радиолошких абнормалности, до тешке форме акутног респираторног дистрес синдрома. Хистолошки се карактерише дифузним оштећењем алвеола, оштећењем

микроциркулације плућа и значајним инфлуksom инфламацијских ћелија (345). Инсуфицијенција бубрега је друга тешка компликација и настаје као последица неадекватне ресусцитације течностима и/или септичких компликација (146).

У актуелном истраживању је уочено да се трећег дана након индукције болести развија значајно оштећење плућа које се карактерише инфилтрацијом леукоцита, задебљањем интерстицијума плућа и алвеоларних преграда и пољима хеморагије. Ове промене у у плућном паренхиму су исте као и код претходних студија (319). *Samuel* и сарадници су показали да подвезивање БПД узрокује оштећење плућа које се карактерише повећаном неутрофилном инфилтрацијом плућног паренхима и значајним задебљањем алвеоларних септи (319). Оштећење плућног паренхима узрокованог инфламацијском реакцијом иницираном у панкреасу је значајно мање код мишева са делецијом гена за Gal-3. Хистолошки је уочено да је у плућном паренхиму C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева мање интерстицијалног едема, мање задебљање алвеоларних септума и мањи степен инфилтрације паренхима плућа.

Церулеин је аналог холецистокинина који је изолован из аустралијске жабе *litoria caerulea*. Холецистокинин у физиолошким концентрацијама регулише нормалну секрецију из панкреаса (346). Један од основних ефеката церулеина је стимулација панкреаса да ствара доминантно протеински секрет са мањим садржајем течности и електролита. Под дејством церулеина, панкреасне ацинусне ћелије повећавају синтезу и секрецију дигестивних ензима, те се ензимски депои егзокриног панкреаса смањују за 75% унутар неколико сати. Супрамаксималне дозе холецистокинина, односно његовог аналога церулеина, узрокују смањену секрецију из ацинусних ћелија, акумулацију секреторних гранула унутар ацинусних ћелија, повећање интраацинусне концентрације калцијумових јона, што све доприноси прераној активацији протеолитичких ензима и оштећењу ацинусних ћелија и читавог панкреаса. Вишеструка примена супрамаксималних доза церулеина, узрокује повећану транслокацију бактерија из дигестивног тракта третираних животиња у мезентеричне лимфне нодусе, панкреас, јетру, слезину и крвоток (347). Септични шок се може појачати применом бактеријског токсина, липополисахарида код мишева и пацова (107). LPS се може применити као интраперитонеална инјекција након примене церулеина како би поспешео развој секундарне бактеријске инфекција у склопу панкреатитиса. Применом LPS узрокује се секундарни инсулт и тако појачава инфламацијски одговор. Штавише, неке студије су показале да комбинована примена церулеина и LPS узрокује тежу лезију панкреаса и удаљену органску инсуфицијенцију у поређењу са применом самог церулеина (348). Сумарно, механизам како церулеин и LPS индукују тешку форму АП подразумева да

церулеин активира локалну деструкцију у панкреасу што узрокује значајну продукцију про-инфламацијских медијатора из инфламацијских ћелија, док примена LPS појачава секрецију инфламацијских медијатора те се тако локални панкреатитис развија у тешку системску инфламацијску реакцију (348).

Резултати наше студије указују да дванаест сати након последње дозе церулеина и LPS-а, значајно расте серумска концентрација амилаза, настају едем, инфилтрација, некроза и поља хеморагије у панкреасу. Уједно архитектоника ацинуса је нарушена. Аблација гена за Gal-3 је праћена мањим степеном оштећења панкреаса који се карактерише мањим интралобуларним и интраацинусним едемом, као и мањом инфилтрацијом инфламацијских ћелија.

Акутни панкреатитис се карактерише пререаном активацијом трипсина, а степен активности овог ензима иницијално одређује опсег оштећења панкреаса. Показано је да је код C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева мања активација трипсина у односу на оболеле C57BL/6 WT мишеве, што је у сагласности са претходним налазима актуелног истраживања који указују да је оштећење панкреаса мање код мишева са аблацијом гена за Gal-3, дванаест сати након индукције хемијског модела болести. Презентовани резултати су у складу са резултатима студије *Pan LL* и сарадника (349) који су приказали да примена лактозе, инхибитора галектина, значајно самњује тежину акутног панкреатитиса индукованог церулеином.

5.2. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА 3 НА РАЗВОЈ ПРО-ИНФЛАМАЦИЈСКОГ ФЕНОТИПА И ЕКСПРЕСИЈУ TLR-4 НА ЋЕЛИЈАМА УРОЂЕНЕ ИМУНОСТИ У ТКИВУ ПАНКРЕАСА

Инфилтрација леукоцита је основна карактеристика акутне инфламације и бројне студије су показале да леукоцити играју кључну улогу у развоју локалних и системских компликација АП (350). Почетна фаза АП обухвата иницијалну прерану активацију протеаза панкреаса као резултат интраћелијске ко-локализације дигестивних и лизозомалних ензима што резултује оштећењем ацинусних ћелија панкреаса (142). Потом, оштећење панкреаса је праћено ослобађањем бројних инфламацијских медијатора и цитокина што узрокује активацију локалних инфламацијских ћелија и појачану миграцију ћелија имунског система у инфламирани панкреас (154).

Пролазак леукоцита кроз ендотел се одвија у четири јасно дефинисане и међусобно повезане фазе: 1) котрљање леукоцита које је посредовано slabим везама са ендотелом, 2) активација леукоцита, 3) јака атхезија посредована интегрином, 4) миграција

леукоцита кроз ендотел. Први догађај у овом процесу је посредован селектинима који припадају фамилији атхезионих молекулима слични лектинима (351, 352). Селектини су површински гликопротеини. Описане су три врсте селектина који су означени на основу типа ћелија на којима су експримирани: леукоцитни селектин (L- селектин); ендотелни селектин (E- селектин); и тромбоцитни селектин (P- селектин) (351). L-селектин је експримиран на површини леукоцита и везује се за угљене хидрате на површини ендотелних ћелија (351). Овај молекул је важан за везивање и накнадно котрљање леукоцита на ендотелним ћелијама чиме олакшава миграцију неутрофила на место инфламације (352). E- и P- селектин су експримирани на површини ендотелних ћелија након активације цитокинима (попут IL-1, TNF- α) и везују се за олигосахаридне рецепторе на неутрофилима (353). P-селектин је детектован већ у првом сату након индукције експерименталног АП и појачана експресија овог лектина је повезана са значајним повећањем продукције слободних кисеоничких радикала и активацијом NF- κ B (354). Поред селектина и други молекули играју значајну улогу у миграцији и инфилтрацији леукоцита у оштећени паренхим панкреаса, попут ICAM-1 атхезивног молекула, али и хемокина као што су MCP-1, MIP-1 α и RANTES (146). Леукоцитно везивање, миграција и активација настају и на удаљеним ткивима и органима, што објашњава настанак мултиорганске дисфункције (146).

Индукцијом АП помоћу два експериментална модела ове болести је документована повећана инфилтрација леукоцита у ткиво панкреаса и плућа на основу хистолошке анализе исечака поменутих органа. Анализом проточне цитометрије је показано да је делеција гена за Gal-3 праћена значајно мањом инфилтрацијом у паренхим панкреаса у односу на C57BL/6 WT мишеве. Поменути резултати су у складу са резултатима добијених имунистохемијским и имунофлуоресценским методама где је документована смањена инфилтрација ћелија урођене имуности у инфламрани панкреас изолован из мишева са делецијом гена за Gal-3. Ови резултати су сагласни са налазима претходних истраживања где је указано да Gal-3 поспешује накупљање леукоцита и игра улогу атхезионог молекула након секреције у ексудатима код различитих инфламацијских процеса (355).

Неутрофили су прве ћелије које инфилтришу панкреас и ове ћелије играју централну улогу у развоју системских и локалних компликација болести. Активирани неутрофили ослобађају протеолитичке и липолитичке ензиме, слободне кисеоничке радикале, поспешују даљу активацију трипсиногена и развој некрозе панкреаса, али и адултног респираторног дистрес синдрома (155). Уједно неутрофили ослобађају цитокине и хемокине путем којих се стимулише инфилтрација других ћелија имунског система у

инфламрани панкреас, али ослобађају и екстраћелијске структуре означене као NET-ови којима додатно оштећују ацинусне ћелије (158). Показано је да деплеција неутрофила значајно смањује тежину АП (155).

У актуелној студији је уочено да трећег дана након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, неутрофили значајно инфилтришу панкреас. Дефицијенција гена за Gal-3 је праћена значајно мањим инфлуксом неутрофила у инфламрани панкреас. Слични резултати су добијени и имунохистохемијским бојењем препарата панкреаса уз помоћ антитела против Ly-6G/Ly-6C као маркера неутрофила. Ови резултати су у складу са претходним налазима да Gal-3 поспешује адхезију неутрофила за ендотел и миграцију неутрофила у место инфламације (279, 296, 356). Додатно је документовано да се екстраћелијски Gal-3 везује за неутрофиле и као резултат повећава продукцију супер-оксидних радикала и секрецију хемокина CXCL8 (енгл. *C-X-C motif chemokine ligand 8*, CXCL8) који потом стимулишу инфлукс неутрофила на место инфламације (286, 356).

Fridlender и сарадници (357) су описали два типа неутрофила: N1 и N2 неутрофили. N1 неутрофили секретују веће количине про-инфламацијских циткина, попут TNF- α и IL-1 β , кисеоничких радикала и снажније активирају цитотоксичке Т лимфоците (326). На молекулском нивоу, N1 неутрофили експримирају FasL. Са друге стране, N2 неутрофили настају у средини где доминира повишена концентрација TGF- β и ови неутрофили су означени као анти-инфламацијски или про-туморски. На молекулском нивоу експримирају повишене нивое маркера CXCR-4, VEGF и STAT-3. У експерименталном моделу акутног панкреатитиса, који је узрокован подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, недостатак Gal-3 је праћен мањом акумулацијом N1 неутрофила који експримирају FasL и секретују IL-1 β . Показано је да је експресија FasL по појединачном неутрофилу значајно већа код C57BL/6 WT мишева него код Gal-3^{-/-} мишева.

Макрофаги су кључне ћелије у патогенези акутног панкреатитиса и развоју тешке форме болести. Поспешују оштећење панкреаса и развој системских компликација болести (332, 358). Макрофаги продукују различите молекуле, попут реактивних кисеоничких радикала, хидролитичких ензима, као и про- и анти-инфламацијске цитокине који утичу на прогресију инфламацијског процеса из панкреаса (359). Степен активације макрофага је круцијалан догађај који одређује тежину акутног панкреатитиса (333).

У актуелном истраживању методом проточне цитометрије и имунохистохемијским бојењем је показано да је индукција АП праћена значајним инфлуксом макрофага у панкреас. Инфилтрација макрофага је значајно мања код мишева са делецијом гена за

Gal-3 у односу на C57BL/6 WT мишеве. Поменути резултати су у складу са ранијим истраживањима где је показано да је Gal-3 је хемоатрактант за моноците и макрофаге (327). Затим, дефицит гена за Gal-3 је праћен мањом инфилтратацијом моноцита и макрофага у ЦНС мишева у експерименталном моделу мултипле склерозе (310). Такође, претходно истраживање је показало да дефицит Gal-3 смањује број Т лимфоцита у јетри мишева у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса (305).

Методом проточне цитометрије је анализиран фенотип инфилтришућих макрофага у односу на продукцију про-инфламацијских цитокина, TNF- α и IL-1 β , као карактеристика класично активираних или M1 макрофага. Аблација гена за Gal-3 је праћена мањим бројем макрофага које продукују TNF- α и IL-1 β , односно мањом инфилтратацијом M1 макрофага. У складу са овим резултатима су подаци из недавне студије где је документовано да примена лактозе, инхибитора галектина, смањује број макрофага у панкреасном ткиву након индукције експерименталног акутног панкреатитиса као и продукцију TNF- α и IL-1 β (349). Показано је да је број макрофага који продукују IL-1 β мањи у колону изолованом из Gal-3^{-/-} мишева након узроковања експерименталног акутног колитиса, модела инфламацијске болести црева (344). Познато је да Gal-3 је значајан за активацију инфлазама, што као резултат има повећану продукцију IL-1 β из макрофага (344). TNF- α и IL-1 β су најзначајнији цитокини у раној фази акутног панкреатитиса (332). Главни извор ових цитокина су активирани макрофаги у паренхиму панкреаса (175). Инхибиција продукције ових цитокина у раној фази акутног панкреатитиса побољшава преживљавање експерименталних животиња са тешком формом акутног панкреатитиса и смањује тежину болести (360).

Ослобођени медијатори узрокују појачану пропустљивост интестиналне епителне баријере и значајну транслокацију бактерија из лумена црева у мезентеријалне лимфне нодусе, системску циркулацију, а све то омогућава развој секундарне инфекције некротичних поља у панкреасу (107). Показано је да TNF- α повећава интестиналну парацелуларну пермеабилност тако што делује на чврсте везе између епителних ћелија (195) и олакшава транслокацију бактерија кроз епител (196). Липополисахарид, али и други бактеријски продукти, се везују за PRRs, пре свега TLR-4 на површини ћелија урођене имуности што омогућава прогресију инфламацијског одговора из панкреаса (325). TLR-4 је рецептор који је конститутивно експримиран на бројним ћелијама имунског система (177). Претходна истраживања су показала да је овај рецептор укључен у почетак и прогресију акутног панкреатитиса (361). Циљана делеција гена за

TLR-4 је праћена смањењем тежине експерименталног акутног панкреатитиса што се карактерише значајно мањим пољима некрозе, едемом и хеморагијама у паренхиму панкреаса (184). Поред LPS, TLR-4 везује и друге лиганде, попут фибриногена, али и различитих протеина који се ослобађају приликом оштећења ћелија (енгл. *heat shock proteins*) (177). Новије студије су показале да је и Gal-3 лиганд за TLR-4 који је експримиран на површини микроглија, врсте мононуклеарних ћелија имунског система која су локализоване у ЦНС-у. Након везивања Gal-3 за TLR-4, развија се про-инфламацијски фенотип ових ћелија (M1 фенотип) (243). У складу са овим налазима су и резултати нашег истраживања где је приказано да се Gal-3 и TLR-4 ко-локализују на површини леукоцита који инфилтришу паренхим панкреаса након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса. Уједно, методом проточне цитометрије је показано да је број неутрофила који експримирају TLR-4 значајно мањи код Gal-3^{-/-} мишева са акутним панкреатитисом у односу на WT мишеве. Такође, ниво експресије TLR-4 је био значајно мањи на појединачним неутрофилима који су изоловани из панкреаса оболелих Gal-3^{-/-} мишева. Слични резултати су добијени имунофлуоресценским бојењем где је показано да је у инфламираном панкреасу значајно мањи број инфилтришућих неутрофила који експримирају TLR-4, али и инфилтришућих макрофага који експримирају TLR-4.

Да би се додатно испитала улога Gal-3/TLR-4 интеракције у патогенези акутног панкреатитиса, праћено је преживљавање C57BL/6 WT мишева оболелих од тешке форме акутног панкреатитиса након апликације CLI-095, специфичног инхибитора TLR-4 (323). Примена CLI-095 је значајно продужила преживљавање мишева након подвезивања билио-панкреатичног канала и преживљавање је било слично као и код оболелих мишева са аблацијом гена за Gal-3.

Досадашња истраживања су показала да дендритске ћелије играју значајну улогу у одржавању виабилности панкреаса у току експерименталног акутног панкреатитиса уклањањем некротичног ткива чиме смањују јачину инфламацијског одговора у панкреасу. Делепција ових ћелија је праћена развојем некрозе читавог егзокриног дела панкреаса. Међутим, из ранијих истраживања није познато које цитокине продукују ове протективне дендритске ћелије (170). У актуелној студији је показано да број дендритских ћелија које продукују про-инфламацијске цитокине, TNF- α - и IL-1 β , мањи у панкреасу мишева са делецијом гена за Gal-3. Ово је у складу са резултатима студије *Yip PK* (244) и сарадника који су показали да примена анти- Gal-3 антитела у експерименталном моделу трауме ЦНС-а смањује продукцију IL-1 β и TNF- α . Такође, број дендритских ћелија које продукују TNF- α је значајно мањи код мишева са

делецијом гена за Gal-3 у експерименталном моделу инфламацијске болести црева (344).

Број NK и NKT ћелија се не мења након индукције АП. Показана је разлика у броју NK и NKT ћелија које продукују IFN- γ изолованих из панкреаса оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева након подвезивања БПД. Слично је показано да селективна инхибиција Gal-3 смањује продукцију IFN- γ из NKT и NK ћелија изолованих у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса (362).

5.3. УТИЦАЈ ДЕЛЕЦИЈЕ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН 3 НА ИНФИЛТРАЦИЈУ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА И АКТИВАЦИЈУ IL-23/IL-17 ОСОВИНЕ У ИНФЛАМИРАНОМ ПАНКРЕАСУ

Значајна активација леукоцита са високим серумским нивоима про-инфламацијских цитокина карактерише системски инфламацијски одговор или SIRS који је водећи узрок смрти у раној фази АП (363). Показано је да је летална форма АП резултат превелике стимулације и активације фагоцита (147).

Мада су макрофаги главне резидентне ћелије имунског система у нормалном панкреасу, Т лимфоцити су такође присутни у мањем проценту, али улога ових Т лимфоцита је још увек нејасна (175). Наиме, *Demols* и сарадници (175) су показали да су Т лимфоцити присутни у панкреасу у физиолошким условима и да инвадирају ткиво панкреаса током АП. Током индукције АП број Т лимфоцита у панкреасу значајно расте. Т лимфоцити из крвотока инвадирају паренхим панкреаса што је регулисано хемокинима, попут MCP-1, MIP-1, лимфотактином и IP-10 (енгл. IFN- γ -*inducible protein 10*, IP-10) (175). Експерија ових хемокина се повећава у првим сатима након индукције болести и инцијално их секретују ацинусне ћелије (175). Активирани макрофаги продукују IL-1 који даље активира Т лимфоците (176). Показано је да се број CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита значајно повећава у панкреасу у првим сатима након индукције експерименталног АП код мишева, са доминацијом помагачких CD4⁺ Т лимфоцита. Затим, деплеција Т лимфоцита је праћена лакшом формом АП са нижим вредностима хидролаза у серуму, мење едема и инфламацијског инфилтрату у панкреасу, као и мањим пољима некрозе панкреаса након индукције експерименталног АП (175). Ранија истраживања су показала да су CD4⁺ Т лимфоцити у популацији лимфоцита најважнији за развој АП, обзиром да деплеција помагачких Т лимфоцита смањује тежину АП, док деплеција CD8⁺ Т лимфоцита не утиче на ток АП (175).

Т лимфоцити играју значајну про-инфламацијску улогу у развоју акутног панкреатитиса тако што стимулишу активацију макрофага и продукцију про-инфламацијских медијатора. Значајна је и цитотоксичка активност Т лимфоцита интеракцијом Fas лиганда на Т лимфоцитима и Fas рецептора на ацинусним ћелијама због последичне смрти ацинусних ћелија (175). Показано је да се број периферних Т лимфоцита, као и CD4+, CD8+, CD3+DR- и CD3-DR+ субпопулација лимфоцита значајно смањује у крви оболелих током ране фазе тешке форме хуманог АП (363). Значајна деплеција помагачких Т лимфоцита у крвотоку настаје услед појачане инфилтрације у инфламрани панкреас, као и друга ткива попут бубрега и плућа (364). У складу са овим налазима, трећег дана након индукције АП подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, број Т лимфоцита у панкреасу значајно расте у поређењу са групом здравих мишева. Резултати нашег истраживања сугеришу да број Т лимфоцита значајно мањи код мишева са делецијом гена за Gal-3 у поређењу са оболелим мишевима дивљег соја. Наиме, показано је да екстраћелијски Gal-3 значајно стимулише миграцију Т лимфоцита у подручје инфламације (343).

У току тешке форме АП која се карактерише значајним оштећењем панкреаса, CD4+ Т лимфоцити диференцирају у Th1 фенотип и повећавају продукцију IL-12 и IFN- γ (363). Код Gal-3 дефицијентних мишева, након индукције акутног панкреатитиса, број Т лимфоцита који продукују IFN- γ био је мањи у односу на број Т лимфоцита дивљег соја са АП. Претходне студије су показале да је концентрација IFN- γ повећана у серуму пацијената са акутним панкреатитисом, тако доприносећи активацији макрофага и развоју инфламације и некрозе панкреаса (175, 363). Такође, у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса је показано да је број Т лимфоцита који продукују IFN- γ смањен у јетри оболелих C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева (343).

У почетној фази тешке форме АП доминира значајна секреција про-инфламацијских цитокина, попут TNF, IL-1, IL-6 и IFN- γ што узрокује појаву клиничких манифестација SIRS-а и на крају мултиорганску дисфункцију (363). Повећана продукција про-инфламацијских цитокина је праћена другом фазом болести која се карактерише смањеном продукцијом IFN- γ и повећањем концентрације IL-10 што је означено као компензаторни анти-инфламацијски одговор или CARS (363). Основни извор IL-10 су регулаторни Т лимфоцити или Tr1 (енгл. *T regulatory 1*, Tr1). Tr1 су ћелије које учествују у регулацији имунског одговора и одржавању имунске хомеостазе. Уједно, контролишу прогресију инфламације у бројним болестима (365). Показано је да Tr1 су активирани у току АП (366). Досадашња истраживања су показала да повећани број

циркулишућих регулаторних Т лимфоцита смањују панкреасну инфламацију и морталитет мишева са тешком формом акутног панкреатитиса (366).

Експериментални налази ове студије указују да је број регулаторних Т лимфоцита које експримирају Foxp3 значајно већи у панкреасу C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева са акутним панкреатитисом. Затим, број Т лимфоцита и регулаторних Т лимфоцита које продукују анти-инфламацијски цитокин, IL-10, је значајно већи код Gal-3^{-/-} мишева. Овај налаз се може објаснити чињеницом да је аблација гена за Gal-3 праћена смањеним стварањем про-инфламацијских цитокина из ћелија урођене имуности што резултира повећаном инфилтрацијом толерогених дендритских ћелија које продукују IL-10. Дендритске ћелије са толерогеним фенотипом су важна компонента имунског система и регулишу имунски одговор у физиолошким и патолошким стањима. Ове ћелије промовишу диференцијацију Т лимфоцита у периферном лимфном ткиву различитим механизмима: продукцијом цитокина попут IL-10, IL-27 и TGFβ; ослобађањем ензима индоламин 2,3-диоксигеназе (енгл. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) и контролом екстраћелијских нивоа аденозин-трифосфата (АТФ) и аденозина (367). Делација гена за Gal-3 је праћена значајно мањим бројем дендритских ћелија са толерогеним фенотипом које продукују IL-10. Толерогене дендритске ћелије потом доприносе повећаној инфилтрацији Т лимфоцита са регулаторним фенотипом, као и помагачких Т лимфоцита које експримирају Foxp3 и CTLA-4 који продукују повећане концентрације IL-10 у панкреасу изолованог из оболелих Gal-3^{-/-} мишева. IL-10 је снажан анти-инфламацијски цитокин који инхибира продукцију цитокина из активираних макрофага и тако смањује тежину АП и повећава преживљавање оболелих од тешке форме АП (175).

Стерилна инфламација са повећаном инфилтрацијом леукоцита је основна карактеристика АП. Неутрофили су прве ћелије које инфилтришу паренхим панкреаса након индукције болести. Резултати актуелног истраживања указују да је аблација гена за Gal-3 праћена мањом инфилтрацијом неутрофила у паренхим панкреаса, али и мањим инфилтратом у плућни паренхим. Досадашња истраживања недвосмислено су показала да активација IL-23/IL-17 осовине доприноси појачаној инфилтрацији неутрофила у инфламирано подручје (368, 369). Наиме, IL-23 продукован из ћелија урођене имуности, пре свега макрофага, утиче на диференцијацију Th17 лимфоцита и продукцију IL-17 (370). Поред Т лимфоцита, IL-17 могу продуктовати и друге ћелије имунског система, попут NKT ћелија (371). Продуковани IL-17 потом стимулише макрофаге и друге ћелије, попут епителних ћелија, фибробласта и ендотелних ћелија да продукују IL-8, IL-1, TNF-α, IL-6 и фактор стимулације гранулоцитних и макрофагних

колонија, те као крајњи ефекат ослобођених медијатора настаје повећана инфилтрација неутрофила на место инфламације (368). Код људи серумски нивои цитокина IL-23 и IL-17 су повезани са тежином АП (371). У актуелној студији је уочено да је број неутрофила и макрофага који продукују IL-23 нижи код мишева дефицијентних за Gal-3. Интересантан је резултат из недавне студије где је показано да су неутрофили главни извор продукције IL-23 у дигестивном тракту код пацијената са инфламацијским болестима црева (372). IL-23 припада IL-12 цитокинској фамилији и поспешује развој Т лимфоцита и NKT ћелија које продукују IL-17 (371). Документовано је да је број Т лимфоцита и NKT ћелија које продукују IL-17 изолованих из панкреаса мишева из оболелих мишева са аблацијом гена за Gal-3 значајно мањи у поређењу са мишевима дивљег соја. Узимајући у обзир ове налазе могуће је закључити да Gal-3 двојачко поспешује инфилтрацију неутрофила у инфламрани панкреас: директним везивањем за рецепторе на неутрофилима при чему игра улогу хемоатрактанта, активирањем IL-23/IL-17 осовине доприносећи повећаној секрецији хемокина који потом стимулишу инфилтрацију неутрофила у инфламрани панкреас.

6. ЗАКЉУЧАК

Делетија гена за Gal-3 продужава преживљавање мишева оболелих од тешке форме акутног панкреатитиса у моделу болести индукованог подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса, а што је повезано са мањом инфламацијом панкреаса, као и мањим степеном системске инфламације и компликација као што су некроза панкреаса и акутно оштећење плућа. Делетија гена за Gal-3 смањује инфилтрацију панкреасног паренхима неутрофилима, макрофагима и Т лимфоцита што указује на потенцијално важну про-инфламацијску улогу овог молекула у развоју акутног панкреатитиса. Смањена инфламација која настаје у одсуству Gal-3 је резултат изостанка интеракције Gal-3 и TLR-4 на површини неутрофила и макрофага чиме се смањује развој про-инфламацијског фенотипа ћелија урођене имуности, што омогућава повећану инфилтрацију толерогених дендритских ћелија, а потом и имunosупресивних регулаторних Т лимфоцита, што доприноси смањењу инфламације. Уједно, делетија гена за Gal-3 је праћена смањеном активацијом IL-23/IL-17 осовине што резултира смањеном инфилтрацијом неутрофила у инфламрани панкреас (Схема 1 и 2).

