



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ивица Р. Петровић

**Улога галектина-3 у патофизиологији β
ћелија панкреаса**

докторска дисертација

Крагујевац, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ivica R. Petrovic

**The role of galectin-3 in pancreatic β cells
pathophysiology**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Ивица Петровић
Датум и место рођења: 29.09.1985. Краљево
Садашње запослење: сарадник у звању асистента за ужу научну област Патолошка физиологија, Факултет медицинских наука
Докторска дисертација
Наслов: Улога галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса
Број страница: 159
Број слика: 42
Број библиографских података: 310
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Експериментална и клиничка интерна медицина, подручје ендокринологија
Ментор: доцент др Немања Јовичић, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 10.07.2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-829/44 од 08.09.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Александар Ђукић – редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија – председник2. Проф. др Небојша Арсенијевић – редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија - члан3. Проф. др Небојша Лалић – редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина – члан

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

1. Академик проф. др Небојша Лалић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор – емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
3. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
4. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. др Нада Пејновић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

Датум одбране дисертације:

*Докторску дисертацију посвећујем,
особама које су се много жртвовале
и одрицале током живота,
да би ме извеле на прави пут.
На томе сам им неизмерно захвалан.*

*Својим родитељима,
мајци Радмили и оцу Радиши.*

Апстракт

Увод: Шећерна болест представља све значајнији здравствени проблем у свету. У патогенези типа 1 шећерне болести централно место заузима аутоимунско запаљење панкреасних острваца које води апсолутном недостатку инсулина. Централно место у патогенези типа 2 шећерне болести, заузима развој гојазности са појавом резистенције периферних ткива на инсулин и последичним повећањем стварања инсулина. Повећани захтеви за продукцију инсулина стимулишу, али и оптерећују β ћелије, што постепено води њиховом оштећењу које је праћено смањеним стварањем инсулина, појавом хипергликемије и развојем типа 2 шећерне болести. Досадашња истраживања у којима су коришћени галектин-3 дефицијентни мишеви, показала су прозапаљенску улогу галектина-3 у развоју типа 1 шећерне болести, док су резултати испитивања улоге овог молекула у патогенези типа 2 шећерне болести контрадикторни. До сада нема података о ефекту селективно појачане експресије галектина-3 у β ћелијама на патогенезу шећерне болести.

Циљ: Испитати ефекат појачане експресије галектина-3 у β ћелијама на патогенезу шећерне болести.

Материјал и методе: Експерименталним животињама, C57Bl/6 мишевима дивљег соја и мишевима са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама, тип 1 шећерне болести је индукован применом стрептозотоцина у пет малих доза од 40mg/kg, док је тип 2 шећерне болести индукован коришћењем хране богате мастима (енгл. high fat diet, HFD, 60% калорија порекла из масних киселина) током 16 недеља. У *in vitro* експериментима коришћена су изолована панкреасна острваца која су третирана метаболичким ноксама након чега је анализирано преживљавање β ћелија као и оксидативни потенцијал третираних β ћелија. У експерименталном моделу типа 1 шећерне болести, апликован је интерлеукин 33 у 4 дозе од 12-18 дана модела.

Резултати: У експерименталном моделу типа 1 шећерне болести трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама делује протективно, на индукцију болести употребом ниских узастопних доза стрептозотоцина. Третирање трансгених мишева интерлеукином 33 додатно ублажава развој хипергликемија. У експерименталном моделу типа 2 шећерне болести трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама делује прозапаљенски поспешујући оштећење β ћелија након исхране богате мастима. *In vitro* резултати указују на прооксидантни ефекат појачане експресије галектина-3 у β ћелијама, док резултати након стимулације метаболичким и инфламаторним ноксама показују значајан прозапаљенски ефекат појачане експресије галектина-3 у β ћелијама.

Закључак: Резултати показују да ефекат појачане експресије галектина-3 у β ћелијама може бити двојак, од протективног до прозапаљенског, у зависности од ноксе која делује на β ћелије и механизма којим нокса доводи до оштећења β ћелије. Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама и примена интерлеукина 33 након појаве хипергликемије имају терапијски ефекат и спречавају развој шећерне болести.

Кључне речи: појачана експресија галектина-3, оксидативни стрес, исхрана богата мастима, стрептозотозин, апоптоза β ћелија, интерлеукин 33, терапија шећерне болести.

Abstract:

Introduction: Diabetes is a serious and emerging health problem around the world. The central place in type 1 diabetes pathogenesis belongs to autoimmune inflammation of the pancreatic islets, which leads to an absolute lack of insulin. In type 2 diabetes pathogenesis, central role belongs to development of obesity, meta-inflammation and appearance of peripheral tissue resistance to insulin with the consequent increase in insulin production. β cells, burdened with increased demands, cannot withstand the new condition for a long time, which gradually leads to their damage, accompanied by reduced insulin production, hyperglycemia and type 2 diabetes onset. Previous studies which used galectin-3 deficient mice shown its pro-inflammatory role in the development of type 1 diabetes, while the results of examining the role of this molecule in the pathogenesis of type 2 diabetes are contradictory. There are no data in the literature about the effect of selectively enhanced galectin-3 expression in β cells on the pathogenesis of diabetes.

Aim: The aim of the research project was to delineate the role of galectin-3, expressed on β cells, in the pathogenesis of diabetes.

Material and methods: Type 1 diabetes was induced by multiple low doses of streptozotocin (40 mg/kg) in C57Bl/6 wild type mice and mice with transgenically enhanced galectin-3 expression in β cells. Type 2 diabetes was induced by use of high-fat diet (HFD, 60% calories from fat) for 16 weeks. In *in vitro* experiments, isolated islets were treated with metabolically harmful factors, after which the survival of β cells was investigated, as well as the oxidative potential of the treated β cells. In experimental model of type 1 diabetes, additional experimental groups were treated with interleukin 33 in 4 doses from 12 to 18 days.

Results: In experimental model of type 1 diabetes, enhanced galectin-3 expression in β cells has a protective effect on disease induction. Interleukin 33 treatment further reduces the development of hyperglycemia in transgenic mice group. In experimental model of type 2 diabetes, transgenically enhanced galectin-3 in β cells has pro-inflammatory effect, accelerating β cell damage after 16 weeks of high fat diet. *In vitro* results indicated that transgenically enhanced galectin-3 expression in β cells has a prooxidant effect, while results after stimulation with metabolically and immune harmful factors showed a significant pro-inflammatory effect of enhanced galectin-3 in β cells.

Conclusion: It seems that the effect of transgenically increased expression of galectin-3 in β cells can be twofold, from protective to pro-inflammatory. The end effect depends on the type of harmful factor acting on the β cells, as well as the pathways that leads to damage to the β cells. The therapeutic effect of interleukin 33, after the development of hyperglycemia, is significantly pronounced in mice with transgenically enhanced galectin-3 expression in β cells.

Key words: enhanced expression of galectin-3, diabetes, oxidative stress, high fat diet, streptozotocin, β -cell apoptosis, interleukin 33, diabetes therapy.

САДРЖАЈ

УВОД.....	1
ДЕФИНИЦИЈА И ИСТОРИЈАТ ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ.....	2
ЕПИДЕМИОЛОГИЈА.....	2
КЛАСИФИКАЦИЈА ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ.....	3
<i>Тип 1 шећерне болести.....</i>	<i>4</i>
Патогенеза типа 1 шећерне болести.....	4
<i>Тип 2 шећерне болести.....</i>	<i>7</i>
Тип 2 шећерне болести, гојазност и запаљење ниског степена.....	7
Патогенеза типа 2 шећерне болести.....	7
Инсулинска резистенција.....	8
Повећана продукција глукозе у јетри.....	8
Повећана реапсорпција глукозе у бубрежним тубулама.....	8
Спланхични регион.....	9
Смањено преузимање глукозе од стране периферних ткива.....	9
Централна инсулинска резистенција.....	9
Слободне масне киселине и патогенеза типа 2 шећерне болести.....	10
<i>Гестациска шећерна болест.....</i>	<i>11</i>
<i>Други специфични типови шећерне болести.....</i>	<i>12</i>
Моногенетски тип шећерне болести.....	12
Шећерна болест узрокована болестима егзокриног панкреаса.....	12
Шећерна болест узрокована ефектом хормона и применом лекова.....	13
Генетски синдроми.....	13
ГАЛЕКТИНИ.....	14
<i>Галектин-3.....</i>	<i>15</i>
Локализација.....	15
Лиганди за галектин-3.....	15
Секреција галектина-3.....	16
<i>Улога галектина-3 у патогенези шећерне болести.....</i>	<i>16</i>
Галектин-3 доводи до развоја тежег облика типа 2 шећерне болести.....	16
Галактин-3 доводи до развоја блажег облика типа 2 шећерне болести.....	17
<i>Улога галектина-3 у развоју других болести.....</i>	<i>18</i>
Атеросклероза.....	18
Болести срца.....	18
Срчани синдром Х.....	19
Гојазност.....	20
Запаљење.....	20
Бронхијална астма.....	21
Неалкохолни стеатохепатитис.....	22
<i>Интерлеукин 33.....</i>	<i>23</i>
Биолошке функције IL-33.....	24
Улога IL-33 у патогенези шећерне болести.....	25
ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	26

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЗАДАЦИ.....	28
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	29
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	30
<i>Методологија добијања мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама</i>	<i>31</i>
<i>Потврда генотипа трансгених мишева методом ланчане реакције полимеразе</i>	<i>32</i>
ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИП 1 И ТИП 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ.....	34
ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА	35
ОДРЕЂИВАЊЕ ВРЕДНОСТИ СОЛУБИЛНОГ ГАЛЕКТИНА-3 У СЕРУМУ.....	36
АНАЛИЗА ПАТОХИСТОЛОШКИХ ПРОМЕНА НА ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА	37
<i>Бојење хематоксилин– еозин хистохемијском техником.....</i>	<i>37</i>
Квантификација и скорирање	38
<i>Имунохистохемија.....</i>	<i>39</i>
АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ИЗ ТКИВА ПАНКРЕАСНИХ ОСТРВАЦА	41
<i>Изолација РНК из панкреасних острваца ex vivo</i>	<i>41</i>
<i>Реакција реверзне транскрипције</i>	<i>41</i>
Квантификација експресије гена	42
ФЕНОТИПСКА АНАЛИЗА ЋЕЛИЈА ПАНКРЕАСНИХ ОСТРВАЦА И ПРИПАДАЈУЋИХ ЛИМФНИХ ЧВОРОВА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ	43
<i>Бојење маркера на повшини ћелија</i>	<i>43</i>
<i>Бојење маркера унутар ћелија.....</i>	<i>44</i>
МЕТОДОЛОГИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА ИЗОЛОВАНИМ ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА IN VITRO	49
<i>Третирање панкреасних острваца палмитинском киселином и проинфламацијским цитокинима</i>	<i>49</i>
<i>Одређивање параметара оксидативног стреса у панкреасним острвцима након стимулације имунских и метаболичким ноксама</i>	<i>49</i>
СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ КОРИШЋЕНЕ ЗА ИНТЕРПЕТАЦИЈУ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА 51	
РЕЗУЛТАТИ	52
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ТИП 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ	53
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на промене телесне масе мишева, док смањује пораст хипергликемије, гликозурије и кетонурије након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина.....</i>	<i>53</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама доводи до појаве значајно виших вредности инсулинемија при значајно нижим вредностима гликемија наше, не утичући на концентрацију солубилног галектина-3 у серуму, након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина</i>	<i>55</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, подстиче развој блажег облика инсулитиса након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина</i>	<i>57</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, не утиче на концентрацију инсулина у панкреасним острвцима, након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина.....</i>	<i>59</i>

<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, доводи до веће заступљености укупних помоћничких Т лимфоцита али знатно мање заступљености прозапаљенских ћелија у острвцима након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина.....</i>	<i>61</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, доводи до значајно мање заступљености прозапаљенских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима, након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина.....</i>	<i>66</i>
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ТИП 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ	71
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на развој гојазности након 16 недеља исхране богате мастима.....</i>	<i>71</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на развој повишене гликемије наите али повећава осетљивост на оптерећење глукозом у свим временским периодима ipГТТ теста, након 16 недеља исхране богате мастима.....</i>	<i>73</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама повећава концентрацију солубилног галектина-3 и доводи до појаве значајно виших вредности инсулинемија и степена инсулинске резистенције, при сличним вредностима гликемија наите након 16 недеља исхране богате мастима</i>	<i>75</i>
<i>Експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, као и концентрације солубилног галектина-3 су појачане након 16 недеља исхране богате мастима</i>	<i>77</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, подстиче развој тежег облика инсулитиса након 16 недеља исхране богате мастима.....</i>	<i>79</i>
<i>Повећана инфламација острвца код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 на β ћелијама је била удружена са поларизацијом макрофага ка М1 типу у панкреатичним лимфним чворовима.....</i>	<i>82</i>
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама, доводи до значајно већег оштећења β ћелија, након 16 недеља исхране богате мастима.....</i>	<i>84</i>
ЕФЕКАТ МЕТАБОЛИЧКИХ НОКСИ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ В ЋЕЛИЈА IN VITRO.....	87
<i>Стимулација изолованих ћелија прозапаљенских цитокинима значајно смањује % здравих ћелија острвца у in vitro условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса.....</i>	<i>87</i>
<i>Примена коктела прозапаљенских цитокина, палмитата и истовременим третирањем цитокинима палмитатом и повећаном вредношћу глукозе значајно повећава % ћелија острвца у стадијуму ране апоптозе у in vitro условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса.....</i>	<i>88</i>
<i>Примена коктела прозапаљенских цитокина, значајно повећава % ћелија острвца у стадијуму касне апоптозе у in vitro условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса.....</i>	<i>89</i>
<i>Примена палмитата значајно смањује проценат ћелија острвца у стадијуму некрозе у in vitro условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса.....</i>	<i>90</i>
ЕФЕКАТ МЕТАБОЛИЧКИХ И ИМУНСКИХ НОКСИ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА IN VITRO	93

<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем концентрације супероксид анјон радикала у острвцима, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат губи у поређењу са острвцима WT мишева .</i>	93
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно након стимулације метаболичким и имунским ноксама, мерењем концентрације водоник пероксида у острвцима у поређењу са острвцима WT мишева</i>	94
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем концентрације нитрита у острвцима, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат чак и појачава у поређењу са острвцима WT мишева</i>	95
<i>Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем нивоа липидне пероксидације, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат чак и појачава у поређењу са острвцима WT мишева.....</i>	96
ЕФЕКАТ ПРИМЕНЕ IL-33 У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ КОД МИШЕВА СА ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНОМ ЕКСПРЕСИЈОМ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА.....	97
<i>Примена IL-33 не утиче на промене у телесној маси, док значајно смањује развој хипергликемија наите, код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести.....</i>	97
<i>Примена IL-33 додатно смањује развој запаљења панкреасних острваца код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести</i>	101
<i>Примена IL-33 доводи до повећане заступљености регулаторних T ћелија а смањене заступљености прозапаљенских ћелија у дренираним панкреатичним лимфним чворовима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести.....</i>	103
ДИСКУСИЈА	107
ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ	108
ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА	113
ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА И ПРИМЕНЕ ЕГЗОГЕНОГ IL-33 У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ	120
ЗАКЉУЧАК.....	121
ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ.....	122
ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ.....	124
ЗАКЉУЧАК ИСТРАЖИВАЊА НА ИЗОЛОВАНИМ ОСТВРЦИМА IN VITRO	126
<i>Ефекат имунских и метаболичких нокси на оштећење β ћелија</i>	126
<i>Ефекат имунских и метаболичких нокси на степен оксидативног стреса у β ћелијама</i>	127
ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ СА ПРИМЕНОМ IL-33	128

УВОД

ДЕФИНИЦИЈА И ИСТОРИЈАТ ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Шећерна болест (лат. *diabetes mellitus*, DM) дефинише се као стање дуготрајне хипергликемије које настаје као последица апсолутног и/или релативног недостатка инсулина или изостанак његовог ефекта на периферним ткивима, а праћено је поремећајем метаболизма свих органских материја. Шећерна болести је вероватно један од најстаријих поремећаја здравља код људи који је први пут описан још пре 3000 година. (1)

Подела на тип 1 (енгл. *type 1 diabetes mellitus*, T1DM) и тип 2 шећерне болести (енгл. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM), први пут је уведена 1936. године. (2) Данас постоје различити типови шећерне болести али заједничку карактеристику свих облика представља недостатак инсулина или његовог ефекта на периферним ткивима што је праћено развојем хипергликемије. Код највећег броја оболелих, дијагностикован је T2DM, док је појава осталих типова шећерне болести значајно ређа. (3)

ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

Број оболелих од шећерне болести у свету драматично се повећава из године у годину. Глобално, 2011. године укупан број оболелих процењен је на око 366 милиона људи, при чему чак 90% овог броја чине болесници са T2DM. (4, 5) Пораст броја оболелих забележен је у свих земљама света али најзначајни пораст уочен је у сиромашним и средње развијеним земљама. (6) Иако се дијагноза шећерне болести поставља највећим делом одраслим особама, у последњих 20 година уочен је значајан пораст обољевања у дечијем узрасту, што раније није био случај. Раније су болесници у дечијем узрасту доминантно обољевали од T1DM док се у последњим деценијама T2DM у дечијем узрасту јавља знатно чешће, чак и до 45% случајева. (7) У педијатријској популацији преваленца је већа код деце женског пола у односу на децу мушког пола, баш као и код одраслих. (8) Просечна старост деце која оболевају од T2DM је од 12. до 16. године живота, животног доба који се поклапа са пубертетом, када физиолошки долази до развоја инсулинске резистенције. У оваквим условима, до развоја T2DM долази искључиво у случајевима поремећене функције β ћелија која је повезана са другим факторима, попут гојазности. (9) И поред глобалног повећања инциденце од T2DM свуда у свету, у појединим земљама попут Финске, из још увек непознатих разлога, болесници доминантно оболевају од T1DM (чак 37 оболелих на 105 људи по години). (10)

У овом тренутку, процењује се да чак 50% људи код којих је дошло до развоја неког од поремећаја метаболизма глукозе, нису препознати и није им постављена дијагноза. Управо ове особе, код којих поремећај метаболизма глукозе није препознат, имају повећан ризик од развоја компликација, те је потребно да буду што раније препознати, обухваћени скринингом и адекватно лечени. Ризик за развој шећерне болести расте са годинама живота, гојазношћу, физичком неактивношћу, као и другим факторима ризика. Процењује се да ће 2030. године, укупан број оболелих од шећерне болести бити око 552 милиона. (11)

КЛАСИФИКАЦИЈА ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Некада се шећерна болест класификовала у односу на потребу пацијента за коришћењем инсулина, те су постојале шећерна болест болесника чије преживљавање је било условљеном применом (инсулин зависан облик) и шећерна болест болесника чије преживљавање није зависило од примене инсулина (инсулин независни облик). Оваква подела била је доста збуњујућа са становишта проучавања узрока настанка болести, те је Светска здравствена организација донела нову поделу са становишта етиологије поремећаја на:

1. Тип 1 шећерне болести,
2. Тип 2 шећерне болести,
3. Гестацијски тип шећерне болести (енгл. *gestational diabetes*, GDM),
4. Друге специфичне типове. (12)

Тип 1 шећерне болести

T1DM настаје због значајног недостатка инсулина услед оштећења панкреасних β ћелија. Најчешће се јавља у дечијем узрасту и периоду адолесценције и обухвата 5-10% од укупног броја оболелих од шећерне болести. (13) Недостатак инсулина је последица прогресивног аутоимунског оштећења β ћелија, са клиничким манифестацијама које се јављају након асимптоматског периода који може трајати и неколико година. (14)

Услед деструкције β ћелија у организму, јавља се потпуни недостатак инсулина или долази до јако оскудне секреције инсулина што углавном води ка апсолутном недостатку инсулина. Иако етиологија настанка овог облика болести није потпуно разјашњена, сматра се да су главни фактори у настанку болести удружено дејство генетске предиспозиције и окидача из спољашње средине (као што су: вирусне инфекције, токсини или неки фактори повезани са исхраном). (15) Услед значајног недостатка инсулина, болесници са T1DM морају да добијају терапију егзогеног инсулина на дневном нивоу како би успели да одрже нормалне вредности гликемије у организму. Болесници који су на адекватној инсулинској терапији, који врше редовну контролу нивоа шећера у крви, примењују здрав начин исхране и здрав стил живота, могу живети дуго и могу одложити развој бројних компликација повезаних са шећерном болешћу.

Патогенеза типа 1 шећерне болести

Обзиром да је у питању аутоимунска болест, значајно место у патогенези болести имају ћелије имунског система. У патогенези T1DM главно место имају помоћнички Т лимфоцити, који након активације, покрећу ефекторске ћелије имунског система које уништавају здраве β ћелије. Да би се T1DM развио, у експерименталним моделима, као и код људи, на првом месту неопходан је одговор ћелија имунског система на антигене сопствених β ћелија. Након покретања одговора према сопственим β ћелијама, тај одговор треба да добије јаке прозапаљенске карактеристике. Посебан део у патогенези T1DM заузима поремећај контроле регулаторних ћелија које не успевају да супримирају одговор имунског система, услед чега одговор добија хроничан карактер и праћен је уништавањем β ћелија. (16)

Пирот и сарадници (енгл. *Pirot et al.*) су показали редослед догађаја у развоју овог спорог аутоимунског процеса. Након иницијалног оштећења одређеног процента β ћелија, који може настати на неколико начина, долази до активације локалних антиген презентујућих ћелија (енгл. *antigen presenting cells*, APC) које се налазе у самим панкреасним острвцима. Активирани APC сада одлазе у панкреатичне лимфне чворове и активирају CD4⁺ помагачке лимфоците презентацијом антигена β ћелија. Активације помагачких CD4⁺ лимфоцита узрокује ослобађање цитокина и хемокина који сада додатно активирају APC да секретују прозапаљенске цитокине и азот оксид. Секретовани цитокини делују на ендотелне ћелије крвних судова, које након активације стварају хемокине, додатно привлачући нове ћелије имунског система у панкреасна острвца али истовремено активирајући CD8⁺ цитотоксичне Т лимфоците. β ћелије такође могу, као одговор на вирусне инфекције или претходно секретоване цитокине, да секретују хемокине, додатно повећавајући регрутовање и долазак ћелија имунског система. Активирани CD8⁺ цитотоксични Т лимфоцити, као ефекторске ћелије, изазивају апоптозу β ћелија. Овај ефекат цитотоксични Т лимфоцити остварују преко Fas лиганда који се везује за Fas рецептор на површини β ћелија. Након активације Fas рецептора на

површини β ћелија долази до активације прокаспазе, која затим покреће каскадни систем различитих молекула што доводи до апоптозе β ћелија.

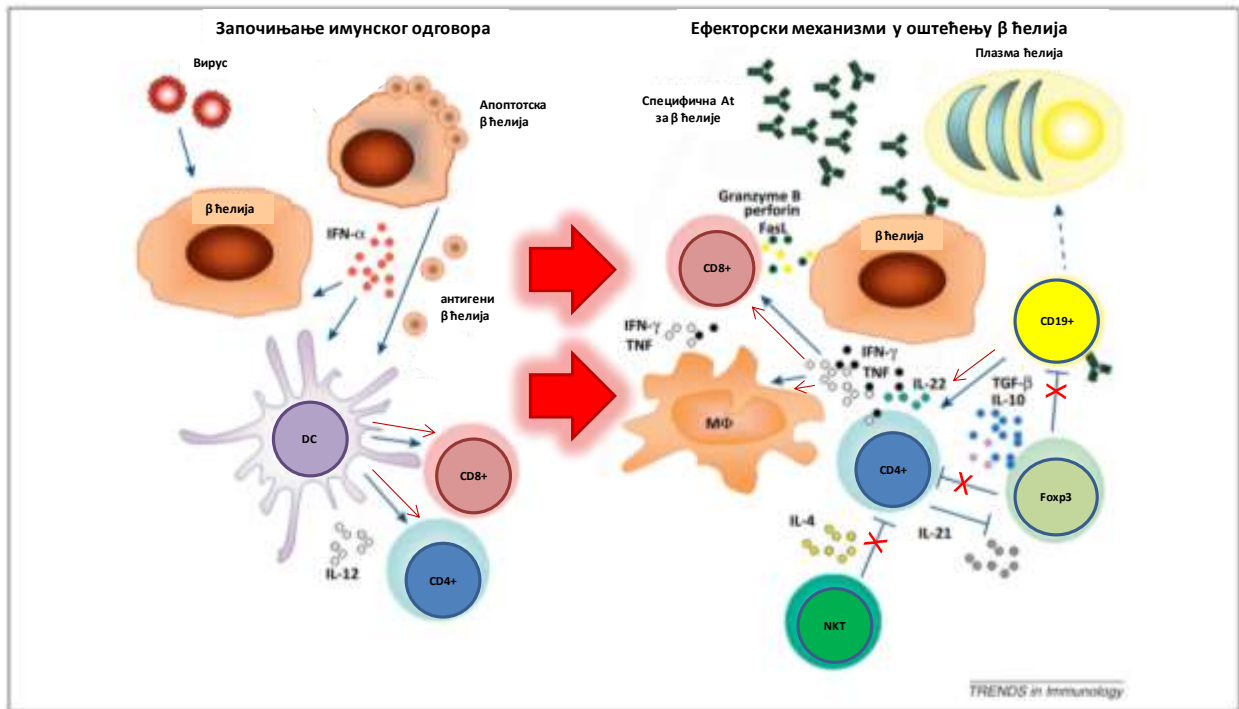
Други механизам индукције апоптозе β ћелија од стране активираних CD8+ цитотоксичних Т лимфоцита представља секреција перфорина и гранзима. Перфорини, након ослобађања узрокују оштећења мембране β ћелија преко Ca^{2+} зависног механизма, а затим омогућавају да гранзими уђу у ћелију. Након уласка гранзима у ћелију долази до активације ефекторске каспазе 3 која активира програмирану ћелијску смрт. (17)

Други механизми активирања програмиране ћелијске смрти β ћелија посредовани су секретованим прозапаљенским цитокинима.

Интерлеукин 1 β (енгл. *interleukin 1 beta*, IL-1 β) везивањем за рецептор на β ћелијама, условљава активацију већег броја каскадних молекула у ћелији што као крајњи ефекат има активацију нуклеарног фактора κB (енгл. *nuclear factor kappa b*, NF- κB) који води ћелију у правцу апоптозе. (17) IL-1 β представља прототип медијатора урођеног имунитета, са вишеструким биолошким функцијама. (18) Јако дуго је познато да су панкреасне β ћелије осетљивије на ефекат IL-1 β у поређењу са другим ћелијама, делимично због веће густине рецептора за IL-1 β на њима и појединих сигналних путева у самим ћелијама. (19) Дакле, услед овог сазнања постављена је хипотеза да блокада IL-1 β може имати а протективан ефекат на очување β ћелија. Међутим, овај потенцијални ефекат блокаде IL-1 β није потврђен код NOD мишева (енгл. *non obese diabetic mice*, NOD мишева) и пацијената са T1DM. (20) Без сумње, IL-1 β сигнали олакшавају оштећење β ћелија, међутим, њихову улогу у патогенези T1DM потребно је додатно истражити. (21)

Фактор туморске некрозе α (енгл. *tumor-necrosis factor alpha*, TNF- α) на два начина активира апоптозу β ћелија. Први начин је активацијом рецептора на β ћелијама којом условљава преношење сигнала и активацију прокаспазе 8. Други начин је да активацијом већег броја каскадних молекула условљава активацију NF- κB који даље води у апоптозу. (17) Ране студије су описале присуство TNF- α створеног од стране дендритских ћелија и макрофага у ћелијском инфилтрату панкреасних острваца, и показале су да су ове ћелије били почетни и главни произвођачи TNF- α . (22) Показано је да TNF- α увећава експресију МНС молекула класе I (енгл. *major histocompatibility complex 1*, МНС I), убрзавајући тако апоптозу β ћелија, (23) као и индукцију унакрсне презентације антигена β ћелија CD8+ Т ћелијама. (24) Друге студије су показале, да је TNF- α убрзава сазревање дендритских ћелија које су способне да активирају Т ћелије у панкреатичним лимфним чворовима. (25) Ови подаци указују да TNF- α игра важну улогу у покретању T1DM.

Интерферон γ (енгл. *interferon gamma*, IFN- γ) секретован од стране помоћничких Т ћелија, директно, без активације других ћелија, може да доведе до апоптозе β ћелија. Директним везивањем за рецептор на β ћелијама доводи до активације јанус киназе и STAT-1 молекула који затим одлази у једру и мења активност каспаза, чија активација води у апоптозу. (17) Чини се да IFN- γ , који се обично сматра прозапаљенским цитокином, може да има двоструко улогу у развоју T1DM. Откривено је да способност IFN- γ да промовише T1DM зависи од дозе и времена интервенције у односу на развој болести код NOD мишева. (26) Међутим, овај цитокин такође посредује у уништавању β ћелија у панкреасним острвцима. IFN- γ индукује експресију МНС I и МНС II (енгл. *major histocompatibility complex*, МНС) молекула у панкреасним ћелијама, преко којих запаљенски процес може оштетити β ћелије. (27, 28)



Слика 1. Иmunски механизми укључени у деструкцију β ћелија

Дендритске ћелије су присутне у острвцима и спремне да преузму ослобођене антигене оштећених β ћелија. Ослобађање прозапаљенских цитокина попут типа 1 интерферона (IFN), као последица вирусне инфекције или одговора ћелија на стрес може да промени одговор β ћелија на деловање цитокина које стварају Т ћелије, попут интерлеукина 22 (IL-22). Интерферони типа 1 такође активирају дендритске ћелије и промовишу презентацију антигена β ћелија Т ћелијама. Дендритске ћелије затим могу активирати CD4+ Т ћелије, које промовишу уништавање β ћелија посредовано макрофагама преко продукције цитокина и реактивних врсте кисеоника. CD4+ Т ћелије такође могу активирати и антиген специфичне В ћелије у острвцима, тако да се диференцирају у плазма ћелије које стварају антитела. Антитела могу да се вежу за β ћелије, и посредују у оштећењу β ћелија другим ефекторским механизмима попут система комплемента. Са друге стране, активирани В ћелије могу функционисати и као антиген презентујуће ћелије, додатно појачавајући имунски одговор на β ћелије. Интеракција са β ћелијама антиген специфичних CD4+ Т ћелија и присуство прозапаљенских цитокина омогућавају дендритским ћелијама да присутне антигене β ћелија прикажу и антиген специфичним CD8+ Т ћелијама. Ове CD8+ Т ћелије могу уништити β ћелије ослобађањем својих гранула, које садрже перфорице и гранзиме, или путем Fas - FasL интеракције. Ови имунски механизми се могу ублажити помоћу појединих подгрупа регулаторних ћелија, као што су Foxp3+ регулаторне Т (Treg) ћелије. (модификовано према *Wällberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. Trends Immunol. 2013;34(12):583-591.*)

Тип 2 шећерне болести

Тип 2 шећерне болести, гојазност и запаљење ниског степена

Код највећег процента болесника са T2DM, гојазних болесника, уочава се повећање укупног броја, као и величине масних ћелија уз развој резистенције адипоцита на физиолошки, антилиполитички, ефекат инсулина. (29) Код оваких болесника уочено је и знатно повећање количине висцералног масног ткива, (30) а познато је да су висцерални адипоцити посебно резистентни на ефекат инсулина. (31) Код гојазних болесника као и код болесника са T2DM, уочена је повећана средња концентрација слободних масних киселина у плазми (енгл. *free fatty acids*, FFA). Повишени нивои FFA у плазми, уз повећан садржај триглицерида/масног ацил ЦоА у мишићима, јетри и β ћелијама, доводе до развоја мишићне, односно хепатичке инсулинске резистенције. Поједине студије препознале су да је хронично запаљење ниског степена, које је праћено активацијом ћелија имунског система, укључено у патогенезу инсулинске резистенције повезане са гојазношћу и T2DM. Масно ткиво, јетра, мишићи и панкреас представљају места запаљења ниског степена у стању гојазности. Инфилтрација макрофага и других имунских ћелија, као и присуство прозапаљенских цитокина у овим ткивима, повезана је са развојем инсулинске резистенције и оштећењем β ћелија. Ослобођени цитокини истовремено остварују ефекат и на ендотел, узрокујући ендотелну дисфункцију и промене у капиларној пропустљивости, које затим утичу на ефекат инсулина у периферним ткивима. (32)

Патогенеза типа 2 шећерне болести

Када говоримо о патофизиологији T2DM постоји више значајних поремећаја који су повезани са развојем болести. Одавно је познато да смањено преузимање глукозе од периферних ткива (углавном мишића), комбиновано са поремећајем ендogene секреције глукозе, представља главну карактеристику резистенције на инсулин. Повећан степен липолизе, праћен повећањем FFA и накупљањем липидних метаболита, узрокује даље повећање поремећаја у стварању глукозе, смањење искоришћавања глукозе у периферним ткивима и поремећају функције β ћелија. Компензаторна хиперинсулинемија у почетном стадијуму поремећаја, успева да одржи нормалне вредности глукозе у крви али обзиром да је функција β ћелија већ тада поремећена, додатно оптерећење условљава додатно погоршање функције β ћелија и секреције инсулина. Истовремено долази до неодговарајуће (повећане) секреције глукагона у α ћелијама панкреасних острваца. Сматра се да је поремећај (смањена секреција) на нивоу инкретинског одговора (стварања специфичних хормона у гастроинтестиналном тракту током јела и варења хране) одговоран за смањено лучење инсулина уз истовремено повећање лучења глукагона. Такође, централна инсулинска резистенција (хипоталамичка – као део централног нервног система) мења способност секретованог инсулина да блокира стварање глукозе. У T2DM долази и до поремећеног капацитета реапсорције глукозе на нивоу бубрежних тубула током стања хипергликемије. (32)

Инсулинска резистенција

Одржавање нормалног метаболизма глукозе у телу условљено је нормалним одговором β ћелија на стање хипергликемије и последичном секрецијом инсулина уз нормалну сензитивност периферних ткива. Комбиновањем ова два механизма омогућава се улазак глукозе у ћелије. Међутим, коначни ефекат зависи од следећа три механизма:

- супресије ендогеног стварања глукозе (јетра 80 % и бубрези 20%),
- стимулације преузимања глукозе од стране ћелија и ткива спланхичне регије (јетра и гастроинтестинални систем)
- стимулације преузимања глукозе од стране периферних ткива (доминантно мишића). (33, 34)

У T2DM јавља се смањено преузимање глукозе у периферна ткива, повећана секреција глукагона, повећано стварање глукозе у јетри и бубрежним тубулима, док комбинација свих ових поремећаја води развоју хипергликемије.

Повећана продукција глукозе у јетри

Након оброка, током нормалног апсорбовања и уласка глукозе у крв, долази со секреције инсулина уз истовремену инхибицију секреције глукагона. Порталним крвотоком, инсулин доспева у јетру где блокира синтезу глукозе и омогућава преузимање глукозе апсорбоване из оброка. Међутим, уколико не дође до секреције инсулина или се он нормано секретује али изостане физиолошки одговор јетре на инсулин, не долази до блокаде стварања глукозе у јетри. Последица таквог стања је да поред иначе високих постпрандијалних вредности глукозе у крви и јетра покреће механизме стварања глукозе, што додатно повећава ниво глукозе у крви. Код пацијената са T2DM доказана је повећана продукција глукозе у јетри у односу на здраве особе. У јетри, глукоза настаје активирањем два механизма, процесима гликогенолизе и глуконеогенезе. (35, 36) Механизми који узрокују повећање глуконеогенезе у јетри су повезани са хиперглукагонемијом (37), повећаним вредностима глуконеогенетских прекурсора (лактата, аланина, глицерола) (38), повећаном оксидацијом FFA (29, 39, 40), појачаном осетљивошћу на глукагон (41) и смањеном осетљивошћу хепатоцита на инсулин. (42, 43)

Повећана реансорпција глукозе у бубрежним тубулима

Данас је познато да бубрези имају веома значајну улогу у одржавању метаболизма глукозе, јер чак са 20% учествују у ендогеним процесима стварања глукозе у телу. (44, 45) Код пацијената са T2DM процес глуконеогенезе је значајно заступљенији у односу на здраве особе. (46) У стању хипергликемије и повећане концентрације глукозе на нивоу проксималног тубула, долази до повећања капацитета натријум глукоса котранспортера-2 што за последицу има повећану реансорпцију глукозе и њено поновно враћање у крв. Овај механизам прилагођавања тубула, односно натријум глукоса котранспортера-2, представља додатни механизам који не сме бити занемарен јер значајно доприноси развоју стања хипергликемије.

Спланхични регион

У стању након апсорпције глукозе, из спланхичног региона физиолошки постоји отпуштање глукозе. У акутном одговору на секрецију инсулина, отпуштање глукозе из овог региона је блокирано, као и у јетри. (47) У стањима продужене хипергликемије и даље постоји благо преузимање глукозе. Ово преузимање је идентично степену преузимања у базалном стању што јасно указује да ткиво спланхичног региона има смањену осетљивост на инсулин, барем када је у питању стимулација преузимања глукозе. (47, 48)

Смањено преузимање глукозе од стране периферних ткива

Мишићи представљају главно место преузимања глукозе из крви код људи. (33, 48, 49) Поједине студије показале су да се око 80% укупног преузимања глукозе дешава у скелетним мишићима. (33, 48) Код пацијената са T2DM налазимо одложен почетак деловања инсулина чак до 40 минута, што представља изразито успорен ефекат, а укупно смањење преузимања глукозе достиже чак до 50% у односу на преузимање нормалне особе. (46) Ови резултати дају јасан доказ да је главно место настанка инсулинске резистенције управо скелетно мишићно ткиво.

Настанак инсулинске резистенције укључује поремећаје метаболизма угљених хидрата у јетри и периферним ткивима. У базалним условима, јетра, представља главни орган за регулацију гликемије. Развој инсулинске резистенције манифестује се прекомерним стварањем глукозе у јетри и поред постојања хипергликемије и хиперинсулинемије наште. Поред јетре, функција периферних ткива има значајно место у преузимању и метаболисању глукозе. Физиолошки, у стању хипергликемије преузимање глукозе од стране периферних ткива је повећано, али након развоја инсулинске резистенције запажа се значајно смањење ефикасности преузимања глукозе. Поред хипергликемије, хиперинсулинемија такође има значајно место у развоју инсулинске резистенције. Код болесника са T2DM значајан део поремећаја метаболизма глукозе, који је повезан са смањеним ефектом инсулина, припада дефекту у преузимању од стране мишића. (32)

Централна инсулинска резистенција

Поједине студије показале су да промене у сигналу инсулина на хипоталамус могу имати последице на ендогено стварање глукозе. Активација инсулинског рецептора у трећој можданој комори, може да доведе до супресије продукције глукозе независно од вредности инсулинемија. Међутим, овај сигнал може да утиче и на могућност да инсулин блокира стварање глукозе у другим органима. (48, 49)

Слободне масне киселине и патогенеза типа 2 шећерне болести

Највећи проценат болесника са T2DM су гојазни болесници (преко 80%). (50) Код мршавих болесника са T2DM уочено је да током дана постоје периоди дуготрајне елевације нивоа FFA у плазми, који не успевају да утичу на нов унос хране (било глукозе или уравнотеженог оброка). Код гојазних болесника са T2DM овај ефекат је још израженији. (51) FFA су складиштене (у форми триглицерида) у адипоцитима и представљају значајан извор енергије у периодима гладовања. Физиолошки, инсулин представља потентан инхибитор липолизе, блокирајући ензим липопротеинску липазу.

У T2DM способност инсулина да инхибира липолизу је смањена. (52) Препознато је да хронично повишене концентрације FFA у плазми, могу довести до резистенције на инсулин у мишићима и јетри (53-55) али и нарушити саму секрецију инсулина (56, 57) Повишени нивои FFA у плазми могу погоршати три главна поремећаја који су одговорни за настанак поремећене хомеостазе глукозе код болесника са T2DM. (58) У условима повишеног нивоа FFA у плазми, долази до накупљања триглицерида у мишићима (59, 60) и јетри (61, 62) што повећава процентуалну заступљеност масти у овим органима и доводи до развоја инсулинске резистенције. Овај след догађаја назива се липотоксичност која поред наведених ткива оштећује и ендокрини панкреас, односно саме β ћелије. (54, 63)

Гестациска шећерна болест

GDM (енг, *Gestational diabetes mellitus*, GDM) је честа компликација трудноће, код које се хипергликемија развија спонтано. (64) Ова хипергликемија настаје као резултат нарушене толеранције глукозе услед поремећаја функције β ћелија, обично настале на претходном постојању хроничног поремећаја инсулинске сензитивности. Фактори ризика за GDM укључују прекомерну тежину и гојазност, године трудноће и позитивну породичну историју за шећерну болест. Последице GDM-а укључују повећани ризик за мајку од развоја кардиоваскуларних болести, T2DM, макросомије као и различитих компликација у току или након порођаја. GDM се јавља код неких 16,5% трудноћа широм света, са тенденцијом повећања услед епидемије гојазности на светском нивоу. (65)

Током здраве трудноће, мајчино тело пролази кроз низ физиолошких промена како би успело да испуни захтеве за раст и развој фетуса. Ове промене укључују адаптацију кардиоваскуларног, реналног, хематолошког, респираторног система, али и самог метаболизма. Једна важна метаболичка адаптација у телу трудноће, представља промену инсулинске осетљивости. Током гестације, осетљивост на инсулин се мења у зависности од захтева трудноће. Током ране трудноће, повећава се инсулинска осетљивост, промовишући унос глукозе у масне ћелије са циљем адекватне припреме за енергетске потребе током каснијих фаза трудноће. (66) Међутим, како трудноћа напредује, пораст концентрације локалних и плацентних хормона, укључујући естроген, прогестерон, лептин, кортизол, плацентни лактоген и плацентни хормон раста, заједно подстичу развој инсулинске резистенције. (67) Као резултат наведеног пораста продукције наведених хормона, глукоза у крви је благо повишена и лако се преноси кроз плаценталну баријеру да би подстакла раст фетуса. Ово благо стање отпорности на инсулин промовише производњу ендogene глукозе и разградњу масних наслага, што доводи до даљег повећања концентрације глукозе али и FFA у крви. (68) Током гестациског дијабетеса, β ћелије не успевају да компензују повећане захтеве и у комбинацији са смањеном осетљивошћу на инсулин, односно повећаном резистенцијом на инсулин, настаје хипергликемија. Након трудноће, функција β ћелија, концентрација глукозе у крви и инсулинска осетљивост могу се вратити у физиолошке оквире или се поремећаји могу одржати, што може водити ка новом GDM (у будућим трудноћама) или развоју T2DM. Бројни органи и органски системи, као што су мозак, масно ткиво, јетра, мишићи и постелица, различитим механизмима доприносе настанку GDM.

Други специфични типови шећерне болести

Моногенетски тип шећерне болести

Откривање и класификовање генетске етиологије шећерне болести омогућава адекватнији и бољи третман, бољу прогнозу и саветовање таквих болесника. (69) Моногени тип шећерне болести, последица је генетског дефекта у појединим генима β ћелија што доводи до поремећаја функције самих β ћелија или смањењу укупног броја β ћелија. Појава шећерне болести код младих, са почетком сазревања (енгл. *maturity onset diabetes of the young*, MODY), представља групу моногених поремећаја које карактерише аутозомно доминантно наслеђени облик шећерне болести који није инсулин зависан. Оваква форма шећерне болести најчешће се јавља у адолесценцији или код младих особа пре 25. године живота. MODY је редак узрок шећерне болести (1% свих случајева) и често се погрешно дијагностикује као T1DM или T2DM. Прецизна молекуларна анализа и дијагностика су неопходни јер доводе до оптималног третмана пацијената и омогућавају постављање ране дијагнозе код чланова породице који су без симптома. (70) Моногени дијабетес је класификован према времену настанка болести и првих симптома на неонатални дијабетес (настао пре старости од шест месеци) или почетни дијабетес код младих (пре старости од 25 година). (71)

Диференцијација β ћелија зависи од експресије транскрипционог фактора PDX1 (енгл. *insulin promoter factor 1*), у самим β ћелијама, где мутација овог гена која је праћена смањеном експресијом PDX1 условљава рани почетак овог типа шећерне болести. (72) Митохондријска шећерна болест је последица тачкасте мутације у митохондријској дезоксирибонуклеинској киселини (ДНК) која је повезана са настанком глувоће, а настаје наслеђивањем мутантне ДНК од мајке. (73) Мутације које доводе до стварања поремећеног инсулина или немогућности претварања проинсулина у инсулин, доводе до поремећене толеранције глукозе. Показало се да генетски дефекти инсулинског рецептора или пута сигналне трансдукције инсулинског рецептора доводе до хиперинсулинемије и хипергликемија ниског степена, али некада чак и до тешких хипергликемија. (1)

Шећерна болест узрокована болестима егзокриног панкреаса

Оштећење β ћелија услед дифузних повреда панкреаса може изазвати шећерну болест. Ова оштећења могу настати услед карцинома панкреаса, панкреатитиса, инфекције, панкреатектомије и трауме. (1) Атрофија егзокриног панкреаса праћена је прогресивним губитком и β ћелија. (74) Накупљање масти у паренхиму панкреаса или стеатоза панкреаса, може довести до шећерне болести услед смањене секреције инсулина и може се јавити много раније од настанка оштећење β ћелија. (75) У већини случајева неопходно је обимно оштећење панкреаса које ће довести до настанка шећерне болести, а које је истовремено праћено смањењем егзокрине функције панкреаса. (76)

Шећерна болест узрокована ефектом хормона и применом лекова

Шећерна болест уочена је и код болесника са различитим ендокриним болестима у којима долази до стварања и ослобађања високих новоа хормона. Међу најзаступљенијим ендокринопатијама доминирају акромегалија (узрокована повећаним нивоом хормона раста), Кушингов синдром и болест (праћених повећаним нивоом глукокортикоида и/или хипофизеотропних хормона), глукагоном (праћен повећаним нивоом глукагона) и феохромоцитом (праћен повећаним нивоом катехоламина). (1) Неки од ових хормона користе се и у терапијске сврхе, као лекови у лечењу других болести. Најбољи примери су употреба глукокортикоида за супримирање функција имунског система, хормона раста за лечење деце са патуљастим растом, те са њиховом применом треба бити опрезан.

Генетски синдроми

Шећерна болест је откривена и код пацијената са различитим генетским синдромима као што су Даунов синдром, Клинефелтеров синдром, Тарнеров синдром и Волфрамов синдром. (1)

ГАЛЕКТИНИ

Галектини представљају породицу широко распрострањених лектина. Код сисара је до сада идентификовано укупно 15 галектина, који садрже или један или два конзервирана домена, односно места помоћу којих препознају и везују угљене хидрате (енгл. *carbohydrate recognising domen*, CRD) који су дужине од 130 аминокиселина. (77-79) Поред овог домена, којим остварују бројне функције, на молекулу галектина постоје и друга места за везивање. (80, 81) Стварају се у цитоплазми и интереагују са гликанима на површини ћелија пратећи њихову секрецију неklasичним егзоцитозним путем, вероватно егзозомски посредованим секреторним путем. (82, 83) Сахариди су кључни молекули из којих се добија енергија у различитим метаболичким путевима. Обзиром да ступају у интерреакције са протеинима и липидима, у процесу стварања гликолипида и гликопротеина, током којих их мењају, утичу на различите биолошке ефекте (унутар и ван ћелије) новостворених молекула. Стога није изненађујуће, да су лектини који везују групе шећера, важни модулатори многих процеса а истовремено и кључни функционални молекули у другим процесима. (84) Иако је везивање угљених хидрата најчешћа функција галектина, галектини могу да ступају у реакције и са другим протеинима независно од CRD. (85)

Постоје три различита фамилије галектина, подељене према грађи и саставу. У фамилију која представља прототип галектина, коју карактерише само један CRD, спадају галектин-1, галектин-2, галектин-5, галектин-7, галектин-10, галектин-11, галектин-13, галектин-14, и галектин-15. Представници ове фамилије могу формирати хомодимере. Другу фамилију, тандем понављајућих галектина, у чији састав улазе два CRD, чине галектин-4, галектин-6, галектин-8, галектин-9 и галектин-12. Трећу фамилију химера галектина, галектина који могу да се комбинују и формирају пентамер, чини галектин-3. Поред CRD домена, галектин-3 има и N терминални домен који му омогућава да формира пентамере. (86)

Способност галектина да у мрежу спајају гликозилиране лиганде омогућава им да формирају динамичку решетку. Галектинска динамична решетка регулише различите функције у организму као што су дифузија, промена ћелијских одељака, ендоцитоза гликопротеина и гликолипида мембрана, активација и заустављање T ћелија, сигнализирање киназе рецептора и функционалност мембранских рецептора. (87) Поједини галектини могу везати за себе бактерије, директно доводећи до њихове аглутинације без помоћи других ефекторских механизма попут система комплемента. (88) Иако су галектини доминатно цитоплазматски протеини, постоје бројни докази о њиховој секрецији из ћелија преко неklasичних путева или о њиховој транслокацији у једро.

Галектини могу често бити како негативни тако и позитивни модулатори многих процеса, на шта указује заступљеност у различитим изоформама, бројне посттранслационе модификације или комолекуле са којима ступају у контакт, као и различита ћелијска локализација. (84)

Галектин-3

Једини члан фамилије химера типа представља галектин-3. (89) Ген који кодира галектин-3 састоји се од пет интрона и шест егзона (хумани локус 14к21-22). Галектин-3 (т.т. 31 кДа) је мономер са два функционална домена. (90-92) До сада је јединствен у фамилији са екстра дугим и флексибилним N-терминалним доменом у чији састав улази 100 до 150 аминокиселинских остатака, састављених од репетитивне секвенце од девет аминокиселинских остатака богатих пролином, глицином, тирозином и глутамином, док им недостају набијени или велики бочни ланац хидрофобних остатака. (90, 91) N-терминални домен садржи места за фосфорилацију Сер 6, Сер 12 (93, 94) и друге детерминанте важне за секрецију лектина помоћу неklasичног механизма (95) док се C-крај CRD, састоји од око 135 аминокиселинских остатака. Галектин-3, делује као рецептор који везује молекуле - лиганде који садрже секвенце поли-N ацетилактосамина који се састоје од многих дисахаридних јединица. Међутим, чини се да галектин-3 има повећани афинитет за везивање комплекснијих олигосахарида. (96) Јединствени је галектин који је у стању да пентамеризује са другим молекулима. Има специфичну плеотропну биолошку функцију и као такав игра важну улогу у многим физиолошким и патолошким процесима.

Локализација

Галектин-3 је свеprisутно експримиран у ткивима. Експерименти изведени на мишевима током ембриогенезе показали су да његова експресија зависи од ткива и времена испитивања. Углавном је експримиран на епителним ћелијама и мијелоидним ћелијама, мада је детектован и у ћелијама ока, бубрежног ткива, панкреаса, изводних канала плувачних жлезда, као и интрахепатичним жучним каналима. Може се наћи и на фибробластима, хондроцитима, као и на остеобластима, остеокластима, кератиноцитима, Шванновим ћелијама, затим на слuzници желуца, ендотелним ћелијама у различитим ткивима и органима. (97) Постоје бројни подаци о експресији и ефекту галектина-3 у ћелијама имунског система и ћелијама укљученим у имунски одговор, као што су неутрофили, еозинофили, базофили и мастоцити, дендритске ћелије, као и моноцити и макрофаге из различитих ткива. Код појединих типова ћелија, као што су лимфоцити, галектин-3 се физиолошки не приказује, али његова експресија може бити индукована различитим стимулусима. (82)

Лиганди за галектин-3

Постоје бројни лиганди за галектин-3 и могу се поделити на једарне, цитоплазматске и екстраћелијске лиганде. (98) Лиганди који се везују за галектин-3 учествују у многим физиолошким процесима у организму. Једарни лиганди су повезани са спајањем и функцијом информационе рибонуклеинске киселине (иРНК) (99, 100) индукцијом ћелијске смрти (101, 102) Интраћелијски лиганди углавном су повезани са контролом и покретањем механизма апоптозе. (103) Екстраћелијски лиганди углавном су повезани са функцијом ћелија имунског система или ћелијском адхезијом. (104, 105)

Секреција галектина-3

Галектин-3 се синтетише у слободним рибозомима у цитоплазми ћелија и нема никакву повезаност са транспортом у ендоплазматски ретикулум (ЕР). (82) Иако не користи уобичајене ћелијске механизме за секрецију, ендоплазматски ретикулум и Голџијев комплекс, постоје бројни докази да се галектин-3 налази изван ћелије. Показано је да се из ћелија излучује новим, непотпуно разумљивим механизмом званим ектоцитоза, који је независан од класичног секреторног пута. (82, 106) Откривено је да кратки сегмент N терминалне секвенце галектина-3 који садржи остатке 89–96 аминокиселина (Тир-Про-Сер-Ала-Про-Гли-Ала-Тир) игра кључну улогу у излучивању ван ћелије. Међутим, ова секвенца сама по себи, није довољна да изазове директно излучивање САТ фузионог протеина, што указује на то да до секреције долази једино у садејству са N терминалном секвенцом. (95) Имунохистохемијске студије, које су се бавиле овим проблемом, показале су да је први корак у излучивању галектина-3 његова акумулација на цитоплазматској страни плазма мембране. (106-108)

Улога галектина-3 у патогенези шећерне болести

Улога галектина-3 у патогенези шећерне болести и настанку њених компликација и даље је област која се истражује. Неколико студија је указало на то да је галектин-3 укључен у регулацију хомеостазе глукозе деловањем на нивоу функције масног ткива и панкреасних острваца, и да на тај начин учествује у настанку гојазности и T2DM. У литератури постоје често супростављени резултати о улогама галектина-3 у патогенези T2DM. У неким истраживањима галектин-3 показао је заштитни ефекат, док је у другим студијама показано да је удружен са развојем тежег облика болести. (109)

Галектин-3 доводи до развоја тежег облика типа 2 шећерне болести

Студије које су испитивале системски ефекат галектина-3 код гојазних људи и болесника са T2DM, показале су да је системски галектин-3 повећан код ових пацијената и да негативно корелира са вредностима гликолизираног хемоглобина. (110) Велика студија спроведена у Кини, показала је да су повећане вредности галектина-3 у серуму болесника са T2DM, повезане са већом шансом за развој срчане инсуфицијенције и компликација шећерне болести попут нефропатије и болести периферних артерија. (111-113) Друге студије показале су да се галектин-3 може сматрати маркером за предиабетес. (114)

Резултати студија на мишевима у експерименталном моделу T2DM били су у сагласности са истраживањима спроведеним на људима. У експерименталним моделима на мишевима, у којима је хипергликемија изазвана дуготрајном исхраном високим садржајем масти, виђено је значајно троструко повећање степена резистенције на инсулин, одређено проценом индекса инсулинске резистенције (НОМА-IR), и такође је указано да је експресија галектина-3 повећана у ендотелним ћелијама и крви. Овакав резултат јасно сугерише да галектин-3 игра значајну улогу у васкуларном одговору у T2DM. (115) Друге студије су код мишева на исхрани богатој мастима показале, да на адипоцитима долази до повећања експресије галектина-3, који затим стимулише пролиферацију и настанак нових адипоцита. (116) Студије са галектин-3 дефицијентним мишевима показале су мање

пораст у телесној маси у поређењу са мишевима дивљег соја, након исхране богате мастима уз смањену експресију PPAR- γ у масном ткиву. (117)

Испитивање у експериментаном моделу T1DM на галектин-3 дефицијентним мишевима, након давања вишеструких ниских доза стрептозотоцина, показало је да недостатак галектина-3 штити од развоја T1DM. (118)

Галектин-3 доводи до развоја блажег облика типа 2 шећерне болести

Иако се већина студија слаже у констатацији да је галектин-3 маркер запаљења и фиброзе, многе студије указују да повећана експресија овог молекула може бити део адаптивног одговора на повреду ткива, потенцирајући резолуцију упале и супротстављајући се преласку запаљеног процеса у хроничан ток. (119) Поједине клиничке студије указују да је галектин-3 у негативној повезаности са инсулинемијама наше и вредностима индекса инсулинске резистенције као и да има заштитну улогу у T2DM. (120) Неке експерименталне студије спроведене на галектин-3 дефицијентним мишевима, у моделу где је болест изазвана исхраном богатом мастима, показале су да недостатак галектина-3 убрзава настанак гојазности, појачава запаљење у масном ткиву и панкреасним острвцима. (121) Друге студије, спроведене такође на галектин-3 дефицијентним мишевима, показале су да је недостатак галектина-3 повезан са повећаним запаљењем у масном ткиву, које је значајан фактор у развоју резистенције на инсулин. (122) Експерименталне студије које су проучавале имунски одговор у стањима исхране богате мастима, показале су заштитну улогу галектина-3 у развоју гојазности и T2DM, што је објашњено модулацијом одговора урођене и адаптивне имуности. (123) Код галектин-3 дефицијентних мишева, развија се прозапаљенски фенотип који се карактерише повећаним системским инфламацијским одговором али и запаљењем панкреаса и масног ткива након метаболичких стимулуса. (124, 125)

Улога галектина-3 у развоју других болести

Атеросклероза

Атеросклероза је морфолошки ентитет који настаје услед инфламаторно-пролиферативног одговора интима крвног суда на повреду. (126, 127) Добро је познато значајно место које моноцити заузимају у процесу атерогенезе (128, 129), а њихово присуство у артеријским плаковима и липидном језгру препознато је још 1993. године. (130) У блиској прошлости, макрофаге су препознате као најбитније запаљенске ћелије у настанку атероматозних плакова, које имају значајну улогу у ремоделовању интима крвог суда, имунском одговору као и функцији чишћења променом нивоа синтезе и излучивања различитих ензима и фактора. (127, 131) Улога галектина-3 у атеросклерози анализирана је у узорцима каротидних крвних судова, крвних судова након ампуација доњих екстремитета као и узорцима грудне аорте након обдукција младих жртава трауме. (132) Према овој студији, позитивно бојење на галектин-3 може се открити близу липидног језгра или у близини подручја са фиброзом, неоваскуларизацијом, калцификацијом, хеморагијом или тромбозом. У каротидним артеријама и артеријама доњих екстремитета, пенасте ћелије представљале су ћелије које су најчешће биле имунореактивне на галектин-3. Мононуклеарне ћелије и пенасте ћелије које садрже галектин-3 такође су примећене у субендотелу, понекад на местима тромбозе. Код атеросклеротичних лезија галектин-3 је често локализован у макрофагама и пенастим ћелијама, а јако ретко у ћелијама глатких мишића. Потребно је потпуно разјаснити присуство и улогу галектина-3 у већини пенастих ћелија у атеросклеротским лезијама. Делује да је присуство галектина-3 повезано са липидним оптерећењем зида крвног суда или накупљањем галектина-3 услед појачаног накупљања напредних продуката гликације (AGEs). Ово сугерише да је би галектин-3 могао деловати као рецептор за модификоване липопротеине, са значајном улогом у стварању пенастих ћелија.