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Галектин 3 дефицијентни мишеви значајно дуже живе након индукције тешке и леталне форме акутног панкреатитиса подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса.
2. Индукција акутног панкреатитиса подвезивањем билио-панкреатичног дуктуса је праћена повећаном експресијом галектина 3 на инфилтришућим леукоцитима и дукталним епителним ћелијама.
3. Галектин 3 дефицијентни мишеви развијају мањи степен оштећења панкреаса у два експериментална модела болести што се манифестује: мањим едемом, мањом инфилтрацијом и пољима некрозе и вакуолизације панкреаса, али и мањом активношћу трипсина у панкреасу и амилазе у серуму.
4. Галектин 3 дефицијентни мишеви развијају мањи степен оштећења плућа након подвезивања билио-панкреатичног дуктуса, што се је праћено мањим едемом интерстицијума, задебљањем алвеоларних преграда, инфилтрацијом и мањим пољима хеморагије у плућима.
5. Експресија TLR-4 на неутрофилима и макрофагима је мања код галектин 3 дефицијентних мишева.

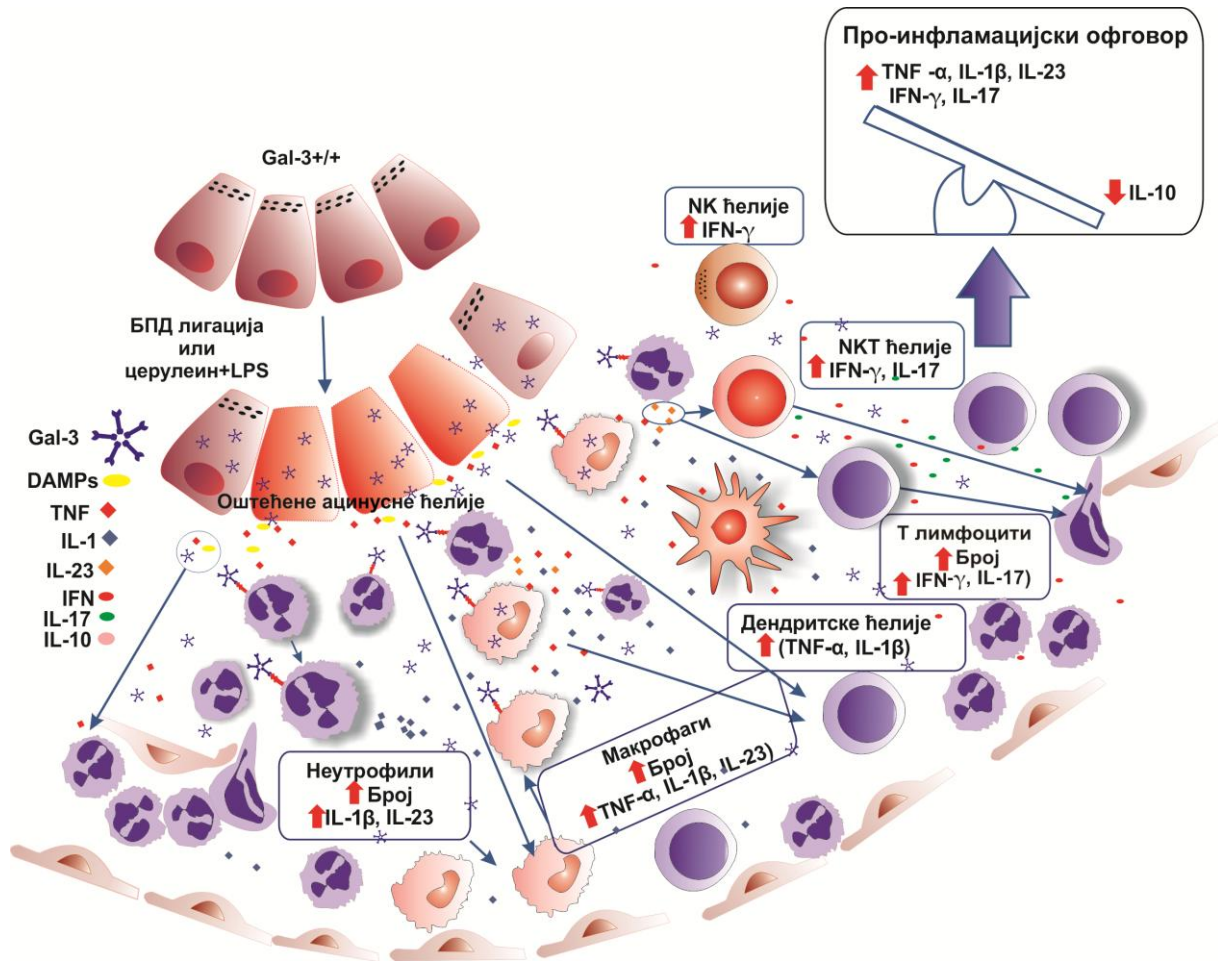


Схема 1. Улога галектина 3 у патогенези акутног панкреатитиса. Подвезивање билио-панкреатичног дуктуса, или примена церулеина и LPS, узрокује оштећење ацинусних ћелија панкреаса и ослобађање алармина, цитокина и галектина 3. Ослобођени галектин 3 се везује за TLR-4 рецепторе на неутрофилима и макрофагама које инфилтришу панкреас и индукује развој про-инфламацијског фенотипа дендритских ћелија, али и ефекторских ћелија урођене и стечене имуности. Као резултат настаје повећана продукција про-инфламацијских цитокина.

6. Галектин 3 се везује за TLR-4 на површини ћелија урођене имуности и утиче на развој про-инфламацијског фенотипа ћелија урођене имуности.

7. Примена инхибитора TLR-4 је праћена повећањем преживљавања мишева дивљег соја након индукције тешке и леталне форме акутног панкреатитиса.

8. Делација гена за галектин 3 је праћена мањом инфилтрацијом про-инфламацијских N1 неутрофила, про-инфламацијских M1 макрофага, дендритских ћелија, НК и NKT ћелија са мањом продукцијом цитокина TNF-α, IL-1β и IFN-γ.

9. Панкреас Gal-3 дефицијентних мишева појачано инфилтришу толерогене дендритске ћелије што је праћено повећаном инфилтрацијом регулаторних Т лимфоцита и повећаном продукцијом анти-инфламацијског цитокина, IL-10. Заступљеност Th1 лимфоцита који продукују IFN- γ се значајно смањује.

10. Делација гена за галектин-3 утиче на активацију IL-23/IL-17 осовине и посредно на инфилтрацију неутрофила у паренхим панкреаса.

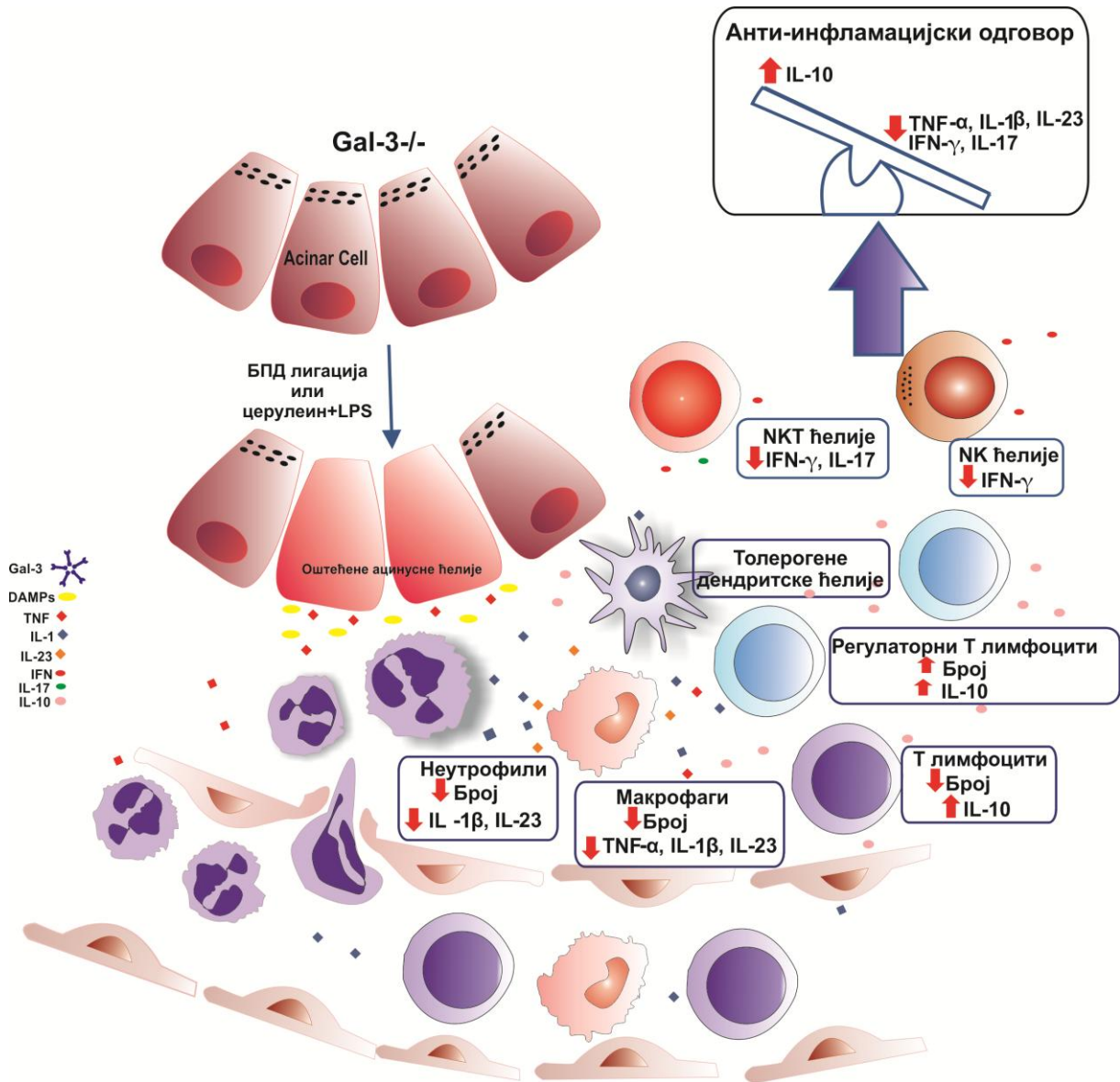


Схема 2. Ефекат делеције гена за галектин 3 на ток експерименталног акутног панкреатитиса. У одсуству галектин 3/TLR-4 интеракције, смањена је активација неутрофила и макрофага и продукција про-инфламацијских цитокина што олакшава преминање у толерогеног фенотипа дендритских ћелија. Као резултат настаје активација регулаторних Foxp3⁺ ћелија које продукују IL-10. Оваква микросредина смањује оштећење ткива панкреаса имунским механизмима.

7. ЛИТЕРАТУРА:

1. Fitzgerald PJ. Medical anecdotes concerning some diseases of the pancreas. Monographs in pathology. 1980;21:1-29.
2. Bernstein A, Bernstein HC. Medicine in the Talmud. California medicine. 1951;74(4):267-8.
3. Singer C. Short history of anatomy from the Greeks to Harvey. New York: Dover Publications; 1957.
4. Nicolson M: Giovanni Battista Morgagni and eighteenth century physical examination. In: Lawrence C (ed) Medical Theory, Surgical Practice: Studies in the History of Surgery London, Routledge 1992, pp 101-34.
5. Brunshwig A. The surgery of pancreatic tumor. St. Louis: CV Mosby, 1942;117-27.
6. Fruton JS. Biochemistry and clinical chemistry--a retrospect. Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie. 1982;20(4):243-52.
7. Langerhans P (1869). Beitrage zur mikroskopische anatomie der Bauchspeicheldruse. Inaugural dissertation. Berlin: Gustav Lange
8. Sachs M. [Study of the pancreas and its inflammatory diseases from the 16th-19th century]. Zentralblatt fur Chirurgie. 1993;118(11):702-11.
9. Fitz RH. Acute Pancreatitis: a consideration of pancreatic hemorrhage, hemorrhagic, suppurative and gangrenous pancreatitis of disseminated fat necrosis. Boston Med Surg J. 1889;120:181-235.
10. Opie E. The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. Am J Med Sci 1901;121:27-43.
11. Mettler CC. History of medicine. Philadelphia: Blackiston, 1947; 83, 125, 131, 142, 182, 183.
12. Lerch MM, Saluja AK, Runzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. Gastroenterology. 1993;104(3):853-61.
13. H. Reyerson Decker. The Recognition of Pancreatic Insufficiency with special reference to the Loewi test: Boston Med Surg J 1917;176:867-871. June 21, 1917.
14. Sumers W. Acute alcoholic pancreatitis. Dublin J Med Sci 1917;143:244-247
15. Elman R, Arneson N, Graham E: Value of blood amylase estimations in the diagnosis of pancreatic disease: a clinical study. Arch Surg 1929;19:943-967.

16. Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 1994;330(17):1198-210.
17. Parshall WA, Remine WH. INTERNAL DRAINAGE OF PSEUDOCYSTS OF THE PANCREAS. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1965;91:480-4.
18. Pollock AV. Acute pancreatitis; analysis of 100 patients. *British medical journal*. 1959;1(5113):6-14.
19. Spooner BS, Walther BT, Rutter WJ. The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *The Journal of cell biology*. 1970;47(1):235-46.
20. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development (Cambridge, England)*. 1995;121(6):1569-80.
21. Couzin J. Developmental biology. In embryos, pancreas and liver reach full size in different ways. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5812):587.
22. Joo YE, Kang HC, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Chung MY, et al. Agenesis of the dorsal pancreas: a case report and review of the literature. *The Korean journal of internal medicine*. 2006;21(4):236-9.
23. J AC, Rotellar F, Salguero J, Benito A, Solorzano JL, Sangro B. Agenesis of the dorsal pancreas: systematic review of a clinical challenge. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2016;108(8):479-84.
24. Bertelli E, Di Gregorio F, Mosca S, Bastianini A. The arterial blood supply of the pancreas: a review. V. The dorsal pancreatic artery. An anatomic review and a radiologic study. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*. 1998;20(6):445-52.
25. Das SL, Kennedy JI, Murphy R, Phillips AR, Windsor JA, Petrov MS. Relationship between the exocrine and endocrine pancreas after acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(45):17196-205.
26. Engelking LR. Physiology of the endocrine pancreas. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 1997;12(4):224-9.
27. Morisset J. Seventy years of pancreatic physiology: take a look back. *Pancreas*. 2014;43(8):1172-84.
28. Weiss FU, Halangk W, Lerch MM. New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2008;22(1):3-15.
29. Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *The Journal of cell biology*. 1995;128(4):589-98.

30. O'Konski MS, Pandol SJ. Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(5):1649-57.
31. Schulz I, Stolze HH. The exocrine pancreas: the role of secretagogues, cyclic nucleotides, and calcium in enzyme secretion. *Annual review of physiology*. 1980;42:127-56.
32. van Acker GJ, Perides G, Steer ML. Co-localization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(13):1985-90.
33. Schneider SW, Sritharan KC, Geibel JP, Oberleithner H, Jena BP. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(1):316-21.
34. Nawrot-Porabka K, Jaworek J, Leja-Szpak A, Kot M, Lange S. The role of antisecretory factor in pancreatic exocrine secretion: studies in vivo and in vitro. *Experimental physiology*. 2015;100(3):267-77.
35. Muniraj T, Gajendran M, Thiruvengadam S, Raghuram K, Rao S, Devaraj P. Acute pancreatitis. *Disease-a-month : DM*. 2012;58(3):98-144.
36. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. 150 mM HCO₃⁽⁻⁾--how does the pancreas do it? Clues from computer modelling of the duct cell. *JOP : Journal of the pancreas*. 2001;2(4 Suppl):198-202.
37. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annual review of physiology*. 2005;67:377-409.
38. Fallon MB, Gorelick FS, Anderson JM, Mennone A, Saluja A, Steer ML. Effect of cerulein hyperstimulation on the paracellular barrier of rat exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 1995;108(6):1863-72.
39. Cosen-Binker LI, Gaisano HY. Recent insights into the cellular mechanisms of acute pancreatitis. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2007;21(1):19-24.
40. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(1):1-17.
41. Junglee D, Katrak A, Mohiuddin J, Blacklock H, Prentice HG, Dandona P. Salivary amylase and pancreatic enzymes in serum after total body irradiation. *Clinical chemistry*. 1986;32(4):609-10.
42. Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(19-20):2161-72.

43. Marshall JB. Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Archives of internal medicine*. 1993;153(10):1185-98.
44. Durie PR, Gaskin KJ, Geokas MC, O'Rourke M, Largman C. Plasma immunoreactive anionic pancreatic trypsin in cystic fibrosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1982;1(3):337-43.
45. Lowe ME. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual review of nutrition*. 1997;17:141-58.
46. Wang Y, Sternfeld L, Yang F, Rodriguez JA, Ross C, Hayden MR, et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells. *Gut*. 2009;58(3):422-30.
47. Hameed AM, Lam VW, Pleass HC. Significant elevations of serum lipase not caused by pancreatitis: a systematic review. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2015;17(2):99-112.
48. Acosta JA, Hoyt DB, Schmid-Schonbein GW, Hugli TE, Anjaria DJ, Frankel DA, et al. Intraluminal pancreatic serine protease activity, mucosal permeability, and shock: a review. *Shock (Augusta, Ga)*. 2006;26(1):3-9.
49. Otsuki M. Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2000;15 Suppl:D71-83.
50. Logsdon CD. Stimulation of pancreatic acinar cell growth by CCK, epidermal growth factor, and insulin in vitro. *The American journal of physiology*. 1986;251(4 Pt 1):G487-94.
51. Samuel I, Zaheer S, Nelson JJ, Yorek MA, Zaheer A. CCK-A receptor induction and P38 and NF-kappaB activation in acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2004;4(1):49-56.
52. Mossner J. New advances in cell physiology and pathophysiology of the exocrine pancreas. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2010;28(6):722-8.
53. Konturek SJ, Pepera J, Zabielski K, Konturek PC, Pawlik T, Szlachcic A, et al. Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2003;54(3):293-317.
54. Ohlsson K. Acute pancreatitis. Biochemical, pathophysiological and therapeutics aspects. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 1988;51(1):3-12.
55. Glasbrenner B, Adler G. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology*. 1993;40(6):517-21.
56. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet (London, England)*. 2015;386(9988):85-96.

57. Blum T, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lankisch PG. Fatal outcome in acute pancreatitis: its occurrence and early prediction. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2001;1(3):237-41.
58. Lankisch PG, Pflichthofer D, Lehnick D. No strict correlation between necrosis and organ failure in acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000;20(3):319-22.
59. de Beaux AC, Palmer KR, Carter DC. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. *Gut*. 1995;37(1):121-6.
60. Perez A, Whang EE, Brooks DC, Moore FD, Jr., Hughes MD, Sica GT, et al. Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extended necrosis and infected necrosis? *Pancreas*. 2002;25(3):229-33.
61. Isenmann R, Runzi M, Kron M, Kahl S, Kraus D, Jung N, et al. Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology*. 2004;126(4):997-1004.
62. Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1179-87.e3.
63. Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC. Acute pancreatitis: a lethal disease of increasing incidence. *Gut*. 1985;26(7):724-9.
64. Banks PA. Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2002;56(6 Suppl):S226-30.
65. Jaakkola M, Nordback I. Pancreatitis in Finland between 1970 and 1989. *Gut*. 1993;34(9):1255-60.
66. Hamada S, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Tsuji I, Shimosegawa T. Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan. *Pancreas*. 2014;43(8):1244-8.
67. Krishna SG, Kamboj AK, Hart PA, Hinton A, Conwell DL. The Changing Epidemiology of Acute Pancreatitis Hospitalizations: A Decade of Trends and the Impact of Chronic Pancreatitis. *Pancreas*. 2017;46(4):482-8.
68. Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2017;17(2):155-65.
69. Shen HN, Lu CL. Incidence, resource use, and outcome of acute pancreatitis with/without intensive care: a nationwide population-based study in Taiwan. *Pancreas*. 2011;40(1):10-5.
70. Forsmark CE, Vege SS, Wilcox CM. Acute Pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 2016;375(20):1972-81.

71. Malcynski JT, Iwanow IC, Burchard KW. Severe pancreatitis. Determinants of mortality in a tertiary referral center. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960). 1996;131(3):242-6.
72. Werner J, Hartwig W, Uhl W, Muller C, Buchler MW. Useful markers for predicting severity and monitoring progression of acute pancreatitis. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]. 2003;3(2):115-27.
73. Isenmann R, Rau B, Beger HG. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. The British journal of surgery. 1999;86(8):1020-4.
74. McKay CJ, Buter A. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]. 2003;3(2):111-4.
75. Halonen KI, Pettila V, Leppaniemi AK, Kemppainen EA, Puolakkainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. Critical care medicine. 2002;30(6):1274-9.
76. Mutinga M, Rosenbluth A, Tenner SM, Odze RR, Sica GT, Banks PA. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology. 2000;28(2):91-5.
77. Pederzoli P, Bassi C, Vesentini S, Campedelli A. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem. Surgery, gynecology & obstetrics. 1993;176(5):480-3.
78. Company L, Saez J, Martinez J, Aparicio JR, Laveda R, Grino P, et al. Factors predicting mortality in severe acute pancreatitis. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]. 2003;3(2):144-8.
79. Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Uhl W, et al. Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960). 2001;136(5):592-6.
80. Akhtar AJ, Shaheen M. Extrapancreatic manifestations of acute pancreatitis in African-American and Hispanic patients. Pancreas. 2004;29(4):291-7.
81. Girman CJ, Kou TD, Cai B, Alexander CM, O'Neill EA, Williams-Herman DE, et al. Patients with type 2 diabetes mellitus have higher risk for acute pancreatitis compared with those without diabetes. Diabetes, obesity & metabolism. 2010;12(9):766-71.
82. Urushihara H, Taketsuna M, Liu Y, Oda E, Nakamura M, Nishiuma S, et al. Increased risk of acute pancreatitis in patients with type 2 diabetes: an observational study using a Japanese hospital database. PloS one. 2012;7(12):e53224.

83. Noel RA, Braun DK, Patterson RE, Bloomgren GL. Increased risk of acute pancreatitis and biliary disease observed in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *Diabetes care*. 2009;32(5):834-8.
84. Bradley EL, 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1993;128(5):586-90.
85. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock (Augusta, Ga)*. 2005;24 Suppl 1:45-51.
86. Gullo L, Migliori M, Olah A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, et al. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas*. 2002;24(3):223-7.
87. Dominguez-Munoz JE. *Clinical pancreatology for Practicing Gastroenterologists and Surgeons*. Oxford: Blackwell Publishing 2005.
88. Andersson R, Andersson B, Haraldsen P, Drewsen G, Eckerwall G. Incidence, management and recurrence rate of acute pancreatitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2004;39(9):891-4.
89. Brunicaudi F, Andersen D, Billiar T, Dunn D, Hunter J, Matthews J, et al. *Schwartz's Principles of Surgery*, 10th edition USA: McGraw-Hill Education 2014: 1341-1346.
90. Acosta JM, Ledesma CL. Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 1974;290(9):484-7.
91. Diehl AK, Holleman DR, Jr., Chapman JB, Schwesinger WH, Kurtin WE. Gallstone size and risk of pancreatitis. *Archives of internal medicine*. 1997;157(15):1674-8.
92. Tenner S, Dubner H, Steinberg W. Predicting gallstone pancreatitis with laboratory parameters: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 1994;89(10):1863-6.
93. Lindkvist B, Appelros S, Manjer J, Berglund G, Borgstrom A. A prospective cohort study of smoking in acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2008;8(1):63-70.
94. Elmunzer BJ, Scheiman JM, Lehman GA, Chak A, Mosler P, Higgins PD, et al. A randomized trial of rectal indomethacin to prevent post-ERCP pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1414-22.
95. Cooper ST, Slivka A. Incidence, risk factors, and prevention of post-ERCP pancreatitis. *Gastroenterology clinics of North America*. 2007;36(2):259-76, vii-viii.
96. Fung AS, Tsiotos GG, Sarr MG. ERCP-induced acute necrotizing pancreatitis: is it a more severe disease? *Pancreas*. 1997;15(3):217-21.