Болести срца

Иако галектин-3 конститутивно има релативно ниску експресију у ћелијама срчаног мишића, под одређеним патофизиолошким условима ниво експресије галектина-3 може се битно променити и играти значајну улогу. Прва студија која се бавила улогом галектина-3 у срчаној слабости објављена је 2004. године. (133) Ова студија, која је изведена на пацовима са тешком хипертензијом и очигледном срчаном слабошћу, показала је да је ген који кодира галектин-3 био најјаче регулисани ген, који се прекомерно експримирао (више од пет пута у односу на контролу) у декомпензованом срчаном мишићу. Ови резултати су, у истој студији, потврђени у срчаном ткиву код људи. Претпоставка да је галектин-3 одговоран за настанак ремоделовања леве коморе и развој срчане слабости настала је из експерименталних студија, које су користиле пацове којима је галектин-3 даван инфузијом у перикардну кесу. (134) Структурне и функционалне модификације миокарда ткива пацова су спречене истовременом применом инхибитор галектина-3. Механизам деловања галектина-3 на нивоу срчаног мишића још није сасвим

разјашњен и може бити само део општих промена у настанку дисфункције леве коморе изазване различитим етиологијама. Међутим, једном када се галектин-3 прекомерно експримира, одговоран је за активирање фибробласта и макрофага и последичну индукцију фиброзе, стварање ожиљака, и на крају, срчаног ремоделовања. Чини се да је галектин-3 укључен у контролу интерстицијске фиброзе, нарочито у стањима када је срце превише оптерећено. (135) Демонстрација улоге експресије галектина-3 у срчаном мишићу, у срчаној слабости, навела је неке ауторе на испитивање могућност да ниво серумског галектина-3 може бити користан у дијагностици акутне срчане инсуфицијенције. (136) Клиничка употреба галектина-3 у дијагностици срчане инсуфицијенције није јасно доказана и галектин-3 није показао повезаност са NYHA функционалном класификацијом пацијената, а поред тога, показао је нижу специфичност и осетљивост у идентификовању срчане инсуфицијенције, у поређењу са NT-proBNP-ом. (136, 137) Много перспективније студије представљају студије које се односе на клиничку корисност мерења галектина-3 у серуму у циљу предвиђања краткорочног и дугорочног обољевања и смртности. (138-140) Различита клиничка испитивања до сада су показала да је галектин-3 повезан са смртношћу код пацијента са хроничним срчаном слабошћу. Галектин-3, дакле, представља значајан предиктор ризика од смртности код пацијената са срчаном слабошћу, након индивидуалног прилагођавања теста, додавањем одређених параметара од интереса. (141) На основу таквих доказа, тест крви на галектин-3 предложен је у иницијалној процени стања пацијената са срчаном слабошћу (140), као и лечењу пацијената са акутном срчаном слабошћу који се налазе на одељењима хитне помоћи. (142) Тренутно, смернице говоре да се мерење биомаркера фиброзе, као што су растворљиви ST2 и галектин-3, може сматрати додатним фактором за процену ризика код ових пацијената. (143-145)

Срчани синдром X

Срчани синдром X односи се на типичну тријаду: ангина пекторис, позитивни стрес тест и нормални коронарни ангиограм. (146) Може се дијагностиковати код око 3–11% пацијената који су подвргнути коронарној ангиографији због типичних тегоба у грудима у виду бола. (147) Међутим, чак и ако се сматра да такви пацијенти спадају у популацију ниског ризика, појава кардиоваскуларних догађаја код таквих пацијената није ретка, нарочито код жена. (148) Много је покушаја да се пронађу корисни маркери за идентификацију болесника са срчаним X синдромом и високим ризиком за кардиоваскуларне болести. (149-151) Серумски нивои галектина-3 мерени су код пацијената који су погођени срчаним X синдромом. Нивои галектина-3 били су значајно већи код ових болесника у поређењу са здравим пацијентима из контролне групе. (152)

Овај закључак треба потврдити на већем броју пацијената, међутим, он сугерише да галектин-3 може играти кључну улогу у срчаном X синдрому и може представљати користан маркер за идентификацију пацијената који су под високим ризиком од развоја кардиоваскуларних болести.

Гојазност

Гојазност је фактор ризика за настанак метаболичког синдрома, групу од неколико болести које укључују инсулинску резистенцију, хипертензију, поремећену толеранцију и токсичност глукозе, хепатичку стеатозу, атерогену дислипидемију и T2DM. (153) Гојазност је у корелацији са хроничним запаљењем ниског степена, која је битна у развоју инсулинске резистенције, а затим и T2DM. Током развоја гојазности макрофаге прожимају бело масно ткиво и заједно са адипоцитима луче различите прозапаљенске цитокине и хемокине. (154, 155) Код гојазних појединаца висцерално масно ткиво је инфилтрирано макрофагама који учествују у стварању и одржавању запаљења ниског степена или метафламације. (156) Галектин-3 се експримира у свим врстама макрофага који прожимају бело масно ткиво и важан је регулатор поларизације и активности ових ћелија, односно, може имати прозапаљенски и антизапаљенски ефекат. (157, 158) Експериментални докази, добијени испитивањем на галектин-3 дефицијентним мишевима, показују да *in vivo* примена галектина-3 изазива интолеранцију на глукозу и инсулинску резистенцију, док *in vitro* третман селективним инхибиторима галектина-3 може директно индуковати смањену осетљивост на инсулин у миоцитима, хепатоцитима и адипоцитима. (159) Такви експерименти сугеришу могући значај галектина-3 у повезаности између запаљења и смањене осетљивости на инсулин.

Запаљење

Поред од раније познате експресије у епителним и ендотелним ћелијама, галектин-3 се експримира у многим ћелијама које учествују у посредовању запаљенског одговора, као што су макрофаге (160), моноцити (161), дендритске ћелије (162), еозинофили (163), мастоцити (164), ћелије природне убице (165), Т лимфоцити (166) и активирани В лимфоцити (167). Поред тога, галектин-3 је појачано изражен у фагоцитима услед чега се сматра њиховим маркером активације (168). Улога овог молекула у запаљењу детаљно је објашњена у многим истраживањима (167, 169-171). Галектин-3 је укључен у многе процесе током акутног запаљенског одговора, укључујући активацију неутрофила и њихову повећану адхезију (169), привлачење моноцита, односно макрофага (161), опсонизацију апоптотских неутрофила (172) и активирање мастоцита (173). Галектин-3 је обилато изражен на макрофагима који га и излучују (174). Поред тога, експресија галектина-3 повећава се при диференцирању моноцита у макрофаге (174) али се и смањују када се незреле дендритске ћелије диференцирају у зреле дендритске ћелије. (175) Галектин-3 такође повећава интеракцију између моноцита, што доводи до формирања циновских ћелија. (176) Обзиром да се улога неутрофила сматра пресудном у погледу имунског одговора на микробе, неколико студија је испитало однос између активирања и миграције галектина-3 и неутрофила. Коришћењем модела пнеумоније на мишевима, установљено је да се галектин-3 накупља у алвеоларном простору, након индукције пнеумоније бактеријом *Streptococcus pneumoniae* и да је тај догађај у корелацији са почетком дијапедезе неутрофила из крвног суда. (177) Занимљиво је, да исти одговор није уочен након инфекције изазване другим изазивачем, бактеријом *Escherichia coli*. Поред тога, за галектин-3 откривено је антимикубно деловање против гљивице *Candida albicans*. (178)

Ефекти галектина-3 на интеракцију између моноцита су такође укључени у хроничне запаљенске и фибротичке болести. (179) Међутим, његова улога је сложена и обе и профиброгена и заштитна улога галектина-3 су забележене у моделима хроничног запаљења и фиброгенезе. Изгледа да ефекти галектина-3 зависе од органа захваћеног патолошким процесом, као и од врсте експерименталног модела и начина повреде ткива.

Бронхијална астма

Астма је болест комплексне етиологије коју карактеришу хронична упала дисајних путева, променљива и реверзибилна опструкција дисајних путева настала услед хиперреактивности. (180) Пре готово педесет година, препознато је да класа хуманог антитела, названа IgE, представља фактор који узрокује осетљивост на алергене и игра централну улогу у реакцијама преосетљивости, односно, алергијским реакцијама. (181)

Сада је јасно да IgE делује као део сложене протеинске мреже. Интеракција гена који припадају овој мрежи у садејству са факторима животне средине, може да одреди ризик од склоности ка алергијским реакцијама. (182) Поред два главна IgE рецептора, FcεRI (са високим афинитетом) и FcεRII/CD23 (са ниским афинитетом), галектин-3 буди све веће интересовање као значајан молекул у патогенези инфламације код астме. Галектин-3 је у почетку био идентификован као протеин који се везује за IgE. (183) Међутим, специфична улога галектина-3 у астми повезана је са његовом функцијом у регрутовању, активацији и уклањању неутрофила. (184) Експериментални подаци истраживања на галектин-3 дефицијентним мишевима показали су смањено регрутовање неутрофила током инфекције. (185) Међутим, најзанимљивије откриће било је запажање да се галектин-3 може сматрати новим биомаркером који даје слику о дугорочном одговору функције плућа код пацијената са тешком астмом. (186) Према овој студији, присуство галектина-3 у узорку биопитата, добијеног од пацијената са тешким обликом астме, може помоћи у предвиђању одговора на лечење. Пацијенти чији су узорци пре почетка лечења били позитивни на галектин-3, реаговали су на лечење блокирајућим антителом – омализумабом, док пацијенти чији су узорци пре почетка лечења били негативни на галектин-3 нису имали добар одговор на терапију.

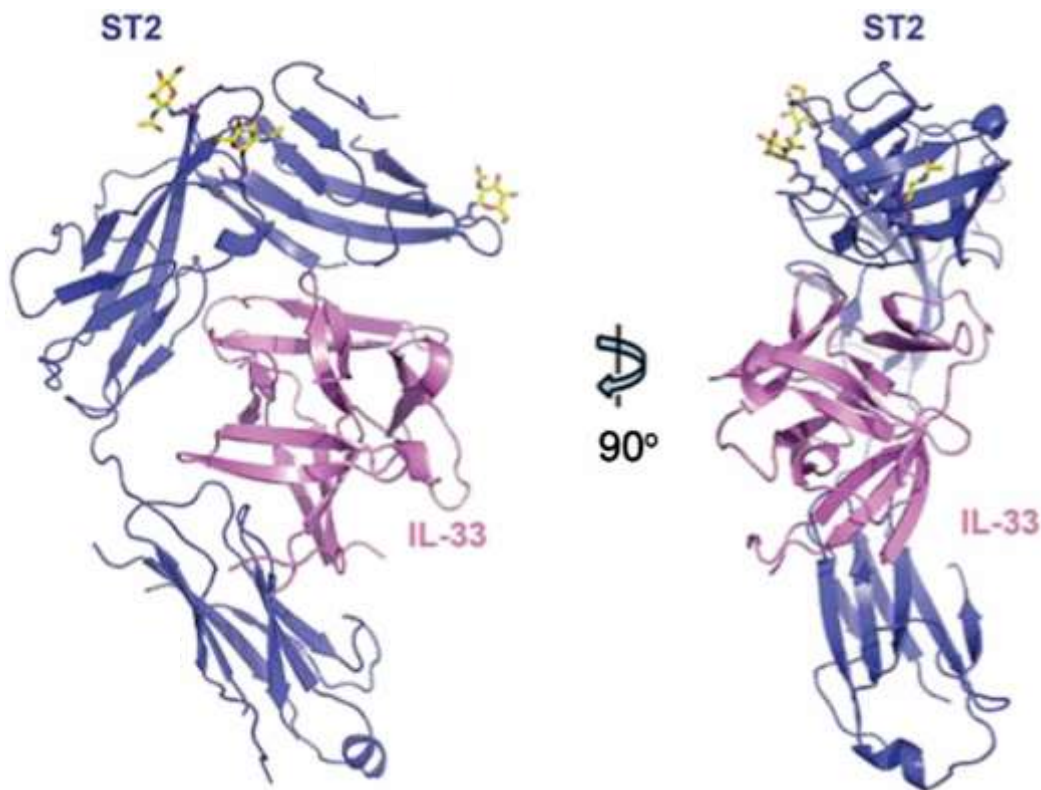
Као мултифункционални протеин експримиран на различитим типовима запаљенских ћелија, галектин-3 се сматра протеином који везује IgE, који регулише степен инфилтратата и активацију ћелија. (187) Активност галектина-3 може бити значајна и код неалергијске астме. (187) У тешкој астми галектин-3 се може сматрати биомаркером ремоделовања плућа. (186) Штавише, галектин-3 дефицијентни мишеви развили су мању хиперреактивност дисајних путева и инфилтрацију еозинофилима, уз смањену концентрацију Th2 цитокина у дисајним путевима у поређењу са мишевима дивљег соја. (188-190)

Неалкохолни стеатохепатитис

Неалкохолни стеатохепатитис (NASH) је стање код кога долази до накупљања липида у јетри што је праћено упалом, у којој претежно доминирају лимфоцити и Купферове ћелије, а све у недостатку податка о конзумирању алкохола. Ова болест се чешће јавља код пацијената са развијеном гојазношћу, метаболичким синдромом и T2DM. Једна је од најчешћих болести јетре, хроничног је тока, чије се преваленција брзо повећава широм света. Карактеристике болести су постојање, хистолошких промена, стеатозе, лобуларне упале, хепатоцелуларног балонирања и фиброзе. (191) Веза између галектина-3 и фиброзе јетре утврђена је када је откривено да су галектин-3 дефицијентни мишеви отпорни на фиброзу јетре изазвану давањем токсина. (192) Таква запажања су у сагласности са студијама у којима су испитивани ефекти на другим органима и системима у вези са улогом галектина-3 у активирању различитих профибротских фактора. Његова улога се огледа у подстицању пролиферације и трансформације фибробласта и производње колагена. (193) Ефекти недостатка галектина-3 на NASH су прилично контраверзни. Показано је да су мишеви са циљаном делецијом галектина-3 отпорни на нагомилавање масти, упалу и фиброзу када су храњени дијетом са високим садржајем масти. (194) Међутим, друге групе су показале да галектин-3 дефицијентни мишеви показују повећану склоност развоју NASH-а. (195)

Интерлеукин 33

Интерлеукин 33 (енгл. *interleukin 33*, IL-33) припада породици IL-1 цитокина. Најчешће је локализован у једру, али може деловати и као цитокин, односно, може испољити своје дејство на ћелије имунског система након ослобађања из ћелије. (196, 197) Првобитно је препознат као нуклеарни фактор експримиран на венулама са високим ендотелом. (198) 2005. године идентификован је као лиганд за молекул ST2. (199) За разлику од других чланова породице IL-1 као што су IL-1 и IL-18, који захтевају активност каспазе-1 за активацију, ослобођени IL-33 услед некрозе ћелија (пуне дужине) је биолошки активан, а његова интерреакција са каспазама током апоптотске ћелијске смрти смањује његову биоактивност. (200, 201) Људски и мишји IL-33 састоје се од седам кодирајућих егзона, који производе протеин од 31 кДа од 270 и 266 аминокиселина. (196)



Слика 2. Кристална структура IL-33 везаног у комплекс са ST2 молекулом (модификовано према *Xi Liu et al. PNAS 2013;110:37:14918-14923*)

Биолошке функције IL-33

IL-33 је конститутивно експримиран од стране ћелија ткивних баријера, као што су епителне и ендотелне ћелије многих органа (199, 202) али је такође заступљен на неким ћелијама урођеног имунског система (макрофаге и дендритске ћелије). (203, 204) Поседује двоструке улоге као традиционални ванћелијски цитокин и као интраћелијски нуклеарни фактор са транскрипционим регулаторним својствима. (196, 205) Какар и сарадници (енгл. *Kakkar et al.*) показали су да је IL-33 локализован истовремено са нуклеарним еухроматином и мембрански везаним цитоплазматским везикулама, и да се излучују из живих ћелија како би извршио ванћелијске функције без некрозе ћелија. (206) Улога као нуклеарног фактора није у потпуности јасна, али поједине студије сугеришу да нуклеарни IL-33 у пуној дужини секвестрира NF- κ B и редукује експресију гена за овај фактор чиме смањује проинфламаторну сигнализацију. (207) IL-33 сматра се алармином где након ослобађања у ванћелијски простор, после оштећења ћелија или повреде ткива, делује као ендогени сигнал о насталој опасности који шаље упозоравајуће сигнале суседним ћелијама или ткивима. (208) IL-33 испољава своје биолошке ефекте као цитокин везивањем за сложени молекулски хетеродимер који сачињавају ST2 и IL-1 рецептор додатног протеина (IL-1RacP), (209) и активирањем сигналних путева попут NF- κ B (енгл. *nuclear factor- κ B*) и MyD 88 (енгл. *myeloid diff. primary-response protein*). (208) Поред мембранског облика ST2, солубилни ST2 (sST2) настаје као резултат алтернативног спајања и делује као рецептор мамац; везивање IL-33 за sST2 доводи до инхибиције IL-33/ST2 сигналног пута. ST2 рецептор експримиран је на многим ћелијама које су у стању мировања или су активирани, укључујући помоћничке Т ћелије 2 (Th2), мастоците, базофиле, макрофаге, дендритичне ћелије, цитотоксичне Т ћелије и В ћелије. (210-212) IL-33 углавном доводи до Th2 одговора активацијом дендритских ћелија које затим покрећу диференцијацију наивних лимфоцита у правцу Th2 ћелија. (213)

IL-33 такође делује на Th2 ћелије, нуоците (тип 2 лимфоидне ћелије урођене имуности (енг. *Innate lymphoid cells type 2, ILC2*) (214) и В1 ћелије (215) у којима подстиче продукцију IL-5 и IL-13, али не и архетипски Th2 цитокин IL-4. (216) Поред тога, IL-33 алтернативним начином активира макрофаге, (217) појачава цитотоксичну клоналну експанзију Т лимфоцита као и њихову антивирусну функцију. (211) Иако се показало да IL-33 синергистички делује са IgE у активацији и дегранулацији мастоцита, (218) дуготрајно излагање IL-33 чини мастоцити резистентним према Fc ϵ RI стимулацији. (219)

Поред ћелија имунског система, ST2 се такође налази на ендотелу, епителним ћелијама (220) и фибробластима (202) многих ткива и органа, што указује на значај IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези великог броја болести. Експресија ST2 у специфичним ћелијама као што су адипоцити, остеобласти, кардиомиоцити и неурони (202) указује да IL-33 такође има ткивно специфичне функције које доприносе развоју болести у различитим органима. Заиста, нови докази указују на то да IL-33 има важне, и плеотропне ефекте у многим болестима посредованим имунским механизмима. Он активира ћелије имунског система и стимулише производњу Th2 цитокина попут IL-5 и IL-13 (216, 221) и често је повезан са типом 2 имунског одговора који погоршава алергијско запаљење дисајних путева, (216, 221, 222) брани организам од паразита (223) и има протективно дејство код кардиоваскуларних болести. (206, 224, 225) Међутим, IL-33 такође може да индукује запаљенску хиперноцицепцију, (226) што је знак прозапаљенске активности. (227) Стога је вероватно да IL-33 може играти про или анти запаљенску улогу у зависности од специфичне болести, органа и имунског контекста.

Улога IL-33 у патогенези шећерне болести

IL-33 може играти улогу у болестима панкреаса јер се конститутивно експримира у ткиву панкреаса што је показано на мишијим моделима (228), а такође и активира стелатне ћелије панкреаса. (229) IL-33 има заштитну улогу код акутног панкреатитиса, а ниво sST2 у серуму је у корелацији са тежином болести. (228) Изненађујуће је мало података о улози IL-33 у патогенези T1DM и T2DM. Добро је познато да је сигнални пут IL-33/ST2 битан у настанку кардиоваскуларних болести и гојазности, повећањем производње Th2 цитокина у адипоцитима и масном ткиву и смањењем експресије адипогених и метаболичких гена. (230) Третман rIL-33 (рекомбинантним IL-3) има заштитне ефекте код генетски гојазних дијабетичких (об/об) мишева са мањим степеном гојазности, побољшава гликорегулацију и толеранцију на инсулин (231) преко T ћелија и типа 2 макрофага. Наведени докази говоре да манипулација експресијом IL-33 може бити корисна терапијска стратегија за лечење или спречавање T2DM гојазних пацијената. Заправо, високи нивои sST2 откривени су код T2DM пацијената у поређењу са здравим контролама, а нивои су још већи код оних са дијастолном дисфункцијом леве коморе. (232) Поред тога, ниво sST2 је у позитивној корелацији са гликемијским контролама у T2DM, а аутори су закључили да хронична упала највероватније поставља основу повећаних нивоа sST2. У студији попречног пресека, Милер ет ал. (енгл. *Miller et al.*) показали су да су нивои sST2 углавном повезани са маркерима повезаним са шећерном болешћу и ектопичним масним ткивом, што указује на потенцијалну улогу IL-33/ST2 пута патогенези шећерне болести. (233) Функција и механизми помоћу којих IL-33/ST2 сигнални пут утиче на патогенезу шећерне болести још увек нису потпуно истражени. У мишјем моделу T1DM, индукованог вишеструким дозама стрептозотоцина, делеција гена за ST2 повећава осетљивост на T1DM код BALB/c соја, иначе резистентног на болест. Овај налаз потврђен је нивоима гликемије, гликозурије, бројем инфилтрираних ћелија и губитком β ћелија. (234) Аутори су предложили да IL-33/ST2 сигнална осовина има заштитни ефекат на T1DM, могуће кроз промену равнотеже између Th1/Th17 и Th2 одговора, јер је клинички приказ болести праћен појачаном експресијом гена који кодирају TNF- α , INF- γ и IL-17 у лимфним чворовима панкреаса. Користећи исти модел животиња, други аутори су закључили да су нивои IL-33 у миокарду смањени у поређењу са контролама, што повећава осетљивост миокарда на оштећење изазвано исхемијом/реперфузијом и механизмима који активирају C β II протеинску киназу. (235) Третман егзогеним IL-33, са друге стране, ублажава исхемију/оштећење изазвано реперфузијом. Генерално, наведени налази указују на важну заштитну улогу IL-33 код дијабетеса и срчаних компликација повезаних са болешћу. (236)

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Главни циљ истраживања био је испитивање ефекта појачане експресије галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса у експерименталним мишјим моделима шећерне болести.

У складу са овим циљем испитиван је:

- ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама у патогенези T1DM
- ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама у патогенези T2DM
- ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама у *in vitro* условима након стимулације изолованих острваца ендокриног панкреаса метаболичким и имунским ноксама
- ефекат галектина-3 у патогенези T1DM уз истовремену примену егзогеног IL-33

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЗАДАЦИ

У складу са овим циљевима постављен је план истраживања са следећим експерименталним задацима:

1. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на промене телесне масе након индукције T1DM
2. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на параметаре гликорегулације, инсулинемију и вредности солубилног галектина-3 током и након индукције T1DM
3. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на развој инфламације у панкреасним острвцима након индукције T1DM
4. Испитати функционалне карактеристике имунских ћелија, а затим и њихове фенотипске карактеристике панкреасним острвцима након индукције T1DM
5. Испитати функционалне карактеристике имунских ћелија а затим и њихове фенотипске карактеристике у дренираним панкреатичним лимфним чворовима након индукције T1DM
6. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на ниво развоја гојазности праћењем промена у телесној маси и количини масног ткива око органа (енгл. *visceral adipose tissue, VAT*) након индукције T2DM
7. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на степен развоја инсулинске резистенције праћењем различитих параметара гликорегулације, инсулинемија и солубилног галектина-3 током и након индукције T2DM
8. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на развој инфламације у панкреасним острвцима након индукције T2DM
9. Испитати фенотипске карактеристике ћелија панкреасних острваца након индукције T2DM
10. Испитати функционалне карактеристике имунских ћелија, а затим и њихове фенотипске карактеристике у панкреасним острвцима након индукције T2DM
11. Испитати функционалне карактеристике имунских ћелија, а затим и њихове фенотипске карактеристике у дренираним панкреатичним лимфним чворовима након индукције T2DM
12. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на преживљавање β ћелија након излагања имунским и метаболичким ноксама *in vitro*
13. Испитати утицај трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на степен оксидативног стреса у β ћелијама након излагања имунским и метаболичким ноксама *in vitro*
14. Испитати ефекат примене IL-33 на параметре гликорегулације и степен инфламације панкреасних острваца мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције T1DM
15. Испитати ефекат примене IL-33 на функционалне карактеристике имунских ћелија, а затим и њихове фенотипске карактеристике у острвцима и у дренираним панкреатичним лимфним чворовима мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције T1DM

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

У експериментима у којима је испитиван ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама панкреаса коришћени су мужјаци чистог (дивљег, енгл. *wildtype*, WT) соја C57Bl/6 и мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 једино у панкреасним β ћелијама (TG мишеви) на C57Bl/6 основи. Експерименталне животиње су биле старости 8-12 недеља. У експериментима у којима је испитиван ефекат примене IL-33 у експерименталном моделу T1DM, коришћени су WT мишеви женског пола соја C57Bl/6 старости 8-12 недеља и TG мишеви исте старости. У свим експериментима коришћени су мишеви приближне телесне тежине и старости. TG мишеви су добијени у сарадњи са проф. Бернардом Торенсом (*Bernard Thorens, University of Lausanne, Physiology Department, Center for Integrative Genomics (CIG), Switzerland*) у оквиру међународног SCOPES пројекта (*SP and grant from Swiss National Science Foundation (project no. IZ73Z0_152407)*). У леглу у коме се налазе TG мишеви и њихови потомци, 4 недеље након рођења, сви мишеви су обележени и истовремено је сваком мишу узет узорак ткива уха који је коришћен као материјал за генетску анализу, тј потврду генотипа миша ради раздвајања експерименталних животиња по групама.

Сви мишеви су одгајани у уобичајним животним условима за експерименталне животиње, у виваријуму Цента за молекулску медицину, ФМН, Универзитета у Крагујевцу. У току целокупног извођења експерименталних протокола, све животиње су имале неограничен приступ исхрани и пијаћој води. (лат. *ad libitum*). Пре започињања експерименталних протокола, студија је добила одобрење за извођење од стране Етичке комисије, Факултета медицинских наука, број 01-7312.

Методологија добијања мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама

TG мишеви добијени су на основи C57Bl/6 мишева, додавањем трансгеног вектора, тј специфичног дела молекула ДНК који одређује појачано стварање галектина-3 једино у панкреасним β ћелијама, у геном миша дивљег соја. Трансгени вектор се састоји из инсулинског промотера пацова, комплементарног ДНК човечијег галектина-3, интрона и полиаденилационих секвенци симиановог вируса. Трансгени продукт галектина-3 изолован је из трансгеног вектора и убачен у оплођене ооците C57Bl/6 мишева.

Један од клонова, добијених ембрионалних ћелија, у ком је дошло до хомологе рекомбинације је узгајан. Из њега су касније, добијене ћелије, које су накнадно убризгаване у 3 до 5 дана старе мишије бластоците истог соја, а оне су затим убациване у привидно гравидне женке другог мишијег соја, CD1, које представљају сурогат мајке. Овако добијени мужјаци, химеричног генотипа, упаривани су са женским јединкама дивљег соја и мишеви, на овај начин добијени представљали су хетерозиготне TG мишеве. Њиховим имбретним упаривањем, након неколико генерација (тачније 9) добијени су хомозиготни мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса..

Генотипизација мишева урађена је путем *Southern blot* или PCR методе са краја молекула ДНК. Миш са трансгеном експресијом галектина-3 имао је присутан производ величине од 591 базних парова који је доказан коришћењем прајмера 1 (Forward: ATGCTCAGCCAAGGACAAAG (On RIP Promoter) и прајмера 2 (Reverse: AGTTGGGCCAGGATAAGCTC (On Lgals3 cDNA), *KAPA 2G Fast Ready Mix PCR Kit* (Kapa Biosystems, USA)). У поступку стварања мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама, генетском манипулацијом је додавањем инсулинског промотера у геном C57Bl/6 миша, додата секвенца нуклеотида која кодира стварање галектина-3 једино у делу генома који кодира стварање инсулина. На тај начин формиран је ембрион, а касније и експериментална животиња са трансгено појачаном експресијом галектина-3 једино у панкреасним β ћелијама код које се коришћењем одређених прајмера региструје продукт од 591 базног пара, а који одговара додатом инсулинском промотеру са нуклеотидима који кодирају галектин-3. Код WT мишева овај продукт се не региструје јер те животиње немају додати инсулински промотер.

Потврда генотипа трансгених мишева методом ланчане реакције полимеразе

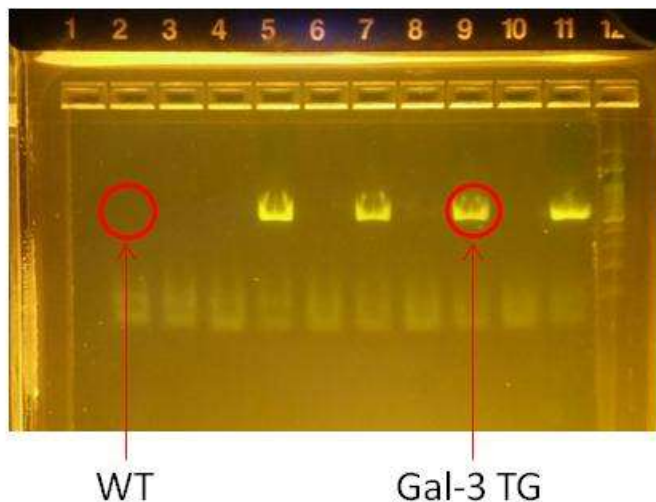
Метода ланчане реакције полимеразе се користи за умножавање кратког, унапред одређеног дела молекула ДНК. Копирани молекул може садржати један или више независних целина, а може бити и само фрагмент једне целине. Овом реакцијом могу се копирати само кратки ДНК фрагменти, најчешће дугачки до 10 kb (до 1000 базних парова) коришћењем *KAPA Express Extract* система. *KAPA Express Extract* је термостабилни систем који се састоји из ензима протеаза и пуфера. Ензим протеаза након 15 минута реакције ослобађа молекул ДНК из разичитих врста узоркованог ткива. Ослобађање молекула ДНК може да буде изведено у стандардном термоблоку или воденом купатилу, након чега се узорак центрифугира. Након завршеног центрифугирања део узорка ДНК се пренесе у нову епендорф тубу. Овакао добијен узорак, који садржи ДНК, уз додатак ТЕ пуфера киселе рН вредности, може се чувати дуже од 6 месеци на температури од -20°C . Између прве и друге фазе узорак добијен овим поступком може да се разблажи уколико је потребно.

У другој фази, процеса ланчане реакције полимеразе, током понављања великог броја тачно дефинисаних циклуса, а у присуству одређених прајмера, долази до амплификације циљаног дела молекула ДНК. Након процеса амплификације припремљени узорак се читава на 2% агарозном гелу ради потврде присуства гена од интереса. Појава траке на агарозном гелу представља доказ присуства циљаног гена.

У циљу потврде генотипа, трансгене експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама, коришћен је *Kapa Express extract kit* за екстракцију молекула ДНК а затим и *KAPA2G Robust Fast ReadyMix* за саму PCR реакцију. PCR реакција се одиграва кроз неколико узастопних фаза. Прва фаза је процес разградње ткива у коме долази до ослобађања молекула ДНК. У епендорф тубу се стави комад ткива уха миша запремине до 2mm^3 или површине до 2mm^2 уз додавање 10 μl пуфера за екстракцију и 2 μl ензима. Узорак се затим допуни са 88 μl воде ослобођене нуклеинских киселина до укупне запремине од 100 μl . Овакав узорак се убаци у термоциклер, који се раније програмира на температурни циклус од 75°C у трајању од 10 минута, у ком се одиграва процес разградње ткива, а затим на циклус од 95°C у трајању од 5 минута ради активације ензима протеазе и коначне разградње. Након завршетка процеса разградње ткива и ослобађања молекула ДНК, а затим и пребацивања 1 μl ДНК у нову тубу, у наредним корацима коришћен је *KAPA2G Fast ReadyMix*. У саставу *KAPA2G Fast Ready Mix*-а налази се претходно припремљена мешавина са свим потребним састојцима осим циљаних прајмера и молекула ДНК. У тубу са 1 μl молекула ДНК додато је 12.5 μl претходно припремљене мешавине и по 1.25 μl оба прајмера. До укупне запремине сваког појединачног узорка од 25 μl додата је вода ослобођена нуклеаза. Овако припремљен узорак се благо промеша, а затим и лако центрифугира након чега је спреман за другу фазу обраде. Сам процес ланчане реакције полимеразе обавља се кроз већи број циклуса који се понављају, док се истовремено прајмери везују за тачно одређена места на денатурисаном молекулу ДНК, односно базе попуњавају празна места на новоформираном молекулу ДНК. Прва подфаза се назива денатурација, у којој под утицајем високе температуре долази до кидања водоничних веза између два ланца молекула ДНК. Трајање прве подфазе је 3 минута а температура на којој се она одвија је 95°C . Друга подфаза састоји се из три дела, у којој се прајмери везују за специфична места а затим се на њих надовезују нове базе. Први део је денатурација, на њу се наставља други део друге подфазе, у којој се прајмери везују за раздвојени молекул ДНК, при температури од 60°C у трајању од 15 секунди а затим се наставља завршном фазом ове подфазе тј. процесом екстензије новонасталих ланаца.

Трећа део се одиграва на 72°C у трајању од 1-15 sec/kb. Друга подфаза, је иначе, део процеса који најдуже траје, јер се овакав циклус понавља 25 до 40 пута. Процес ланчане реакције полимеразе завршава се трећом подфазом која представља завршну екстензију на 72°C у трајању од 1 min/kb.

Након завршеног процеса ланчане реакције полимеразе, 2% агарозни гел, поставља се на апарат за електрофорезу. Прво се укључи програм за припрему гела у трајању од 2 минута, а након завршене припреме, из гела се извуче заштитни уметак, а у слободне, празне бунарчиће на гелу, се сипа 20 до 25 микролитара узорка док се у један од бунарчића сипа *DNA ladder* (контрола која има обележене траке са различитим величинама продукта). Појава траке од 590 базних парова говори у прилог TG мишу.



Слика 3. Потврда генотипа мишева са појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама.

Пре формирања експерименталних група свим мишевима узет је део уха који је искоришћен за PCR анализу и потврду генотипа. Једино мишеви са продуктом од 591 базних парова сматрани су TG мишевима са појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама.

ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИП 1 И ТИП 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Експериментални модел T1DM, у ком смо испитивали ефекте трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама панкреаса, индукован је субкутаним давањем стрептозотоцина раствореног у цитратном пуферу (pH 4.5), у дози од 40 mg/kg, пет узастопних дана. Експерименталне животиње жртвоване су 21. дана експеримента односно 16. дана након последњег давања стрептозотоцина. Експерименталне групе чинили су WT и TG мужјаци старости од 8-12 недеља.

Експериментални модел T1DM, у коме смо желели да испитамо заједнички ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама и истовременог давања IL-33, индукован је субкутаним давањем стрептозотоцима раствореног у цитратном пуферу (pH 4.5) у дози од 40 mg/kg, пет узастопних дана. Рекомбинантни IL-33 у овом моделу је даван дванаестог, четрнаестог, шеснаестог и осамнаестог дана од почетка експеримента. Експерименталне животиње су жртвоване 23. дана експеримента односно 18. дана од завршеног давања стрептозотоцина. Експерименталне групе чинили су WT и TG мужјаци 8-12 недеља старости.

Експериментални модел T2DM идукован је храњењем мишева храном са веома високим уделом масти (*HFD, Mucedola, Italy*). Животиње су храњене оваквом храном у трајању од 16 недеља. Контролне групе мишева биле су на исхрани са нормалном стандардном храном (енгл. *chow, Mucedola, Italy*). Приступ храни и води је у току трајања експеримента био слободан (*ad libitum*). Након предвиђеног времена за посебан режим исхране, животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом.

ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА

Тенденција промене телесне масе праћена је у редовни временским оквирима, појединачним мерењем мишева. Ниво шећера у крви наше, уз претходно склањање хране у трајању од 4h, мерен је у једнаким временским интервалима током трајања експеримента. Ниво шећера у крви наше мерен је и након 12h без хране, која је била склоњена у току ноћи. Крв за анализу добијена је пункцијом вене мишјег репа. За мерење је коришћена само добијена кап пуне крви, која је затим наношена на тест трачицу, а затим је добијена вредност очитана помоћу апарата за одређивање концентрације шећера у крви (*Accu-Chek Performa, Roche*). Мерење је извршено за сваку животињу појединачно. Коришћењем брзих тест трачица, квалитативно је одређивана концентрација шећера и кетона у урину (*Uriscan, Diagnostics*) појединачно сваком мишу. Концентрација инсулина наше, након претходне припреме, одређивана је из серума ELISA тестом (*CSB E05071m, Cusabio biotech*) пратећи упутство произвођача. Вредности индекса инсулинске резистенције (НОМА-IR) израчунате су према вредностима наше гликемија и инсулинемија у тренутку жртвовања, појединачно за сваког миша коришћењем формуле: инсулин (mU/ml), помножен са вредношћу гликемија наше (mmol/l), подељен са коефицијентом+ 22,5. Концентрације триглицерида у серуму мерене су појединачно сваком мишу коришћењем апарата *Olympus AU600 chemistry immune analyzer (Olympus, Japan)*.

ОДРЕЂИВАЊЕ ВРЕДНОСТИ СОЛУБИЛНОГ ГАЛЕКТИНА-3 У СЕРУМУ

У циљу одређивања концентрације солубилног галектина-3 у серуму, коришћен је комерцијални ELISA комплет (*Mouse Galectin 3 ELISA Kit, ab 203369, Abcam*), у складу са упутствима произвођача. Везујуће антитело (енгл. *Capture Antibody*) у запремини од по 100 μl , различено је у одељке микротитар плоче (енгл. *96 well plate*) са 96 одељака са заравњеним дном (*Sarstedt*). Након додавања антитела, плоча је прекривена адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и инкубација је трајала током ноћи, на собној температури. Следећег дана су антитела у одељцима испрана пуфером за прање (енгл. *WashBuffer*) коришћењем аутоматске перилице плоча. Након испирања у све одељке је додат пуфер за блокирање (*Block Buffer, 1% BSA* (енгл. *Bovine serum albumin*) растворен у PBS-у), запремине од 300 μl . Пре поновног испирања, микротитар плоче су инкубирани у трајању од најмање једног сата на собној температури. Експериментални узорци серума су претходно разблажени у дејонизованој води у размери 1:10. Припремљени узорци и фабрички стандардни раствори, који су припремљени у опадајућим концентрацијама, додати су у одељке плоче, након чега су поново заштићени фолијом и остављени на инкубацију на температури од 24 степена у трајању од 2 сата. Антитело за детекцију антигена, у радном разблажењу и у запремини од 100 μl (енгл. *Detection Antibody*) је додато у све одељке по завршетку инкубације. Након додавања антитела за детекцију, плоче су обложене и након нове инкубације, у трајању од 2 сата на собној температури, без директног излагања светлости, одељци плоче су поново испрани. Након тога је у одељке додато 80 μl *Streptavidin-HRP* у препорученој концентрацији (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Након 20 минута, посуде су испране и инкубација је прекинута. По 100 μl раствора супстрата, који је припремљен према упутству произвођача, у размери 1:1 (енгл. *Substrate sol. : Color reag. A + Color reag. B*), је додато у сваки одељак. Реакција је прекинута додавањем 50 μl раствора за заустављање након двадесет минута (енгл. *Stop Solution: 2N H₂SO₄*). Непосредно након заустављања реакције оптичка густина је очитана помоћу апарата за анализу микроплоча (*Zenyth 3100, Austria*) користећи таласну дужину од 450 nm. У току анализе резултата, од измерених вредности су одузете вредности апсорбанце очитане за слепу пробу. Као слепа проба коришћена је дејонизована вода. Коришћењем измерених вредности фабричког стандарда постављена је стандардна крива. Вредности концентрације испитиваних узорака израчунати су коришћењем формуле и стандардне криве. Сви узорци серума испитивани су троструко, односно у трипликату.

АНАЛИЗА ПАТОХИСТОЛОШКИХ ПРОМЕНА НА ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА

У експерименталном моделу T1DM, WT и TG мишеви коришћени у експерименту жртвовани су 21. дана од почетка експеримента односно 16. Дан од апликације стрептозотоцина.

У експерименталном моделу T2DM, мишеви коришћени у експерименту жртвовани су након 16 недеља исхране богате мастима, односно стандардном исхраном. За хистопатолошку анализу, користили смо ткива панкреаса фиксирана у формалину и укалупљена у парафину. За анализу степена инфилтрације острваца коришћени су ткивни исечци, дебљине 5µm који су обојени хематоксилин еозин хистохемијском техником. Након изоловања ткива од интереса, а након жртвовања, ткиво панкреаса је фиксирано у 4% формалдехиду, након чега је обрађено у ткивном процесору и укалупљено у парафинске калупе. Парафински блокови са фиксираним ткивом, затим су сечени на ротирајућем микротому (*Leica RM2135*) на собној температури. Серијски пресеци дебљине 5-µm потапани су у водено купатило на температури од 40°C, а затим су фиксирани на предметна стакла за микроскопирање.

Бојење хематоксилин– еозин хистохемијском техником

Стаклене микроскопске плочице са парафинским исечцима прво су загрејане у термостату на 56°C у трајању од 45 минута, а затим су након краткотрајног спонтаног хлађења потапане у ксилол, по два пута у трајању до 5 минута, у циљу депарафинизације ткива. Након ксилола плочице су потапане постепено у опадајуће концентрације етанола, по два пута у периодима од 5 минута, ради дехидратације. Коначно, поступак рехидратације је завршаван испирањем плочица са ткивом у дестилованој води. Након вишеструког испирања извршено је бојење раствором хематоксилина по *Mayer*-у (*Sigma Aldrich, USA*) у току 10 минута, а након бојења плочице са препаратима ткива су поново испране дестилованом а на крају и текућом водом током пет минута. Након испирања, препарати су обојени алкохолним раствором еозина (*Sigma Aldrich, USA*) у току 2 минута. Након бојења еозином, извршен је поступак ткивне дехидратације и просветљивања узорака ткива. За дехидратацију ткива коришћене су повећавајуће концентрације етил алкохола у одговарајућим посудама и то: у трајању 5 минута у 70%, затим у трајању 5 минута у 90%, у трајању 5 минута у 96% и на послетку два пута у трајању од 5 минута у анхидроном етанолу. Након завршеног процеса ткивне дехидратације, процес просветљавања ткива је извршен коришћењем два раствора ксилола у трајању од по 5 минута. На препарате је након поменуте процедуре ручно нанесен медијум за покривање на бази ксилола, *DPX mounting medium* (*Sigma Aldrich*), а затим су ткива пажљиво покривена покровним стаклима у циљу заштите препарата. Након бојења и прекривања препарата, предметна стакла су покривена и осушена на собној температури током 24 часа. Препарати обојени на овај начин анализирани су употребом светлосног микроскопа (*Olympus BX51, Japan*), а дигиталним фотоапаратом су усликане фотомикрографије региона од интереса. Након извршеног сликања ткивних препарата, на добијеним фотомикрографијама извршена је анализа.

Квантификација и скорирање

Након завршеног бојења хематоксилин – еозин хистохемијском техником, ткива су анализирана коришћењем светлосног микроскопа и светлог поља. У панкреасним острвцима праћени су дистрибуција и степен инфламаторног инфилтрата.

Степен инфилтрације мононуклеарних ћелија подељен је у пет нивоа, тј скорова и то:

скор 1 = острвца без инфилтрације мононуклеарним ћелијама,

скор 2 = острвца са инфилтрацијом локализованом периваскуларно/перидуктално,

скор 3 = острвца са периинсулитисом,

скор 4 = острвца са благим инсулитисом (мање од 25% острвца је захваћено процесом),

скор 5 = острвца са израженим инсулитисом (више од 25% острвца је захваћено процесом).

Анализа и скорирање инфилтрата урађена је употребом и коришћењем претходно описаног протокола. (237)

Имунохистохемија

Имунохистохемијска анализа парафинских исечка панкреасног ткива, урађена је употребом комерцијалног комплета *Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a* (*ab64259, Abcam*), праћењем смерница из упутства произвођача. Ткивни исечци панкреаса нанети на предметну плочицу, дебљине од 4-6 μm , у првом кораку су грејани у термостату на 56°C у времену од 45 минута, а затим се након краткотрајног спонтаног хлађења, приступило поступку депарафинизације и рехидратације ткива. Поступак депарафинизације ткива подразумева испирање плочица са ткивом у ксилолу, растворима опадајућих концентрација алкохола (етанола): и то у трајању 5 минута у два циклуса у апсолутном (100%) алкохолу, затим у трајању 5 минута у 96% етанолу, затим у трајању 5 минута у 75% етанолу, да би се поступак депарафинизације завршио испирањем плочица и рехидратацијом ткива у трајању од 5 минута у дестилованој води. Након поступка депарафинизације и серијског испирања препарата са ткивом, на ткиво је стављен *Hydrogen Peroxide Block-a*, а инкубација је извршена на собној температури у трајању од 12 минута. По завршеној инкубацији, препарати су испрани 3 пута по пет минута са раствором PBS-а. Након испирања додат је *Protein Block*, да би се блокирало неспецифично везивање антитела и позадинско пребојавање. Инкубација на собној температури је трајала 10 минута, након чега су препарати поново испрани у PBS-у, два пута по 5 минута. Овако припремљени исечци ткива панкреаса, су затим кувани током 21 минута у 10mM Na-цитрату, охлађени на собној температури, а након завршетка хлађења поново су испрани четири пута у PBS-у. На овако припремљена ткива, након демаскирања антигена, апликована су примарна антитела. Додато је 100 μl анти-мишјег CD68 антитела (*ab49777, Abcam*) раствореног према упутству произвођача у концентрацији 1:200. За испитивање имунореактивности ћелија панкреасних острваца на галектин-3 коришћено је 120 μl необележеног анти-мишјег галектин-3 антитела (*ab53082, Abcam*) раствореног у концентрацији 1:100. За испитивање заступљености инсулин позитивних ћелија у острвцима апликовано је 100 μl биотинисаног анти-мишјег антитела на инсулин (*ab63820, Abcam*) у концентрацији 1:100. За испитивање имунореактивности ћелија панкреасних острваца на TLR4 (енгл. *Toll-like receptor 4, TLR4*) коришћено је 100 μl анти-мишјег TLR4 антитела (*ab22048, Abcam*) раствореног у концентрацији 1:200. Након додавања примарног антитела, овако припремљени препарати ткива панкреаса, инкубирани су 14h у влажној комори. Сутрадан, након завршене инкубације, препарати ткива панкреаса су поново 3 пута испрани у трајању од по 5 минута PBS-ом. Након новог испирања на ткива је додата *Streptavidin Peroxidase-a*, при чему је инкубација трајала 12 минута. Након поновног испирања (2 пута у трајању од по 5 минута) PBS-ом, на ткиво је апликован DAB реагенс, добијеног према упутству произвођача, растварањем DAB *Chromogen-a* у DAB *Substrat-y*. Након настале хемијске реакције и развијања боје, препарати ткива панкреаса су затим испрани у дејонизованој води.

Контрастирање и бојење ћелијских једара извршено је коришћењем хематоксилина формулисаног по *Mayer-y*. Препарати су обојени краткотрајно, у трајању од једног минута, након чега су интензивно испрани млаком текућом водом. Ткива су након испирања дехидрирана у етанолу растућих концентрација и просветљена у ксилолу. На послетку, на ткивне исечке је нанесен медијум за покривање на бази ксилола, DPX (*Dibutylphthalate Polystyrene Xylene, Sigma Aldrich*) и покровна стакла. Препарати су осушени на температури од 20-23 степена у трајању од 24 сата, након чега су анализирани. Имуноореактивност ћелија је анализирана коришћењем светлосног микроскопа (*BX51*,

Olympus, Japan), а у том циљу су израђене и фотомикрографије. Бројање имунореактивних ћелија и анализа имунореактивне површине ткива, извршени су у 10 непреклапајућих видних поља по препарату помоћу рачунарског програма *ImageJ*.

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ИЗ ТКИВА ПАНКРЕАСНИХ ОСТРВАЦА

Изолација РНК из панкреасних острваца ex vivo

Поступак изолације панкреасних острваца је урађен као што је раније објашњено коришћењем упутстава из литературе. (238) Након изолације и опоравка добијених острваца, преко ноћи, у комплетном стерилном медијуму, преостала острваца су покупљена, стимулирана коктелом цитокина, раствореним палмитатом и липополисахародом (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS) у трајању од 24h. Након готове стимулације ноксама, покупљен је супернатант, а из острваца је коришћењем тризола, изолована укупна РНК. Овај поступак је изведен механичком хомогенизацијом коришћењем 1ml тризола (TRI Reagent®, Applied Biosystems,). Након хомогенизације, ткиво је пребачено у нове епендорф епрувете, величине 1,5ml (Eppendorf, Germany), а након инкубације од 5 минута на собној температури, ткиво је центрифугирано у трајању од 20 минута при брзини од 12000 rpm, уз додатак 100µl бромохлорпропана (1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich). Након центрифугирања, РНК, који се приликом обраде издваја у површинској, провидној фази, је премештен у чисте посуде, у које је након тога наливено 750µl расхлађеног изопропанола, у циљу преципитације укупне РНК. Након додавања алкохола и благог мешања, сви узорци су поново инкубирани на температури од 20-23 степена у трајању од 20 минута, након чега су још једном центрифугирани у трајању од 8 минута при брзини од 12000 rpm на температури од +4°C. Преципитат РНК је, након таложења на дну епрувете, два пута опран, коришћењем 1 ml хладног 70% етанола. Након додавања етанола, узорци су центрифугирани у трајању од 8 минута при брзини од 8000 rpm. Етанол је пажљиво одливен из сваке епрувете, а наталожени узорак РНК је осушен на собној температури у трајању до 5 минута. Изоловани узорак укупне РНК је након сушења суспендован у води прочишћеној од нуклеаза (Nuclease-Free Water, Qiagen). Чистоћа узорка РНК, као и концентрација присутна у изолату је одређивана употребом спектрофотометријских метода, мерењем апсорбанце на таласној дужини од 260/280 nm коришћењем биофотометра *Biophotometer* (Eppendorf®, Ger.).

Реакција реверзне транскрипције

Превођење РНК у њој комплементарну ДНК (cDNA), односно реакција реверзне транскрипције, изведена је помоћу комерцијалног комплета *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA), праћењем произвођачког упутства. У посуде са изолованим узорком РНК, додавана је комерцијална реакциона мешавина или „мастер микс“, а добијена смеша је промешана, а затим и инкубирана на температури од 20-23 степена у току 10 минута. Након завршене инкубације на температури од 23°C настављена је инкубација у трајању од 120 минута на температури од 37°C, а затим је реакција заустављена, грејањем узорака у трајању од 5 минута на 85°C. Након ове фазе узорци су охлађени на 4°C. Реакција реверзне транскрипције изведена је коришћењем термоблока. Комплементарна ДНК, добијена у току овог поступка, коришћена је за анализу експресије гена од интереса.