97. Christoforidis E, Goulimaris I, Kanellos I, Tsalis K, Demetriades C, Betsis D. Post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: patient-related and operative risk factors. *Endoscopy*. 2002;34(4):286-92.
98. Charnley RM. Hereditary pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2003;9(1):1-4.
99. Whitcomb DC, LaRusch J, Krasinskas AM, Klei L, Smith JP, Brand RE, et al. Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nature genetics*. 2012;44(12):1349-54.
100. Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1292-302.
101. Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis. *Gastroenterology clinics of North America*. 1990;19(4):783-91.
102. Dominguez-Munoz JE, Malfertheiner P, Ditschuneit HH, Blanco-Chavez J, Uhl W, Buchler M, et al. Hyperlipidemia in acute pancreatitis. Relationship with etiology, onset, and severity of the disease. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 1991;10(3-4):261-7.
103. Fortson MR, Freedman SN, Webster PD, 3rd. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 1995;90(12):2134-9.
104. Scherer J, Singh VP, Pitchumoni CS, Yadav D. Issues in hypertriglyceridemic pancreatitis: an update. *Journal of clinical gastroenterology*. 2014;48(3):195-203.
105. Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology*. 1995;109(1):239-46.
106. McArthur KE. Review article: drug-induced pancreatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 1996;10(1):23-38.
107. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *The Surgical clinics of North America*. 2007;87(6):1325-40, vii.
108. Mirete G, Masia M, Gutierrez F, Mora A, Escolano C, Maestre A. Acute pancreatitis as a complication of ritonavir therapy in a patient with AIDS. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 1998;17(11):810-1.
109. Badalov N, Baradarian R, Iswara K, Li J, Steinberg W, Tenner S. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official*

- clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2007;5(6):648-61; quiz 4.
110. Maxson CJ, Greenfield SM, Turner JL. Acute pancreatitis as a common complication of 2',3'-dideoxyinosine therapy in the acquired immunodeficiency syndrome. The American journal of gastroenterology. 1992;87(6):708-13.
111. Feldstein JD, Johnson FR, Kallick CA, Doolas A. Acute hemorrhagic pancreatitis and pseudocyst due to mumps. Annals of surgery. 1974;180(1):85-8.
112. Rabelo-Goncalves EM, Roesler BM, Zeitune JM. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection: Possible role of bacterium in liver and pancreas diseases. World journal of hepatology. 2015;7(30):2968-79.
113. Blum A, Podvitzky O, Shalabi R, Simsolo C. Acute pancreatitis may be caused by H1N1 influenza A virus infection. The Israel Medical Association journal : IMAJ. 2010;12(10):640-1.
114. Nitsche C, Maertin S, Scheiber J, Ritter CA, Lerch MM, Mayerle J. Drug-induced pancreatitis. Current gastroenterology reports. 2012;14(2):131-8.
115. Sadr-Azodi O, Orsini N, Andren-Sandberg A, Wolk A. Abdominal and total adiposity and the risk of acute pancreatitis: a population-based prospective cohort study. The American journal of gastroenterology. 2013;108(1):133-9.
116. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology. 2013;144(6):1252-61.
117. Krishna SG, Hinton A, Oza V, Hart PA, Swee E, El-Dika S, et al. Morbid Obesity Is Associated With Adverse Clinical Outcomes in Acute Pancreatitis: A Propensity-Matched Study. The American journal of gastroenterology. 2015;110(11):1608-19.
118. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, Phillips AR, Windsor JA. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. Gastroenterology. 2010;139(3):813-20.
119. Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, et al. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. The American journal of physiology. 1998;275(2):G352-62.
120. Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? Annual review of physiology. 2007;69:249-69.
121. Saluja A, Saluja M, Villa A, Leli U, Rutledge P, Meldolesi J, et al. Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization. The Journal of clinical investigation. 1989;84(4):1260-6.

122. Saluja AK, Saluja M, Printz H, Zaverchnik A, Sengupta A, Steer ML. Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(22):8968-71.
123. Kim JY, Kim KH, Lee JA, Namkung W, Sun AQ, Ananthanarayanan M, et al. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1941-53.
124. Gukovskaya AS, Pandol SJ, Gukovsky I. New insights into the pathways initiating and driving pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology*. 2016;32(5):429-35.
125. Perides G, Laukkarinen JM, Vassileva G, Steer ML. Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar1. *Gastroenterology*. 2010;138(2):715-25.
126. Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, et al. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2011;140(7):2116-25.
127. Voronina S, Collier D, Chvanov M, Middlehurst B, Beckett AJ, Prior IA, et al. The role of Ca²⁺ influx in endocytic vacuole formation in pancreatic acinar cells. *The Biochemical journal*. 2015;465(3):405-12.
128. Mukherjee R, Mareninova OA, Odinkova IV, Huang W, Murphy J, Chvanov M, et al. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut*. 2016;65(8):1333-46.
129. Saluja A, Hashimoto S, Saluja M, Powers RE, Meldolesi J, Steer ML. Subcellular redistribution of lysosomal enzymes during caerulein-induced pancreatitis. *The American journal of physiology*. 1987;253(4 Pt 1):G508-16.
130. Van Acker GJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;283(3):G794-800.
131. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, et al. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(6):773-81.
132. Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, Chugh R, Borja-Cacho D, Dawra RK, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1772-82.

133. Hoque R, Malik AF, Gorelick F, Mehal WZ. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. *Pancreas*. 2012;41(3):353-7.
134. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*. 2012;249(1):158-75.
135. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell death and DAMPs in acute pancreatitis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2014;20:466-77.
136. Kempuraj D, Twait EC, Williard DE, Yuan Z, Meyerholz DK, Samuel I. The novel cytokine interleukin-33 activates acinar cell proinflammatory pathways and induces acute pancreatic inflammation in mice. *PloS one*. 2013;8(2):e56866.
137. Mayerle J. A novel role for leucocytes in determining the severity of acute pancreatitis. *Gut*. 2009;58(11):1440-1.
138. Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *The American journal of physiology*. 1998;275(6):G1402-14.
139. Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;280(1):388-95.
140. Rakonczay Z, Jr., Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut*. 2008;57(2):259-67.
141. Huang H, Liu Y, Daniluk J, Gaiser S, Chu J, Wang H, et al. Activation of nuclear factor-kappaB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2013;144(1):202-10.
142. Saluja A, Dudeja V, Dawra R, Sah RP. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2019;156(7):1979-93.
143. Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang X, Andersson R. Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2006;41(4):472-80.
144. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):826-37.
145. Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV. Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 medicine reports*. 2011;3:15.
146. Xue J, Sharma V, Habtezion A. Immune cells and immune-based therapy in pancreatitis. *Immunologic research*. 2014;58(2-3):378-86.

147. Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 1988;3(2-3):105-12.
148. Singh P, Garg PK. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2016;35(3):153-66.
149. Akinosoglou K, Gogos C. Immune-modulating therapy in acute pancreatitis: fact or fiction. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(41):15200-15.
150. Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology*. 1996;111(4):1081-91.
151. Yang ZW, Meng XX, Xu P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(11):2513-20.
152. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
153. Repo H, Harlan JM. Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium. *Annals of medicine*. 1999;31(3):156-65.
154. Liu FC, Chuang YH, Tsai YF, Yu HP. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock (Augusta, Ga)*. 2014;41(6):491-8.
155. Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lusic AJ, Brennan ML, et al. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2002;122(4):974-84.
156. Sendler M, Dummer A, Weiss FU, Kruger B, Wartmann T, Scharffetter-Kochanek K, et al. Tumour necrosis factor alpha secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*. 2013;62(3):430-9.
157. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5663):1532-5.
158. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(8):577-82.
159. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93.
160. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical care (London, England)*. 2016;20:73.

161. Korhonen JT, Dudeja V, Dawra R, Kubes P, Saluja A. Neutrophil Extracellular Traps Provide a Grip on the Enigmatic Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1682-5.
162. Merza M, Hartman H, Rahman M, Hwaiz R, Zhang E, Renstrom E, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1920-31.e8.
163. Leppkes M, Maueroder C, Hirth S, Nowecki S, Gunther C, Billmeier U, et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nature communications*. 2016;7:10973.
164. Perides G, Weiss ER, Michael ES, Laukkarinen JM, Duffield JS, Steer ML. TNF- α -dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6C(hi) monocytes in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(15):13327-35.
165. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Algul H, Habtezion A. Autophagy, Inflammation, and Immune Dysfunction in the Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1212-26.
166. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*. 2015;33:643-75.
167. Dugernier T, Laterre PF, Reynaert MS. Ascites fluid in severe acute pancreatitis: from pathophysiology to therapy. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 2000;63(3):264-8.
168. Gea-Sorli S, Closa D. In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis. *BMC immunology*. 2009;10:42.
169. Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *The Journal of pathology*. 2007;211(4):383-8.
170. Bedrosian AS, Nguyen AH, Hackman M, Connolly MK, Malhotra A, Ibrahim J, et al. Dendritic cells promote pancreatic viability in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1915-26.e1-14.
171. Abraham SN, Arock M. Mast cells and basophils in innate immunity. *Seminars in immunology*. 1998;10(5):373-81.
172. Dib M, Zhao X, Wang X, Andersson E, Drewsen G, Andersson R. Acute phase response in acute pancreatitis: a comparison with abdominal sepsis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2003;38(10):1072-7.
173. Mylona V, Koussoulas V, Tzivras D, Makrygiannis E, Georgopoulou P, Koratzanis G, et al. Changes in adaptive and innate immunity in patients with acute pancreatitis and systemic inflammatory response syndrome. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2011;11(5):475-81.

174. Yang Z, Zhang Y, Dong L, Yang C, Gou S, Yin T, et al. The Reduction of Peripheral Blood CD4+ T Cell Indicates Persistent Organ Failure in Acute Pancreatitis. *PloS one*. 2015;10(5):e0125529.
175. Demols A, Le Moine O, Desalle F, Quertinmont E, Van Laethem JL, Deviere J. CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2000;118(3):582-90.
176. Fonteh P, Smith M, Brand M. Adaptive Immune Cell Dysregulation and Role in Acute Pancreatitis Disease Progression and Treatment. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2018;66(3):199-209.
177. Vaz J, Akbarshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(5):616-30.
178. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):168-79.
179. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(10):776-87.
180. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
181. Hedayat M, Netea MG, Rezaei N. Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *The Lancet Infectious diseases*. 2011;11(9):702-12.
182. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
183. Li Y, Zhou ZG, Xia QJ, Zhang J, Li HG, Cao GQ, et al. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2005;30(4):375-81.
184. Awla D, Abdulla A, Regner S, Thorlacius H. TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2011;60(12):1093-8.
185. Jaffray C, Mendez C, Denham W, Carter G, Norman J. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha: role of nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B proteins. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2000;4(4):370-7; discussion 7-8.

186. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(8):2223-33.
187. Wu HS, Zhang L, Chen Y, Guo XJ, Wang L, Xu JB, et al. Effect of nitric oxide on toll-like receptor 2 and 4 gene expression in rats with acute lung injury complicated by acute hemorrhage necrotizing pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2005;4(4):609-13.
188. Pastor CM, Pugin J, Kwak B, Chanson M, Mach F, Hadengue A, et al. Role of Toll-like receptor 4 on pancreatic and pulmonary injury in a mice model of acute pancreatitis associated with endotoxemia. *Critical care medicine*. 2004;32(8):1759-63.
189. Li HG, Zhou ZG, Li Y, Zheng XL, Lei S, Zhu L, et al. Alterations of Toll-like receptor 4 expression on peripheral blood monocytes during the early stage of human acute pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(8):1973-8.
190. Hoque R, Mehal WZ. Inflammasomes in pancreatic physiology and disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2015;308(8):G643-51.
191. Gao HK, Zhou ZG, Li Y, Chen YQ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis: a study in the Chinese population. *Pancreas*. 2007;34(3):295-8.
192. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(1):9-20.
193. Foitzik T. The enteral factor in pancreatic infection. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2001;1(3):217-23.
194. Li Q, Wang C, Tang C, He Q, Li N, Li J. Bacteremia in patients with acute pancreatitis as revealed by 16S ribosomal RNA gene-based techniques*. *Critical care medicine*. 2013;41(8):1938-50.
195. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(11):6164-72.
196. Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhurst G, Curry A, Carlson GL. Glutamine deprivation facilitates tumour necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate. *Gut*. 2003;52(2):224-30.
197. Gianotti L, Munda R, Alexander JW, Tchervenkov JI, Babcock GF. Bacterial translocation: a potential source for infection in acute pancreatitis. *Pancreas*. 1993;8(5):551-8.

198. Tsuji Y, Watanabe T, Kudo M, Arai H, Strober W, Chiba T. Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. *Immunity*. 2012;37(2):326-38.
199. Fritz S, Hartwig W, Lehmann R, Will-Schweiger K, Kommerell M, Hackert T, et al. Prophylactic antibiotic treatment is superior to therapy on-demand in experimental necrotising pancreatitis. *Critical care (London, England)*. 2008;12(6):R141.
200. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(1):29-41.
201. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, et al. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Annals of translational medicine*. 2014;2(9):88.
202. de Waard A, Hickman S, Kornfeld S. Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *The Journal of biological chemistry*. 1976;251(23):7581-7.
203. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
204. Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Molecular biology and evolution*. 2004;21(7):1177-87.
205. Baum LG, Garner OB, Schaefer K, Lee B. Microbe-Host Interactions are Positively and Negatively Regulated by Galectin-Glycan Interactions. *Frontiers in immunology*. 2014;5:284.
206. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *The Journal of cell biology*. 2009;185(3):381-5.
207. Thiemann S, Baum LG. The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(1):2-9.
208. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1253:181-92.
209. Lichtenstein RG, Rabinovich GA. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell death and differentiation*. 2013;20(8):976-86.
210. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):433-40.

211. Varela PF, Solis D, Diaz-Maurino T, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. The 2.15 Å crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *Journal of molecular biology*. 1999;294(2):537-49.
212. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(13):1679-700.
213. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e17.
214. Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai K, Wada Y, et al. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;361(2):195-201.
215. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation; research in biological diversity*. 1998;63(3):159-68.
216. 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. *Scandinavian journal of immunology*. 2007;66(2-3):143-58.
217. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, et al. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(5):3091-102.
218. Wilson TJ, Firth MN, Powell JT, Harrison FL. The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *The Biochemical journal*. 1989;261(3):847-52.
219. Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(5):741-52.
220. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(5):338-52.
221. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):15819-27.
222. Shi Y, He B, Kuchenbecker KM, You L, Xu Z, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *International journal of cancer*. 2007;121(6):1175-81.

223. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):232-54.
224. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, et al. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(15):10109-23.
225. Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Current opinion in structural biology*. 1999;9(5):578-84.
226. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):263-73.
227. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in immunology*. 2002;23(6):313-20.
228. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):441-9.
229. Georgiadis V, Stewart HJ, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, et al. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236(4):1014-24.
230. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(6):424-38.
231. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(15):7383-90.
232. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, et al. 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 bacterial and tissue collagenase. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(35):26704-11.
233. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer research*. 1999;59(24):6239-45.
234. 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 the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology*. 2000;10(11):1201-8.

235. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):527-35.
236. Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1379(1):97-106.
237. Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cellular & molecular biology letters*. 2004;9(2):305-28.
238. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1473(1):172-85.
239. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(13):7097-9.
240. Domic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1760(4):616-35.
241. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001;83(7):667-76.
242. Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, Letesson JJ, Van den Brule F, Castronovo V, et al. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *International journal of cancer*. 1998;75(1):105-11.
243. Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell reports*. 2015.
244. Yip PK, Carrillo-Jimenez A, King P, Vilalta A, Nomura K, Chau CC, et al. Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Scientific reports*. 2017;7:41689.
245. Zhou W, Chen X, Hu Q, Chen X, Chen Y, Huang L. Galectin-3 activates TLR4/NF-kappaB signaling to promote lung adenocarcinoma cell proliferation through activating lncRNA-NEAT1 expression. *BMC cancer*. 2018;18(1):580.
246. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Experimental cell research*. 2000;255(2):278-90.
247. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, et al. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer letters*. 2004;212(2):233-9.
248. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug news & perspectives*. 2007;20(7):455-60.

249. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(6):4424-30.
250. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(2):1031-6.
251. Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Current biology : CB*. 2006;16(4):408-14.
252. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochemical Society transactions*. 1997;25(4):1194-8.
253. Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology*. 1994;4(1):5-12.
254. Birdsall B, Feeney J, Burdett ID, Bawumia S, Barboni EA, Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry*. 2001;40(15):4859-66.
255. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(46):36311-5.
256. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):575-81.
257. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(9):6852-7.
258. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(21):13047-52.
259. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):198-208.
260. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(13):6737-42.

261. Funasaka T, Balan V, Raz A, Wong RW. Nucleoporin Nup98 mediates galectin-3 nuclear-cytoplasmic trafficking. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;434(1):155-61.
262. 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. *European journal of biochemistry*. 1999;264(2):569-76.
263. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1673(1-2):75-93.
264. Laing JG, Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*. 1988;27(14):5329-34.
265. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(17):3595-602.
266. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21(52):8001-10.
267. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer research*. 2004;64(18):6363-7.
268. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(4):1213-7.
269. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer research*. 2005;65(9):3535-7.
270. 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 research*. 2005;65(16):7292-300.
271. Hsu DK, Yang RY, Liu FT. Galectins in apoptosis. *Methods in enzymology*. 2006;417:256-73.
272. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):507-15.
273. Sundblad V, Croci DO, Rabinovich GA. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. *Histology and histopathology*. 2011;26(2):247-65.

274. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(3):788-91.
275. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(10):3939-44.
276. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(4):1813-22.
277. Fernandez GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gomez SA, Beigier Bompadre M, et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology*. 2005;15(5):519-27.
278. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(4):2466-73.
279. Bhaumik P, St-Pierre G, Milot V, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 facilitates neutrophil recruitment as an innate immune response to a parasitic protozoa cutaneous infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;190(2):630-40.
280. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, et al. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *The American journal of pathology*. 2006;168(6):1910-20.
281. Sundqvist M, Welin A, Elmwall J, Osla V, Nilsson UJ, Leffler H, et al. Galectin-3 type-C self-association on neutrophil surfaces; The carbohydrate recognition domain regulates cell function. *Journal of leukocyte biology*. 2018;103(2):341-53.
282. Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Bjorstad A, Brown KL, Telemo E, et al. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology*. 2009;19(1):16-20.
283. Linden JR, Kunkel D, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cellular microbiology*. 2013;15(7):1127-42.
284. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:158-82.
285. Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Carvalho JV, Pajuaba AC, et al. Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. *Immunobiology*. 2010;215(6):475-85.

286. Nieminen J, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(5):1127-35.
287. Baseras B, Gaida MM, Kahle N, Schuppel AK, Kathrey D, Prior B, et al. Galectin-3 inhibits the chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Immunobiology*. 2012;217(1):83-90.
288. Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunology letters*. 1994;42(3):113-6.
289. 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. *The American journal of pathology*. 1995;147(4):1016-28.
290. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(3):731-8.
291. Danella Polli C, Alves Toledo K, Franco LH, Sammartino Mariano V, de Oliveira LL, Soares Bernardes E, et al. Monocyte Migration Driven by Galectin-3 Occurs through Distinct Mechanisms Involving Selective Interactions with the Extracellular Matrix. *ISRN inflammation*. 2013;2013:259256.
292. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(3):389-97.
293. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(4):2650-8.
294. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *Journal of dermatological science*. 2003;31(2):119-28.
295. Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RM, Krutzik SR, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(6):947-56.
296. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):1073-83.
297. Granovsky M, Fata J, Pawling J, Muller WJ, Khokha R, Dennis JW. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med*. 2000;6(3):306-12.

298. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
299. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumic J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820(7):804-18.
300. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733-9.
301. Muller S, Schaffer T, Flogerzi B, Fleetwood A, Weimann R, Schoepfer AM, et al. Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(7):588-97.
302. 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. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(4):555-64.
303. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological reviews*. 2009;230(1):160-71.
304. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunological reviews*. 2009;230(1):114-27.
305. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunologic research*. 2012;52(1-2):100-10.
306. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(1):493-502.
307. Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;161(1):385-9.
308. 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. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(1):10-21.
309. John CM, Jarvis GA, Swanson KV, Leffler H, Cooper MD, Huflejt ME, et al. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cellular microbiology*. 2002;4(10):649-62.

310. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2009;182(2):1167-73.
311. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clinical immunology* (Orlando, Fla). 2009;130(1):83-8.
312. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ). 2015;240(8):1019-28.
313. Gebhardt A, Ackermann W, Unver N, Elsasser HP. Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell and tissue research*. 2004;315(3):321-9.
314. Schaffert C, Pour PM, Chaney WG. Localization of galectin-3 in normal and diseased pancreatic tissue. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 1998;23(1):1-9.
315. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition. Science Taylor & Francis Group, 2007.
316. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature*. 2002; 420: 510.
317. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14(15):32.
318. Gritzmacher CA, Mehl VS, Liu FT. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 5' untranslated regions. *Biochemistry*. 1992;31(40):9533-8.
319. Samuel I, Yuan Z, Meyerholz DK, Twait E, Williard DE, Kempuraj D. A novel model of severe gallstone pancreatitis: murine pancreatic duct ligation results in systemic inflammation and substantial mortality. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2010;10(5):536-44.
320. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Warzecha AM, Pawlik WW, Dembinski M, et al. Dual, time-dependent deleterious and protective effect of anandamide on the course of cerulein-induced acute pancreatitis. Role of sensory nerves. *European journal of pharmacology*. 2008;591(1-3):284-92.
321. Markakis C, Tsaroucha A, Papalois AE, Lambropoulou M, Spartalis E, Tsigalou C, et al. The Role of Eugenol in the Prevention of Acute Pancreatitis-Induced Acute Kidney Injury:

Experimental Study. HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery. 2016;2016:3203147.

322. Boitard C, Debray-Sachs M, Pouplard A, Assan R, Hamburger J. Lymphocytes from diabetics suppress insulin release in vitro. Diabetologia. 1981;21(1):41-6.

323. Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, et al. A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. Molecular pharmacology. 2006;69(4):1288-95.

324. Ding SP, Li JC, Jin C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. World journal of gastroenterology. 2003;9(3):584-9.

325. Watanabe T, Kudo M, Strober W. Immunopathogenesis of pancreatitis. Mucosal immunology. 2017;10(2):283-98.

326. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. Critical reviews in oncology/hematology. 2012;82(3):296-309.

327. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2000;165(4):2156-64.

328. Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. Biochemistry. 1993;32(30):7644-9.

329. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, et al. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2000;80(8):1233-41.

330. Zhao W, Ajani JA, Sushovan G, Ochi N, Hwang R, Hafley M, et al. Galectin-3 Mediates Tumor Cell-Stroma Interactions by Activating Pancreatic Stellate Cells to Produce Cytokines via Integrin Signaling. Gastroenterology. 2018;154(5):1524-37.e6.

331. Song S, Ji B, Ramachandran V, Wang H, Hafley M, Logsdon C, et al. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. PloS one. 2012;7(8):e42699.

332. Shrivastava P, Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. World journal of gastroenterology. 2010;16(32):3995-4002.

333. Gea-Sorli S, Closa D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics. 2010;1(5):107-11.

334. Minkov GA, Halacheva KS, Yovtchev YP, Gulubova MV. Pathophysiological mechanisms of acute pancreatitis define inflammatory markers of clinical prognosis. *Pancreas*. 2015;44(5):713-7.
335. Dabrowski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. Jun kinases are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(10):5686-90.
336. Gallmeier E, Schafer C, Moubarak P, Tietz A, Plossl I, Huss R, et al. JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells. *Journal of cellular physiology*. 2005;203(1):209-16.
337. McKay C, Imrie CW, Baxter JN. Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1996;219:32-6.
338. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Annals of surgery*. 1992;216(2):117-34.
339. Kylanpaa L, Rakonczay Z, Jr., O'Reilly DA. The clinical course of acute pancreatitis and the inflammatory mediators that drive it. *International journal of inflammation*. 2012;2012:360685.
340. Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2001;8(3):187-94.
341. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology*. 1986;91(2):433-8.
342. Capurso G, Zerboni G, Signoretti M, Valente R, Stigliano S, Piciocchi M, et al. Role of the gut barrier in acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012;46 Suppl:S46-51.
343. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(6):1954-64.
344. 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-1beta in Macrophages. *Journal of Crohn's & colitis*. 2016;10(5):593-606.
345. Zhou MT, Chen CS, Chen BC, Zhang QY, Andersson R. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(17):2094-9.
346. Hyun JJ, Lee HS. Experimental models of pancreatitis. *Clinical endoscopy*. 2014;47(3):212-6.

347. Gorry MC, Gabbaizedeh D, Furey W, Gates LK, Jr., Preston RA, Aston CE, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1063-8.
348. Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1180-93.
349. Pan LL, Deng YY, Wang R, Wu C, Li J, Niu W, et al. Lactose Induces Phenotypic and Functional Changes of Neutrophils and Macrophages to Alleviate Acute Pancreatitis in Mice. *Frontiers in immunology*. 2018;9:751.
350. Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regner S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(5):975-82.
351. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in molecular medicine*. 2003;9(6):263-8.
352. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
353. Barreiro O, Sanchez-Madrid F. Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Revista espanola de cardiologia*. 2009;62(5):552-62.
354. Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 2001;96(1):56-67.
355. Gittens BR, Bodkin JV, Nourshargh S, Perretti M, Cooper D. Galectin-3: A Positive Regulator of Leukocyte Recruitment in the Inflamed Microcirculation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;198(11):4458-69.
356. Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *The American journal of pathology*. 2008;172(2):395-405.
357. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-94.
358. Van Gassen N, Van Overmeire E, Leuckx G, Heremans Y, De Groef S, Cai Y, et al. Macrophage dynamics are regulated by local macrophage proliferation and monocyte recruitment in injured pancreas. *European journal of immunology*. 2015;45(5):1482-93.
359. Bonjoch L, Gea-Sorli S, Closa D. Lipids generated during acute pancreatitis increase inflammatory status of macrophages by interfering with their M2 polarization. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al]*. 2015;15(4):352-9.

360. Yang J, Denham W, Tracey KJ, Wang H, Kramer AA, Salhab KF, et al. The physiologic consequences of macrophage pacification during severe acute pancreatitis. *Shock* (Augusta, Ga). 1998;10(3):169-75.
361. Ding JL, Li Y, Zhou XY, Wang L, Zhou B, Wang R, et al. Potential role of the TLR4/IRAK-4 signaling pathway in the pathophysiology of acute pancreatitis in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2009;58(11):783-90.
362. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *European journal of immunology*. 2015;45(2):531-43.
363. Pietruczuk M, Dabrowska MI, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Dabrowski A. Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(33):5344-51.
364. Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, et al. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(15):1845-53.
365. Wang W, Xiang HP, Wang HP, Zhu LX, Geng XP. CD4 + CD25 + CD127 high cells as a negative predictor of multiple organ failure in acute pancreatitis. *World journal of emergency surgery : WJES*. 2017;12:7.
366. Zheng YS, Wu ZS, Zhang LY, Ke L, Li WQ, Li N, et al. Nicotine ameliorates experimental severe acute pancreatitis via enhancing immunoregulation of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Pancreas*. 2015;44(3):500-6.
367. Takenaka MC, Quintana FJ. Tolerogenic dendritic cells. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(2):113-20.
368. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):479-89.
369. Eyerich K, Dimartino V, Cavani A. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *European journal of immunology*. 2017;47(4):607-14.
370. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
371. Jia R, Tang M, Qiu L, Sun R, Cheng L, Ma X, et al. Increased interleukin-23/17 axis and C-reactive protein are associated with severity of acute pancreatitis in patients. *Pancreas*. 2015;44(2):321-5.

372. Kvedaraite E, Lourda M, Idestrom M, Chen P, Olsson-Akefeldt S, Forkel M, et al. Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut*. 2016;65(10):1632-41.