Квантификација експресије гена

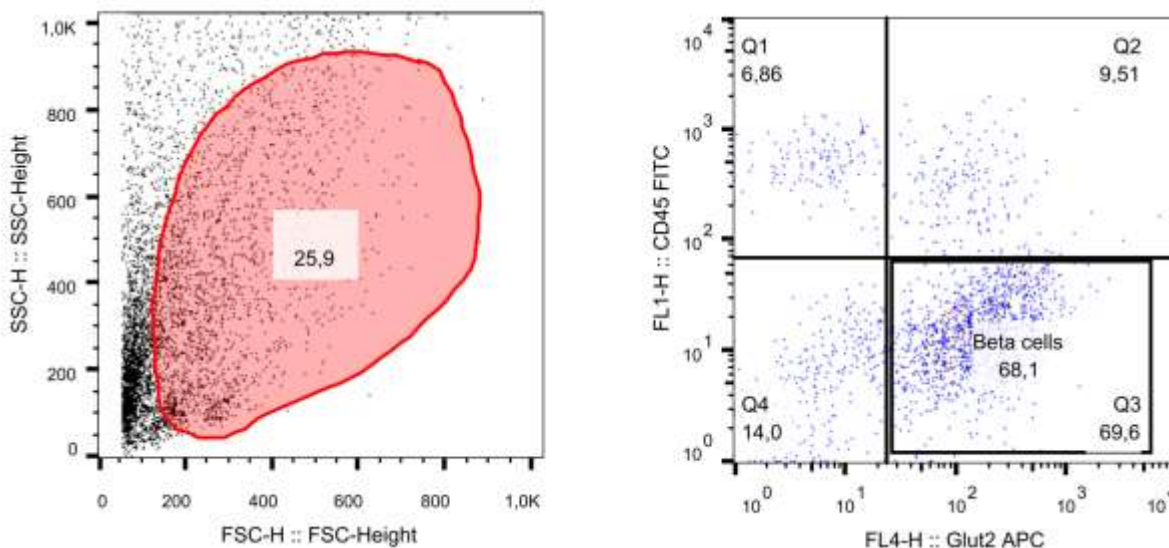
Експресија гена од интереса, испитивана је коришћењем методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену (*Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*). Ова метода је изведена коришћењем *MastercyclerRealplex* апарата (*Eppendorf, Ger.*) употребом плоча са 96 одељака (*Twin.tec. plates, Eppendorf*). Свака комора садржала је запремину смеше од 20 μ l који је садржао: 2 μ l узорка комплементарне ДНК (сDNA), 10 μ l главне реакционе смеше (*SYBR Green PCR Master Mix, AB*), 1,2 μ l раствора прајмера за обележавање испитиваног гена („forward“ и „reverse“), и 5,8 μ l воде без нуклеинских киселина. За испитивање експресије гена од интереса, употребљени су прајмери за BAX и Bcl2 (R&D, MN). За експресију референтног гена коришћени су прајмери за хелијски β актин (forward 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3' и reverse 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3'). Након додавања реакционе смеше, микротитар плоче су прекривене помоћу адхезивне фолије (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), а затим центрифугиране у трајању од 1 минута при брзини од 2000 rpm. Температурни профил за извођење реакције qRT-PCR апарата, претходно је подешен у складу са упутством произвођача: 4 минута на температуру од 95°C, затим 45 циклуса у току 15 секунди на температури од 95°C и по минут на температури од 62°C. Након овог корака, задати су параметри за одређивање криве дисоцијације (енгл. *Melting curve analysis*) узорка: 15 секунди на температури од 95°C, 15 секунди на температури од 60°C, 20 минута температурног раста до температуре од 95°C. Анализа је рађена у дупликату, за сваки испитивани узорак. Анализа и израчунавање резултата изведени су на следећи начин, коришћењем методе Ливака и Шмитгена. У првом кораку израчунате су просечне вредности C_t референтног гена (β актин) и просечних вредности C_t за гене чија је експресија испитивана. Затим су просечне вредности C_t референтног гена одузете од просека вредности C_t гена чија је експресија испитивана. На овај начин добијена је разлика вредности односно ΔC_t , а релативна експресија испитиваног гена представљена је као $2^{-\Delta C_t}$. Добијени резултати су представљени и тумачени као релативна експресија у односу према релативној експресији контролних узорака.

ФЕНОТИПСКА АНАЛИЗА ЋЕЛИЈА ПАНКРЕАСНИХ ОСТРВАЦА И ПРИПАДАЈУЋИХ ЛИМФНИХ ЧВОРОВА МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ

Након жртвовања цервикалном дислокацијом, после 16 недеља режима исхране богате мастима, из мишева су изоловане ћелије панкреасних острваца и деренираних лимфних чворова. Добијене ћелије затим су анализирани методом проточне цитометрије. При том су анализирани фенотипске карактеристике и функција, апсолутни број као и процентуална заступљеност, различитих ћелијских популација.

Бојење маркера на повшини ћелија

За испитивање фенотипа и функције различитих ћелијских субпопулација, изолованих из панкреасних острваца и панкреатичних лимфних чворова, коришћена су моноклонска антитела коњугована одређеним флуорофорама, специфична за различите интрацелуларне и молекуле експримиране на повшини ћелија. На одређени узорак, 5×10^5 ћелија, које су ресуспендоване у пуферу за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) у запремини од 50 μ l, стављена је одређена концентрација моноклонских антитела коњугованих различитим флуорофорама. Суспензија моноклеарних ћелија је такође обележена одговарајућим изотипским контролним антителима. Концентрација коришћених антитела је припремљена у складу са упутством произвођача, тако да је коначно разблажење, након додавања ћелијској суспензији, било 1:100. Након додавања антитела за површинске маркере и брзог вортексовања, узорци су на температури од 4°C, инкубирани 20 минута, заштићени од сунчеве светлости. Ћелије су након завршене инкубације два пута опране коришћењем 2 ml расхлађеног пуфера и центрифугирањем при брзини од 1450 rpm у трајању од 5 минута. После последњег центрифугирања, супернатант из епрувете је пажљиво одливан, а талог ћелија је разблажен у 350 μ l *Staining Buffer-a*. Овако припремљена суспензија ћелија је анализирана коришћењем проточног цитометра *FACSCalibur* (BD Biosciences). Стратегија за анализу ћелија панкреасних острваца подразумевала је коришћење регион (енгл. *Gate*) из ког су изостављене моноклеарне ћелије (енгл. *Forward scattered light/Side-scattered light*). За цитометријску анализу ћелија регионалних лимфних чворова, коришћен је регион у ком су на основу FSC/SSC карактеристика, односно на основу величине и гранулираности ћелија, издвојени моноклеари. У току извођења анализе на проточном цитометру, регистровано је од 25000 до 100000 догађаја. Очитани подаци су накнадно анализирани и обрађени помоћу *FlowJo* (*FlowJo LLC, Becton Dickinson*) програмског пакета.



Слика 4. Стратегија коришћена за анализу резултата проточне цитометрије.

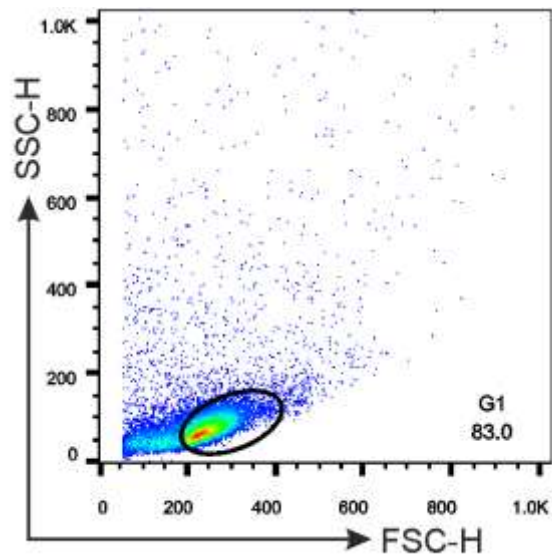
На панелу лево, приказано је подручје које је издвојено на основу FSC/SSC параметара, односно на основу величине и гранулираности детектованих ћелија. На панелу десно, приказана је популација CD45-Glut2+ ћелија, односно β ћелија панкреасних острваца.

Бојење маркера унутар ћелија

Бојење маркера у унутрашњости ћелија, као и продукованих цитокина, спроведено је коришћењем *BD Cytofix/Cytoperm™* у складу са упутствима произвођача. Ћелије су претходно стимулисане за шта су коришћени стимулатори јономицин (енгл. *ionomycin*, *Sigma Aldrich*) и форбол 12-миристат 13-ацетат (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, РМА; *Sigma Aldrich*). Ови стимулатори активирају РКС, протеин киназу С (енгл. *Protein Kinase C*, РКС) и улазак калцијумових јона унутар ћелије. У претходно стимулисаној ћелији, улазак јона калцијума изазива повећање експресије интрацелуларних молекула као и цитокина. Како дужина стимулације, односно инкубације, може имати штетно дејство по ћелију, она је оптимално трајала најмање 4, а највише 6 сати.

Инхибитори интрацелуларног транспорта, *BD GolgyStop™* и *GolgyPlug™*, су употребљени у току *in vitro* стимулације. Наведени инхибитори делују тако што заустављају интрацелуларни везикуларни транспорт и узрокују задржавање протеина, као што су цитокини у ЕПР и Голџи комплексу. На овај начин, спречавањем секреције или артефицијалног губитка ћелијских продуката који може настати у току процедуре, повећава се могућност идентификације ћелија које продукују испитиване цитокине. Након инкубације од 6 часова, не дуже због могућег цитотоксичног ефекта, суспензија ћелија је центрифугирана при брзини од 1400 rpm у трајању од 5 минута. Након тога је ћелијски талог ресуспендован у пуферу који се користи за бојење. Према раније описаној процедури, затим се обоје маркери експримирају на ћелијској мембрани. Ћелије су инкубиране 20 минута на температури од 4°C у мраку са коњугованим антителима

специфичним за мембранске маркере. По истеку инкубације, суспензија ћелија је опрана помоћу 2 ml расхлађеног пуфера за бојење, и центрофугирана при брзини од 1400 rpm у трајању од 5 минута. Након тога, ћелије су пермеабелизоване и мембрана је фиксирана и коришћењем комерцијалног раствора за ову намену у запремини од 250 μ l (енгл. *Fixation/Permeabilisation solution, BD Biosciences*). Овај процес је изведен у трајању од 20 минута на температури од 4°C. Непосредно пре и непосредно након додавања раствора за пермеабелизацију и фиксацију сви узорци ћелија су интензивно промешани коришћењем вортекса. По извршеној фиксацији, ћелијске суспензије су испране помоћу 2 ml пуфера за испирање концентрације 10% (енгл. *Perm/WashTM, BD*) и центрифугиране при брзини од 1400 rpm у трајању од 5 минута. Потом је уклоњен супернатант, а на талог ћелија су накупана антитела специфична за интраћелијске молекуле који су испитивани. Антитела су претходно растворена 10% пуферу за пермеабелизацију. Инкубација је трајала 30 минута и изведена је на температури од +4°C. Примарна коњугована антитела (дата у табели 1) припремљена су према упутствима произвођача. Након инкубације суспензије ћелија су испране помоћу 2 ml 10% пуфера за пермеабелизацију и центрифугиране при брзини од 1400 rpm у трајању од 5 минута. Испирање је извршено два пута, након чега су ћелије разблажене у 350 μ l пуфера и коначно припремљене за анализу. Након извршене процедуре бојења, суспензије ћелија су анализирани коришћењем проточног цитометра *FACSCalibur (BD)*.



Слика 5. Стратегија коришћена за анализу резултата проточне цитометрије. На панелу лево, приказано је подручје које је издвојено на основу FSC/SSC параметара, односно на основу величине и гранулираности детектованих ћелија. На панелу приказана су популације ћелија имунског система.

Табела 1. Списак антитела коришћених током истраживања

Назив	Каталожки број	Произвођач
CD3	FAB4841F	R&D Systems
	553067	BD Biosciences
CD4	130-102-597	MACS Biotech
	FAB554F	R&D Systems
CD8	130-102-468	MACS Biotech
	FAB116A	R&D Systems
CCR6	FAB5906	R&D Systems
CXCR3	562152	BD Biosciences
FoxP3	130-093-013	MACS Miltenyl Biotec
ST2	FAB10041A	R&D Systems
IL-12p40	554479	BD Biosciences
IL-10	NBP1-00673PCP	NOVUS
IL-17A	130-102-344	MACS Biotech
INF γ	RM9001	Invitrogen
CD45	553079	BD Biosciences
F4/80	FAB5580A	R&D Systems
	MF48020	Invitrogen
MHCII	12-53322-81	Ebioscience
CD206	FAB2535	R&D Systems
	ABTU0111121	R&D Systems
TNF α	IC410F	R&D Systems
	130-102-294	MACS Miltenyl Biotec

IL-1β	IC4013P	R&D Systems
CD11b	553312	BD Biosciences
CD11c	A14788	Life Technologies
	MCD11C05	Invitrogen
Galectin-3	130-101-312	MACS Biotech
	12-5301-82	eBioscience
GLUT-2	FAB1440A	R&D Systems
Annexin V, propidium iodide	4830-01-K	Trevigen
TLR4	12-9041-80	eBioscience

МЕТОДОЛОГИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА НА ИЗОЛОВАНИМ ПАНКРЕАСНИМ ОСТРВЦИМА IN VITRO

Третирање панкреасних острваца палмитинском киселином и проинфламацијским цитокинима

Након жртвовања животиња, које су претходно биле на стандардном режиму исхране, извршене венепункције (по ранијем успостављеном протоколу), вршено је узорковање панкреаса и изолација панкреасних острваца. (238) Овако добијена острваца, остављају се у комплетном медијуму преко ноћи (RPMI 1640), ради опоравка острваца од претходног третирања. Наредног дана панкреасна острваца се покупе, са тенденцијом да се избегну делови егзокриног панкреаса, а затим се поделе, на по 20 острваца по бунарчићу по микротитар плочи, у које се затим дода комплетни медијум и имунске или метаболичке ноксе.

У припреми и растварању радног раствора палмитинске киселине, палмитат је помешан са Кребс Рингер ХЕПЕС пуфером који садржи 20% BSA (*fraction V, Roche, Basel, Switzerland*). Поједина острваца су третирана палмитатом (100mmol/l) у трајању од 24h.

Друге групе острваца третиране су коктелом прозапаљенских цитокина: rat IFN- γ (*R&D Systems, MI, USA, 10 ng/ml*), mouse IL-1 β (*R&D Systems, MI, USA, 10 ng/ml*), mouse TNF- α (*R&D Systems, MI, USA, 10 ng/ml*). Након готове стимулације, из третираних бунарчића покупљен је супернатант, који је коришћен за даљу анализу и мерење параметара оксидативног стреса, док је преостали ћелијски талог коришћен за анализу ћелија, употребом проточне цитометрије.

Одређивање параметара оксидативног стреса у панкреасним острвцима након стимулације имунских и метаболичким ноксама

Параметри оксидативног стреса одређивани су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*) користећи прикупљене узорке супернатанта панкреасних острваца.

Ниво супероксид анјонског радикала (O_2^-) мерен је реакцијом нитро плавог тетразолијума у TRIS пуферу на 530 nm. *Krebs-Henseleit* раствор је коришћен као слепа проба. (239)

Мерење нивоа водоник пероксида (H_2O_2) базирано је на оксидацији фенол црвеног водоник пероксида у реакцији катализованом пероксидазом (HRP). 200 μ L перфузата је исталожено употребом 800 mL свеже припремљеног раствора фенол црвеног; Затим је додато 10 μ L (1:20) HRPO (направљено *ex tempore*). За слепу пробу, коришћен је адекватан волумен *Krebs-Henseleit* раствора. Ниво H_2O_2 је мерен на 610 nm. (240)

Азотни оксид се брзо разлаже и ствара стабилне производе нитрита / нитрата. Ниво нитрита (NO_2^-) је мерен и коришћен као индекс производње азотног оксида (NO), користећи *Griess's* реагенс. Укупно 0.5 mL супернатанта је исталожено са 200 μ L 30% сулфо-салицилне киселине, вортексован 30 минута и центрифугирано на 3.000g. Додате су једнаке запремине супернатанта и *Griess's* реагенса, који садрже 1% сулфаниламида у 5% фосфорној киселини / 0,1% нафталин етилендиамин-ди хидрохлорид и инкубирани 10 минута у мраку, а затим мерени на 543 nm.

Ниво нитрита је израчунат коришћењем натријум нитрита као стандарда. (241)

Степен липидне пероксидације у супернатанту ћелија острваца процењен је мерењем TBARS, користећи 1% тиобарбитурне киселине у 0,05 NaOH, која је инкубирана на 100°C током 15 минута и мерена на 530 nm. *Krebs-Henseleit* раствор је коришћен као слепа проба. (242)

СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ КОРИШЋЕНЕ ЗА ИНТЕРПЕТАЦИЈУ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

Добијени подаци из експеримената су анализирани употребом рачунарског пакета SPSS, верзија 22. Правилност расподеле добијених вредности анализирана је пре обраде података. Када је квантум анализираних вредности био испод 50, за правилност расподеле коришћен је *Shapiro-Wilk* статистички тест, док је за узорак изнад 50 резултата употребљен *Kolmogorov-Smirnov* статистички тест. Уколико су претходно измерене вредности пратиле нормалну расподелу, у накнадној анализи коришћен је *Student*-ов *t* тест, односно параметарски статистички тест. У случају да вредности нису пратиле нормалну расподелу, за даљу анализу је коришћен непараметарски тест, односно *Mann-Whitney* тест. За прорачун површине испод криве графика коришћена је метода трапезоида. За сваку вредност криве у временском интервалу од интереса коришћена је следећа формула:

$$\Delta AUC_{1-2} = \frac{(Cp_1 + Cp_2)}{2} \times (t_2 - t_1)$$

Након израчунавања вредности за све трапезоиде са графика, укупна површина испод криве израчунава се сабирањем апсолутних вредности свих трапезоида.

Резултати прикупљени током експеримената су представљени графички, а нумеричке вредности су изражене као просечна вредност +/- стандардна грешка мерења (енгл. *Standard err.*, SE). Три нивоа статистичке значајности коришћена су за одређивање постојања статистички значајне разлике међу експерименталним групама, односно, вредности вероватноће су биле: $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$.

Величина узорка израчуната је на основу студије сличног дизајна (243) из 2016. године, коришћењем рачунарског програма G*Power 3.1.7. На основу вредности гликемија наше мишева дивљег соја, чија је просечна вредност на стандардној исхрани била 14.11 mmol/l уз SE 0.47mmol/l, и просечне вредности гликемије мишева дивљег соја којима је индукована T1DM која је износила 22.23 mmol/l +/-1.09 mmol/l, одређена је величина узорка. Потребна величина узорка за ниво значајности $\alpha = 0.05$ и статистичку моћ теста $1 - \beta$ од 95%, поређењем група у оба смера, износила је минимум 5 експерименталних животиња по групи. Овако одређен студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student t* тест за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе испитаника, са снагом студије 95%.

РЕЗУЛТАТИ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ТИП 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на промене телесне масе мишева, док смањује пораст хипергликемије, гликозурије и кетонурије након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина

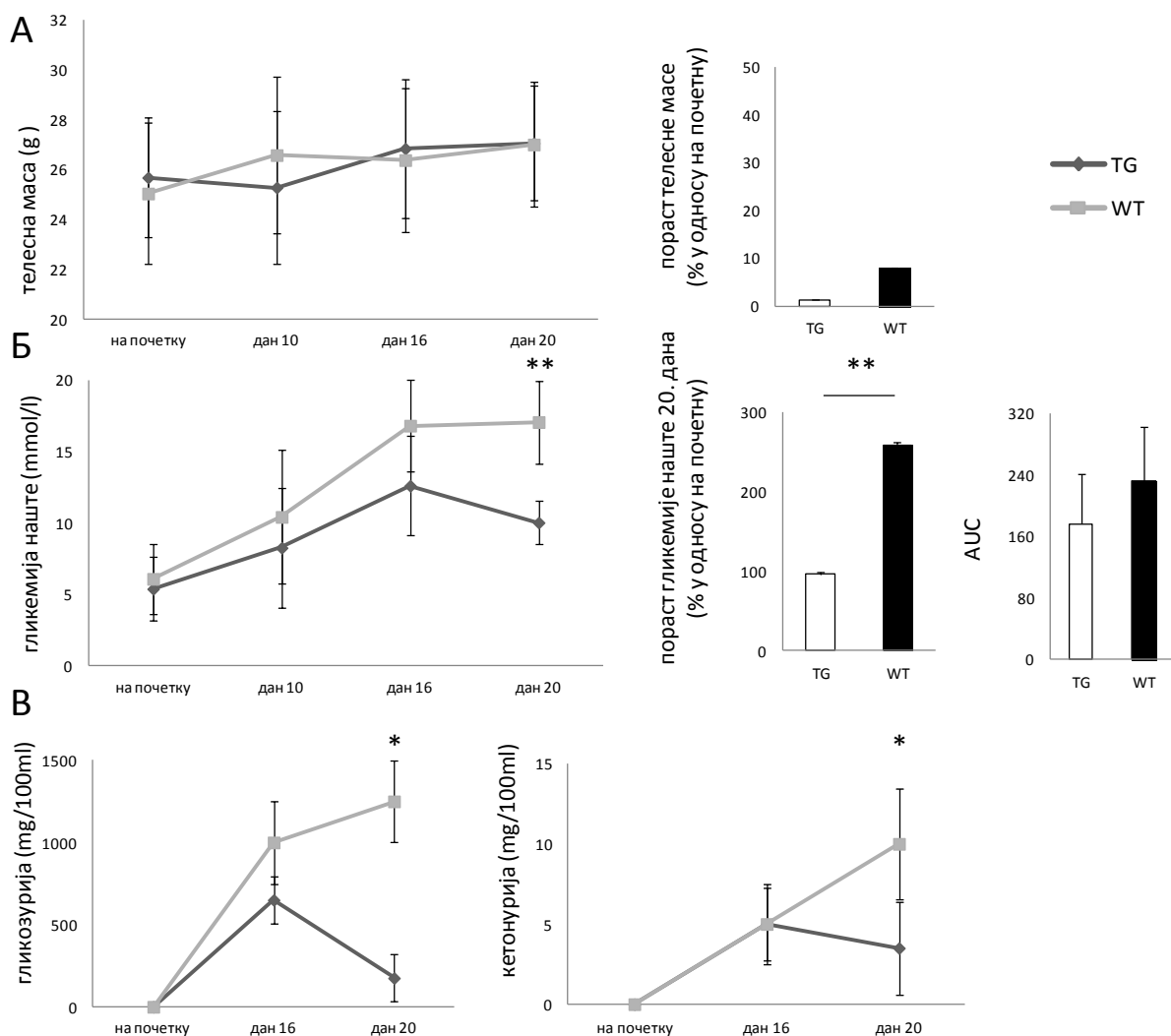
Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама, направљени су, да би се испитао утицај појачане експресије галектина-3 у патогенези шећерне болести. Са циљем утврђивања евентуалног утицаја појачане експресије галектина-3 у патогенези T1DM, WT и TG мишевима апликован је стрептозотоцин у дози од 40 mg/kg пет узастопних дана интраперитонеално.

Након 21. дана експеримента дошло је до минималних промена у телесној маси у обе групе мишева, без значајне разлике у телесној маси између група (Слика 6А). Добијени резултати показују да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на промене у телесној маси мишева у експерименталном моделу T1DM.

Праћење и анализа вредности гликемија наше, након претходне припреме без хране у трајању од 4h, показала је да је у групи TG мишева ефекат стрептозотоцина доста слабији. Након сличних вредности гликемије наше међу групама, пре примене стрептозотоцина, десетог дана експерименталног модела, а још израженије шеснаестог дана, вредности гликемије наше су у порасту, али тај пораст је слабије изражен у групи TG мишева у поређењу са гликемијама наше у контролној групи. Измерене вредности гликозурије и кетонурије биле су у порасту али сличних вредности у обе експерименталне групе до шеснаестог дана експерименталног модела. Након шеснаестог дана и достизања пика, просечна вредност гликемије наше у групи TG мишева почиње да пада, док у контролној групи мишева вредности гликемија наше настављају да расту уз појаву статистички значајне разлике између група (Слика 6Б).

Вредности гликозурије и кетонурије након шеснаестог дана у групи TG мишева почињу да опадају, док у контролној групи мишева вредности гликозурије и кетонурије настављају да расту, такође уз појаву статистички значајне разлике између група (Слика 6В).

Како су се у контролној групи мишева, шеснаестог дана од старта, вредности хипергликемије досегле и одржале на преко 12 mmol/L, сматра се да је болести правилно индукована. У групи TG мишева долази до развоја хипергликемије од 12 mmol/L која се не одржава, већ запажамо пад вредности гликемије наше који је праћен падом гликозурије и кетонурије, те можемо рећи да трансгена појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама након иницијалног оштећења стрептозотоцином смањује оштећење β ћелија.

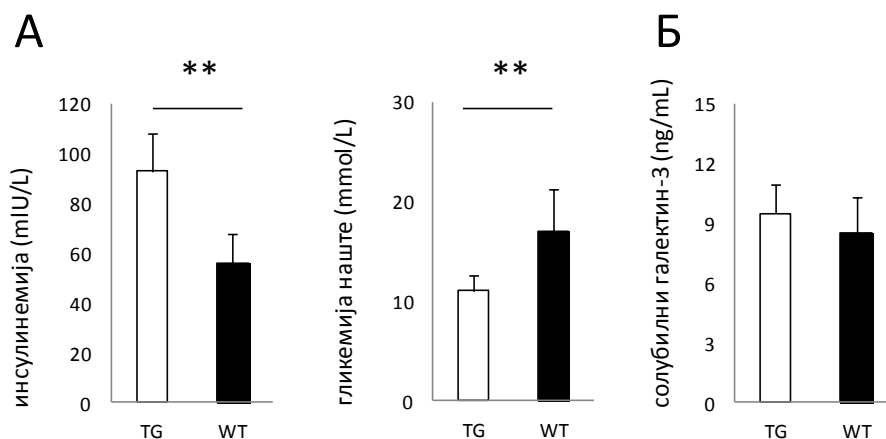


Слика 6. Разлике у метаболичким параметрима између група након примене пет ниских узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Приказане су промене у вредностима метаболичких параметара у експерименталном моделу T1DM. (A) Мерењем телесне масе и анализом није уочена значајна разлика међу групама у телесној маси и проценту увећања телесне масе у односу на почетак експеримента. (B) Значајно ниже вредности хипергликемије наште виђене су у групи TG мишева 20. дана експерименталног модела, представљене као вредности гликемије наште, као % пораста гликемије наште у односу на почетне вредности као и вредности површине испод криве. (B) Значајно ниже вредности гликозурије и кетонурије виђене су у групи TG мишева 20. дана експерименталног модела. Представљени су резултати здружених експеримента, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама доводи до појаве значајно виших вредности инсулинемија при значајно нижим вредностима гликемија наше, не утичући на концентрацију солубилног галектина-3 у серуму, након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина

На дан жртвовања експерименталних животиња, које су претходно третиране са пет узастопних доза стрептозотоцина од 40mg/kg, мерена је гликемија наше уз претходну припрему. Након жртвовања и узорковања крви, у серуму животиња измерена је концентрација инсулина која одговара вредностима гликемије наше. Анализа вредности гликемије наше показала је сигнификантно нижу вредност у групи TG мишева, у поређењу са контролном групом мишева. Вредности гликемије наше у групи TG мишева сматрају се нормалном гликемијом, док се вредности у контролној групи мишева сматрају развијеном хипергликемијом. Истовремена вредност инсулинемије била је статистички сигнификантно већа у групи TG мишева, у поређењу са контролном групом мишева, што указује на значајно мање оштећење β ћелија стрептозотоцином ове групе мишева (Слика 7А). Анализа концентрације солубилног галектина-3 у серуму није показала постојање разлика између група (Слика 6Б).

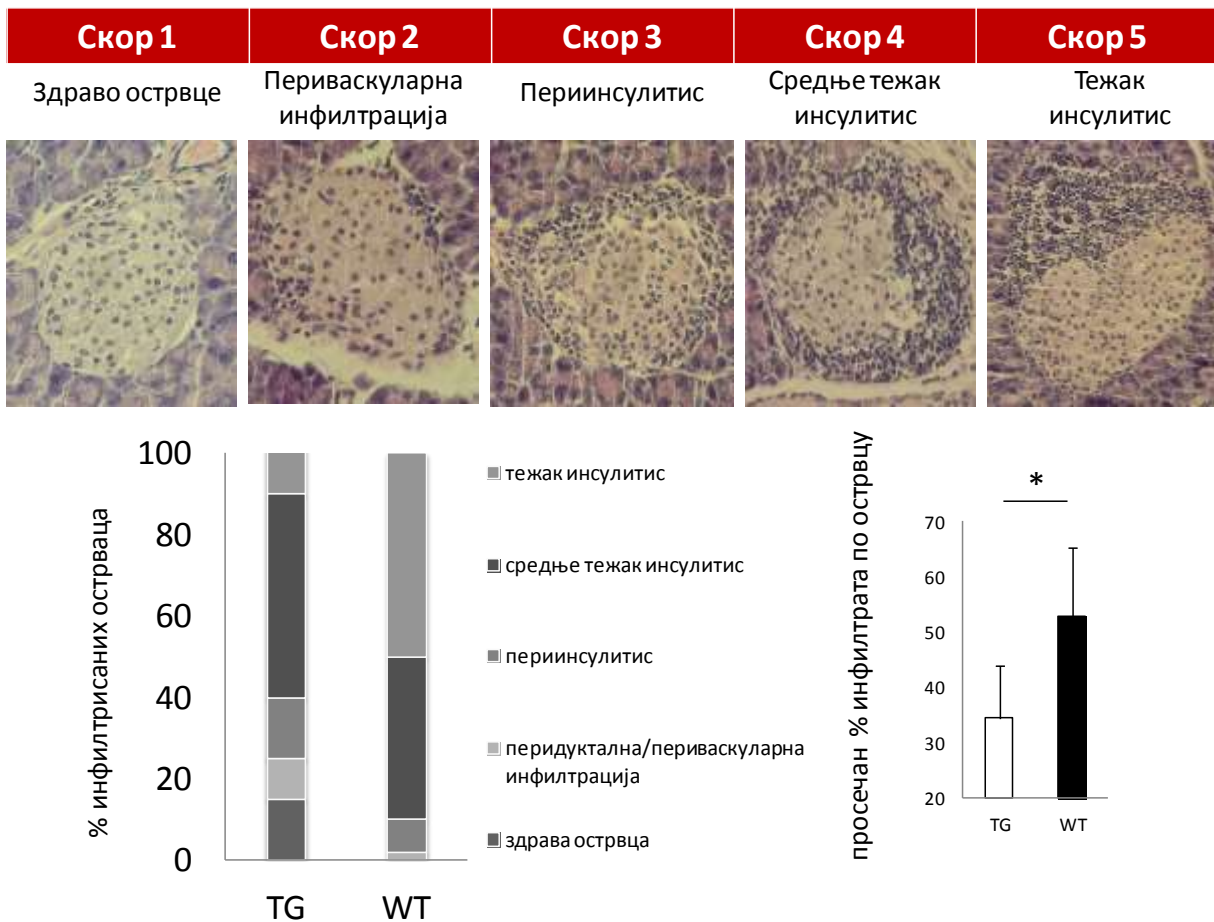


Слика 7. Разлике у вредностима инсулинемија и концентрације солубилног галектина-3 у серуму између група након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Приказане су промене у вредностима гликемија наше, инсулинемија и солубилног галектина-3 у експерименталном моделу T1DM. (А) Измерене вредности инсулинемија показале су значајно веће инсулинемије у групи TG мишева уз исповремено значајно ниже вредности гликемија наше. (Б) У измереним вредностима солубилног галектина-3 није било значајних разлика између група. Представљени су резултати здружених експеримента, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, подстиче развој блажег облика инсулитиса након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина

Након праћења метаболичких параметара и утврђених разлика у вредностима гликемијама наше, гликозурији, кетонурији и концентрацији инсулина, испитивана је повезаност ових параметара са морфолошким променама острваца и инфилтрацијом ћелија имунског система. Са тим циљем су патохистолошком анализом ткивних препарата испитивани степен али и дистрибуција инфитрираних ћелија у панкреасна острвца експерименталних животиња. Анализа хистолошких препарата показала је да је проценат острваца са израженим инсулитисом (10% vs 50%) сигнификантно нижи у групи TG мишева, у односу на контролну групу мишева. Анализа заступљености острваца са нижим степеном патохистолошких промена: благим инсулитисом, периваскуларним /перидукталним инфилтратом и пери-инсулитисом (75% vs 50%) показала је већу процентуалну заступљеност острваца са лакшим степеном инсулитиса у групи TG мишева у поређењу са контролном групом мишева. Насупрот томе, проценат нормалних, здравих острваца, без присутног инфилтрата, био је сигнификантно већи у групи TG мишева (15%), у поређењу са мишевима дивљег соја где нису виђена здрава острвца (0%). Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају слабије изражену инфилтрацију острваца и знатно више здравих панкреасних острваца у поређењу са контролном групом мишева (Слика 8).



Слика 8. Слабије изражено запаљење панкреасних острваца TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Бојењем хематоксилин-еозином показали смо да TG мишеви имају мањи степен запаљење панкреасних острваца у поређењу са мишевима дивљег соја након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина. Репрезентативне слике препарата обојених хематоксилин-еозин техником (коришћено је увеличање $\times 40$) са квантификацијом инсулитиса. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ мишева по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

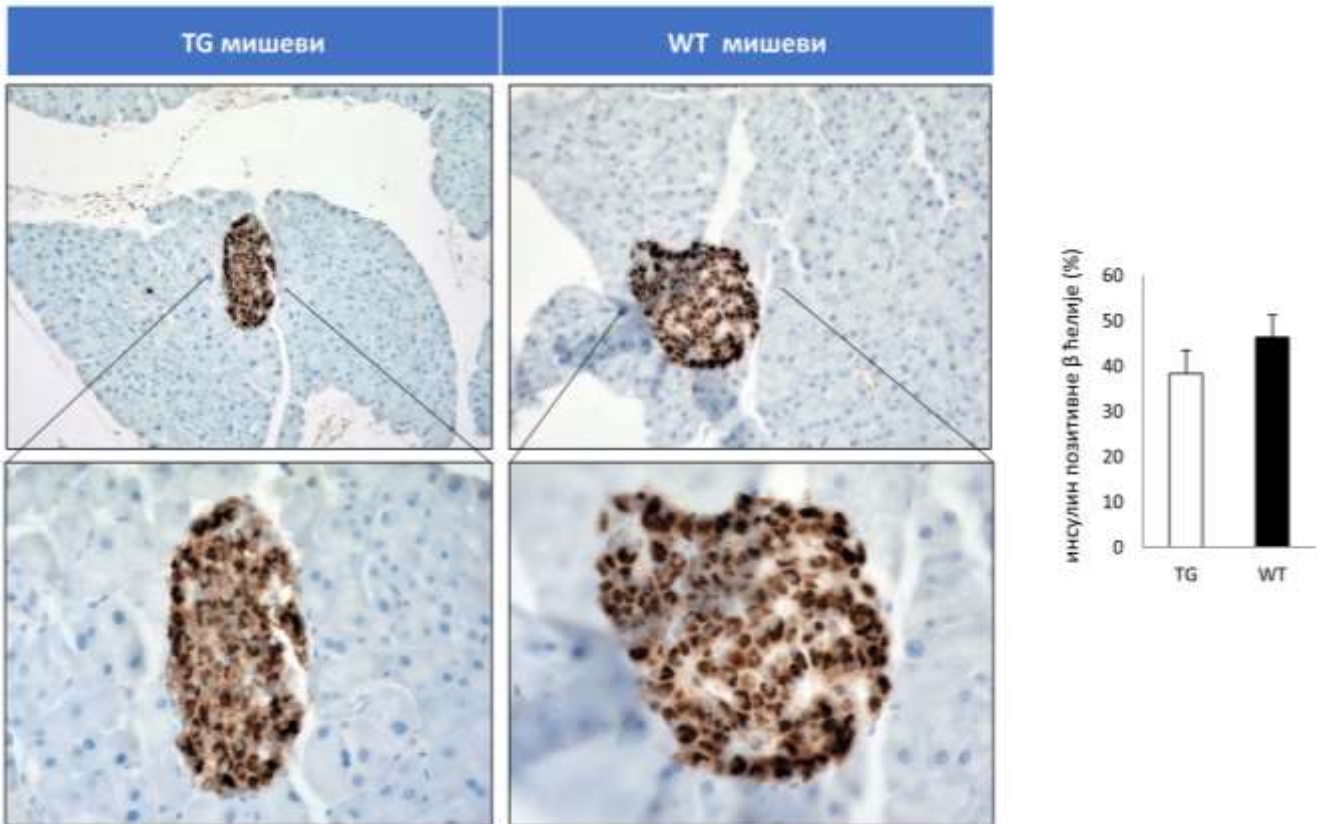
Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, не утиче на концентрацију инсулина у панкреасним острвцима, након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина

У експерименталном моделу T1DM, који је изазван давањем пет узастопних малих доза стрептозотоцина, изазива се покретање аутоимунске реакције која за последицу има оштећење панкреасних острваца тј. β ћелија. Ово оштећење праћено је смањењем укупног броја β ћелија и смањеном секрецијом инсулина. Овакво оштећење доводи до развоја стања хипергликемије, који механизмом повратне спреге додатно стимулише преостале β ћелија да стварају још већу количину инсулина у покушају да се поново успостави хомеостаза. Обзиром да се број здравих β ћелија, са развојем болести, прогресивно смањује преостале β ћелије покушавају да компензаторно повећају стварање инсулина, али безуспешно, и стање хипергликемије добија хроничан ток.

Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама имали су сличну површину острвца имунореактивну на инсулин у поређењу са панкреасним острвцима мишева дивљег соја. Анализиран је само проценат инсулин позитивних β ћелија 21. дана експерименталног модела али не и интензитет којим се β ћелије боје, који би могао да укаже на количину инсулина у њима, пошто коришћење DAB хромогена у имунохистохемији не дозвољава овакву врсту анализе (Слика 9).

Давање пет узастопних малих доза стрептозотоцина, код TG мишева довело је до развоја значајно мање хипергликемије у поређењу са мишевима дивљег соја третираних на исти начин али са ипак нешто већим гликемијама у поређењу са потпуно здравим мишевима, који нису третирани стрептозотоцином, чије су гликемије у нормалним опсезима.

У овом контексту гледано, вредност инсулинемије која је значајно виша, као и слична количина инсулин позитивних ћелија у острвцима, у групи TG мишева говоре о слабијем оштећењу острваца TG мишева након давања пет узастопних малих доза стрептозотоцина.



Слика 9. Сличан проценат инсулин позитивних ћелија у панкреасном острвацу TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Имунохистохемијском анализом парафинских исечака показано је да TG мишеви имају сличан проценат инсулин позитивних ћелија у панкреасним острвцима у поређењу са мишевима дивљег соја, након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина. Репрезентативне слике инсулин позитивних ћелија (увеличање x10 и x40). Представљени су резултати здружених експеримената, n=5-7 мишева по свакој групи, као просечна вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

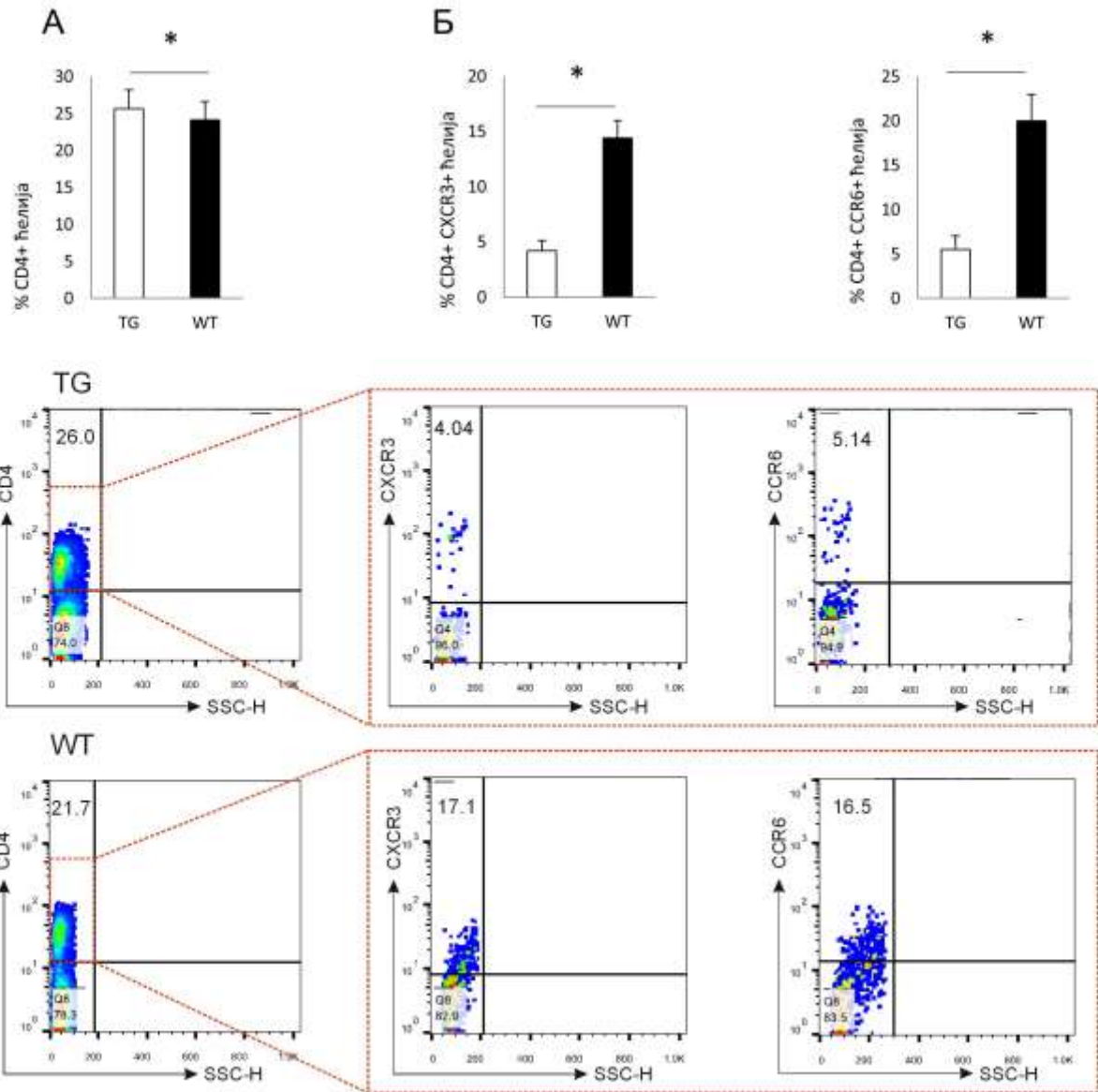
Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, доводи до веће заступљености укупних помоћничких Т лимфоцита али знатно мање заступљености прозапаљенских ћелија у острвцима након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина

Након анализа метаболичких параметара, параметара гликорегулације и степена инфламације острваца, изведена је фенотипска анализа инфилтришућих ћелија панкреасних острваца. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама имали су мању укупну заступљеност инфилтрисаних ћелија имунског система у острвцима, у поређењу са мишевима дивљег соја, након давања пет узастопних малих доза стрептозотоцина. У испитиваној популацији инфилтрисаних ћелија TG мишеви имали су статистички значајно већи проценат укупних помоћничких лимфоцита у поређењу са контролном групом (Слика 10А). Међутим, проценат прозапаљенских, Th1 и Th17 помоћничких Т лимфоцита (Слика 10Б) био је сигнификантно мањи у групи TG мишева, у поређењу са контролном групом.

Процентуална заступљеност Foxp3+ (енгл. *forkhead box P3*) регулаторних ћелија као и ST2 позитивних регулаторних ћелија (Слика 11Б), била је значајно нижа у панкреасним острвцима TG мишева. Међутим, однос регулаторних и прозапаљенских лимфоцита био је значајно повољнији у групи TG мишева (Слика 11А).

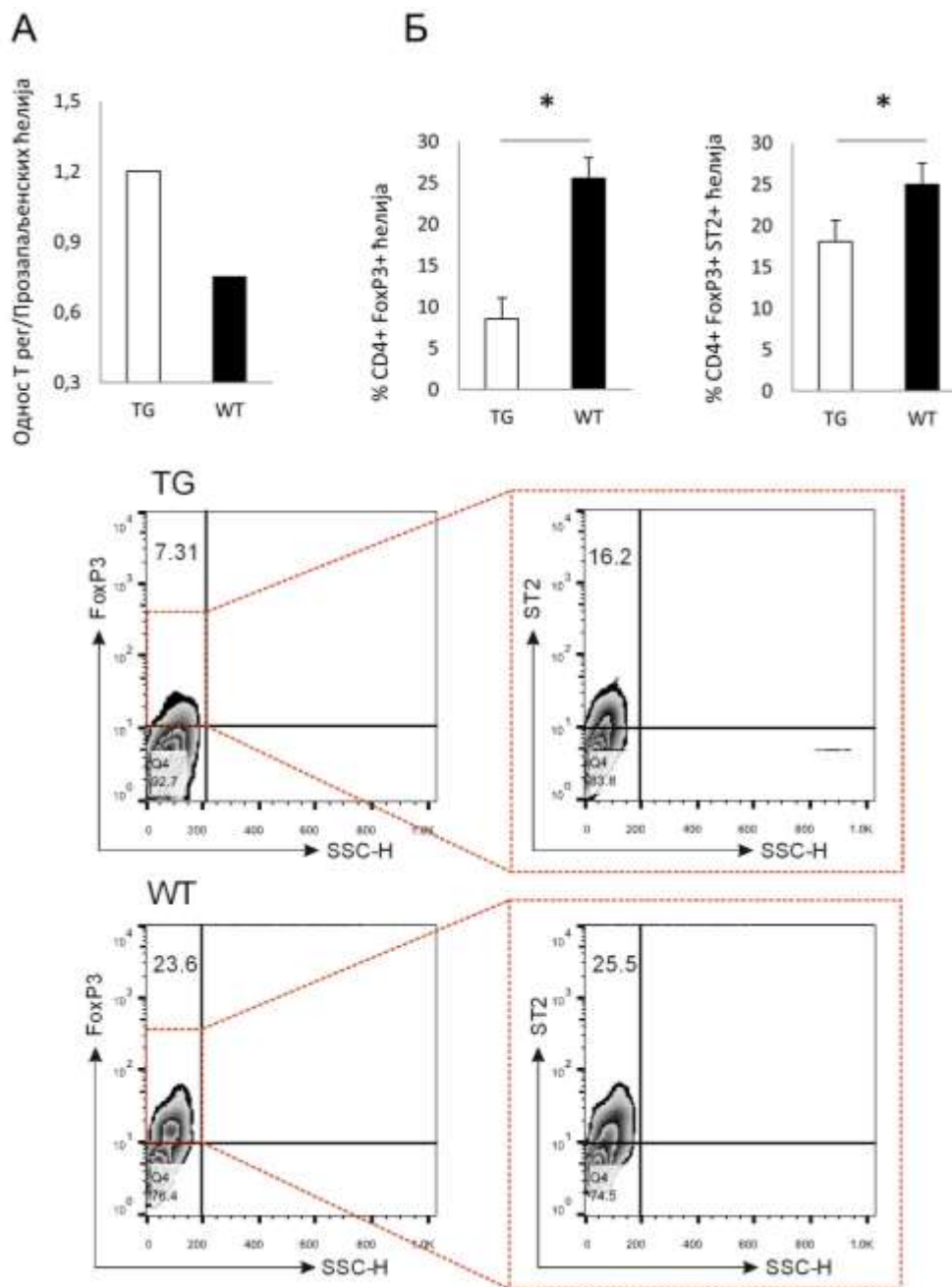
Процентуална заступљеност цитотоксичних (Слика 12А) и активираних цитотоксичних Т лимфоцита (Слика 12Б) била је сигнификантно мања у групи TG мишева, у поређењу са контролном групом.

Процент укупних макрофага био је приближно исти између група (Слика 13А) али је проценат класично активираних макрофага али макрофага активираних алтернативним путем био значајно мањи у групи TG мишева (Слика 13Б). Статистичка разлика није уочена ни у анализи процентуалне заступљености моноцита и дендритских ћелија (Слика 13В), али је у групи TG мишева било значајно више галектин-3 позитивних дендритских ћелија (Слика 13Г).



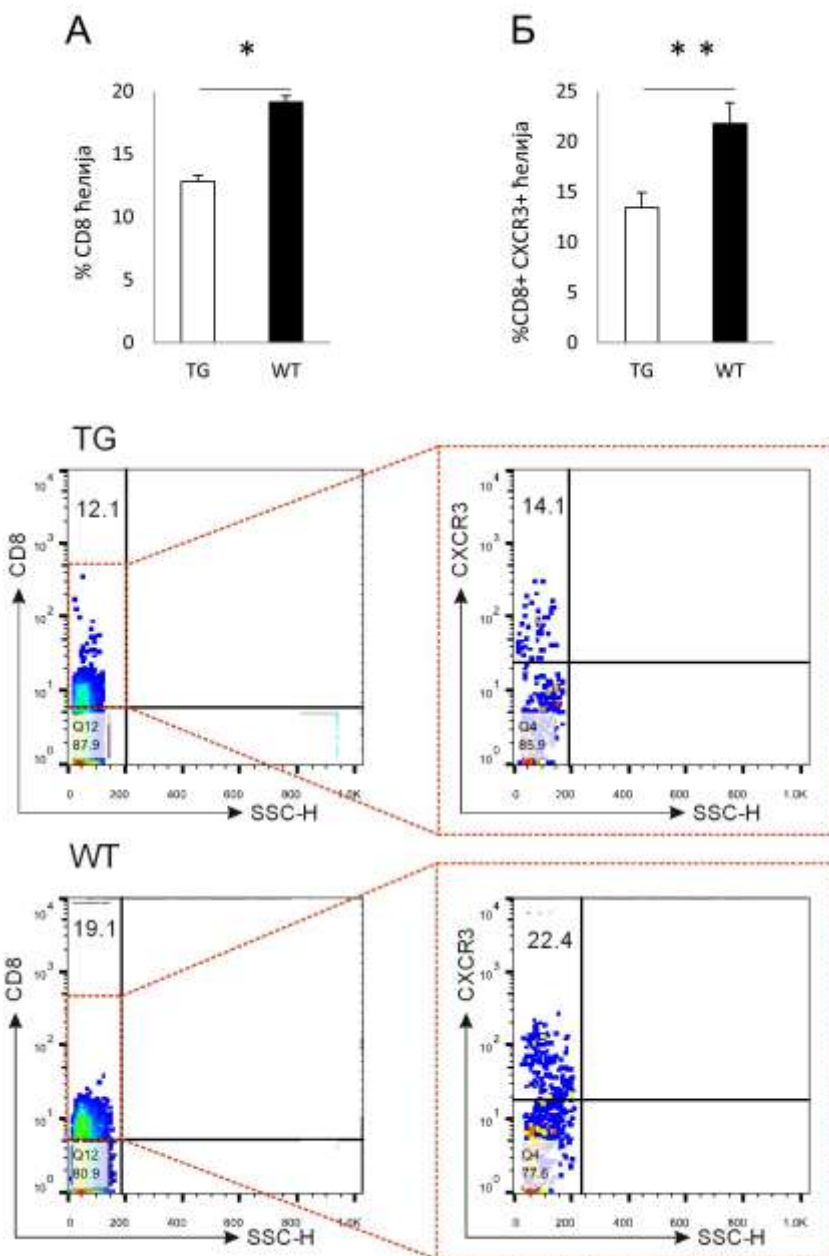
Слика 10. Мања заступљеност проинфламацијских CD4+ ћелија у панкреасним острвцима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је проценат (А) укупних помоћничких CD4+ лимфоцита, (Б) и Th1 и Th17 ћелија у острвцима. Представљени су и репрезентативни плотови. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



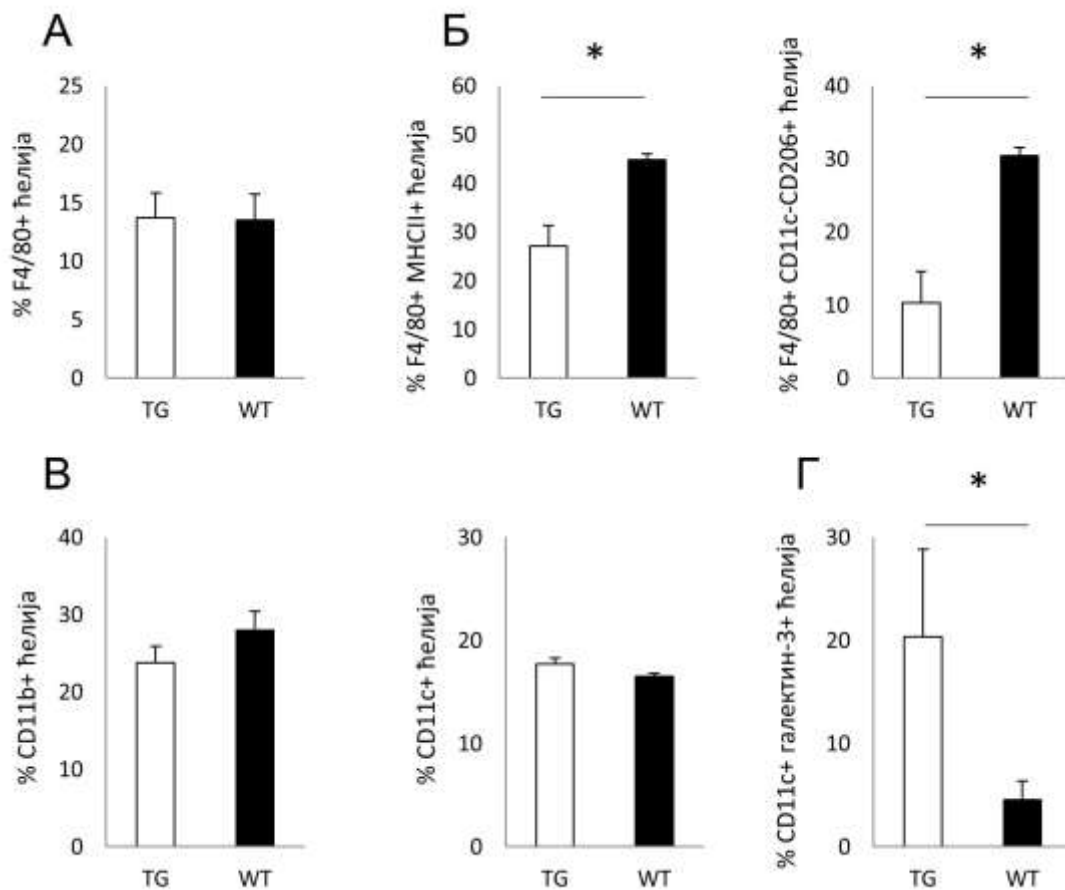
Слика 11. Мања заступљеност регулаторних CD4+ ћелија у панкреасним острвцима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је (А) Однос регулаторних и укупних прозапаљенских ћелија у острвцима. (Б) Процентуална заступљеност регулаторних и ST2 позитивних регулаторних ћелија, у острвцима. Представљени су и репрезентативни плотови. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Слика 12. Мања заступљеност цитотоксичних CD8+ ћелија у панкреасним острвцима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је проценат (А) укупних цитотоксичних и (Б) активираних цитотоксичних ћелија у острвцу. Представљени су и репрезентативни плотови. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.