БИОГРАФИЈА

Бојан Стојановић, рођен 01.01.1986. године у Призрену. Основну школу и Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршио је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уписао је школске 2004/2005. године, и дипломирао је 2010. године, са просечном оценом 9,81 (девет и 81/100) као најбољи студент у генерацији и тиме стекао звање доктор медицине. Након завршених студија, обавио је обавезан лекарски стаж и положио стручни испит за доктора медицине у мају 2011. године. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија уписао је школске 2010/2011.године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Усмени докторски испит је положио септембра 2012. године са оценом 10 (десет). Од новембра 2011. године до данас, ради као сарадник у настави на Катедри за хирургију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Фебруара 2014. године је изабран у звање истраживача сарадника за ужу научну област Хирургија. Од 01.08.2012. године ради као клинички лекар у Клиничком центру Крагујевац. У школској 2013/2014. години уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Факултета медицинских наука у Крагујевцу је уписао специјалистичке студије из области Опште хирургије. Дана 16.07.2018. је положио специјалистички испит из Опште хирургије са одличним успехом. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару. Учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија у оквиру макро и јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Био је учесник два јуниор пројекта у оквиру макропројекта Факултета медицинских наука у Крагујевцу ЈП 13-11 „Анализа цитокинског профила болесника са акутним панкреатитисом леченим у интензивној нези“ и ЈП 12-11 „Анализа цитокинског профила политрауматизованих болесника лечених у интензивној нези“

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Stojanovic B**, Jovanovic I, Stojanovic BS, Stojanovic MD, Gajovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells. *Eur J Immunol.* 2019;49(6):940-946. **M21**
2. Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, **Stojanovic B**, Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML, Milovanovic M. Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α - Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection. *Front Microbiol.* 2019;10:185. **M21**
3. Radosavljevic I, **Stojanovic B**, Spasic M, Jankovic S, Djordjevic N. CFTR IVS8 Polymorphism Variation Affects Severity of Acute Pancreatitis in Women. *J Gastrointest Surg.* 2019;23(5):975-981. **M21**
4. Milosevic B, Cvetkovic A, Ninkovic S, Markovic S, Mitrovic S, **Stojanovic B**, Radunovic A, Vulovic M, and Cvetkovic D. Mammaglobin expression in tissue as a predictor of breast carcinoma aggressiveness. *Vojnosanit Pregl* 2019. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP190129046M> **M23**
5. Pavlovic M, Milosevic B., Radovanovic D, Cvetkovic A, Trifunovic B, Canovic D, Mitrovic S, Jovanovic M, Spasic M, Vulovic M, **Stojanovic B**, Jeremic D and Jevdjić, J. Malignant fibrous histiocytoma of the right upper leg – A case report. *Vojnosanit Pregl* 2018; 75(3): 320–325. **M23**
6. **Stojanović B**, Spasic M, Radosavljevic I, Canovic D, Radovanovic D, Praznik I, Prodanovic N, Milojevic A, Jelic I, Babic Z, Artinovic V, Grubor I, Nikolic Lj, Vucicevic K, Miljkovic J, Divjak A, Stefanovic S, Jankovic S. Risk factors for development of acute necrotizing pancreatitis. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16(2): 121-127 **M52**
7. Radovanović D, Pavlović M, Čanović D, Lazić D, Cvetković A, Spasić M, **Stojanović B**, Milošević B. The Collis procedure and the acquired short esophagus. *Ser J Exp Clin Res* 2016 doi: 10.1515/SJECR-2016-0078 **M51**
8. Kostic I, Spasic M, **Stojanovic B**, Jurisevic M, Radovanovic D, Canovic D, Stefanovic S, Jankovic S. Early cytokine profile changes in interstitial and necrotic forms of acute pancreatitis. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16(1): 33-37 **M52**
9. Radosavljevic I, Milojevic A, Miljkovic J, Divjak A, Jelic I, Artinovic V, Spasic M, Stojanovic B, Canovic P, Jankovic S, Djordjevic N. Lack of PRSS1 and SPINK1 polymorphism in Serbian acute pancreatitis patients. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16(3): 201-206 **M52**

10. Canović D, Milošević B, Lazić D, Cvetković A, Spasić M, **Stojanović B**, Mitrović S, Pavlović M. Mobilizacija jednjaka u lečenju kratkog jednjaka. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018; 19(2):185-188. **M51**
11. Praznik I, Spasić M, Radosavljević I, Stojanović B, Čanović D, Radovanović D, Savović Z, Vojinović R, Babić Ž, Đonović N, Luković T, Lazarević P, Đorđević N, Kostić I, Jelić I, Petrović J, Stojanović S, Jurišević M, Grubor I, Nikolić L, Vučićević K, Artinović V, Milojević A, Kostić M, Stefanović S, Janković S. Analiza faktora udruženih sa smrtnim ishodom kod pacijenata sa teškim nekrotičnim akutnim pankreatitisom. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2016; 33(3):173-185. **M51**

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: Монографска публикација

ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: Докторска дисертација

ВР

Аутор: Бојан С. Стојановић

АУ

Ментор/коментор: проф др Миодраг Л. Лукић

МН

Наслов рада: Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса

НР

Језик публикације: српски/ћирилица
ЈП

Језик извода: српски/енглески
ЈИ

Земља публикавања: Република Србија
ЗП

Уже географско подручје: Централна Србија
УГП

Година: 2019.
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

Место и адреса: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија
МС

Физичи опис рада: 202 стране, 7 слика, 8 графикона, 25 фигура, 4 табела и 2 шеме
ФО

Научна област: Медицина

Научна дисциплина: Клиничка и експериментална хирургија
ДИ

Предметна одредница/ кључне речи ПО: Галектин 3, акутни панкреатитис, имунски одговор, TLR-4

УДК

Чува се: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
ЧУ

Важна напомена:**МН****Извод:****ИД**

Увод: Акутни панкреатитис се карактерише аутодигестијом панкреасних ћелија што је потом праћено акутном инфламацијом која доприноси развоју патолошких промена и смртном исходу. У експерименталним условима је показано да галектин 3 експримирају ацинусне ћелије и инфилтришући макрофаги, али је непозната улога овог лектина у развоју акутног панкреатитиса.

Материјал и методе: Акутни панкреатитис је узрокован подвезивањем билио-панкреатиног дуктуса или секвенцијалном и интраперитонеалном применом церулеина и липополисахарида код мишева дивљег соја и мишева са делецијом гена за галектин 3.

Резултати: Делеција галектина 3 је побољшала преживљавање мишева услед смањења тежине инфламације панкреаса што је праћено редукованим леукоцитним инфилтратом, нижим вредностима амилаза у серуму и активношћу трипсина у панкреасу, смањеном инфилтрацијом макрофага и неутрофила који експримирају TLR-4, а посебно про-инфламацијских неутрофила. Галектин 3 и TLR-4 су колокализирани на површини леукоцита у инфилтрату. Примена инхибитора TLR-4, CLI-095, побољшала је преживљавање оболелих мишева. Недостатак галектина 3 је праћен мањом продукцијом TNF- α и IL-1 β из макрофага и дендритских ћелија. Делеција гена за галектин 3 је праћена и мањом продукцијом IFN- γ из Т лимфоцита, НК и NKT ћелија, мања је активација IL-23/IL-17 осовине и повећана је инфилтрација регулаторних Т лимфоцита који продукују IL-10 у панкреасу изолованог из оболелих мишева.

Закључак: Делеција галектина 3 смањује тежину акутног панкреатитиса у два експериментална модела болести утицајем на инфлукс неутрофила и мононуклеарних ћелија урођене и стечене имуности. Ове ињенице указују да примена инхибитора галектина 3 може имати повољан ефекат на прогресију акутног панкреатитиса.

Кључне речи: Галектин 3, акутни панкреатитис, имунски одговор, TLR-4

Датум прихватања теме од стране ННВ: 07.09.2016.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник
2. **Проф. др Данило Војводић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
3. **Доц. др Александар Цветковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type: Monographic publication

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: Ph. D. Thesis

CC

Author: Bojan S. Stojanovic

AU

Menthor/co-mentor: Professor Miodrag L. Lukic

MN

Title: The role of galectin-3 in experimental acute pancreatitis

TI

Language of text: Serbian / Cyrillic

LT

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Central Serbia
LP

Publication year: 2019.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia
PP

Physical description : 202 pages, 7 images, 8 graphs, 25 figures, 4 tables and 2 schemes
PD

Scientific field: medicine

SF

Scientific discipline: Clinical and experimental surgery

SD

Subject/key words:

SKW

Introduction: Acute pancreatitis is characterized by autodigestion of pancreatic cells followed by acute inflammation leading to pathology and death. In experimental acute pancreatitis, pancreatic acinar cells and infiltrating macrophages express Galectin-3 but its role in pathology is unknown.

Material and methods: Acute pancreatitis was induced by ligation of bile-pancreatic duct or sequential peritoneal administration of cerulein and lipopolysaccharide to wild-type and Galectin-3 deficient C57BL/6 mice. We determined survival of mice, serum concentrations of amylase, pancreatic pathology, and phenotypic and molecular features of inflammatory cells. Therefore, we studied its role using Galectin-3 deficient mice.

Results: Deletion of Galectin-3 prolonged survival of mice contributed to attenuation of histopathology, reduced leukocytes infiltration, lowered serum amylase concentration and pancreatic trypsin activity, and decreased infiltration of macrophages and neutrophils that express TLR-4, in particular, pro-inflammatory N1 neutrophils. Galectin-3 and TLR-4 are also colocalized on infiltrating cells. Additionally, administration of CLI-095, the specific inhibitor of TLR-4, prolonged survival of diseased animals. Furthermore, lack of Galectin-3 reduced expression of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in F4/80⁺CD11c⁻ macrophages and CD11c⁺F4/80⁻ dendritic cells. Gal-3 deficiency decreased the total number of IFN- γ -producing CD3⁺CD49⁻ T cells, CD3⁻CD49⁺ NK cells, and CD3⁺CD49⁺ NKT cells; downregulated activation of IL-23/IL-17 axis and increased accumulation of IL-10-producing Foxp3⁺ T regulatory cells in pancreata of diseased animals.

Conclusion: Deletion of Galectin-3 ameliorates acute pancreatitis in the two experimental models by attenuating early influx of neutrophils and inflammatory mononuclear cells of innate and acquired immunity. These findings provide the basis to consider Galectin-3 as a therapeutic target in acute pancreatitis.

Keywords: Galectin-3, acute pancreatitis, immune response, TLR-4

UDC

Holding data:

Note:

N

Abstract:

AB

Accepted by the Scientific Board on: September 07th 2016.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

1. **Associate Professor, Ivan Jovanovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman
2. **Professor, Danilo Vojvodic**, M.D, Ph.D, Military Medical Academy , Belgrade , Serbia, member.
3. **Assistant Professor, Aleksandar Cvetkovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бојан Стојановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса

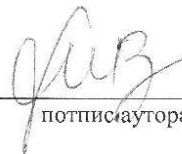
која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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, 2019. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бојан Стојановић,

- дозвољавам
 не дозвољавам

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

Улога галектина 3 у експерименталном моделу акутног панкреатитиса

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 дозвољавам¹

¹ 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 прерада²

У Крагујевцу _____, 2019. године,




потпис аутора

² 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 поменутих лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Short Communication

Deletion of Galectin-3 attenuates acute pancreatitis in mice by affecting activation of innate inflammatory cells

Bojan Stojanovic^{1,2}, Ivan Jovanovic¹, Bojana S. Stojanovic^{1,3},
Milica Dimitrijevic Stojanovic¹, Nevena Gajovic¹, Gordana Radosavljevic¹,
Jelena Pantic¹, Nebojsa Arsenijevic¹ and Miodrag L. Lukic¹ 

¹ Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

² Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Department of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Acute pancreatitis is characterized by autodigestion of pancreatic cells followed by acute inflammation leading to pathology and death. In experimental acute pancreatitis, pancreatic acinar cells and infiltrating macrophages express Galectin-3 but its role in pathology of this disease is unknown. Therefore, we studied its role using Galectin-3 deficient mice. Deletion of Galectin-3 prolonged the survival of mice, led to attenuation of histopathology, and decreased infiltration of mononuclear cells and neutrophils that express TLR-4, in particular, pro-inflammatory N1 neutrophils. Galectin-3 and TLR-4 are also colocalized on infiltrating cells. Lack of Galectin-3 reduced expression of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in F4/80⁺CD11c⁻ and CD11c⁺F4/80⁻ cells. Thus, deletion of Galectin-3 ameliorates acute pancreatitis by attenuating early influx of neutrophils and inflammatory mononuclear cells of innate immunity. These findings provide the basis to consider Galectin-3 as a therapeutic target in acute pancreatitis.

Keywords: acute pancreatitis · Galectin-3 · N1 neutrophils · TLR4

Introduction

Acute pancreatitis (AP) is an acute inflammation of pancreatic tissue initiated by intra-acinar activation of proteolytic enzymes in a cathepsin-B-dependent and calcium-dependent manner [1]. Activated proteolytic enzymes cause destruction of acinar cells and release of inflammatory cytokines [2]. Injured acinar cells also release intracellular content into the extracellular space that serves as damage-associated molecular patterns attracting inflammatory cells that can cause further damage of pancreas [2].

Galectin-3 (Gal-3) is a member of galectins family with a unique chimeric structure and plays important pro-inflammatory role in inflammatory and autoimmune diseases [3]. Under physiological conditions in mice, only duct epithelium cells of pancreas express Gal-3 [4]. After the induction of pancreatitis, acinar cells start to express Gal-3, and there is an increased expression of Gal-3 in infiltrating cells [4].

Here, we demonstrated that Gal-3 deficient mice survived longer after bile-pancreatic duct (BPD) ligation as a model of the severe and lethal form of AP. In addition, we showed that deletion of Gal-3 contributes to a significant attenuation of AP accompanied by decreased influx of neutrophils and mononuclear cells into the pancreas, and decreased accumulation of pro-inflammatory innate immune cells.

Correspondence: Prof. Miodrag L. Lukic
e-mail: miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs

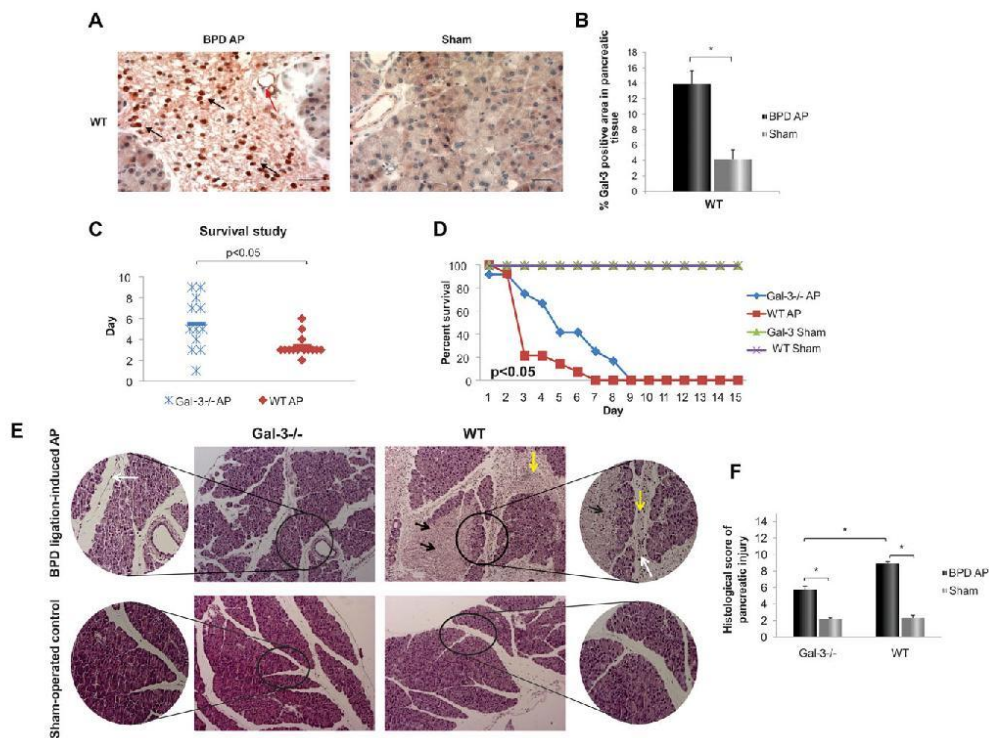


Figure 1. Target disruption of Gal-3 prolongs survival of mice with acute pancreatitis and suppresses disease induced by BPD ligation. (A) Immunohistochemical staining showing expression of Gal-3 in duct cells (red arrow) and infiltrating cells (black arrows) in the pancreas samples obtained from diseased (left panel) and control animals (right panel). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments with 10 mice per group in each experiment. (B) Percentage of expression of Gal-3 in pancreata of diseased and control mice. (C) Scatter plot of mortality in mice with BPD ligation-induced AP. (D) Kaplan–Meier curve presents survival rate in BPD ligation model of AP. Data shown are pooled from two independent experiments with seven mice per group per experiment. (E) Photomicrographs of representative H&E-stained mouse pancreas 72 h after BPD ligation model of AP. Massive pancreatic necrosis (black arrows), massive inflammatory cell infiltration (yellow arrows) and intralobular edema (white arrows) were observed in WT mice in comparison, to a lesser extent of pancreatic damage observed in Gal-3^{-/-} mice characterized only with intralobular and inter-acinar edema (white arrows). Photomicrographs of representative H&E-stained mouse pancreas from sham-operated controls that were without signs of pancreatic injury. Scale bar: 200 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (F) Total histological score of AP, * p < 0.05, Mann–Whitney U-test.

Taken together, our data demonstrate that Gal-3 plays an important pro-inflammatory role and may be a potential therapeutic target in pancreatitis.

Results and discussion

Galectin-3 deletion prolongs survival of mice with acute pancreatitis and attenuates tissue damage

We found intracytoplasmic and intranuclear increased expression of Gal-3 in the infiltrating leukocytes within 72 h after AP induction by BPD ligation, indicating its involvement in pathology

(Fig. 1A and B). This correlates with previous reported enhanced expression of Gal-3 in experimental pancreatitis [4].

In accordance with previous findings [5], we showed that “wild-type” (WT) mice with a lethal form of AP-induced by BPD ligation showed 100% mortality within 5 days, with a median mortality at day 3 (Fig. 1C). However, Galectin-3 deficient (Gal-3^{-/-}) mice with a lethal form of AP-induced by BPD ligation showed 100% mortality within 9 days, with median mortality at day 5 (Fig. 1C). Thus, Gal-3^{-/-} mice with AP survived significantly longer in comparison to WT mice with AP (Fig. 1C). Also, Kaplan–Meier curves revealed significant difference in survival rate between WT and Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 1D). As expected, both sham-operated controls had 100% survival at 15 days (Fig. 1D). It appears that longer survival of Gal-3^{-/-} mice is

related to milder inflammatory response as illustrated in Figure 1E and G. Specifically, 72 h after BPD ligation, histological analysis of H&E-stained pancreatic section revealed that WT mice with AP showed significantly more severe edema, leukocyte infiltration, and widespread areas of necrosis and vacuolization of pancreatic parenchyma that were not seen in Gal-3^{-/-} mice (Fig. 1E). Total acute pancreatitis histological score was markedly lower in Gal-3^{-/-} mice with AP compared with WT mice (Fig. 1F). Our results are in line with those of Pan et al. [6] who showed that treatment with lactose, an inhibitor of galectins, alleviated the severity of experimental AP.

Gal-3 deficiency decreases early influx of TLR-4+ innate inflammatory cells in AP

Seventy-two hours after BPD ligation, total number of infiltrating leukocytes in pancreatic tissue was significantly higher in WT mice with AP compared with Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 2A). After induction of AP, there was significant influx of neutrophils into the pancreas (Fig. 2B). The total number of these cells was significantly higher in pancreata of WT mice than Gal-3^{-/-} mice (Fig. 2B), although the difference in the percentage of neutrophils did not reach statistical significance (Fig. 2C). The percentage of F4/80⁺CD11c⁻ cells and total number of these cells were significantly higher in WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice (Fig. 2D and E). Immunohistochemical analysis confirmed increased infiltration of Ly-6G/Ly-6C⁺ cells (Fig. 2F) and F4/80⁺ cells (Fig. 2H), with significantly increased percentage of Ly-6G/Ly-6C⁺ cells (Fig. 2G) and F4/80⁺ cells (Fig. 2I) in pancreata of diseased WT mice compared to Gal-3 deficient mice. It is well known that Gal-3 promotes leukocyte recruitment and may act as an adhesion molecule when it is present in inflammatory exudates [7].

Also, Gal-3^{-/-} mice with AP exhibited significantly lower percentage (Fig. 2K) and total number of TLR-4-expressing neutrophils in comparison to WT mice (Fig. 2J). Similarly, level of TLR-4 expression was significantly decreased on individual neutrophils derived from diseased Gal-3^{-/-} mice in comparison to diseased WT mice (Fig. 2L). In line with these findings, we also performed immunofluorescent double staining with anti-TLR-4 and anti-F4/80 antibodies, as well as anti-Ly-6G/Ly-6C antibody. As expected, WT mice with AP had increased infiltration of Ly-6G/Ly-6C⁺ neutrophils that express TLR-4 (Fig. 2M) and F4/80⁺ cells that express TLR-4 (Fig. 2O). Quantitative immunofluorescence of the pancreatic tissue revealed significantly greater number of TLR-4-positive neutrophils (Fig. 2N) and TLR-4-positive F4/80 cells (Fig. 2P) in diseased WT animals compared to Gal-3^{-/-} animals. The analysis summarized in Figure 2Q shows colocalization of TLR-4 and Gal-3 on the same leukocytes in infiltrate. Consistent with these findings, it is shown that Gal-3 is ligand for TLR-4 in experimental neuroinflammation [8, 9]. Further, targeted deletion of TLR-4 gene ameliorates experimental AP by significantly reduced influx of neutrophil and tissue damage in severe AP [10].

Gal-3 deletion attenuates influx of N1 neutrophils and pro-inflammatory accessory cells

Neutrophils, key players in acute inflammation, play crucial role in a course of AP and infiltrate the pancreas within first hours after induction of experimental model of AP [11]. After the induction of AP, Gal-3^{-/-} mice had significantly lower number of neutrophils compared to WT mice (Fig. 2B). In tumor model, Fridlender et al. [12] described two types of neutrophils: N1 neutrophils and N2 neutrophils. N1 neutrophils secrete higher level of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , oxygen radicals, and are more potent in activating cytotoxic T lymphocytes. At the molecular level, N1 neutrophils express higher levels of FasL molecule. We found that the total number of FasL-expressing neutrophils was significantly higher in WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice (Fig. 3A). Furthermore, we found significantly higher expression of FasL per neutrophils isolated from pancreata of WT mice compared to Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 3C). Importantly, pancreata of WT mice had significantly higher percentage and total number of IL-1 β -producing neutrophils (Fig. 3D and E).

As shown previously (Fig. 2D), the total number of F4/80⁺CD11c⁻ cells was significantly lower in pancreata of Gal-3^{-/-} mice. Intracellular staining shown significantly lower the total number of these cells that produce TNF- α in Gal-3^{-/-} mice with AP (Fig. 3F). Also, the pancreata of Gal-3^{-/-} mice had lower total number of F4/80⁺CD11c⁻ cells that produce IL-1 β compared to WT mice with AP (Fig. 3H). Intracellular staining of CD11c⁺F4/80⁻ cells revealed that WT mice with AP had significantly increased total number of TNF- α -producing CD11c⁺F4/80⁻ cells (Fig. 3J). Furthermore, AP induction markedly decreased total number of IL-1 β -producing CD11c⁺F4/80⁻ cells in Gal-3^{-/-} mice in comparison to WT mice (Fig. 3L). Our results were also in accordance with those of Yip et al. [9] that have shown in the model of traumatic injury neutralizing anti-Gal-3 antibody decreased expression of IL-1 β and TNF- α .

Concluding remarks

In summing up, deletion of Gal-3 expressed in inflammatory cells ameliorates AP by attenuating inflammatory response after disease induction. This is evident by lower infiltration of innate immune cells. This is also supported by decreased production of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β .

Materials and methods

Animals

We used 6–8 weeks old Gal-3^{-/-} mice on C57BL/6 background and WT C57BL/6 mice in all experiments. Targeted deletion of Gal-3 gene was done in C57BL/6 embryonic stem cells by Hsu et al. as previously described [13]. Breeding pairs of Gal-3^{-/-}

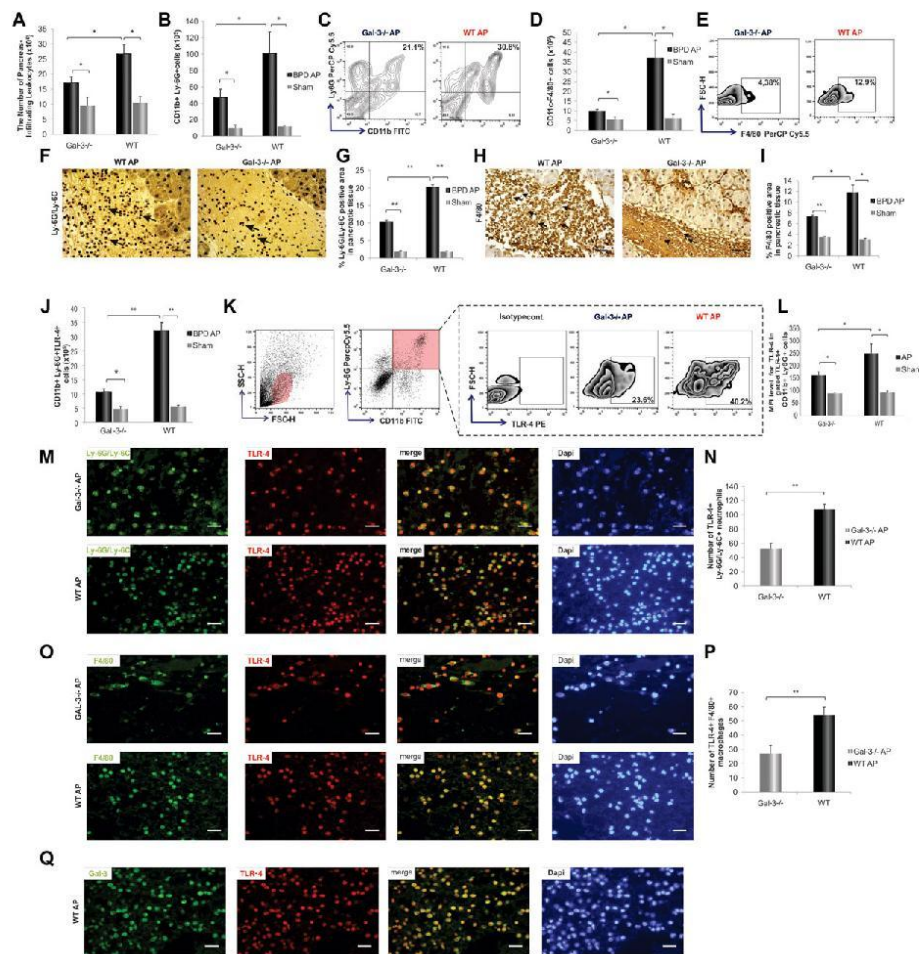


Figure 2. The number of infiltrating cells is lower in the pancreas of Gal-3^{-/-} mice with BPD ligation-induced acute pancreatitis. (A) The total number of pancreas-infiltrating leukocytes was determined by flow cytometry. The total number and representative flow cytometry plots illustrating percentages of neutrophils (B, C) and macrophages (D, E). The total number was calculated per pancreas. Data are shown as the mean \pm SEM of 12 mice per group per experiment and are pooled from two independent experiments. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. (F) The representative immunohistochemical image of infiltration of Ly-6G/Ly-6C⁺ neutrophils (black arrows). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (G) Immunohistochemical analyses of the amount of Ly-6G/Ly-6C⁺ positive areas were performed on pancreatic tissue sections. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. (H) Representative immunohistochemical image of infiltration of F4/80⁺ cells (black arrows). Scale bar: 100 μ m. Images are representative of two independent experiments (12 mice per group in each experiment). (I) Quantitative immunohistochemistry of the F4/80⁺ positive area in pancreata. * $p < 0.05$; Student's *t*-test. The total number and representative FACS plots illustrating percentages of TLR-4-expressing neutrophils (J and K). Data are shown as mean \pm SEM of 12 mice per group per experiment from two independent experiments, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, Student's *t*-test. (L) Quantification of mean fluorescence intensity (MFI) level for TLR-4 in gated CD11b⁺Ly6G⁺ cells. (M) Double immunofluorescent staining of Ly-6G/Ly-6C (green) and TLR-4 (red) together with DNA staining with DAPI (blue) in pancreata from representative Gal-3^{-/-} (top) and WT mice with AP (bottom). Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment). (N) Number of TLR-4⁺ neutrophils from pancreata 72 h after BPD ligation. Data are shown as the mean \pm SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; Student's *t*-test. (O) Immunofluorescent double staining using an anti-F4/80 antibody (red) and an anti-TLR-4 antibody (green) together with DNA staining with DAPI (blue) in pancreata from representative Gal-3^{-/-} (top) and WT mice with AP (bottom). Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment). (P) Number of TLR-4⁺ macrophages from pancreata of diseased animals 72 h after BPD ligation. Data are shown as the mean \pm SEM, ** $p < 0.001$; Student's *t*-test. (Q) Colocalization of Gal-3 and TLR-4 in infiltrating cell in pancreata 72h after induction of AP. Scale bar: 25 μ m. Images are representative of two independent experiments (10 mice per group in each experiment).

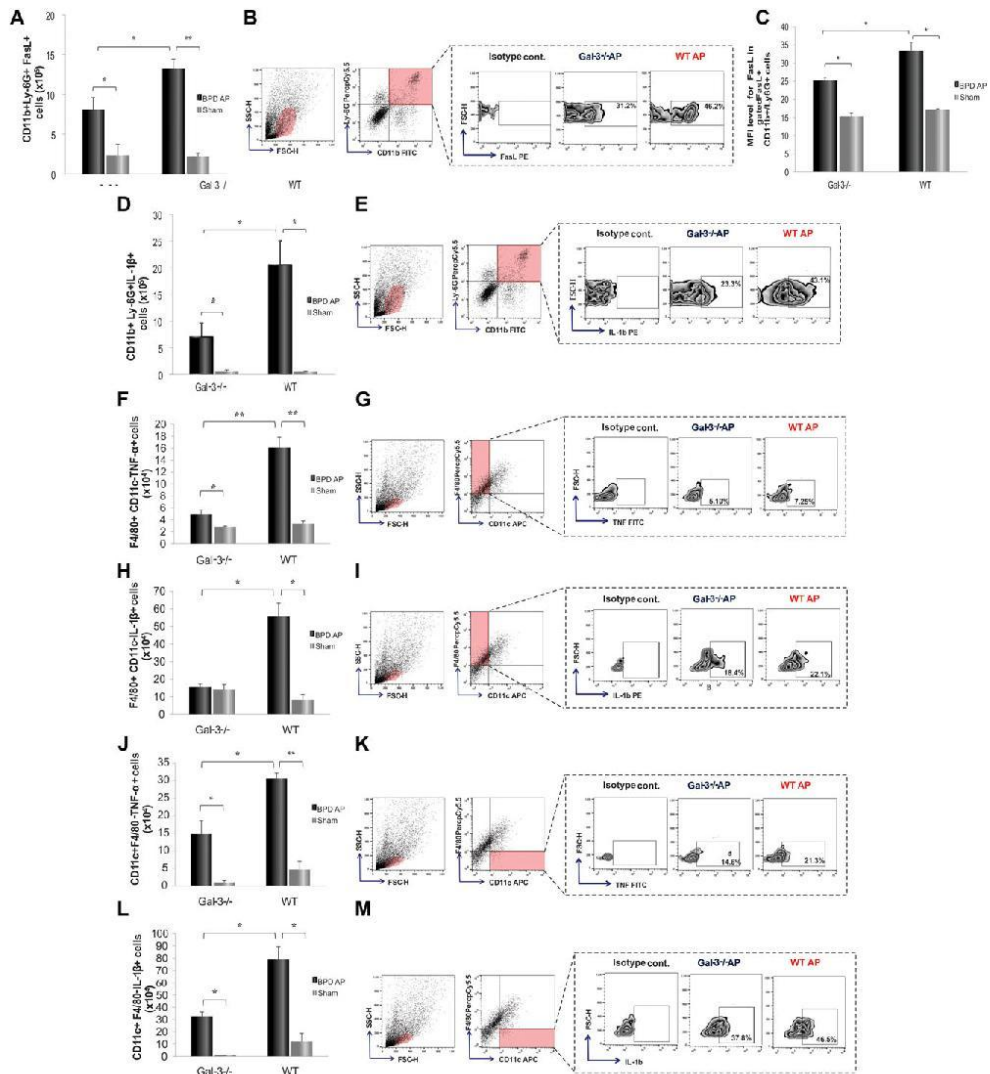


Figure 3. Galectin-3 deletion diminishes pro-inflammatory phenotypes of innate immune cells. The total number and representative flow cytometry plots displaying the frequency of FasL-expressing neutrophils (A, B). (C) Quantification of MFI level for FasL in gated CD11b⁺Ly6G⁺ cells. The total number and representative flow cytometry plots displaying the frequency of IL-1β-producing neutrophils (D, E), TNF-α-producing F4/80⁺CD11c⁺ cells (F, G), IL-1β-producing F4/80⁺CD11c⁺ cells (H, I), TNF-α-producing CD11c⁺F4/80⁺ cells (J, K), and IL-1β-producing CD11c⁺F4/80⁺ cells (L, M), derived from the pancreas. Data are shown as mean ± SEM of 12 mice per group per experiment and are pooled from two independent experiments, **p* < 0.05; ***p* < 0.001, two-tailed unpaired Student's *t*-test.

and WT C57BL/6 mice of the same substrain were housed in a temperature-regulated environment with 12-h light–dark cycle in conventional facilities of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All experiments were approved by the Ethics Board of Faculty of Medical Science and were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Induction of acute pancreatitis by BPD ligation

Acute pancreatitis was induced by BPD ligation to mimic severe gallstone-induced pancreatitis as described by Samuel et al. [5]. The groups in the experiment were: Gal-3^{-/-} mice with BPD ligation, WT mice with BPD ligation, Gal-3^{-/-} mice with sham operation, and WT mice with sham operation. For survival studies, we observed mice twice daily after BPD ligation. Mice were sacrificed by euthanasia when they showed signs of marked distress and suffering or on day 15 if without clinical signs of disease. For the determination of disease severity and analysis of infiltrating cells, mice were sacrificed 72 h after surgery.

Histopathological and cellular analysis of pancreas

Portions of pancreata from all animal groups were fixed in formalin and embedded in paraffin and 5 mm sections were stained with H&E. Sections were analyzed in a blindly fashion by two observers. The scoring system used as previously suggested.

Pancreatic leukocytes were isolated using collagenase digestion method, as previously described [14]. Flow cytometric analysis was performed as detailed in Cossarizza et al. [15]. The cells were labeled with the following monoclonal antibodies: anti-mouse CD11b, TNF- α , CTLA-4, and F4/80Abs conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ); anti-mouse FasL, and IL-1 β Abs conjugated with PE (BD Bioscience); anti-mouse Ly-6G, CD11c and F4/80 Abs conjugated with peridinin chlorophyll protein (PerCP, BD Biosciences); and anti-mouse and CD11b Abs conjugated with allophycocyanin (APC, BD Bioscience). For intracellular staining, the cells were activated as previously described [16]. Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACS Calibur and analyzed by using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Immunohistochemistry of mouse pancreatic samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse pancreatic tissue sections were incubated with rabbit anti-mouse F4/80 (ab100790, Abcam, Cambridge, UK) and Gal-3 (ab53082, Abcam), and rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (RB6-8C5, Novusbio, Littleton, CO, USA). Sections were visualized by rabbit-specific conjugate (ZytoChem Plus HRP Kit; Zytomed, Berlin, Germany), and rat-specific HRP-conjugated antibody (HAF005, R&D Systems, D Systems, Minneapolis, MN) and photomicrographed with a digital camera mounted on the light microscope (Olympus BX51). The

cells stained brown were considered as positive and results are expressed as percent positive staining in the pancreata calculated using Image J software.

Immunofluorescent staining was performed using rabbit anti-mouse F4/80 (1:800), Gal-3 (1:500) antibodies (Abcam), followed by incubation with goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with FITC (1:1000; Abcam), then using rat anti-mouse TLR-4 antibody (1:10; R&D Systems), followed by incubation with donkey anti-rat IgG antibody conjugated with PE (1:150, Abcam); and using rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C Antibody (1:500, Novus Biologicals, CO, USA), followed by incubation with donkey anti-rat antibody conjugated with biotin (1:500, Abcam) and goat anti-biotin antibody conjugated with FITC (1:100, Abcam). The sections were mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Images were obtained and analyzed using an immunofluorescence microscope (Olympus BX51). Only brightness and contrast were adjusted. Results are presented as a mean count of double-stained cells per field.

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm SEM. The normality of distribution was tested by Kolmogorov–Smirnov test. The two-tailed Student's *t*-test or nonparametric Mann–Whitney rank-sum test were used depending on the normality of distribution. The results were considered significantly different when $p < 0.05$. The data were analyzed using SPSS version 20, statistical package.

Acknowledgements: Funding for this work was provided by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175069, 175071 and 175103), Serbia and from the Faculty of medical sciences, Kragujevac (project JP 06/15), Serbia. The authors thank Professor Dr Irena Tanaskovic for assistance in histopathological assessment, and Aleksandar Ilic and Milena Jurisevic for excellent technical assistance.

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

- 1 Talukdar, R., Sareen, A., Zhu, H., Yuan, Z., Dixit, A., Cheema, H., George, J. et al., Release of Cathepsin B in Cytosol Causes Cell Death in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2016. 151: 747–758.e745.
- 2 Lankisch, P. G., Apte, M. and Banks, P. A. Acute pancreatitis. *Lancet* 2015. 386: 85–96.
- 3 Radosavljevic G.D., P. J., Jovanovic I., Lukic M.L. and Arsenijevic N. The two faces of galectin-3: roles in various pathological conditions. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 2016. 17: 187–198.

- 4 Gebhardt, A., Ackermann, W., Unver, N. and Elsasser, H. P. Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell Tissue Res* 2004. **315**: 321–329.
- 5 Samuel, I., Yuan, Z., Meyerholz, D. K., Twait, E., Williard, D. E. and Kempuraj, D. A novel model of severe gallstone pancreatitis: murine pancreatic duct ligation results in systemic inflammation and substantial mortality. *Pancreatology* 2010. **10**: 536–544.
- 6 Pan, L. L., Deng, Y. Y., Wang, R., Wu, C., Li, J., Niu, W., Yang, Q. et al., Lactose induces phenotypic and functional changes of neutrophils and macrophages to alleviate acute pancreatitis in mice. *Front. Immunol.* 2018. **9**: 751.
- 7 Gittens, B. R., Bodkin, J. V., Nourshargh, S., Perretti, M. and Cooper, D. Galectin-3: a positive regulator of leukocyte recruitment in the inflamed microcirculation. *J. Immunol.* 2017. **198**: 4458–4469.
- 8 Burguillos, M. A., Svensson, M., Schulte, T., Boza-Serrano, A., Garcia-Quintanilla, A., Kavanagh, E., Santiago, M. et al., Microglia-secreted Galectin-3 acts as a Toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell. Rep.* 2015. **10**: 1626–1638.
- 9 Yip, P. K., Carrillo-Jimenez, A., King, P., Vilalta, A., Nomura, K., Chau, C. C., Egerton, A. M. et al., Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Sci. Rep.* 2017. **7**: 41689.
- 10 Awla, D., Abdulla, A., Regner, S. and Thorlacius, H. TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate. *Inflamm. Res.* 2011. **60**: 1093–1098.
- 11 Merza, M., Hartman, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renstrom, E., Luo, L. et al., Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2015. **149**: 1920–1931.e1928.
- 12 Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S. et al., Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009. **16**: 183–194.
- 13 Hsu, D. K., Yang, R. Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D. R., Fung-Leung, W. P. et al., Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 2000. **156**: 1073–1083.
- 14 Xue, J., Nguyen, D. T. and Habtezion, A. Aryl hydrocarbon receptor regulates pancreatic IL-22 production and protects mice from acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2012. **143**: 1670–1680.
- 15 Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Akdis, M., Andra, I., Annunziato, F., Bacher, P. et al., Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur. J. Immunol.* 2017. **47**: 1584–1797.
- 16 Volarevic, V., Milovanovic, M., Ljujic, B., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Nilsson, U., Leffler, H. et al., Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012. **55**: 1954–1964.

Abbreviations: AP: acute pancreatitis · BPD: bile-pancreatic duct · FasL: Fas ligand · Gal-3: Galectin-3 · Gal-3^{-/-}: Galectin-3 deficient · MFI: Mean Fluorescence Intensity · WT: wild type

Full correspondence: Prof. Miodrag L. Lukic, MD, PhD; Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.201847890>

Received: 29/8/2018
Revised: 26/1/2019
Accepted: 18/3/2019
Accepted article online: 20/3/2019



Galectin-3 Deficiency Facilitates TNF- α -Dependent Hepatocyte Death and Liver Inflammation in MCMV Infection

Bojana Stojanovic^{1,2}, Jelena Milovanovic^{1,3}, Aleksandar Arsenijevic¹, Bojan Stojanovic⁴, Ivana Strazic Geljic⁵, Nebojsa Arsenijevic¹, Stipan Jonjic⁵, Miodrag L. Lukic¹ and Marija Milovanovic^{1*}

¹ Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ² Faculty of Medical Sciences, Institute of Pathophysiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ³ Faculty of Medical Sciences, Institute of Histology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ⁴ Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, ⁵ Department for Histology and Embryology, Center for Proteomics, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

OPEN ACCESS

Edited by:

Slobodan Paessler,
The University of Texas Medical
Branch at Galveston, United States

Reviewed by:

Takaaki Koma,
Tokushima University, Japan
Benedikt B. Kaufel,
Freie Universität Berlin, Germany
Isao Kosugi,
Hamamatsu University School
of Medicine, Japan

*Correspondence:

Marija Milovanovic
marjaposta@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 November 2018

Accepted: 23 January 2019

Published: 08 February 2019

Citation:

Stojanovic B, Milovanovic J,
Arsenijevic A, Stojanovic B,
Strazic Geljic I, Arsenijevic N, Jonjic S,
Lukic ML and Milovanovic M (2019)
Galectin-3 Deficiency Facilitates
TNF- α -Dependent Hepatocyte Death
and Liver Inflammation in MCMV
Infection. *Front. Microbiol.* 10:185.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00185

Galectin-3 (Gal-3) has a role in multiple inflammatory pathways. Various, opposite roles of Gal-3 in liver diseases have been described but there are no data about the role of Gal-3 in development of hepatitis induced with cytomegalovirus infection. In this study we aimed to clarify the role of Gal-3 in murine cytomegalovirus (MCMV)-induced hepatitis by using Gal-3-deficient (Gal-3 KO) mice. Here we provide the evidence that Gal-3 has the protective role in MCMV-induced hepatitis. Enhanced hepatitis manifested by more inflammatory and necrotic foci and serum level of ALT, enhanced apoptosis and necroptosis of hepatocytes and enhanced viral replication were detected in MCMV-infected Gal-3 deficient mice. NK cells does not contribute to more severe liver damage in MCMV-infected Gal-3 KO mice. Enhanced expression of TNF- α in the hepatocytes of Gal-3 KO mice after MCMV infection, abrogated hepatocyte death, and attenuated inflammation in the livers of Gal-3 KO mice after TNF- α blockade suggest that TNF- α plays the role in enhanced disease in Gal-3 deficient animals. Treatment with recombinant Gal-3 reduces inflammation and especially necrosis of hepatocytes in the livers of MCMV-infected Gal-3 KO mice. Our data highlight the protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis by attenuation of TNF- α -mediated death of hepatocytes.

Keywords: galectin-3, hepatitis, murine cytomegalovirus infection, TNF- α , hepatocyte death

INTRODUCTION

Infection with human cytomegalovirus (HCMV) is typically asymptomatic in immunocompetent individuals, but in individuals with immature or deficient immune system HCMV is a cause of morbidity and mortality (Mocarski et al., 2007). In immunocompromised hosts, especially in transplant recipients, HCMV induces severe hepatitis that elevates mortality (Bozza et al., 2007;

Mocarski et al., 2013). A better understanding of HCMV-induced liver damage could provide insights into potential novel therapeutic strategies for immunocompromised patients (Livingston-Rosanoff et al., 2012). Murine CMV (MCMV) causes a chronic infection with initial hepatic inflammation and damage and is the most widely used model to study the pathogenesis of human CMV disease (Livingston-Rosanoff et al., 2012; Brune, 2013). In C57BL/6 mice NK cells, recruited by inflammatory monocytes, play a crucial role in the early control of MCMV infection by both NK cell-mediated cytotoxicity and the production of effector cytokines (Smith et al., 2002; Scalzo and Yokoyama, 2008). Infection promotes liver inflammation by enhancing IL-1 β and TNF- α production. TNF- α plays a role in defense against MCMV infection by activation of antiviral activities of T and NK cells (Orange and Biron, 1996), but is also critical in MCMV-induced liver damage in normal or immunodeficient hosts (Orange et al., 1997). TNF- α -mediated signaling is required for the development of early necrotic foci in the livers of MCMV-infected C57BL/6J Rag-/- mice and the NK- and T- cell-deficient E26 mice, indicating that the main source of TNF- α are non-immune liver cells.

Galectins play an important role in the regulation of major cellular functions such as cell attachment, spreading, migration, proliferation (Elola et al., 2007). Gal-3 also regulates cell signaling and apoptosis (Markowska et al., 2011), and plays different roles in the pathogenesis of many inflammatory, infectious and malignant diseases (Radosavljevic et al., 2011; Volarevic et al., 2012; Arsenijevic et al., 2016; Simovic Markovic et al., 2016). An increased expression of Gal-3 was observed in human T lymphotropic virus-1 infection (Hsu et al., 1996), as well as in Junin virus-induced central nervous system lesions, but its role in the pathogenesis of viral disease is not revealed (Jaquenod De Giusti et al., 2011).

We have previously shown that deletion of galectin-3 gene, *Lgals3*, prevents ConA-induced hepatitis and that Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT cell induced liver injury (Volarevic et al., 2012, 2015). Further, *Lgals3* ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and IL-33 dependant fibrosis in mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Jeftic et al., 2015), and enhances bile duct damage and liver fibrosis in xenobiotic induced primary biliary cholangitis (PBC) (Arsenijevic et al., 2016). Also Gal-3 overexpression was found in hepatocellular carcinoma (Hsu et al., 1999). The role of Gal-3 in viral hepatitis is not understood.

In order to explore possible role of Gal-3 in the development of MCMV-induced hepatitis we used Gal-3 deficient mice on C57BL/6 background and two strains of MCMV. Our results provide the first evidence that *Lgals3* deletion promotes MCMV-induced liver inflammation and enhances MCMV-induced hepatitis by facilitation of TNF- α -dependent hepatocyte death. This effect appears to be independent of NK cells. Moreover, TNF- α blockade before MCMV infection attenuates apoptosis of hepatocytes. Treatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with recombinant Gal-3 reduces liver necrosis and inflammation. Thus, our data show that Gal-3 plays an important role in MCMV-induced liver damage and therefore may be

a potential target for therapeutic intervention in acute CMV-induced liver disease.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Gal-3-deficient mice on the C57BL/6 background (Gal-3 KO) and wild-type (WT) C57BL/6 mice (6–8 weeks of age) were used in the experiments. Breeding pairs of WT and Gal-3 KO mice were obtained from the University of California, Davis, United States (Davis, CA, United States; by courtesy of D.K. Hsu and F.T. Liu). All animal procedures were approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and conducted in accordance with the National Institutes of Health guidelines for humane treatment of laboratory animals. Unless otherwise stated each experimental group in each experiment contained six animals.

Viruses

The bacterial artificial chromosome (BAC)-derived MCMV strain MW97.01 has previously been shown to be biologically equivalent to MCMV strain Smith (VR-1399) and is hereafter referred as WT MCMV (Wagner et al., 1999). Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1×10^5 PFU of MCMV strain MW97.01 in a volume of 200 μ L of diluent (PBS). Mice were also infected with MW97.01, the mutant virus lacking m157 gene (Δ m157 MCMV) intravenously (i.v.) with 2×10^5 PFU in a volume of 100 μ L of diluent (PBS).

Serum Levels of Transaminases

Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured 36 and 72 h after MCMV infection by standard photometric method using the automated biochemistry analyzer Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Germany) and Olympus AU reagents, according to the manufacturer's instructions, expressed in U/L.

Histological Analyses

The isolated livers were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and consecutive 4 μ m tissue sections were cut at various depths and mounted on slides. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and every fourth (six slides) was evaluated for inflammation and necrosis in the liver. Section examined under low-power light microscopy (BX51; Olympus) equipped with digital camera. Scores of cumulative liver pathology for inflammation and necrosis were presented using the following scoring system: 0, normal (no pathology); 1, mild (1–3 abnormal areas); 2, moderate (3–5 abnormal areas); 3, severe (>5 abnormal areas). To determine the number of inflammatory infiltrates, whole liver tissue was sectioned at three non-subsequent depths and ten different fields were counted/section. Histological samples were blinded prior to evaluation.

Immunohistochemical Detection of Galectin-3 and TNF- α

Formalin-fixed, paraffin-embedded mouse liver tissue sections were incubated with rabbit anti-TNF- α (ab66579, Abcam), rabbit anti-caspase-3, active/cleaved (NB100-56113, Novus Biologicals), anti-caspase 3 and rabbit anti-Gal-3 (ab53082, Abcam). Sections were visualized by rabbit-specific conjugate (Expose Mouse and RabbitSpecific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam) and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope (BX51; Olympus). Virus-infected cells were visualized by anti-IE1 staining (MCMV protein expressed with early kinetics).

Detection of Cell Death by TUNEL Staining

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nickend labeling) staining was performed to assess death hepatocytes in livers sections. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were stained with *in situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche) following the instructions of manufacturer. DAB (3,3'-diaminobenzidine) as peroxidase substrate, was used to yield the characteristic brown color for nuclei. Slides were counterstained with hematoxylin solution and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope. The TUNEL-positive nuclei (brown) were quantified under $\times 400$ magnification in five randomly fields and the data were summarized as the mean number of positive cells.

Isolation of Hepatic Mononuclear Cells and Flow Cytometry

The isolation of liver-infiltrating inflammatory mononuclear cells was conducted as previously described (Volarevic et al., 2012). The isolated liver-infiltrating mononuclear cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies, including CD3, CD49b, CD8, NKG2D, CD69, perforin, granzyme B, NF- κ B, IFN- γ , IL-10, IL-17, and TNF- α . Isotype Abs with matching conjugates were used as negative controls. For intracellular staining, cells were activated with PMA/ionomycin and processed as previously described (Milovanovic et al., 2012). Cells were analyzed with the FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences), and analysis was conducted with FlowJo (Tree Star).

Infliximab Treatment

In order to inhibit production of TNF- α , mice were injected with chimeric monoclonal antibody, Infliximab (Remicade, JANSSEN BIOLOGICS B.V.), 5 mg/kg in 200 μ L of saline intraperitoneally 1 h before MCMV infection. Mice were sacrificed 48 h after infection.

Treatment With Recombinant Galectin-3

WT and galectin-3 KO mice were treated with recombinant Galectin-3, 5 μ g per mouse (Peprotech, Rocky Hill, NJ, United States) intraperitoneally, 2 h

before MCMV infection. Mice were sacrificed 36 h after MCMV infection.

Isolation of Hepatocytes and Flow Cytometry

Hepatocytes were isolated as previously described (Li et al., 2010). Briefly, extirpated livers were transferred HBSS, cut into 1 mm³ size pieces and washed in complete DMEM. Dissected tissue was centrifuged at 800 \times G for 4 min, pellet resuspended in digestion medium (0.6% NaCl, 0.05% KCl, 1.2% HEPES, 0.07% CaCl₂, 3 g/mL collagenase type I) and incubated for 20 min at 37°C. After incubation cells centrifuged at 800 \times G for 4 min, pellet was washed twice in a complete DMEM, passed through the 100 μ m filter and cells centrifuged at 600 \times G for 4 min. Pellet that contains hepatocytes was resuspended in DMEM medium with FBS. Isolated hepatocytes were washed in cold PBS and resuspended in 1X binding buffer (10X binding buffer: 0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) at concentration 1 \times 10⁶/mL. Annexin FITC and propidium iodide (PI) were added to the 100 μ L of cell suspension and incubated for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. After incubation 400 μ L of 1X binding buffer was added to each tube and stained cells were analyzed within 1h using FACSCalibur (BD, San Jose, United States) and FlowJo software (Tri Star). For detection of cell surface expression of calreticulin, isolated hepatocytes were stained with anti-calreticulin antibody (Abcam) and analyzed by FACSCalibur (BD, San Jose, United States) and FlowJo software (Tri Star).