Слика 13. Заступљеност ћелија урођене имуности у панкреасним острвцима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

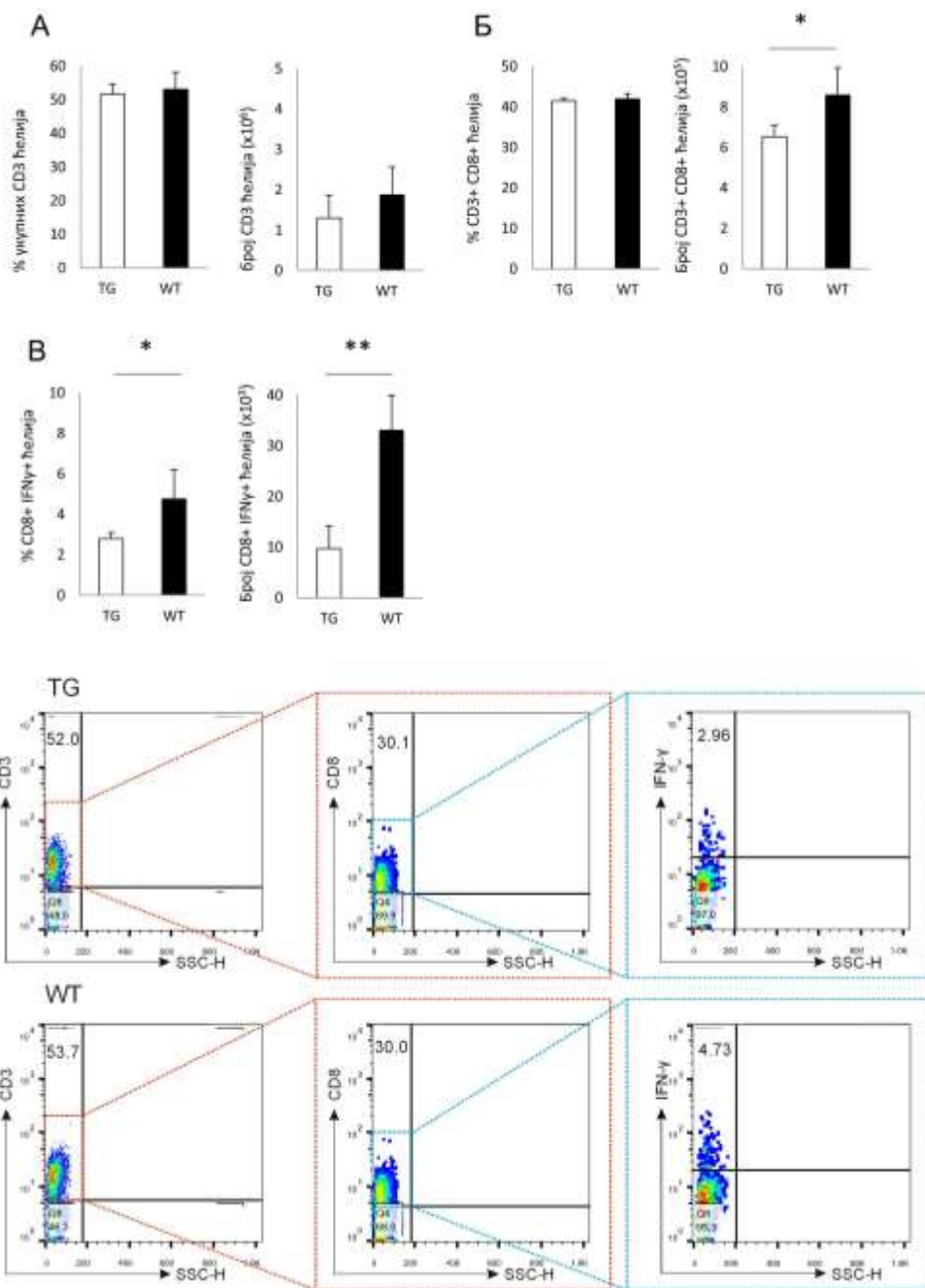
Проточном цитометријом анализиран је проценат (А) укупних макрофага (Б) прозапаљенских и профиброгених макрофага (В) укупних моноцита и дендритских ћелија (Г) галектин-3 позитивних дендритских ћелија у острвцима. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, доводи до значајно мање заступљености прозапаљенских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима, након примене пет узастопних малих доза стрептозотоцина

Након фенотипске анализе ћелија панкреасних острваца, испитане су и фенотипске, као и функционалне карактеристике ћелија регионалних, панкреатичних лимфних чворова. Анализа је показала да није постојала значајна разлика у процентуалној заступљености и апсолутном броју укупних, CD3+ лимфоцита (Слика 14А). Такође није уочена разлика у процентуалној заступљености CD3+CD8+ Т лимфоцита, али је апсолутни број ових ћелија био значајно нижи у групи TG животиња у односу на мишеве дивљег соја (Слика 14Б). Такође је уочено да су и проценат и апсолутни број активираних ефекторних CD3+CD8+IFN γ + Т лимфоцита били значајно нижи у регионалним лимфним чворовима TG мишева у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 14В).

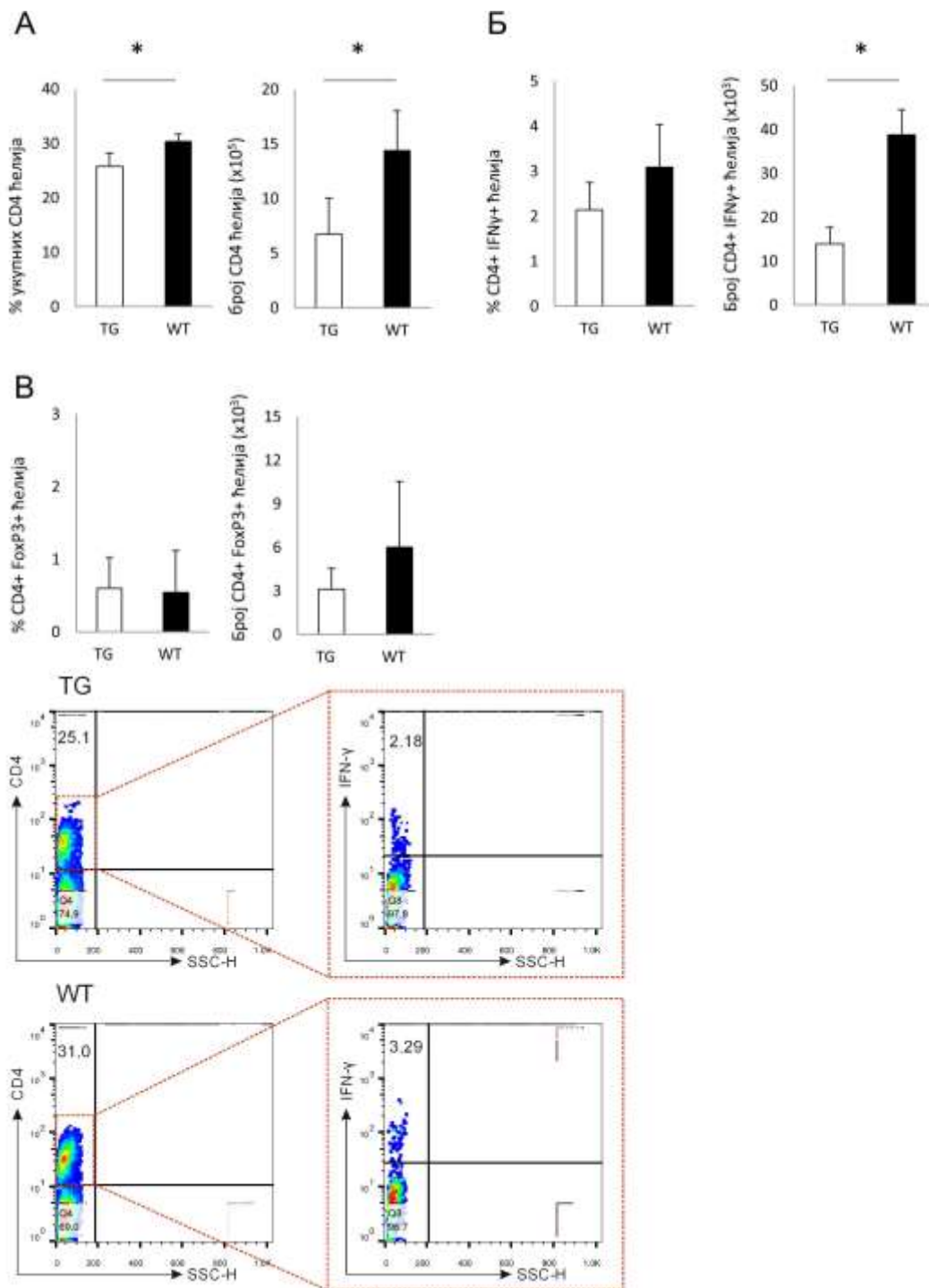
Даља анализа је показала да су процентуална заступљеност као и апсолутни број помоћничких CD4+ Т лимфоцита били значајно мањи у лимфним чворовима TG животиња (Слика 15А). Истовремено је показано и да је апсолутни број прозапаљенских CD4+IFN γ + Т лимфоцита био сигнификантно нижи у групи TG мишева у односу на контролну групу (Слика 15Б). Није уочена статистички значајна разлика у проценту и апсолутном броју регулаторних CD4+FoxP3+ Т лимфоцита у панкреатичним лимфним чворовима испитиваних животиња (Слика 15В).

Испитивање карактеристика ћелија урођене имуности је показало да није постојала значајна разлика у процентуалној заступљености F4/80+ макрофага, али да је апсолутни број ових ћелија био сигнификантно нижи у групи TG животиња у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 16А). Такође, није уочена значајна разлика у проценту прозапаљенских F4/80+IL-6+ макрофага, али је њихов број био значајно нижи у регионалним лимфним чворовима TG животиња (Слика 16Б). У складу са овим подацима, процентуална заступљеност CD11b+ моноцита, као и прозапаљенских CD11b+TNF- α + моноцита се није разликовала између испитиваних група животиња, али је њихов апсолутни број био значајно нижи код TG мишева (Слика 17А и 17Б). Даља испитивања су показала да су и процентуална заступљеност и апсолутни број CD11c+ дендритских ћелија били значајно виши у лимфним чворовима TG мишева у односу на контролну групу животиња (Слика 17В). Такође, проценат и број CD11c+IL12p40+ дендритских ћелија су били значајно виши у лимфним чворовима TG животиња у поређењу са контролном групом (Слика 17В).



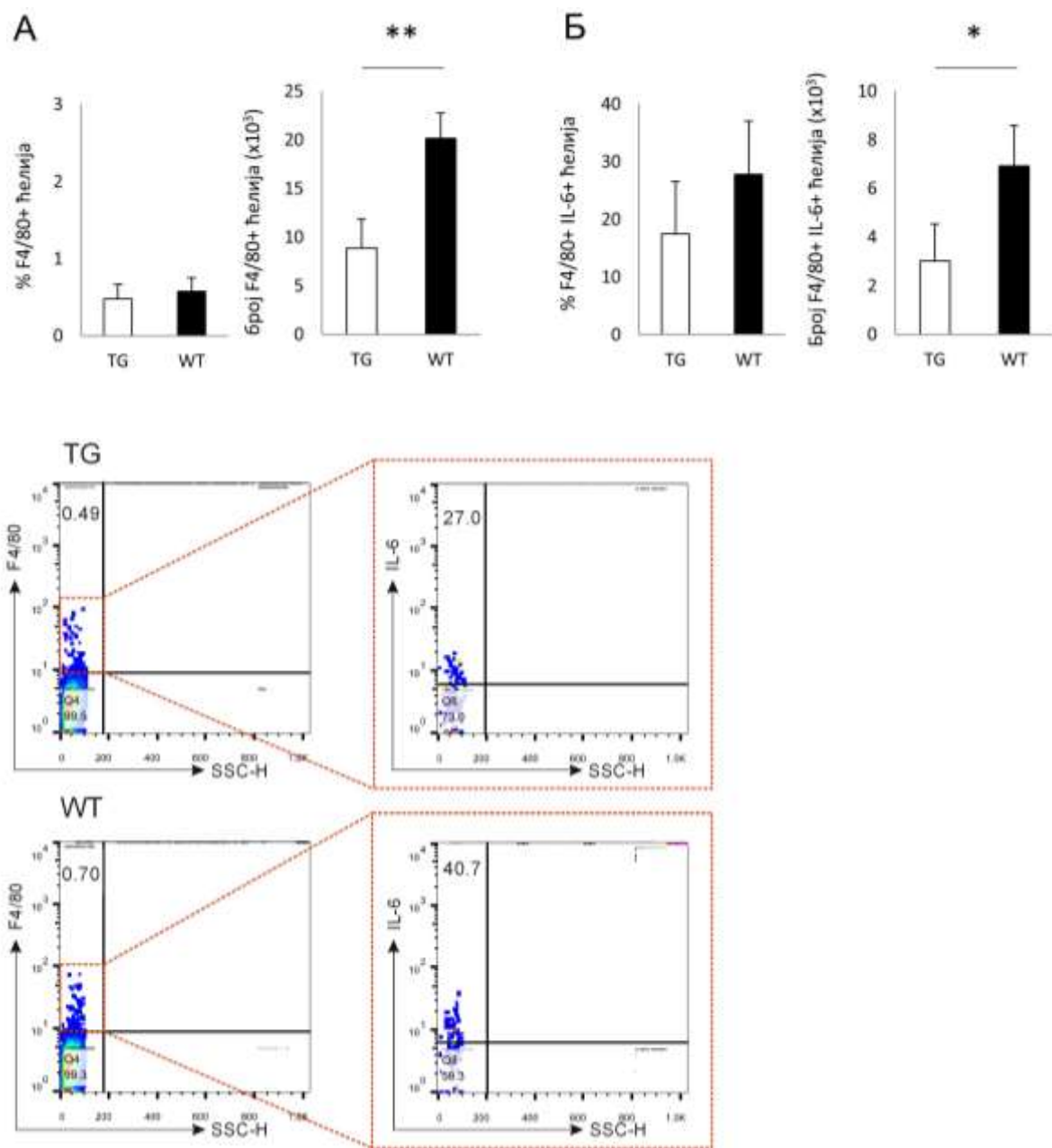
Слика 14. Мања заступљеност прозапаљенских ћелија стечене имуности у лимфним чворовима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализирани су процентуална заступљеност и апсолутни број: (А) укупних CD3+ ћелија (Б) укупних цитотоксичних и (В) активираних ефекторских цитотоксичних ћелија у регионалном лимфном чвору. Представљени су репрезентативни плотови и резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



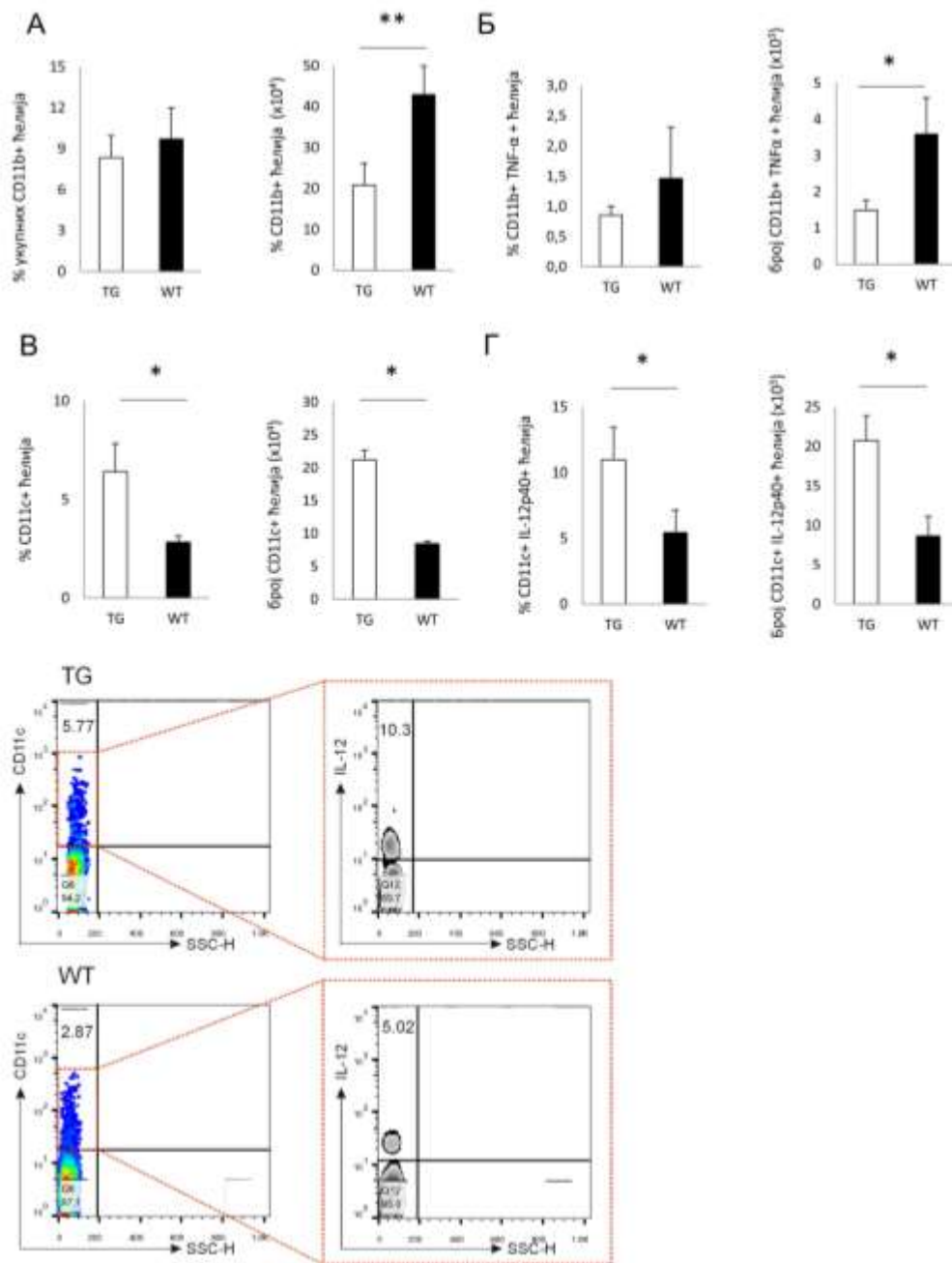
Слика 15. Мања заступљеност прозапаљенских ћелија стечене имуности у лимфним чворовима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализирани су процентуална заступљеност и апсолутни број: (А) укупних помоћничких, (Б) активираних прозапаљенских помоћничких (В) регулаторних помоћничких ћелија у регионалном лимфном чвору. Представљени су репрезентативни плотови и резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Слика 16. Мања заступљеност прозапаљенских ћелија урођене имуности у лимфним чворовима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозоцина 20. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализирани су процентуална заступљеност и апсолутни број: (А) укупних макрофага, (Б) активираних прозапаљенских макрофага у регионалном лимфном чвору. Представљени су репрезентативни плотови и резултати здружених експеримената, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.



Слика 17. Мања заступљеност прозапаљенских ћелија урођене имуности у лимфним чворовима TG мишева након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела.

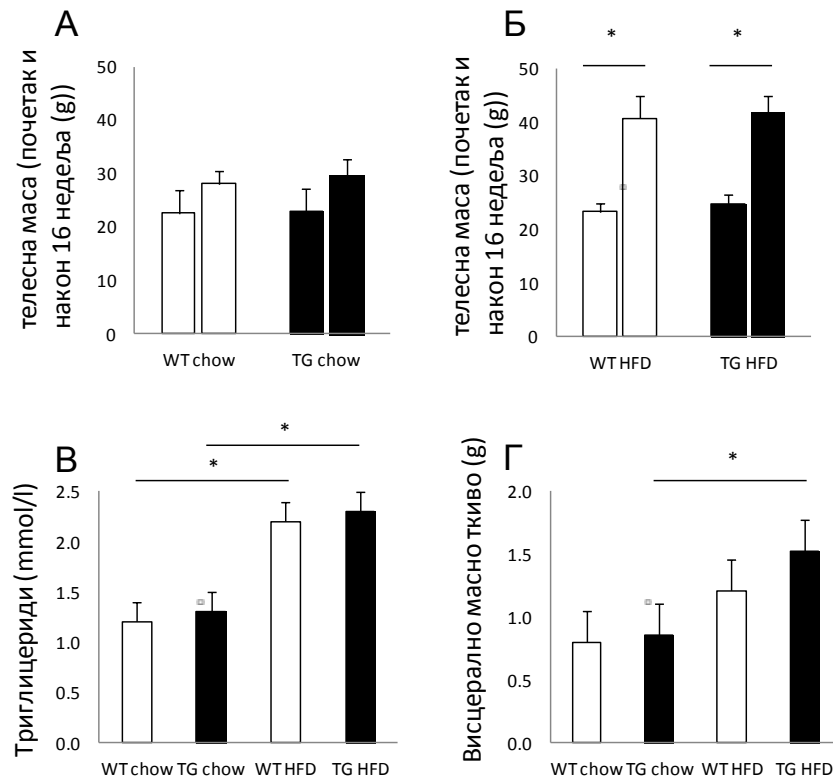
Проточном цитометријом анализирани су процентуална заступљеност и апсолутни број: (А) укупних моноцита, (Б) активираних моноцита, (В) укупних дендритских ћелија, (Г) CD11c+IL12p40+ дендритских ћелија у регионалном лимфном чвору. Представљени су репрезентативни плотови и резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ ТИП 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на развој гојазности након 16 недеља исхране богате мастима

Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама, направљени су да би се испитао утицај појачане експресије галектина-3 на развој гојазности и патогенезу шећерне болести. Циљ студије је био испитивање утицаја појачане експресије галектина-3 на степен развоја гојазности и T2DM. TG и мишеви дивљег соја, третирани су храном са веома повећаним садржајем масти (60% калорија из масти) или у случају контролних група, стандардном храном за глодаре (10% калорија из масти) у континуитету од 16 недеља. Након 16 недеља, исхрана са повећаним садржајем масти, код обе групе мишева, довела је до повећања телесне масе у односу на групе мишева на стандардној исхрани, али без разлика у телесној маси између група који су били на режиму храњења обогаћеног мастима (Слика 18А и 18Б). Добијени резултати указују на то да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на развој гојазности код животиња на храни са повећаним садржајем масти али и животиња које су биле храњене стандардном храном.

Гојазност представља хронично обољење које се карактерише повећњем количине масног ткива у организму, како висцералног, чије увећање значајно ремети инсулинску сензитивност, тако и поткожног. Након 16 недеља експерименталног режима исхране, животиње су жртвоване када је и измерена тежина висцералног епидидималног масног ткива (Слика 18Г). Такође је показано да је у групама на исхрани богатој мастима дошло до пораста тежине епидидималног висцералног масног ткива у оба соја животиња, у поређењу са групама мишева на стандардном режиму исхране, али са значајно већом тежином епидидималног висцералног масног ткива у групи TG мишева, који су третирани исхраном богатом мастима, у поређењу са истом групом мишева на стандардној лабораторијској исхрани. Оваква разлика није уочена у контролним групама мишева (Слика 18Г). Обзиром на то да исхрана богата мастима доводи до пораста вредности триглицерида, испитане су вредности триглицерида у свим групама. Анализа је показала да нема разлика у вредностима триглицерида међу групама мишева на истом режиму исхране, како на стандардној исхрани тако и на исхрани богатој мастима. Статистички значајна разлика виђена је само у поређењу истих генотипова на различитим режимима исхране, са значајно већим вредностима триглицерида у обе групе мишева на исхрани богатој мастима (Слика 18В).



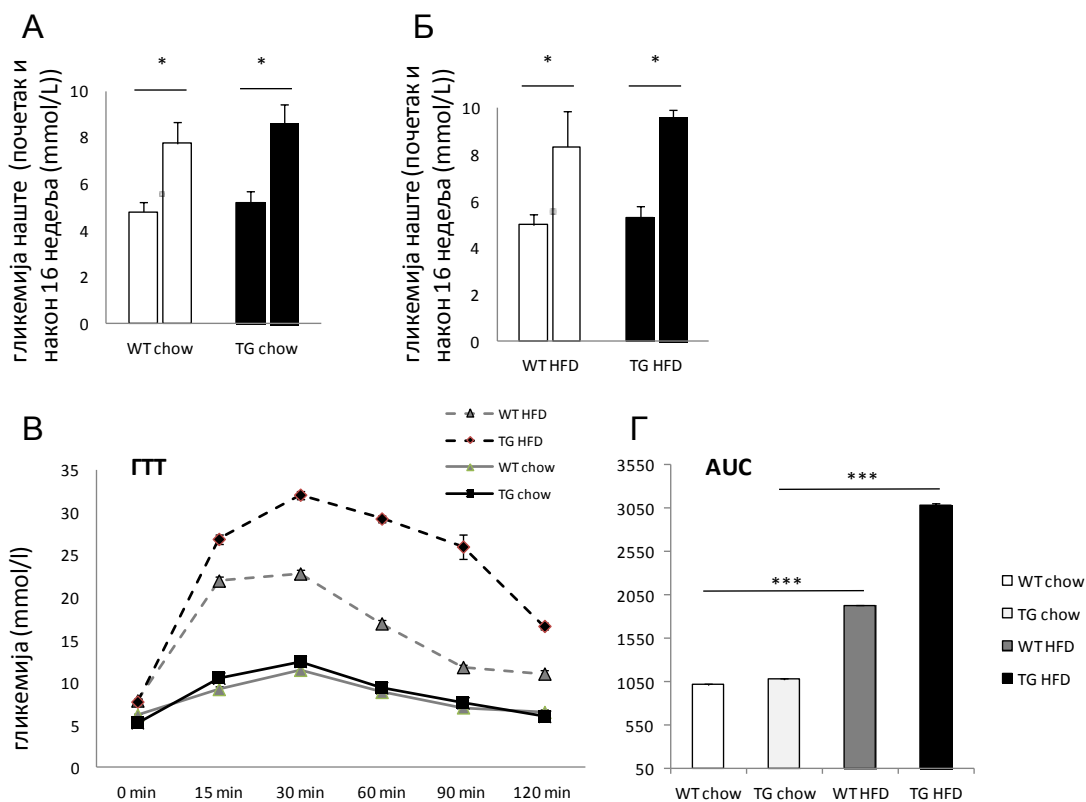
Слика 18. Разлике у телесној маси и висцералном масном ткиву након 16 недеља исхране богате мастима.

Приказане су промене у вредностима у телесној маси и висцералном масном ткиву у експерименталном моделу T2DM у групама на нормалној исхрани и исхрани богатој мастима. (А) Мерењем телесне масе и анализом података није утврђена значајна разлика међу групама у телесној маси након 16 недеља нормалне исхране. (Б) Мерењем телесне масе и анализом података није утврђена значајна разлика међу групама у телесној маси након 16 недеља HFD. (В) Мерењем нивоа триглицерида и анализом података утврђена је значајна разлика између група након 16 недеља исхране богате мастима. (Г) Мерењем тежине висцералног масног ткива и анализом података утврђена је значајна разлика између група TG мишева након 16 недеља исхране богате мастима. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама не утиче на развој повишене гликемије наште али повећава осетљивост на оптерећење глукозом у свим временским периодима *ip*ГТТ теста, након 16 недеља исхране богате мастима

Након анализе метаболичких параметара испитан је ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама на параметре гликорегулације. Током експеримената праћени су поједини параметри гликорегулације, као што су гликемија наште, која је мерена након претходне припреме животиња, односно депривације хране у трајању од 4h и вредности гликемије током теста оптерећења глукозом. У све четири експерименталне групе, након 16. недеља одређеног режима исхране, дошло је до статистички значајног повећења гликемија наште у поређењу са почетним вредностима (Слика 19А и 19Б). Поређење вредности гликемије наште између група на стандардном режиму исхране није показало постојање разлике између група. Анализа вредности гликемија наште код група на исхрани богатој мастима показала је да су TG мишеви имали нешто вишу просечну вредности гликемија наште након 16. недеља исхране богате мастима, али не и статистички значајну, у поређењу са контролном групом мишева на истом режиму исхране (Слика 19А и 19Б).