Measurement of TNF- α and HMGB1

Levels of TNF- α and HMGB1 in the liver homogenate were measured using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States for TNF- α and Elabscience for HMGB1) according to the manufacturer's instructions.

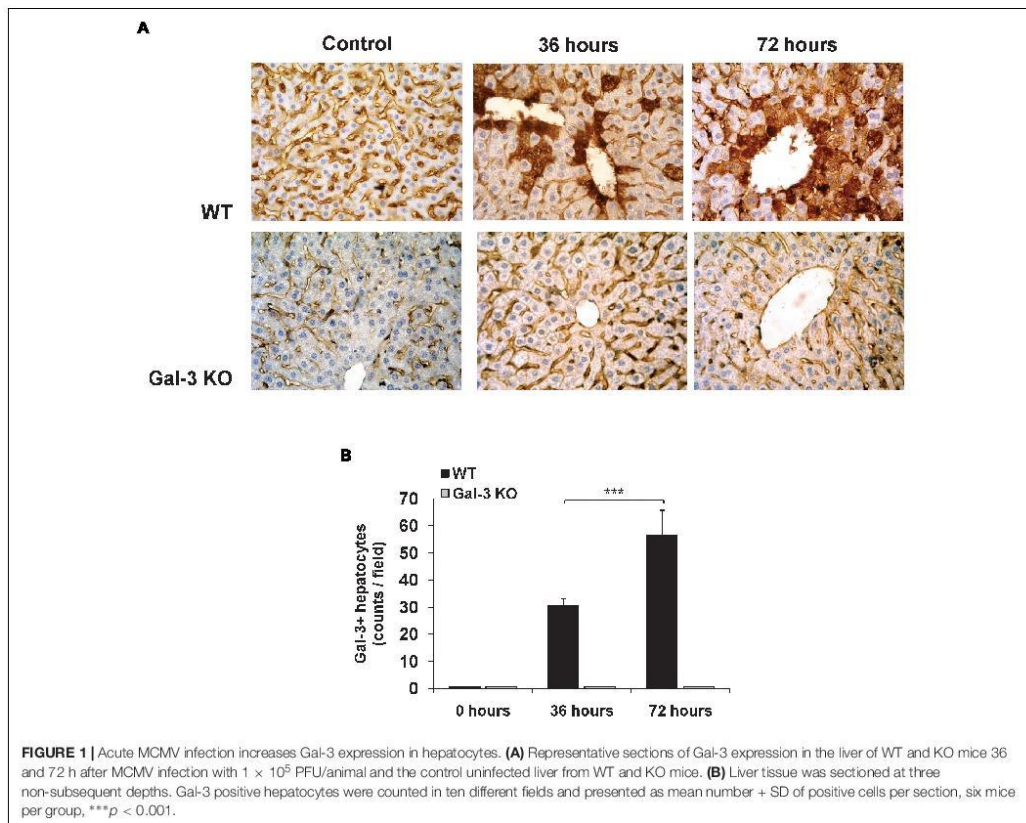
Statistical Analysis

All statistics were carried out using SPSS 18.0 for Windows software. Results were analyzed using the Student's *t*-test or Mann-Whitney test and ANOVA or Kruskal-Wallis. Data in this study were expressed as the mean + SE or +SD. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

RESULTS

MCMV Infection Increases the Expression of Galectin-3 in Hepatocytes

Previously, we have shown very weak expression of Gal-3 in the liver parenchyma and biliary epithelial cells in healthy C57BL/6 mice (Arsenijevic et al., 2016). Also we found strongly enhanced expression of Gal-3 in patients with virus induced hepatitis (Volarevic et al., 2015). To explore the effect of MCMV infection on Gal-3 expression in mouse livers, immunostaining of Gal-3 in the livers of WT and Gal-3 KO mice was done 36 and 72 h after MCMV infection. Time-dependent increase of Gal-3 expression in hepatocytes after MCMV infection was noticed



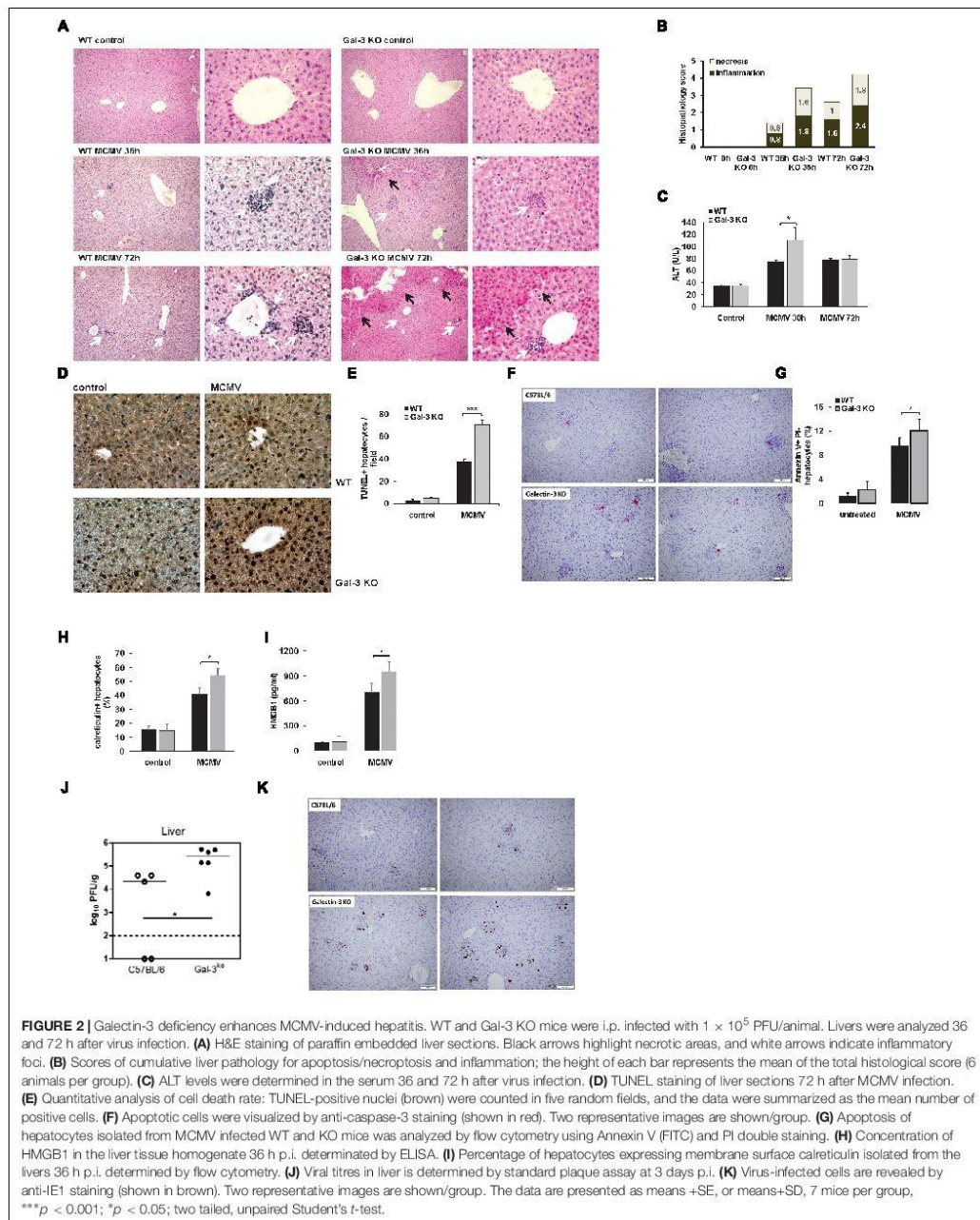
in the livers of WT mice (Figure 1A). Significantly higher number of Gal-3 expressing hepatocytes per field was noticed 72 h after infection when compared with liver sections obtained 36 h after MCMV infection (Figure 1B). As a control, Gal-3 was not detected in the livers of untreated and KO infected mice (Figure 1A).

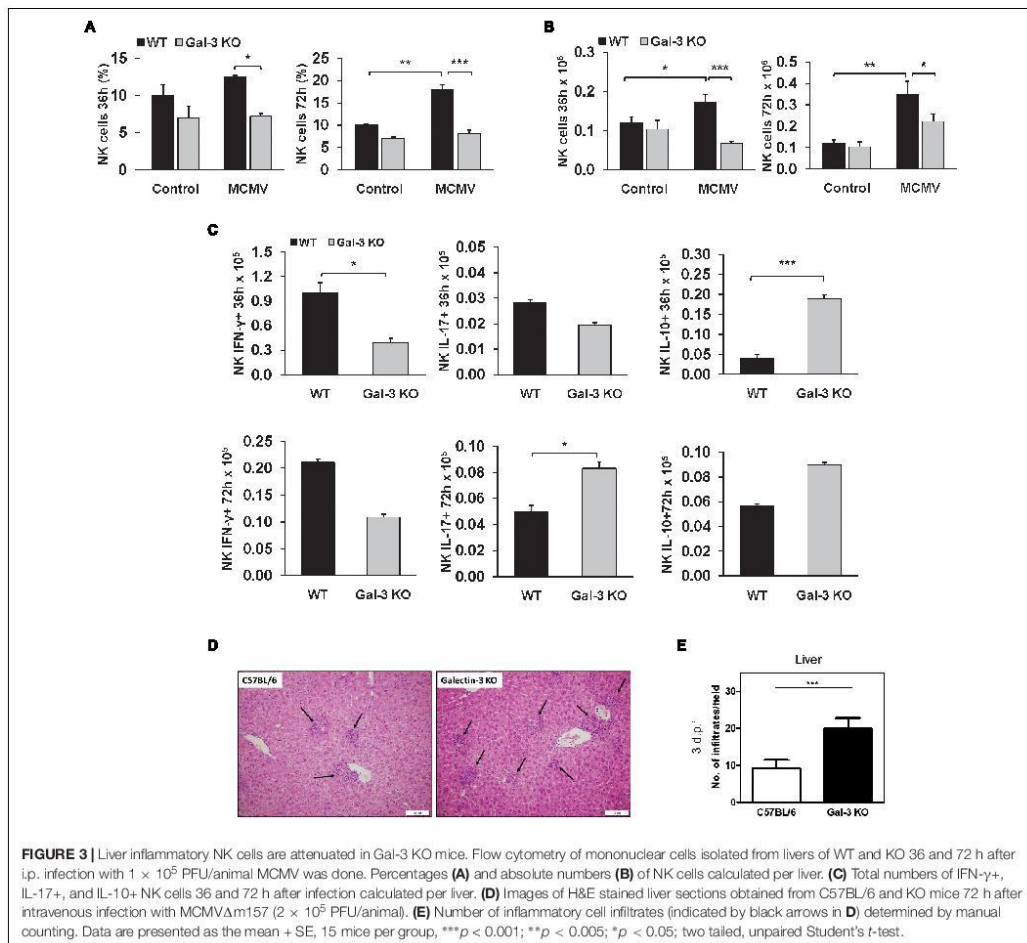
The Absence of Gal-3 Enhances Virus Induced Hepatitis and MCMV Titers in the Liver

In light of increased Gal-3 expression in hepatocytes of MCMV-infected mice, we wanted to explore the role of Gal-3 in overall severity of MCMV-induced hepatitis. For this, histological and serological parameters of liver damage were analyzed in WT and Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after MCMV infection. Histological parameters related to MCMV-induced hepatitis, liver inflammation and necrosis were more pronounced in Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after infection (Figures 2A,B). No difference in the architecture of liver tissue was noticed

between WT and Gal-3 KO uninfected mice (Figure 2A). Bigger necrotic areas and inflammatory foci were observed in the livers of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice, 36 h after infection (Figures 2A,B). Similar differences between Gal-3 KO and WT mice in the size of necrotic areas were observed 72 h after infection also (Figures 2A,B). At this time point, there was no difference in the size of inflammatory foci between the two groups (Figure 2A), but Gal-3 KO mice had higher number of smaller inflammatory foci compared with WT mice (Figure 2A). Although HCMV infection in immunocompetent hosts is subclinical, it is often accompanied with elevated serum levels of transaminases. Thus, we examined the level of alanine transaminase (ALT) in the sera of infected mice. In line with histological findings, we observed significantly higher level of ALT in the sera of Gal-3 KO mice 36 h after MCMV infection, compared to WT mice (Figure 2C).

In order to further analyze the liver damage in WT and KO mice after MCMV infection we used TUNEL assay. As shown in Figures 2D,E, 72 h after MCMV infection, the livers of Gal-3 KO mice contains significantly higher number of TUNEL

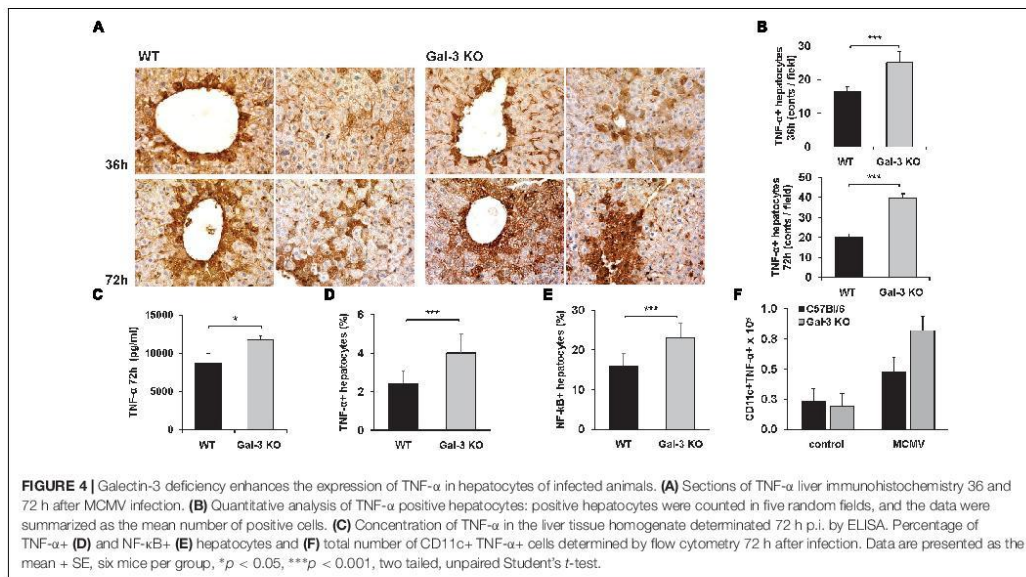




positive (brown nuclei) hepatocytes than the livers of WT mice. Moreover, higher number of apoptotic (caspase 3 positive) cells per one inflammatory infiltrate was detected in Gal-3 KO compared to the WT livers (Figure 2F, red dots). To confirm the increased apoptosis of hepatocytes in Gal-3 KO mice, we isolated hepatocytes from WT and Gal-3 KO mice 72 h after MCMV infection and measured the percentage of apoptotic cells by flow cytometry. In line with histological observations, we detected significantly higher percentage of apoptotic (Annexin V positive) hepatocytes isolated from infected Gal-3 KO mice, compared with those from WT mice (Figure 2G). Given the marked necrotic fields in the liver sections from Gal-3 KO mice (Figures 2A,B) and the ability of MCMV to induce necroptosis (Upton et al., 2017), we examined markers of necroptotic death,

HMGB1 in liver tissue homogenates and membrane expression of calreticulin on hepatocytes, 36 h after infection. We have found significantly higher concentration of HMGB1 in the liver homogenates (Figure 2H) and higher percentage of hepatocytes expressing calreticulin on membrane surface (Figure 2I) in Gal-3 KO mice in comparison with infected WT mice.

In the livers of Gal-3 KO mice, there is a significant increase in viral titers compared to the livers of wild-type mice (Figure 2J). There was no significant difference in viral titers in lung and spleen between WT and Gal-3 KO mice, 72 h after infection (Supplementary Figure S1A). At 8 days post-infection (Supplementary Figure S1B), viral plaques in spleen were not detected with the exception of a very low titer in one Gal-3 KO animal. In lungs, liver and salivary gland, viral plaques were



readily detected but no significant differences were observed between the two groups. Lastly, to demonstrate the presence of virus-infected cells, sections of liver were stained with an antibody against IE1, a MCMV protein expressed with early kinetics. As shown in **Figure 2K**, in the liver tissue of Gal-3 KO mice, higher number of infected cells was observed compared to the WT animals.

Together, previous data indicate protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis, possibly relating to its increased expression in hepatocytes and known role of Gal-3 in attenuation of cell death (Takenaka et al., 2004).

Enhanced Disease in Gal-3 KO Mice Is Independent of NK Cell Activation

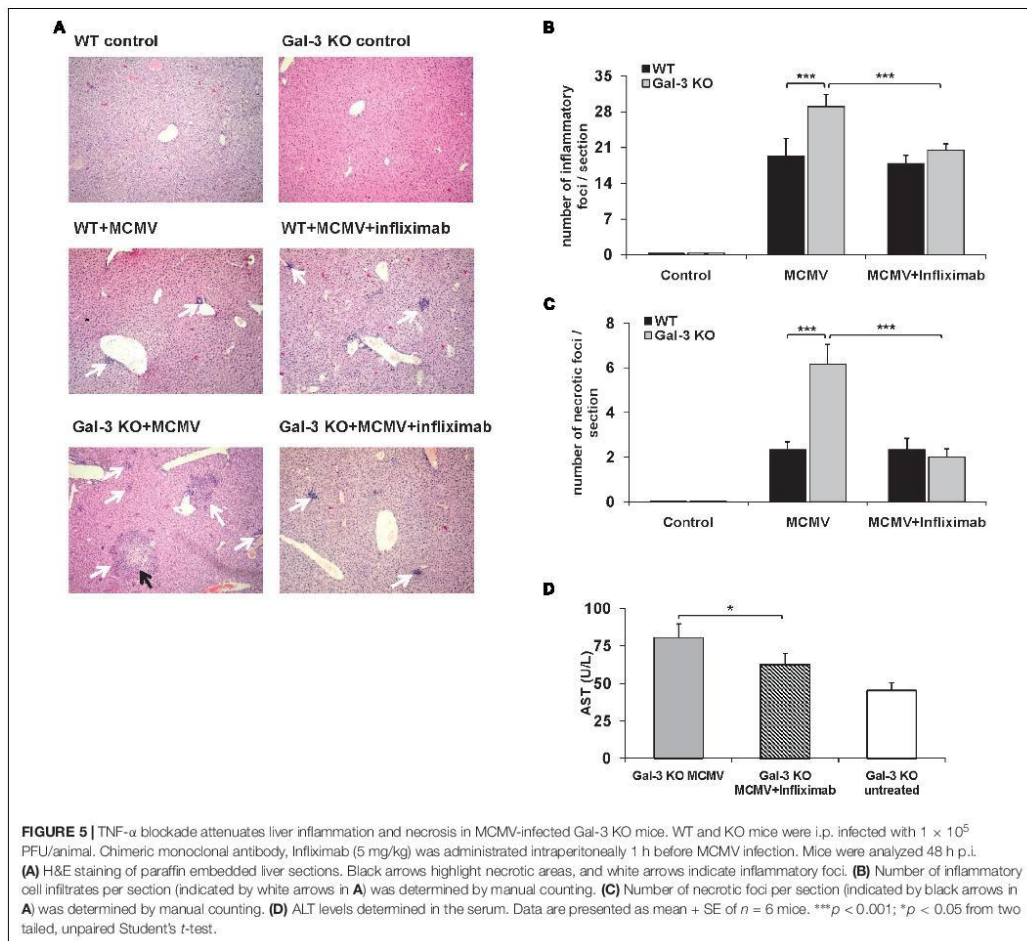
Taking into account the facts that NK cells play a crucial role in the early immune response against MCMV in C57BL/6 mice (Scalzo and Yokoyama, 2008) and that NK cells contribute to liver damage in viral infections (Zheng et al., 2015), we explored the possibility that bigger liver damage in infected Gal-3 KO mice is a consequence of stronger NK cell activity. We analyzed the presence and the phenotype of NK cells in liver mononuclear infiltrates in WT and Gal-3 KO mice, 36 and 72 h after MCMV infection. There was no statistically significant increase in the percentage and total number of NK cells in the livers of infected Gal-3 KO mice in comparison with uninfected Gal-3 KO mice (**Figures 3A,B**). On the other hand, MCMV infection induced a significant increase in both total number and percentage of NK cells in the livers of WT mice (**Figures 3A,B**). Total number of IFN- γ expressing NK cells 36 h after MCMV infection was significantly higher in the livers of WT mice in

comparison with Gal-3KO mice, while 72 h after infection this difference lost significance (**Figure 3C**). No significant difference in the percentage and total number of NK cells expressing IL-17 was noticed between the groups. Lastly, total number of IL-10 positive NK cells was significantly higher in the liver of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice, 36 h after infection (**Figure 3C**).

In order to exclude the role of NK cells in the higher liver damage in Gal-3 KO mice after infection with Δ m157 MCMV, the mutant virus lacking m157 gene, which does not stimulate NK cells. As observed for WT MCMV, the inflammatory cell infiltrates were readily observed in the liver tissue of both wild-type and Gal-3 KO infected mice (**Figure 3D**, black arrows). No difference in the size of infiltrates was observed between the two groups but, interestingly, the number of infiltrates was significantly higher in Gal-3 KO mice compared to the wild-type mice (**Figure 3E**). Thus, enhanced liver damage in MCMV-infected Gal-3 KO mice does not appear to relate to NK cell activity.

The Expression of TNF- α in Hepatocytes Is Increased in MCMV-Infected Gal-3 KO Mice

Based on our finding of enhanced necroptosis in Gal-3 KO mice and the fact that TNF- α signaling triggers necroptosis (Vandenabeele et al., 2010) and is required for MCMV-induced liver damage (Orange et al., 1997), TNF- α detection in the livers of MCMV-infected mice was done. The expression of TNF- α in hepatocytes was detected by immunostaining the livers of MCMV-infected mice both, WT and Gal-3 KO (**Figure 4A**).

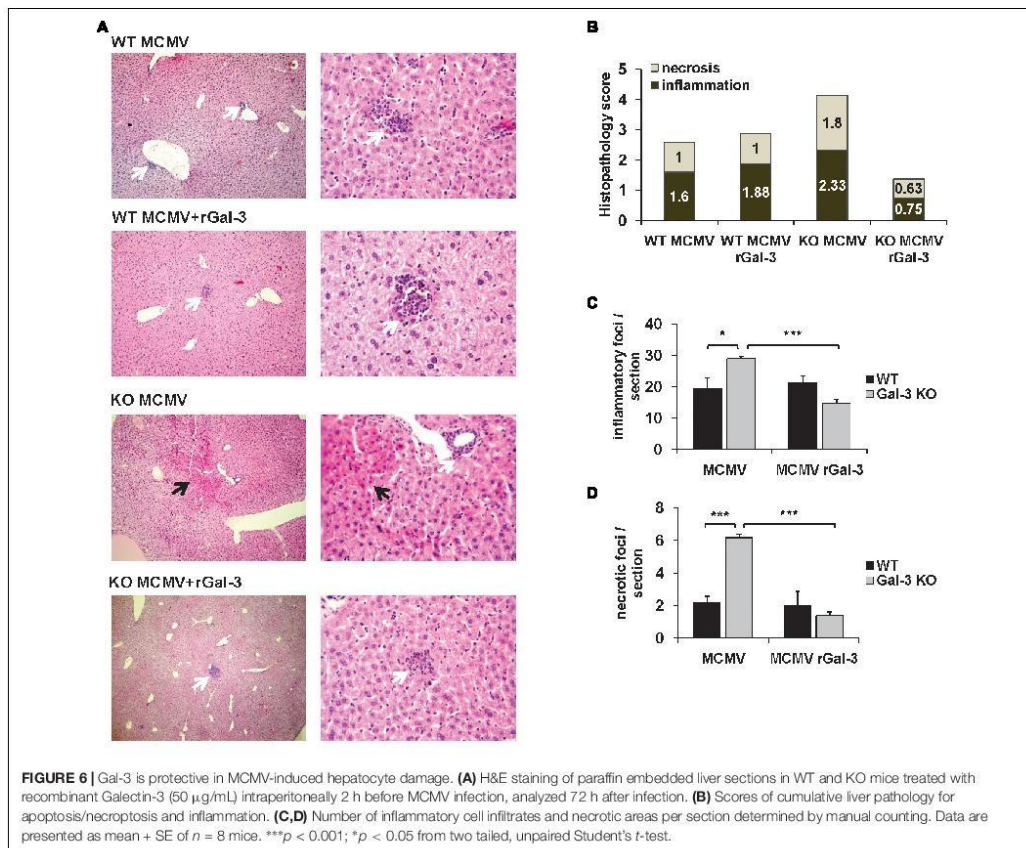


The number of TNF- α positive hepatocytes was significantly higher in the livers of Gal-3 KO mice compared to the group of infected WT mice, 36 and 72 h after infection (Figure 4B). Also, the concentration of TNF- α in the liver tissue homogenate was significantly higher in the group of Gal-3 KO mice compared to the group of WT mice, 72 h after MCMV infection (Figure 4C). Further, significantly higher percentage of TNF- α + hepatocytes (Figure 4D), and total number of TNF- α + CD11c+ cells (Figure 4E), analyzed by flow cytometry 72 h after MCMV infection, were found in the group of Gal-3 KO mice in comparison with WT mice. In accordance with the role of NF- κ B in the promotion of TNF- α expression and its role in TNF- α mediated actions, significantly higher percentage of NF- κ B+ hepatocytes was found in the group of Gal-3 KO mice in comparison to WT mice, 72 h after infection (Figure 4F). These

results suggest that higher TNF- α expression in hepatocytes and immune cells could be the cause of enhanced MCMV-induced hepatocyte death observed in Gal-3 KO mice.

Inhibition of TNF- α Binding Alleviates MCMV-Induced Hepatitis

In order to further explore the possibility that TNF- α plays a role in enhanced MCMV-induced liver damage in Gal-3 deficient animals, pharmacological inhibition of TNF- α with infiximab was done before infection. In the control group of WT mice, TNF- α blockade before MCMV infection did not alter liver inflammation or necrosis, while a pre-treatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with infiximab significantly decreased liver inflammation and necrosis (Figures 5A–C). Liver



of untreated MCMV-infected Gal-3 KO mice contained bigger inflammatory and necrotic foci in comparison to the liver of infliximab-pretreated mice (Figure 5A). Also, the TNF- α blockade before MCMV infection significantly decreased serum levels of ALT in Gal-3 KO mice (Figure 5D). Ameliorated MCMV-induced hepatitis in Gal-3 KO mice treated with infliximab supports the role of TNF- α in enhanced disease in Gal-3 deficient animals.

Exogenous Gal-3 Alleviates MCMV-Induced Liver Damage

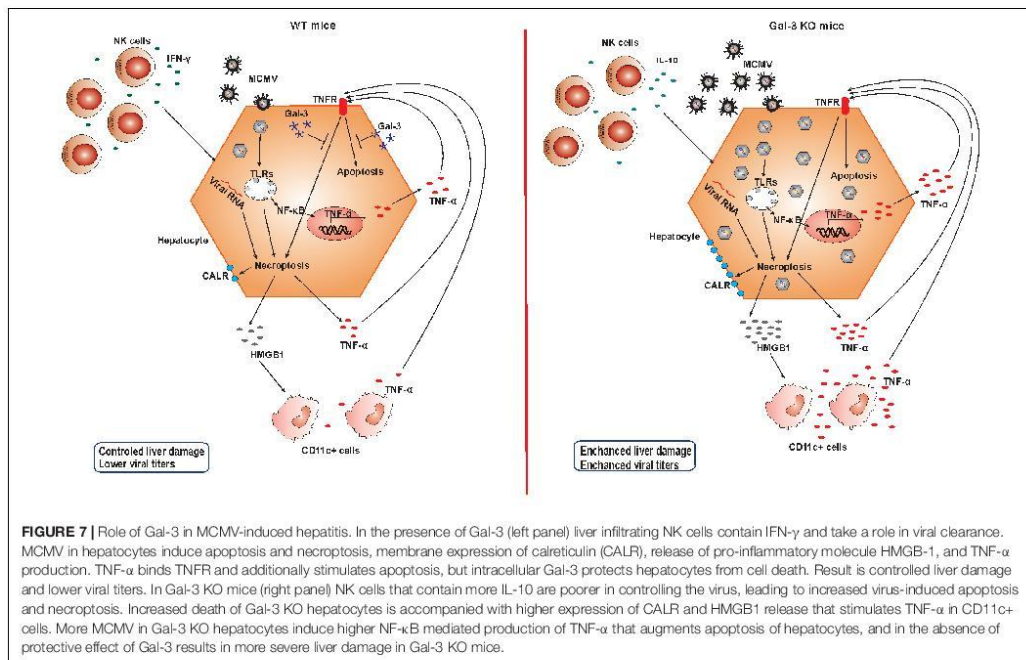
To confirm the protective role of Gal-3 in MCMV-induced hepatitis disease severity in WT and Gal-3 KO mice treated with recombinant Gal-3 was evaluated. Administration of recombinant Galectin-3 did not significantly alter inflammation and necrosis in WT mice (Figures 6A,B). Although we have not observed an altered number of inflammatory foci per liver in WT mice, there was an increase in their size (Figure 6A, white arrows). Gal-3 KO mice treated with recombinant

Galectin-3 had lower histological score of necrosis and inflammation and lower number of inflammatory and necrotic foci per section, 72 h after MCMV infection (Figures 6A–D). Alleviated disease in Gal-3 KO mice treated with recombinant Galectin-3 confirms the protective role of Gal-3 in MCMV induced hepatitis.

DISCUSSION

Here, we provide the first evidence that Gal-3 plays a protective role in MCMV-induced hepatitis as indicated by higher liver damage, serum levels of ALT and higher virus titers in Gal-3 deficient mice (Figure 2). Further exogenous Gal-3 alleviates MCMV-induced liver damage (Figure 6).

Several clinical studies indicate an increased serum level of Gal-3 in viral infections (Ten Oever et al., 2013; Lukic et al., 2017), and point out Gal-3 as a potential marker of viral infection (Kobayashi et al., 2015). Findings obtained in



animal model of coxsackievirus B3 virus induced cardiac injury in C57BL/6 mice studies indicate a protective role of Gal-3 in viral-induced diseases (Jaquenod De Giusti et al., 2015). Here, we show that Gal-3 gene deletion leads to accelerated liver damage induced by MCMV infection. In C57BL/6 mice, Gal-3 deletion enhances liver disease which is characterized by higher liver infiltrates and necrosis (Figures 2A,B), increased serum level of ALT (Figure 2C), enhanced apoptosis and necroptosis of hepatocytes (Figures 2D–I), higher viral titers (Figure 2J) and higher number of MCMV-infected cells in liver (Figure 2K). Further, a pretreatment of MCMV-infected Gal-3 KO mice with recombinant Gal-3 reduced the inflammation and liver damage in MCMV-induced hepatitis (Figure 6). The diverse effects of Gal-3 in different inflammatory conditions depend on the dominant pathogenic mechanisms involved. In macrophage mediated carditis and cardiac fibrosis induced by coxsackievirus B3 virus disruption of Gal-3 gene, or pharmacological inhibition of Gal-3, has the protective role (Jaquenod De Giusti et al., 2015). We also previously reported that Gal-3 gene deletion alleviates T and NKT cell mediated hepatitis (Volarevic et al., 2012, 2015). But, in line with finding of this study is our previous report that Gal-3 gene deletion aggravates xenobiotic induced PBC (Arsenijevic et al., 2016) due to enhanced hepatocyte apoptosis and release of autoantigens.

NK cells play a crucial role in the early immune response against murine cytomegalovirus infection and in the clearance

of MCMV in C57BL/6 mice (Scalzo and Yokoyama, 2008). NK cells, also contribute to liver damage in viral infections (Zheng et al., 2015). Although NK cells express Gal-3 that mainly downregulates their inflammatory and cytotoxic activities (Radosavljevic et al., 2011), higher liver damage in Gal-3 KO mice was not accompanied with higher activity of NK cells (Figure 3). Here, we have demonstrated that WT mice had higher influx of NK cells in the liver in comparison with Gal-3 KO mice (Figures 3A,B). Higher total number of IFN- γ expressing and lower total number of IL-10 expressing NK cells was noticed in the livers of WT mice (Figure 3C). In accordance with previous report that NK cells as the main source of IFN- γ , which plays a pivotal role in the antiviral response (Jost and Altfeld, 2013), our results indicate that lower viral titers in the livers of WT mice (Figure 2J) are the result of enhanced activity of NK cells in these mice in comparison with Gal-3 KO mice. The absence of NK cells involvement in higher liver damage in Gal-3 KO mice was confirmed by experiments with MCMV Δ m157 infection. The stimulation of activating Ly49H receptor of NK cells with MCMV-encoded protein m157, has a crucial role in early MCMV control and resistance to MCMV infection (Smith et al., 2002). The deletion of m157 gene or blocking the Ly49H receptor on NK cells abrogates the control of MCMV infection in most of the organs (Brown et al., 2001; Lee et al., 2001; Bubic et al., 2004; Sumaria et al., 2009). Higher number of liver infiltrates in Gal-3 KO mice infected with

MCMV Δ m157 in comparison with MCMV Δ m157 infected WT mice (Figures 3D,E) suggests that higher activity of NK cells doesn't play important role in enhanced liver damage of Gal-3 KO mice.

Acute MCMV infection generates an early systemic inflammatory response characterized by high levels of TNF- α , IL-12, IFN- γ , and type I IFNs (Orange and Biron, 1996; Nguyen et al., 2002). TNF- α mediates MCMV-induced liver damage independently of T and NK cells. It is required for the development of early hepatic necrotic foci and increased levels of liver enzymes (Orange et al., 1997). Our results indicate that hepatocytes are a significant source of TNF- α in MCMV infection (Figure 4). Although TNF- α is traditionally described as cytokine secreted by the cells of innate immunity (Wajant et al., 2003; Crane et al., 2012) and also on activity of MAPK-activated protein kinase 2 (Ehling et al., 2016). Since, we found MCMV-infected hepatocytes (Figure 2K) it can be assumed that MCMV directly stimulates TNF- α production in hepatocytes. We detected higher expression of TNF- α and higher number of TNF- α expressing hepatocytes in the liver of MCMV-infected KO mice (Figure 4). Additionally, TNF- α blockade with monoclonal antibody, Infliximab, significantly reduced hepatocyte death in MCMV-infected mice, especially in Gal-3 KO mice (Figure 5). TNF- α sensitizes hepatocytes to both caspase-dependant and caspase-independent apoptosis (Jones et al., 2000), and triggers necroptosis (Vandenabeele et al., 2010). Taking into account these observations, it appears that the higher production of TNF- α in hepatocytes of MCMV-infected Gal-3 KO mice contributes to greater liver damage.

Normal hepatocytes do not express Gal-3 in humans (Arsenijevic et al., 2016), but expression of Gal-3 is increased in different liver diseases (Shimonishi et al., 2001). Here, we have shown no Gal-3 expression in hepatocytes of untreated mice and a time-dependant increase of Gal-3 expression in hepatocytes of MCMV-infected WT mice (Figures 1A,B). This finding is in accordance with previously reported up-regulated expression of Gal-3 in mouse CNS tissue after encephalomyocarditis virus infection (Kobayashi et al., 2015) and in microglia and astrocytes of mice infected with Junin virus (Jaquenod De Giusti et al., 2011). Recently, it has been shown that TNF- α increases expression of Gal-3 (Okamoto et al., 2019), indicating that MCMV-induced Gal-3 expression in hepatocytes could be the result of virus-induced TNF- α production. The deletion of galectin-3-encoding gene sensitizes human keratinocytes, colorectal cancer cells, leukemia cells, human renal cell carcinoma and cholangiocarcinoma cells to apoptosis (Shi et al., 2007; Wongkham et al., 2009; Cheng et al., 2011; Xu et al., 2013), whereas the overexpression of *Lgals3* protects the cells from apoptosis (Takenaka et al., 2004). Gal-3 inhibits TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, induced apoptosis by activation of the PI3K/Akt pathway which blocks loss of the mitochondrial membrane potential, resulting

in inhibition of caspase-9 and caspase-3 activation (Oka et al., 2005). In accordance with this, we found higher percentage of TNF- α positive (Figures 4A–D) and apoptotic hepatocytes (Figures 2D–G) in infected Gal-3 KO mice, compared to WT mice. Further, we found significantly higher HMGB1 release (Figure 2H) and percentage of calreticulin positive hepatocytes (Figure 2I), markers of necroptotic death (Kepp et al., 2014), in the livers of infected Gal-3 KO mice compared with WT mice. HMGB1 binds to several receptors on the surface of immune cells (TLR2, TLR4, RAGE) and mediates strong inflammation (Scaffidi et al., 2002), while exposed calreticulin binds to receptors on antigen presenting cells and stimulates phagocytosis (Chao et al., 2010). It can be assumed that higher necroptosis of hepatocyte in Gal-3 deficient mice, early after MCMV infection, accompanied with higher release of HMGB1 (Figure 2J), enhances liver inflammation and TNF- α production in innate immune cells (Figure 4F) which in turn activates NF- κ B in hepatocytes and subsequently augments the expression of innate cytokines (TNF- α) in hepatocytes (Zhou et al., 2016) leading to enhanced liver damage.

Finally, our data suggest that the increased expression of Gal-3 in MCMV-infected livers protects hepatocytes from TNF- α facilitated apoptosis and necroptosis, and consequentially attenuates liver damage in MCMV-induced hepatitis (Figure 7). This findings combined with reduced MCMV-induced liver damage after recombinant Gal-3 treatment indicate protective role for Gal-3 in MCMV-induced liver damage, which can be of therapeutic relevance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BS (1st Author), MM, NA, SJ, and ML conceived and designed the experiments. BS (1st Author), JM, AA, BS (4th Author), IS, and MM performed the experiments. BS (1st Author), IS, and MM analyzed the data. BS (1st Author), ML, and MM wrote the paper.

FUNDING

This work was funded by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (Grants Nos. ON175071, ON175069, and ON175103), Serbia, and The Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP 01/14 and MP 02/14).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00185/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Galectin-3 KO mice exhibit higher viral titres early after infection. C57BL/6 and galectin-3 KO mice were i.v. infected with 2×10^5 PFU/animal. Viral titres in individual organs are determined by standard plaque assay at (A) 3 days and (B) 8 days post-infection. Each dot represents an individual animal and the bar represents the median titre.

REFERENCES

- Arsenijevic, A., Milovanovic, M., Milovanovic, J., Stojanovic, B., Zdravkovic, N., Leung, P. S., et al. (2016). Deletion of Galectin-3 enhances xenobiotic induced murine primary biliary cholangitis by facilitating apoptosis of BECs and release of autoantigens. *Sci. Rep.* 6:23348. doi: 10.1038/srep23348
- Bluml, S., Scheinecker, C., Smolen, J. S., and Redlich, K. (2012). Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 24, 275–281. doi: 10.1093/intimm/dxs047
- Bozza, S., Gaziano, R., Bonifazi, P., Zelante, T., Pizzurra, L., Montagnoli, C., et al. (2007). Thymosin alpha 1 activates the TLR9/MyD88/IRF7-dependent murine cytomegalovirus sensing for induction of anti-viral responses in vivo. *Int. Immunol.* 19, 1261–1270. doi: 10.1093/intimm/dxm097
- Brown, M. G., Dokun, A. O., Heusel, J. W., Smith, H. R., Beckman, D. L., Blattenberger, E. A., et al. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934–937. doi: 10.1126/science.1060042
- Brune, W. (2013). "Molecular basis of cytomegalovirus host species specificity," in *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, ed. M. J. Reddehase (Poole: Caister Academic Press), 322–329.
- Bubic, I., Wagner, M., Krmotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W. M., et al. (2004). Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 78, 7536–7544. doi: 10.1128/JVI.78.14.7536-7544.2004
- Chao, M. P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Volkmer, J., et al. (2010). Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2:63ra94. doi: 10.1126/scitranslmed.3001375
- Cheng, Y. L., Huang, W. C., Chen, C. L., Tsai, C. C., Wang, C. Y., Chiu, W. H., et al. (2011). Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 334–340. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.099
- Crane, M. J., Gaddi, P. J., and Salazar-Mather, T. P. (2012). UNC93B1 mediates innate inflammation and antiviral defense in the liver during acute murine cytomegalovirus infection. *PLoS One* 7:e39161. doi: 10.1371/journal.pone.0039161
- Ehling, C., Trilling, M., Tiedje, C., Le-Trilling, V. T. K., Albrecht, U., Kluge, S., et al. (2016). MAPKAP kinase 2 regulates IL-10 expression and prevents formation of intrahepatic myeloid cell aggregates during cytomegalovirus infections. *J. Hepatol.* 64, 380–389. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.012
- Eloia, M. T., Wolfenstein-Todt, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., and Rabinovich, G. A. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1679–1700. doi: 10.1007/s00018-007-7044-8
- Gonzalez-Amaro, R., Garcia-Monzon, C., Garcia-Bucy, L., Moreno-Otero, R., Alonso, J. L., Yague, E., et al. (1994). Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J. Exp. Med.* 179, 841–848. doi: 10.1084/jem.179.3.841
- Hsu, D. K., Dowling, C. A., Jeng, K. C., Chen, J. T., Yang, R. Y., and Liu, F. T. (1999). Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 81, 519–526. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990517)81:4<519::AID-IJC3>3.0.CO;2-0
- Hsu, D. K., Hammes, S. R., Kuwabara, I., Greene, W. C., and Liu, F. T. (1996). Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am. J. Pathol.* 148, 1661–1670.
- Jaquenod De Giusti, C., Alberdi, L., Frik, J., Ferrer, M. F., Scharrig, E., Schattner, M., et al. (2011). Galectin-3 is upregulated in activated glia during Junin virus-induced murine encephalitis. *Neurosci. Lett.* 501, 163–166. doi: 10.1016/j.neulet.2011.07.007
- Jaquenod De Giusti, C., Ure, A. E., Rivadeneyra, L., Schattner, M., and Gomez, R. M. (2015). Macrophages and galectin 3 play critical roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *J. Mol. Cell Cardiol.* 85, 58–70. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.010
- Jeftic, I., Jovicic, N., Pantic, J., Arsenijevic, N., Lukic, M. L., and Pejnovic, N. (2015). Galectin-3 ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and IL-33-dependent fibrosis in obesogenic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol. Med.* 21, 453–465. doi: 10.2119/molmed.2014.00178
- Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K., Valentino, K. L., et al. (2000). Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 705–712. doi: 10.1074/jbc.275.1.705
- Jost, S., and Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 163–194. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100001
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3, e955691. doi: 10.4161/2162401.2014.955691
- Kobayashi, K., Niwa, M., Hoshi, M., Saito, K., Hisamatsu, K., Hatano, Y., et al. (2015). Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation. *Neurosci. Lett.* 592, 107–112. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.061
- Lee, S. H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A., Belouchi, A., et al. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 28, 42–45. doi: 10.1038/ng0501-42
- Li, W. C., Ralphs, K. L., and Tosh, D. (2010). Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol. Biol.* 633, 185–196. doi: 10.1007/978-1-59745-019-5-13
- Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Garcia, A., McCormick, A. L., Huang, J., and Mocarski, E. S. (2012). Antiviral T cell response triggers cytomegalovirus hepatitis in mice. *J. Virol.* 86, 12879–12890. doi: 10.1128/JVI.01752-12
- Lukic, R., Gajovic, N., Jovanovic, I., Jurisevic, M., Mijailovic, Z., Maric, V., et al. (2017). Potential hepatoprotective role of galectin-3 during hcv infection in end-stage renal disease patients. *Dis. Markers* 2017:6275987. doi: 10.1155/2017/6275987
- Markowska, A. I., Jefferies, K. C., and Panjwani, N. (2011). Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 29913–29921. doi: 10.1074/jbc.M111.226423
- Milovanovic, M., Volarevic, V., Ljubic, B., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Arsenijevic, N., et al. (2012). Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One* 7:e45225. doi: 10.1371/journal.pone.0045225
- Mocarski, E. S., Shenk, T., Griffiths, P. D., and Pass, R. F. (2013). *Fields Virology*, 6th Edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1960–2014.
- Mocarski, E. S., Shenk, T., and Pass, R. F. (2007). "Cytomegaloviruses," in *Fields Virology*, eds B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X. Q., Liew, F. Y., et al. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J. Immunol.* 169, 4279–4287. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4279
- Oka, N., Nakahara, S., Takenaka, Y., Fukumori, T., Hogan, V., Kanayama, H. O., et al. (2005). Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* 65, 7546–7553. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1197
- Okamoto, M., Hidaka, A., Toyama, M., and Baba, M. (2019). Galectin-3 is involved in HIV-1 expression through NF-kappaB activation and associated with Tat in latently infected cells. *Virus Res.* 260, 86–93. doi: 10.1016/j.virusres.2018.11.012
- Orange, J. S., and Biron, C. A. (1996). Characterization of early IL-12, IFN-alpha, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156, 4746–4756.
- Orange, J. S., Salazar-Mather, T. P., Opal, S. M., and Biron, C. A. (1997). Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 71, 9248–9258.
- Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Majstorovic, I., Mitrovic, M., Lisnic, V. J., Arsenijevic, N., et al. (2011). Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 451–462. doi: 10.1007/s10585-011-9383-y
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195. doi: 10.1038/nature00858

- Scalzo, A. A., and Yokoyama, W. M. (2008). Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 321, 101–122. doi: 10.1007/978-3-540-75203-5_5
- Shi, Y., He, B., Kuchenbecker, K. M., You, L., Xu, Z., Mikami, I., et al. (2007). Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* 121, 1175–1181. doi: 10.1002/ijc.22848
- Shimonishi, T., Miyazaki, K., Kono, N., Sabit, H., Tuneyama, K., Harada, K., et al. (2001). Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum. Pathol.* 32, 302–310. doi: 10.1053/hupa.2001.22767
- Simovic Markovic, B., Nikolic, A., Gazdic, M., Bojic, S., Vucicevic, L., Kosic, M., et al. (2016). 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-1beta in macrophages. *J. Crohns Colitis* 10, 593–606. doi: 10.1093/ecco-jcc/ijw013
- Smith, H. R., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., et al. (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8826–8831. doi: 10.1073/pnas.092258599
- Sumaria, N., Van Dommelen, S. L., Andoniou, C. E., Smyth, M. J., Scalzo, A. A., and Degli-Esposti, M. A. (2009). The roles of interferon-gamma and perforin in antiviral immunity in mice that differ in genetically determined NK-cell-mediated antiviral activity. *Immunol. Cell Biol.* 87, 559–566. doi: 10.1038/icb.2009.41
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H. R., et al. (2004). Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Cell Biol.* 24, 4395–4406. doi: 10.1128/MCB.24.10.4395-4406.2004
- Ten Oever, J., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Van De Veerdonk, F. L., Stelma, F. F., Simon, A., Janssen, M., et al. (2013). Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1605–1610. doi: 10.1007/s10096-013-1919-4
- Upton, J. W., Shubina, M., and Balachandran, S. (2017). RIPK3-driven cell death during virus infections. *Immunol. Rev.* 277, 90–101. doi: 10.1111/immr.12539
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714. doi: 10.1038/nrm2970
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Bojic, S., Stojanovic, M., Nilsson, U., Leffler, H., et al. (2015). Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur. J. Immunol.* 45, 531–543. doi: 10.1002/eji.201444849
- Volarevic, V., Milovanovic, M., Ljujic, B., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Nilsson, U., et al. (2012). Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 55, 1954–1964. doi: 10.1002/hep.25542
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U. H., and Messerle, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73, 7056–7060.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189
- Wongkham, S., Junking, M., Wongkham, C., Sripa, B., Chur-In, S., and Araki, N. (2009). Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 100, 2077–2084. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01304.x
- Xu, Y., Gu, X., Gong, M., Guo, G., Han, K., and An, R. (2013). Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. *Cancer Biol. Ther.* 14, 897–906. doi: 10.4161/cbt.25937
- Yoshigai, E., Hara, T., Inaba, H., Hashimoto, I., Tanaka, Y., Kaibori, M., et al. (2014). Interleukin-1beta induces tumor necrosis factor-alpha secretion from rat hepatocytes. *Hepatol. Res.* 44, 571–583. doi: 10.1111/hepr.12157
- Zheng, Q., Zhu, Y. Y., Chen, J., Ye, Y. B., Li, J. Y., Liu, Y. R., et al. (2015). Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 180, 499–508. doi: 10.1111/cei.12597
- Zhou, Z., Xu, M. J., and Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol. Immunol.* 13, 301–315. doi: 10.1038/cmi.2015.97
- Zucchini, N., Bessou, G., Traub, S., Robbins, S. H., Uematsu, S., Akira, S., et al. (2008). Cutting edge: overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J. Immunol.* 180, 5799–5803. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5799

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Stojanovic, Milovanovic, Arsenijevic, Stojanovic, Strazic Gelfic, Arsenijevic, Jonjic, Lukic and Milovanovic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



CFTR IVS8 Poly-T Variation Affects Severity of Acute Pancreatitis in Women

Ivan Radosavljevic¹ · Bojan Stojanovic¹ · Marko Spasic¹ · Slobodan Jankovic² · Natasa Djordjevic²

Received: 9 May 2018 / Accepted: 1 August 2018
© 2018 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

Abstract

Background Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is important for normal pancreatic function. Its coding gene is polymorphic, and the variations have been associated with the increased risk for acute pancreatitis. However, their impact on the disease severity is still unknown. Therefore, the aim of our study was to determine the functional importance of common cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variations IVS8-poly T, R117H, and M470V for the severity of acute pancreatitis.

Method The study involved 98 acute pancreatitis patients. The severity of the disease was determined based on the Atlanta Classification system. IVS8-poly T, R117H, and M470V genotyping was performed using PCR-RFLP method.

Results IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T, and M470V alleles were found at the frequencies of 5.7, 75.5, 18.9, and 55.7%, respectively, while R117H was not observed. Among women, the severe form of the disease was more frequent in carriers of at least one IVS8 9T allele (RR for 9T/9T + 9T/non-9T vs. non-9T/non-9T: 2.115; 95% CI: 1.241–3.605). This association was not detected in men and was not affected by M470V. In addition, co-morbidities increased the severity of acute pancreatitis ($p = 0.022$).

Conclusion Our study reveals that IVS8 poly-T variation affects severity of acute pancreatitis in women and that existent co-morbidities worsen the clinical course of the disease.

Keywords Acute pancreatitis · CFTR · IVS8-poly T · Sex

Introduction

Acute pancreatitis is a gastrointestinal disease characterized by acute onset of pancreatic inflammation. Its incidence is increasing worldwide, and the mortality, depending on the severity of the disease, could be as high as 50%.¹ The development and the course of acute pancreatitis are both affected

by numerous factors, including the alteration of pancreatic proteins that are important for normal function of the gland.²

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is one of the pancreatic proteins, involved in pancreatic juice production. It consists of 1480 amino acids and serves as an anion transmembrane channel for Cl^- and HCO_3^- . In exocrine pancreas, it transports bicarbonate from the pancreatic duct cell to the lumen of the duct, which in turn pulls water and increases the volume, and therefore the flow, of pancreatic juice. When its function is diminished or missing, the volume of pancreatic juice is reduced and the density is increased; the pancreatic duct is more prone to obstruction, proenzymes are prematurely activated, and pancreatitis develops.³

CFTR gene is located on a long arm of chromosome 7 (q31-q32) and consists of 250-kb-long genomic sequence, which includes 27 exons. It is extremely polymorphic, with more than 2000 variations described so far (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). According to the molecular defect and its phenotypic consequences, CFTR variations have been classified into six groups.³ To assess the risk of pancreatitis

The study was approved on August 29th, 2011, by the ethics committee at the Clinical Centre Kragujevac, decision No 01-9024. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions, with all the patients giving their written informed consent.

✉ Natasa Djordjevic
natashadj2002@yahoo.com

¹ Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia

² Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacology and toxicology, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34 000, Serbia

in carriers of *CFTR* variations, a Pancreatic Insufficiency Prevalence (PIP) scoring system was also developed, classifying them based on functional severity as mild (<0.25) or severe (>0.25).⁴

Previous study with cystic fibrosis patients showed an increased risk of pancreatitis in mild *CFTR* variation carriers compared to those carrying severe variations.⁴ The observed association suggests that the certain level of pancreatic acinus reserve is necessary for the onset of pancreatitis, stressing the role of seemingly less important variations in the disease development. However, as to our best knowledge, there are no studies evaluating the impact of *CFTR* genetics on the course of already developed disease. The aim of our study was to determine the functional importance of three of the most commonly tested mild *CFTR* variations, namely IVS8-poly T, R117H, and M470V,³ for the severity of acute pancreatitis.

Materials and Methods

Ninety eight acute pancreatitis patients, hospitalized between November 2011 and May 2014 at the Intensive Care Unit, Clinical Centre Kragujevac, Serbia, participated in the study. The diagnosis has been established based on the presence of at least two of the following three features: (1) abdominal pain characteristic of acute pancreatitis, (2) at least 3-fold increase of serum amylase and/or lipase, and (3) characteristic computed tomography findings. The severity of the disease was determined based on the Atlanta Classification system, i.e., minimal organ dysfunction and uneventful recovery defined mild form, while local complications (necrosis, abscess, pseudocyst) and/or organ failure were interpreted as characteristics of severe acute pancreatitis. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions, with all the patients giving their written informed consent. The study was approved on August 29th, 2011, by the ethics committee at the Clinical Centre Kragujevac, decision No 01-9024.

Genomic DNA was isolated from EDTA blood samples using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). *CFTR* genotyping was performed using PCR-RFLP method, according to Shrimpton et al.⁵ for IVS8 poly-T (rs1805177, 5T/7T/9T allele) and 350G>A (rs78655421, R117H) and to Qiao et al.⁶ for 1408G>A (rs213950, M470V), with slight modifications of PCR reagents and conditions (available upon request). All PCR reactions were performed on Techne Genius PCR Thermal Cycler (Techne, Cambridge, UK), and the reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA), New England Biolab (Ipswich, MA), or Thermo Scientific (Waltham, MA). The PCR amplicons and restriction fragments were detected by gel electrophoresis on 1.2 or 2.4% agarose gel stained with Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Statistical analyses were performed with SPSS Statistics, version 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Haplotype analysis and haplotype frequency calculations were carried out using the population genetic software program Arlequin, version 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Genotype data were presented as allele, genotype, haplotype, and diplotype frequencies. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using Chi-square statistics. Two-tailed Fisher exact, Fisher-Freeman-Halton, Pearson Chi-square test, and logistic regression analysis were used to compare the frequencies of alleles, genotypes, diplotypes, and genotype groups (determined using dominant or recessive genetic model), as well as other patient characteristics (age, sex, co-morbidities, etiology of pancreatitis, alcohol consumption, cigarette smoking) between mild and severe acute pancreatitis patients. The association between *CFTR* genotype and the severity of acute pancreatitis was assessed by estimating the relative risk (RR) of complications and/or organ failure with 95% confidence intervals (95% CI). *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

There were 38 women and 60 men enrolled in the study, with median age of 61 (range from 23 to 86), and the body mass index from 19.2 to 42.2 (median value of 27.2). Of them, 53 (17 women) and 45 (21 women) were classified as mild and severe acute pancreatitis patients, respectively. Etiology of pancreatitis has been confirmed as alcoholic in 22 patients (3 women), biliary in 51 (28 women), and idiopathic in other 25 (5 women). As expected, the most frequent type of acute pancreatitis in women was biliary ($\chi^2 = 15.3, p < 0.0001$).

All *CFTR* genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 < 3.346, p = 0.05$). *CFTR* 350G>A variation (R117H) was not observed. Based on the length of the IVS8 poly-T residue, two stratification strategies were employed: subjects were assigned to carriers or non-carriers of (a) the shortest (5T vs. non-5T) and (b) the longest (9T vs. non-9T) polythymidine tract. Genotype groups were determined using both dominant and recessive genetic models (comparing homozygous carriers of the wild-type allele with carriers of at least one variant allele and carriers of at least one wild-type allele with homozygous carriers of the variant allele, respectively), but no significant difference in their frequency was observed between mild and severe acute pancreatitis patients. The frequency distributions of *CFTR* alleles, genotypes, and genotype groups according to the severity of acute pancreatitis are presented in Table 1. The frequencies of estimated haplotypes and diplotypes did not differ significantly between the groups (Table 2). Of other examined variables, i.e., patients' age, sex, existing co-morbidities (expressed by Charlson Comorbidity Index, CCI), etiology of pancreatitis,

Table 1 *CFTR* allele, genotype, and genotype group frequencies in patients with mild ($n = 53$) and severe ($n = 45$) acute pancreatitis

	Mild acute pancreatitis	Severe acute pancreatitis	<i>P</i>
Allele			
rs1805177 (IVS8 poly-T)			
IVS8 5T	0.057 (6/106)	0.022 (2/90)	0.211
IVS8 7T	0.755 (80/106)	0.700 (63/90)	
IVS8 9T	0.189 (20/106)	0.278 (25/90)	
IVS8 non-5T	0.943 (100/106)	0.978 (88/90)	0.225
IVS8 non-9T	0.811 (86/106)	0.722 (65/90)	0.139
rs78655421 (350G>A, R117H)			
350G	1.000 (106/106)	1.000 (90/90)	1.000
350A	0.000 (0/106)	0.000 (0/90)	
rs213950 (1408G>A, M470V)			
1408G	0.443 (47/106)	0.478 (43/90)	0.630
1408A	0.557 (59/106)	0.522 (47/90)	
Genotype			
rs1805177 (IVS8 poly-T)			
5T/5T	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	0.370
5T/7T	0.038 (2/53)	0.022 (1/45)	
5T/9T	0.075 (4/53)	0.022 (1/45)	
7T/7T	0.660 (35/53)	0.556 (25/45)	
7T/9T	0.151 (8/53)	0.267 (12/45)	
9T/9T	0.075 (4/53)	0.133 (6/45)	
5T/non-5T	0.113 (6/53)	0.044 (2/45)	0.282
non-5T/non-5T	0.887 (47/53)	0.956 (43/45)	
9T/non-9T	0.226 (12/53)	0.289 (13/45)	0.411
non-9T/non-9T	0.698 (37/53)	0.578 (26/45)	
rs78655421 (350G>A, R117H)			
G/G	1.000 (53/53)	1.000 (45/45)	1.000
G/A	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	
A/A	0.000 (0/53)	0.000 (0/45)	
rs213950 (1408G>A, M470V)			
G/G	0.189 (10/53)	0.222 (10/45)	0.896
G/A	0.509 (27/53)	0.511 (23/45)	
A/A	0.302 (16/53)	0.267 (12/45)	
Genotype group			
Dominant genetic model			
rs1805177 (IVS8 poly-T)			
5T/non-5T + non-5T/non-5T	1.000 (53/53)	1.000 (45/45)	NA
9T/non-9T + non-9T/non-9T	0.925 (49/53)	0.867 (39/45)	0.505
rs213950 (1408G>A, M470V)			
G/A + A/A	0.811 (43/53)	0.778 (35/45)	0.803
Recessive genetic model			
rs1805177 (IVS8 poly-T)			
5T/5T + 5T/non-5T	0.113 (6/53)	0.044 (2/45)	0.282
9T/9T + 9T/non-9T	0.302 (16/53)	0.422 (19/45)	0.290
rs213950 (1408G>A, M470V)			
G/G + G/A	0.698 (37/53)	0.733 (33/45)	0.823

alcohol consumption, and cigarette smoking, only CCI was found to be associated with increased severity of acute pancreatitis ($p = 0.022$).

The possible effect of the length of the IVS8 poly-T residue on the severity of acute pancreatitis was tested in men and women separately, with the frequency distribution of alleles,

Table 2 *CFTR* haplotype and diplotype frequencies in patients with mild ($n = 53$) and severe ($n = 45$) acute pancreatitis

	Mild acute pancreatitis	Severe acute pancreatitis	<i>P</i>	
Haplotype				
rs1805177-rs78655421-rs213950				
5T-350G-1408A	0.019 (2/106)	0.000 (0/90)	0.554	
5T-350G-1408G	0.038 (4/106)	0.022 (2/90)		
7T-350G-1408A	0.500 (53/106)	0.467 (42/90)		
7T-350G-1408G	0.255 (27/106)	0.233 (21/90)		
9T-350G-1408A	0.038 (4/106)	0.056 (5/90)		
9T-350G-1408G	0.151 (16/106)	0.222 (20/90)		
Diplotype				
rs1805177-rs78655421-rs213950				
5T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)		0.739
5T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)		
5T-350G-1408G/7T-350G-1408G	0.019 (1/53)	0.022 (1/45)		
5T-350G-1408G/9T-350G-1408G	0.038 (2/53)	0.022 (1/45)		
7T-350G-1408A/7T-350G-1408A	0.283 (15/53)	0.222 (10/45)		
7T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.000 (0/53)	0.022 (1/45)		
7T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.283 (15/53)	0.289 (13/45)		
7T-350G-1408G/7T-350G-1408G	0.094 (5/53)	0.044 (2/45)		
7T-350G-1408G/9T-350G-1408G	0.019 (1/53)	0.067 (3/45)		
9T-350G-1408A/9T-350G-1408A	0.00 (0/53)	0.022 (1/45)		
9T-350G-1408G/5T-350G-1408A	0.019 (1/53)	0.000 (0/45)		
9T-350G-1408G/7T-350G-1408A	0.132 (7/53)	0.178 (8/45)		
9T-350G-1408G/9T-350G-1408A	0.057 (3/53)	0.044 (2/45)		

genotypes, and genotype groups presented in Table 3. The results revealed that in female patients with acute pancreatitis, the risk of developing the severe form of the disease is more than two times higher if she is a carrier of at least one *CFTR* IVS8 9T allele (RR for 9T/9T + 9T/non-9T vs. non-9T/non-9T: 2.115; 95% CI: 1.241–3.605). Additional haplotype and diplotype-based comparison showed that female carriers of at least one 9T-350G-1408G haplotype were significantly more frequent among severe acute pancreatitis patients ($p = 0.021$). This association was not detected in men (RR for 9T/9T + 9T/non-9T vs. non-9T/non-9T: 1.158; 95% CI: 0.594–2.256) and was not affected by 1408G>A (M470V) genotype ($p = 0.545$). The association of *CFTR* IVS8 9T allele and severity of acute pancreatitis with biliary etiology (the most frequent type in women) was not observed (RR for 9T/9T + 9T/non-9T vs. non-9T/non-9T: 1.123; 95% CI: 0.709–1.778). The significance of IVS8 poly-T variation for severity of acute pancreatitis in women was confirmed by both univariate ($p = 0.015$) and multivariate ($p = 0.030$) logistic regression, while the role of other examined variables was not detected ($p = 0.308$). The best fitting model, which included genotype, patients' age, and existing co-morbidities (Cox & Snell R^2 : 0.252, Nagelkerke R^2 : 0.337, Hosmer-Lemeshow $\chi^2 = 4.642$, $df = 8$, $p = 0.795$), confirmed the recessive effect of *CFTR* IVS8 9T allele on acute pancreatitis severity in women ($p = 0.012$; Table 4).

Discussion

The main finding of our study is that in women with acute pancreatitis, the risk of developing the severe form of disease is more than two times higher if she is a carrier of at least one *CFTR* IVS8 9T allele. As to our best knowledge, this is the first study to report this finding. In addition, in acute pancreatitis patients, CCI scores were positively associated with the disease severity.

It is well known that reduced HCO_3^- secretion in pancreatic duct contributes to the development of acute pancreatitis. Namely, to maintain normal functioning of pancreas, acinar and ductal cells daily secrete up to 2 l of alkaline juice.⁷ While secretion from acinar cells results in a small amount of NaCl-rich fluid, ductal cells increase the volume of pancreatic juice by exchanging chloride ions from the lumen for bicarbonates and consequently pulling water into the lumen.⁷ Since extracellular acidosis promotes pancreatitis development by triggering activation of proenzymes in pancreatic acini and duct,⁸ efficient bicarbonate secretion is very important in preventing the onset of the disease. The described anion exchange, which is crucial both for neutralization of the secreted fluid and for the duct flushing, largely depends on *CFTR* transporting activity.⁷

CFTR is an ATP-binding cassette (ABC) transporter that acts as an anion channel.⁷ It consists of one regulatory domain

Table 3 *CFTR* IVS8 poly-T allele, genotype, and genotype group frequencies in male and female acute pancreatitis patients

	Men (n = 60)			Women (n = 38)		
	Mild acute pancreatitis	Severe acute pancreatitis	<i>p</i>	Mild acute pancreatitis	Severe acute pancreatitis	<i>p</i>
Allele						
IVS8 5T	0.083 (6/72)	0.042 (2/48)	0.587	0.000 (0/34)	0.000 (0/42)	0.017
IVS8 7T	0.694 (50/72)	0.771 (37/48)		0.882 (30/34)	0.619 (26/42)	
IVS8 9T	0.222 (16/72)	0.188 (9/48)		0.118 (4/34)	0.381 (16/42)	
Genotype						
5T/5T	0.000 (0/36)	0.000 (0/24)	0.954	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	0.017
5T/7T	0.056 (2/36)	0.042 (1/24)		0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	
5T/9T	0.111 (4/36)	0.042 (1/24)		0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	
7T/7T	0.565 (20/36)	0.625 (15/24)		0.882 (15/17)	0.476 (10/21)	
7T/9T	0.222 (8/36)	0.250 (6/24)		0.000 (0/17)	0.286 (6/21)	
9T/9T	0.056 (2/36)	0.042 (1/24)		0.118 (2/17)	0.238 (5/21)	
5T/non-5T	0.167 (6/36)	0.083 (2/24)	0.457	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	NA
Non-5T/non-5T	0.833 (30/36)	0.917 (22/24)		1.000 (17/17)	1.000 (21/21)	
9T/non-9T	0.333 (12/36)	0.292 (7/24)	0.902	0.000 (0/17)	0.286 (6/21)	0.017
Non-9T/non-9T	0.611 (22/36)	0.667 (16/24)		0.882 (15/17)	0.476 (10/21)	
Genotype group						
Dominant genetic model						
5T/non-5T + non-5T/non-5T	1.000 (36/36)	1.000 (24/24)	NA	1.000 (17/17)	1.000 (21/21)	NA
9T/non-9T + non-9T/non-9T	0.944 (34/36)	0.958 (23/24)	1.000	0.882 (15/17)	0.762 (16/21)	0.427
Recessive genetic model						
5T/5T + 5T/non-5T	0.167 (6/36)	0.083 (2/24)	0.457	0.000 (0/17)	0.000 (0/21)	NA
9T/9T + 9T/non-9T	0.389 (14/36)	0.333 (8/24)	0.787	0.118 (2/17)	0.524 (11/21)	0.015

(RD) that connects two homologous halves, each containing two cytoplasmic nucleotide binding domains (NBD1 and NBD2), coupled with corresponding pore-forming membrane spanning domains MSD1 and MSD2.⁹ The channel opening and closing relies on an ATP-driven CFTR conformation change, enabled by phosphorylation at several sites within RD.¹⁰ In brief, binding of ATP initiates NBD1-NBD2 dimerisation and subsequent MSDs outward-facing conformation, which leads to channel opening.¹¹ In contrast, ATP hydrolysis reverses the process and closes the channel.¹² Based on the previous observations on the role of NBD1 and NBD2 in CFTR gating,¹¹ one might expect that the loss or alteration of any of the NBDs could result in decreased CFTR function.

Of all genes mechanistically linked to pancreatic function, *CFTR* seems to be the most variable. One of the most

frequently studied *CFTR* variation is IVS8-poly T, which represents an intronic sequence composed of five, seven, or nine thymidines. It has been demonstrated that the shorter poly-T sequence often affects splicing of exon 9, leading to synthesis of truncated NBD1.¹³ Due to the importance of NBD1 for channel gating, CFTR is more efficient if this poly-T tract is longer, and this has been confirmed by several studies.⁵ Therefore, the possibility that the *CFTR* IVS8 9T results in CFTR hypofunction seems paradoxical and unlikely.

Previous investigations showed that the described IVS8 poly-T effect might depend on simultaneous presence of another *CFTR* variation on the same chromosome, namely R117H.⁵ R117H represents a missense mutation that affects the structure of the first extracellular loop of MSD1, causing decreased CFTR function by reducing number of channels, channel conductance, and average open probability.¹⁴ As in

Table 4 Summary of variable estimates using multiple logistic regression analysis regarding severity of acute pancreatitis in women (n = 38)

Variables	β	SE	Wald χ^2	<i>p</i>	OR	95% CI
Recessive <i>CFTR</i> IVS8 9T genetic model	2.533	1.009	6.298	0.012	12.594	1.741–91.074
Charlson Comorbidity Index	0.294	0.418	0.495	0.482	1.342	0.591–3.044
Age	0.040	0.030	1.791	0.181	1.041	0.982–1.104

β the regression coefficient, SE the standard error of β , Wald χ^2 Wald test statistic for DF = 1, *p* the probability value, OR odds ratio, 95% CI the 95% confidence interval for the estimated OR

our study, none of the acute pancreatitis patients was a carrier of R117H, the effect of *CFTR* IVS8 9T that we observed seems independent of R117H. The association between 9T allele and severity of acute pancreatitis was not affected by M470V either, although the latter decreases channel activity¹³ and has been previously linked to IVS8-poly T variation.¹⁵ Still, none of this explains the apparent paradox related to the observed *CFTR* IVS8 9T effect.

In attempt to understand the mechanism behind our findings, we have developed several theories. Firstly, in severe acute pancreatitis, the most common organ failure is respiratory, and it develops due to accumulation of fluid between the alveolar membrane and the capillaries in the lung.¹⁶ The fluid component of the secretion in lungs, i.e., in the submucosal glands of distal tubules and acini, depends on transporting activity of *CFTR*.⁷ Therefore, in the presence of already existing acute pancreatitis, the carriers of fully functional *CFTR* IVS8 9T allele could more easily develop pulmonary edema, resulting in respiratory organ failure that defines pancreatic disease as severe. However, this explanation does not clarify why the observed *CFTR* IVS8 9T effect would be present only in women.

On the other hand, sex specificity of genetics' influence on disease prevalence and course has been already recognized. Well-known examples of this sexual dimorphism include association between *ACE* gene variation and hypertension, observed only in men,¹⁷ or between *RELN* gene variation and schizophrenia, detected only in women.¹⁸ Similar has been reported for *CFTR* IVS8-poly T in relation to cystic fibrosis, 5T variant apparently having milder consequences in women compared to men.¹⁹ Low penetrance of 5T allele, observed in women with a *CFTR*-related disease such as cystic fibrosis, might be an explanation for severe clinical course in female acute pancreatitis patients carrying 9T allele.

In addition to cis-acting elements (such as R117H) and epigenetic regulation, sex-specific gene expression and penetrance could be influenced by non-genetic factors too, including environmental and hormonal influences.²⁰ In acute pancreatitis, environment has an important role in both etiology and clinical course of the disease.²¹ The environmental effects are also sex-specific, with the two most frequent types of pancreatitis, namely alcoholic and biliary, predominating in men and women, respectively.²² It has been observed that in alcohol-induced pancreatitis, dominant type of acinar cell death is necrosis,²³ while the bile salts, present in excess in acinus lumen in biliary pancreatitis, could activate both apoptosis and necrosis.²⁴ In addition, the type of pancreatic acinar cell death has been associated with the severity of acute pancreatitis too, mild form usually coupled with apoptosis, and severe with necrosis.²⁵ As in the presence of *CFTR* dysfunction sensitivity of cells to apoptogenic agents is increased,²⁶ it can be expected that women with fully functional *CFTR* and biliary etiology of acute pancreatitis would be more prone to

necrosis of acinar cells, thus more easily develop severe form of the disease. However, in our study, sample etiology was not associated with increased severity of acute pancreatitis.

Nevertheless, acute pancreatitis development and course might also be affected by sex hormones: estrogens seem to alter pancreatic function by inhibiting *CFTR* and decreasing bicarbonate production.²⁷ On the other hand, *CFTR* itself regulates synthesis of estrogens by turning up the signal of FSH-stimulated estrogen production.²⁸ We believe that this negative feedback loop between estrogen and *CFTR* might be the most plausible explanation for our main finding. Namely, female carriers of fully functional IVS8 9T allele (as compared to female IVS8 5T or 7T carriers) would have higher levels of estrogens, which in turn would inhibit *CFTR* function in other organs, including pancreas. Reduced bicarbonate secretion in pancreatic duct would then increase the risk for development or (if the disease is already present) the severity of acute pancreatitis. As healthy subjects did not participate in our study, we were not able to estimate the influence of investigated factors on the prevalence of acute pancreatitis. Yet, we did observe different frequency distribution of IVS8 poly-T alleles in Serbian acute pancreatitis patients compared to healthy Serbian volunteers,²⁹ implicating the possibility of association between this variation and the disease development.

The Charlson Comorbidity Index (CCI) was introduced in 1987 as a tool for prediction of the 10-year mortality for patients with co-morbidities that are enrolled in longitudinal studies. Earlier studies on acute pancreatitis revealed that co-morbidity does contribute to organ failure and mortality.³⁰ In the present study, in line with the previous reports, higher CCI was associated with increased severity of acute pancreatitis.

Conclusion

Our study reveals that *CFTR* IVS8 poly-T variation affects severity of acute pancreatitis in women and that existent co-morbidities worsen the clinical course of the disease. To confirm these findings and test their potential clinical applicability, additional studies on larger and ethnically diverse population, with inclusion of other genetic and non-genetic factors, are warranted.

Author's Contribution Ivan Radosavljevic contributed acquisition of data, interpretation of data, and drafting of the manuscript. Bojan Stojanovic and Marko Spasic contributed acquisition of data. Slobodan Jankovic contributed study concept and design and interpretation of the data. Natasa Djordjevic contributed study concept and design, statistical analysis, interpretation of the data, and drafting of the manuscript. All authors contributed to critical manuscript revision.

Funding The study was financially supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia, JP 10/11, and the Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia, grants No. 175007 and 175056.

Compliance with Ethical Standards

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions, with all the patients giving their written informed consent. The study was approved on August 29th, 2011, by the ethics committee at the Clinical Centre Kragujevac, decision No 01-9024.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Roberts SE, Morrison-Rees S, John A, Williams JG, Brown TH, Samuel DG. The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology*. 2017;17(2):155–65.
- Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1292–302.
- Ooi CY, Durie PR. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in pancreatitis. *J Cyst Fibros*. 2012;11(5):355–62.
- Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, Freedman SD, Zielenski J, Berthiaume Y, Corey M, Schibli S, Tullis E, Durie PR. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011;140(1):153–61.
- Shrimpton AE. R117H and IVS8-5T cystic fibrosis mutation detection by restriction enzyme digestion. *Mol Diagn*. 2000;5(3):235–8.
- Qiao D, Yi L, Hua L, Xu Z, Ding Y, Shi D, Ni L, Song N, Wang Y, Wu H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene 5T allele may protect against prostate cancer: a case-control study in Chinese Han population. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):210–4.
- Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol Rev*. 2012;92(1):39–74.
- Pallagi P, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr, Borka K, Korompay A, Ozsvari B, Judak L, Sahin-Toth M, Geisz A, Schnur A, Maletz J, Takacs T, Gray MA, Argent BE, Mayerle J, Lerch MM, Wittmann T, Hegyi P. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl⁻ channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2228–39.e6.
- Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:701–18.
- Hwang TC, Sheppard DN. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol*. 2009;587(Pt 10):2151–61.
- Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*. 2005;433(7028):876–80.
- Hwang TC, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(11):4698–702.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest*. 1998;101(2):487–96.
- Yu YC, Sohma Y, Hwang TC. On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Physiol*. 2016;594(12):3227–44.
- Boudaya M, Fredj SH, Haj RB, Khrouf M, Bouker A, Halouani L, Messaoud T. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations and polymorphisms associated with congenital bilateral absence of vas deferens in a restricted group of patients from North Africa. *Ann Hum Biol*. 2012;39(1):76–9.
- Johnson CD. Organ failure and acute pancreatitis. In: Forsmark CE, Gardner TB, editors. Prediction and management of severe acute pancreatitis. New York: Springer; 2015. p.15–27.
- Stankovic A, Zivkovic M, Alavantic D. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in a Serbian population: a gender-specific association with hypertension. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62(6):469–75.
- Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, Chen SX, Collier DA, Craddock NJ, Kendler KS, Li T, O'Donovan M, O'Neill FA, Owen MJ, Walsh D, Weinberger DR, Sun C, Flint J, Darvasi A. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS Genet*. 2008;4(2):e28.
- Sun W, Anderson B, Redman J, Milunsky A, Buller A, McGinniss MJ, Quan F, Anguiano A, Huang S, Hantash F, Strom C. CFTR 5T variant has a low penetrance in females that is partially attributable to its haplotype. *Genet Med*. 2006;8(6):339–45.
- Weiss LA, Pan L, Abney M, Ober C. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet*. 2006;38(2):218–22.
- Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(12):1427–30.
- Lankisch PG, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Acute pancreatitis: does gender matter? *Dig Dis Sci*. 2001;46(11):2470–4.
- Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, Whitcomb DC. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G232–41.
- Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ*. 2007;14(7):1285–94.
- Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol*. 1995;269(5 Pt 1):C1295–304.
- Rottner M, Kunzelmann C, Mergely M, Freyssonnet JM, Martinez MC. Exaggerated apoptosis and NF-kappaB activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *Faseb j*. 2007;21(11):2939–48.
- Singh AK, Schultz BD, Katzenellenbogen JA, Price EM, Bridges RJ, Bradbury NA. Estrogen inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride secretion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295(1):195–204.
- Chen H, Guo JH, Lu YC, Ding GL, Yu MK, Tsang LL, Fok KL, Liu XM, Zhang XH, Chung YW, Huang P, Huang H, Chan HC. Impaired CFTR-dependent amplification of FSH-stimulated estrogen production in cystic fibrosis and PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):923–32.
- Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V and R75Q in healthy Serbian population. *Genetika*. 2006;42(7):996–8.
- Murata A, Ohtani M, Muramatsu K, Matsuda S. Influence of comorbidity on outcomes of older patients with acute pancreatitis based on a national administrative database. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(4):422–8.