Обзиром на овакав резултат и непостојање разлика у вредностима гликемија наште након 16. недеља специјалног режима исхране, изведен је интрапериотонеални тест оптерећења глукозом након дванаесточасовног гладовања. Вредности гликемија добијене током ГТТ-а, у групама мишева који су били на стандардном режиму исхране, показале су нормалан одговор на оптерећење глукозом без разлика између група у односу на генотип мишева (Слика 19В). Због физиолошког одговора, мишеви група на стандардној исхрани сматрани су здравим и искључени су из даљих анализа. У групама мишева које су биле на исхрани обогатој мастима у трајању од 16. недеља, уочен је развој хипергликемија након оптерећења глукозом у свим временским пресецима ГТТ-а у поређењу са мишевима на стандардној исхрани (Слика 19В). У обе групе мишева на исхрани богатој мастима развила се изразита хипергликемија у времену које би могло одговарати првој фази лучења инсулина, али са статистички значајно вишим вредностима у групи TG мишева. Након 60. минута ГТТ-а, у групи WT мишева долази до очекиваног опадања вредности хипергликемија док у групи TG мишева долази до знатно споријег опадања вредности гликемија уз одржавање изразитих хипергликемија. У 120. минути ГТТ-а вредност хипергликемија у групи TG мишева и даље задржава тенденцију пада али је и у том тренутку мерења статистички значајно виша у поређењу са вредностима гликемије у групи WT мишева истог режима исхране. У периоду од 60. до 120. минута ГТТ, које би могло одговарати другој фази лучења инсулина, вредности хипергликемија су драстично и статистички значајно више у групи TG мишева (Слика 19В). Анализа вредности гликемија током ГТТ-а показала је да мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно изражену хипергликемију (мерену површином испод криве) све време трајања ГТТ-а у поређењу са WT групом мишева који су јели исту храну (Слика 19Г).

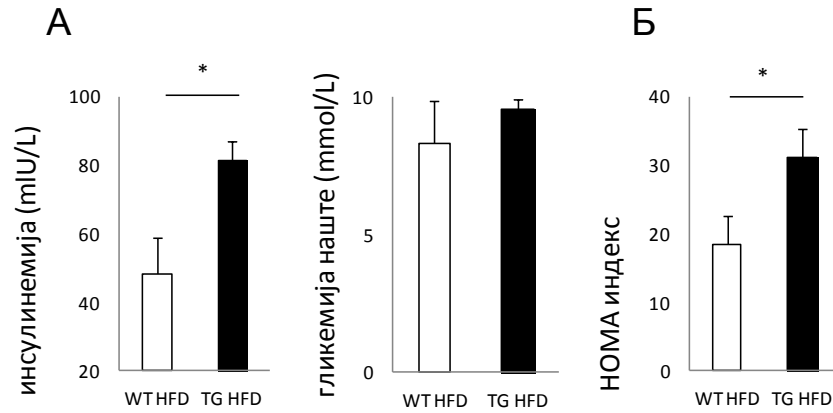


Слика 19. Разлике у параметрима гликорегулације између група након 16 недеља експеримента.

Приказане су промене у вредностима гликемије наше и вредностима гликемија током ipГТТ у експерименталном моделу T2DM. (А) Мерењем гликемије наше и анализом података није утврђена значајна разлика између група на почетку и након 16 недеља нормалне исхране. (Б) Мерењем гликемије наше и анализом података није утврђена значајна разлика између група на почетку и након 16 недеља исхране богате мастима. (В) Мерења гликемија током оптерећењем глукозом, током ГТТ и анализом података утврђене су статистички значајне хипергликемије у групи TG мишева на HFD режиму, у односу на контролну групу на истом режиму. Такође су утврђене статистички значајне хипергликемије у групи TG мишева на HFD режиму, у поређењу са групом истих мишева на стандардном режиму. Разлике су представљене и као вредности површине испод криве. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама повећава концентрацију солубилног галектина-3 и доводи до појаве значајно виших вредности инсулинемија и степена инсулинске резистенције, при сличним вредностима гликемија наше након 16 недеља исхране богате мастима

Након уочених значајних разлика у вредностима параметара гликорегулације, анализиране су вредности инсулинемија у групама мишева на исхрани богатој мастима, обзиром су код њих виђене јако повишене вредности гликемија током интраперитонеалног ГТТ. На дан жртвовања експерименталних животиња, које су претходно биле на исхрани богатој мастима, мерена је гликемија наше уз претходну припрему. Након жртвовања и узорковања крви, у серуму животиња мерена је концентрација инсулина која би одговарала вредностима инсулина за вредност гликемије наше (Слика 20А). Анализа вредности гликемије наше није показала статистички значајне разлике међу групама док је у групи TG мишева вредност инсулинемије и индекса инсулинске резистенције (НОМА-IR индекса) била статистички значајно већа (Слика 20Б), што указује на знатно већи степен инсулинске резистенције у овој групи животиња у поређењу са контролном групом животиња.

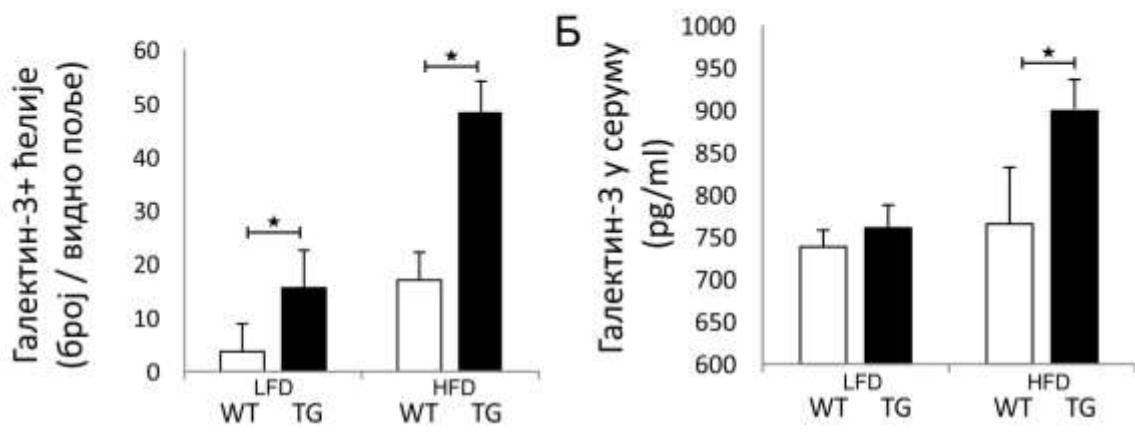
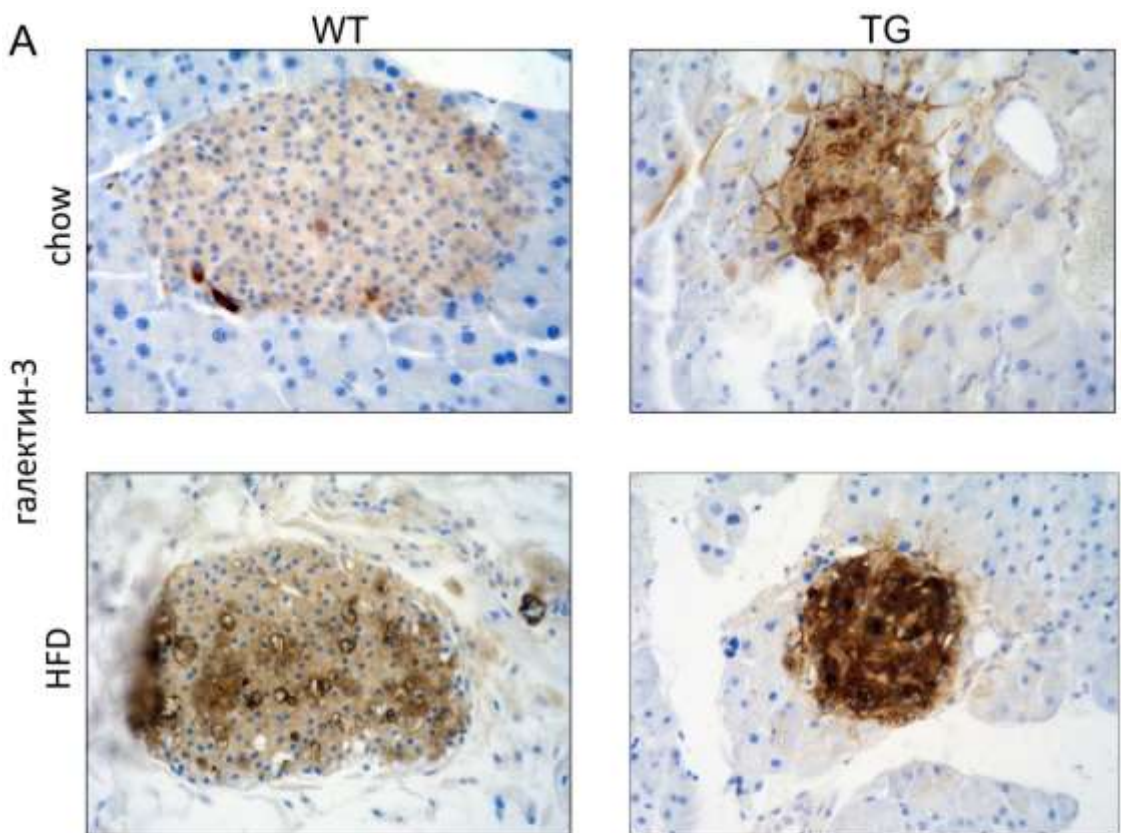


Слика 20. Разлике у вредностима инсулинемија, индекса инсулинске резистенције између група након 16 недеља експеримента.

Приказане су вредности гликемија наше, истовремених инсулинемија и индекса инсулинске резистенције у експерименталном моделу T2DM. (А) Измерене вредности инсулинемија показале су значајно више инсулинемије у групи TG мишева уз истовремено сличне вредности гликемија наше. (Б) Израчунате вредности HOMA-IR индекса показале су значајно више вредности индекса инсулинске резистенције у групи TG мишева. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, као и концентрације солубилног галектина-3 су појачане након 16 недеља исхране богате мастима

Након анализа метболичких параметара, параметара гликорегулације, и инсулинемија, испитана је експресија галектина-3 у панкреасним острвцима и β ћелијама, као и у серуму. Патохистолошка анализа ткива је показала да је број галектин-3 имунореактивних ћелија био значајно већи у острвцима TG животиња у поређењу са животињама дивљег соја на стандардном режиму. На дијети обогаћеној мастима, број галектин-3 позитивних ћелија је порастао код оба соја мишева, међутим, уочена је значајна разлика у броју ћелија између експерименталних група (Слика 21А). Након 16 недеља на исхрани обогаћеној мастима, ниво солубилног галектина-3 у серуму био је сигнификантно већи у експерименталној групи TG животиња у односу на животиње дивљег соја. У условима исхране обогаћене мастима, обе експерименталне групе су имале пораст серумског нивоа галектина-3, али је ово повећање било знатно израженије у TG групи мишева. На измењеном режиму исхране, ово повећање је позитивно корелирало са дужином третмана и почетним концентрацијама галектина-3 (Слика 21Б).



Слика 21. Повећана експресија галектина-3 у ткиву панкреаса, као и серумских концентрација галектина-3 након 16 недеља исхране богате мастима.

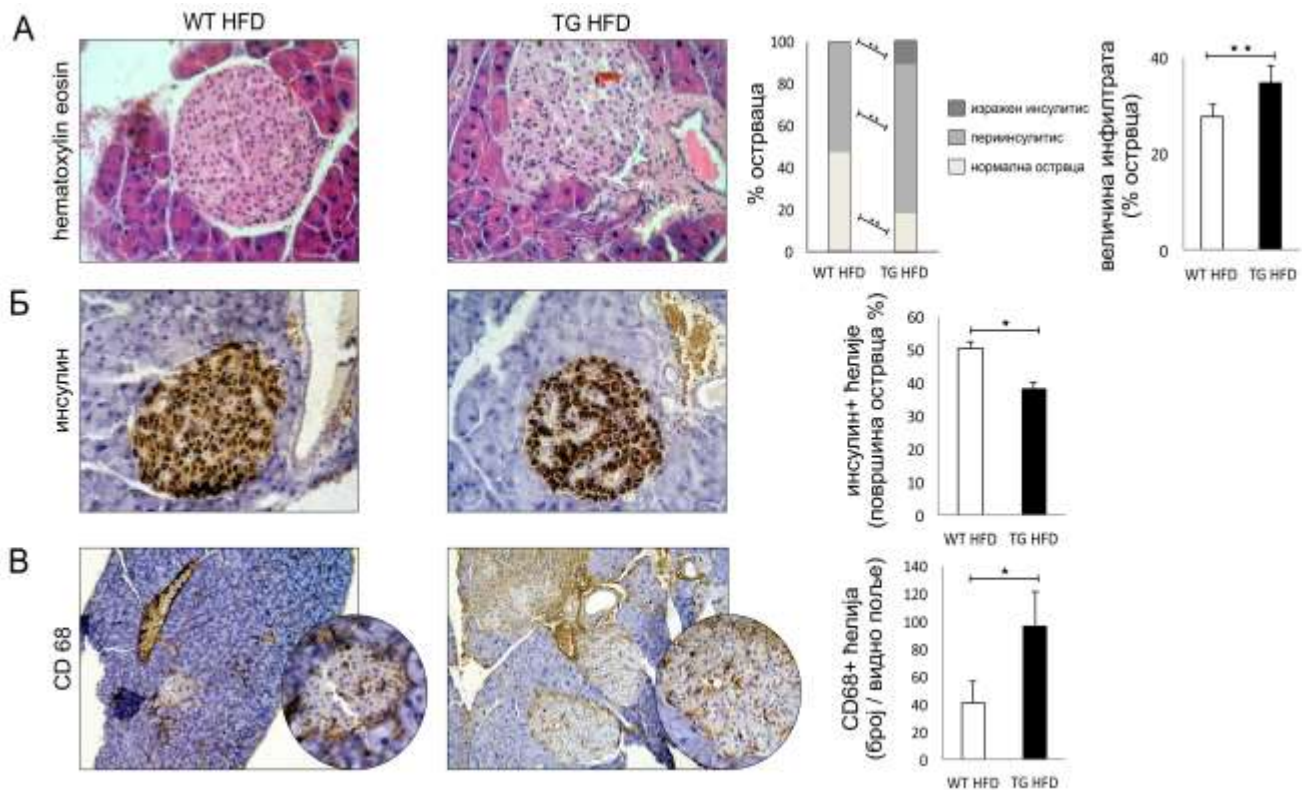
Имунохистохемијском анализом парафинских исечака показано је да TG мишеви имају већи број (А) галектин-3 позитивних ћелија у панкреасним острвцима (Б) пораст серумских вредности солубилног галектина-3 у поређењу са мишевима дивљег соја након 16 недеља исхране богате мастима. Репрезентативне фотомикрографије (увеличање x20). Представљени су резултати здружених експеримента, n=5-7 по свакој групи, као просечна вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама панкреаса, подстиче развој тежег облика инсулитиса након 16 недеља исхране богате мастима

Праћењем метаболичких параметара развоја гојазности, гликемије наше и вредностима гликемија током ГТТ као и регистроване хиперинсулинемије испитивано је да ли су ови феномени праћени морфолошким променама као и инфилтрацијом ћелија имунског система. Са тим циљем су хистолошком анализом испитавани ниво инфилтрације и дистрибуција инфилтрираних мононуклеарних ћелија у панкреасним острвцима експерименталних животиња.

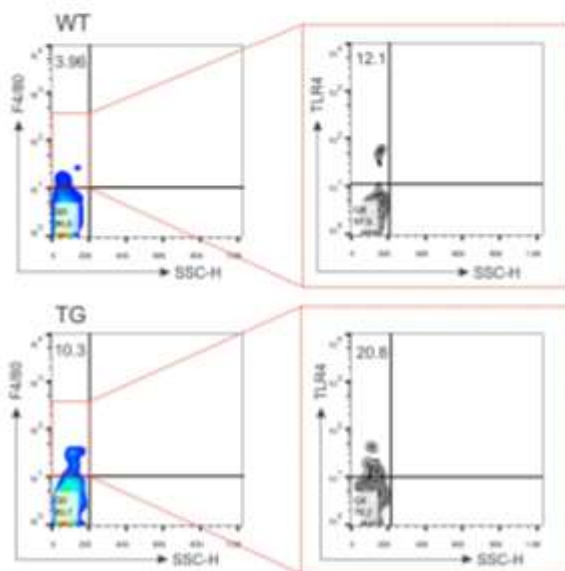
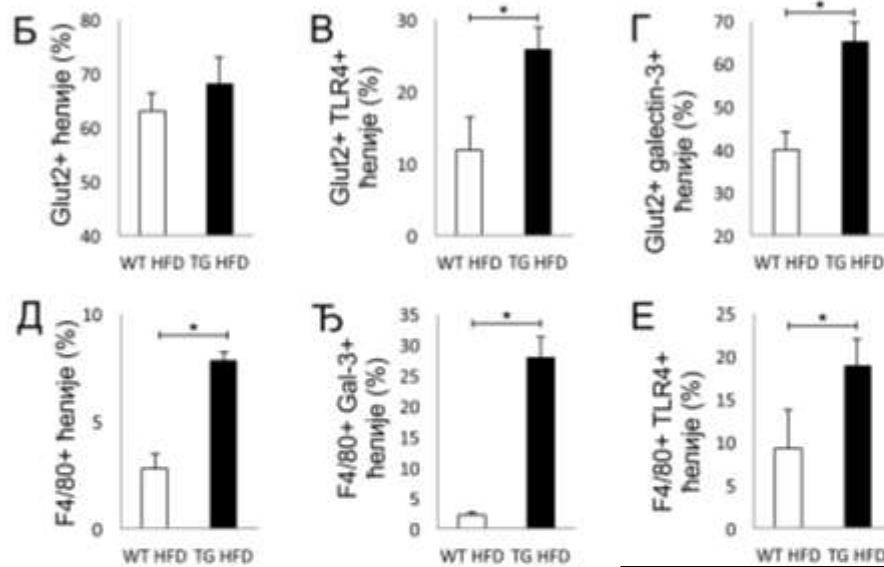
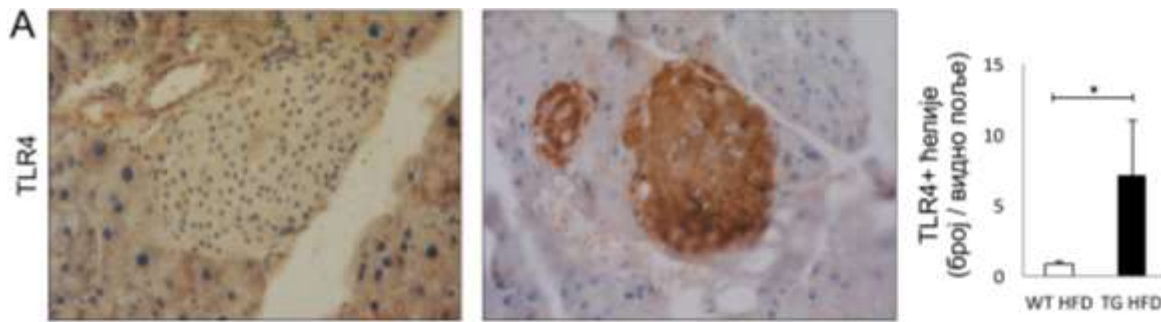
Анализа хистолошких препарата показала је да је проценат острваца са израженим инсулитисом (12%), благим инсулитисом и периваскуларним/перидукталним инфилтратом и пери-инсулитисом (70%), сигнификантно већи у групи TG животиња у односу на WT групу на режиму храћења обogaћеном мастима. Стога је проценат нормалних острваца, без инфилтрата, сигнификантно мањи у групи TG мишева (18%), у односу на WT групу на режиму храћења обogaћеном мастима (47%). Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама на исхрани са јако високим процентом масти имају јаче изражену инфилтрацију острваца са већом инфилтрацијом мононуклеарним ћелијама и знатно мањим процентом здравих острваца (Слика 22А). Такође, проценат површине острваца имунореактивних на инсулин, био је статистички значајно мањи у групи TG животиња у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 22Б). Имунохистохемијска анализа панкреасних острваца показала је сигнификантно већи број CD68+ макрофага у острвцима TG животиња на исхрани обogaћеној мастима, у односу на дивљи сој мишева (Слика 22В). Овај ћелијски маркер се, поред макрофага, може експримирати и на ћелијама ендотела, при чему његова експресија може указати на присуство запаљења у ткиву.

У испитиваном ткиву, такође је уочена повећана експресија TLR4 рецептора. Имунохистохемијском анализом, показана је повећана експресија TLR4 рецептора на ћелијама панкреасних острваца TG мишева у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 23А). Фенотипском анализом ћелија изолованих острваца, показано је да је процентуалан заступљеност Glut2+ TLR4+ β ћелија (Слика 23А), као и F4/80+TLR4+ макрофага (Слика 23Е) значајно већа код TG животиња у поређењу са WT мишевима. Фенотипска анализа ћелија панкреасних острваца није показала значајну разлику у броју Glut2+ β ћелија између две групе експерименталних животиња (Слика 23Б), али је проценат Glut2+ галектин-3+ β ћелија (Слика 23Г), као и F4/80+ галектин-3+ макрофага (Слика 23Е) био сигнификантно већи у групи TG животиња на режиму храћења обogaћеном мастима.



Слика 22. Трансгено појачана експресија галектина-3 на β ћелијама погоршава запаљење панкреасних острваца код мишева након 16 недеља исхране богате мастима.

Патохистолошком анализом показано је да TG мишеви имају већи степен запаљења панкреасних острваца у поређењу са мишевима дивљег соја након 16 недеља исхране богате мастима. (A) Репрезентативне фотомикрографије анализе степена захваћености острваца инфилтратом (x40). (Б) Репрезентативне фотомикрографије и квантификација површине острваца имунореактивних на инсулин (x40). (В) Репрезентативне фотомикрографије и квантификација CD68+ макрофага у панкреасним острвцима. (x10, x 40). Представљени су резултати здружених експеримената, n=5-7 животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Слика 23. Трансгено појачана експресија галектина-3 појачава експресију TLR4 рецептора на β ћелијама и макрофагама у панкреасним острвцима након 16 недеља исхране богате мастима.

(А) Анализом ИНС препарата, показана је повећана експресија TLR4 рецептора у острвцима TG мишева.

Проточном цитометријом показана је:

(Б)заступљеност Glut2+ β ћелија,

(В)заступљеност Glut2+ TLR4+ β ћелија,

(Г)заступљеност Glut2+ галектин-3 + β ћелија,

(Д)заступљеност F4/80+ макрофага,

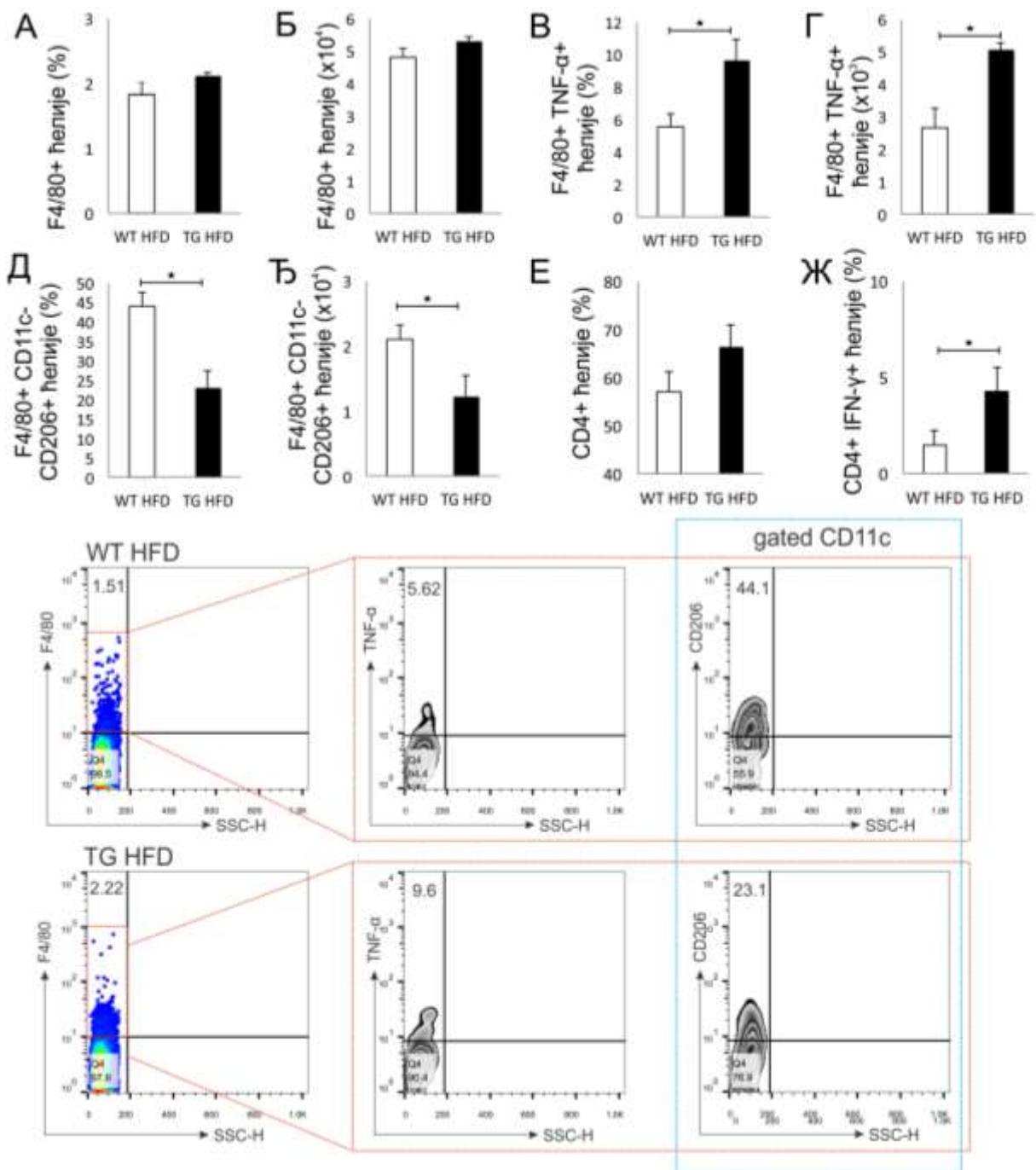
(Ђ)заступљеност F4/80+ галектин-3+ макрофага,

(Е) заступљеност F4/80+ TLR4+ макрофага.

Репрезентативни плотови су представљени као и резултати здружених експеримената, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Повећана инфламација острваца код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 на β ћелијама је била удружена са поларизацијом макрофага ка M1 типу у панкреатичним лимфним чворовима

Након анализе хистолошких препарата и степена инфилтрата панкреасних острваца, извршена је анализа мононуклеарних ћелија панкреатичних лимфних чворова. Фенотипска анализа ћелија изолованих из панкреатичних лимфних чворова TG животиња на режиму храњења обогаћеном мастима, показала је да није постојала разлика у проценту и броју F4/80+ макрофага код мишева на исхрани обогаћеној мастима (Слика 24А и 24Б). Међутим, процентауална заступљеност, као и број проинфламаторних F4/80+ TNF- α + M1 макрофага је био сигнификантно већи у лимфним чворовима TG животиња у поређењу са WT мишевима (Слика 24В и 24Г). Такође, проценат и број број F4/80+CD11c-CD206+ M2 макрофага су били сигнификантно нижи у панкреатичним лимфним чворовима TG мишева на режиму храњења обогаћеном мастима у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране (Слика 24Д и 24Ђ). Иако није уочена разлика у проценту CD4+ помоћничких Т лимфоцита, процентауална заступљеност CD4+IFN- γ + прозапаљенских помоћничких лимфоцита је била значајно израженија у лимфним чворовима TG животиња у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 24Е и 24Ж).



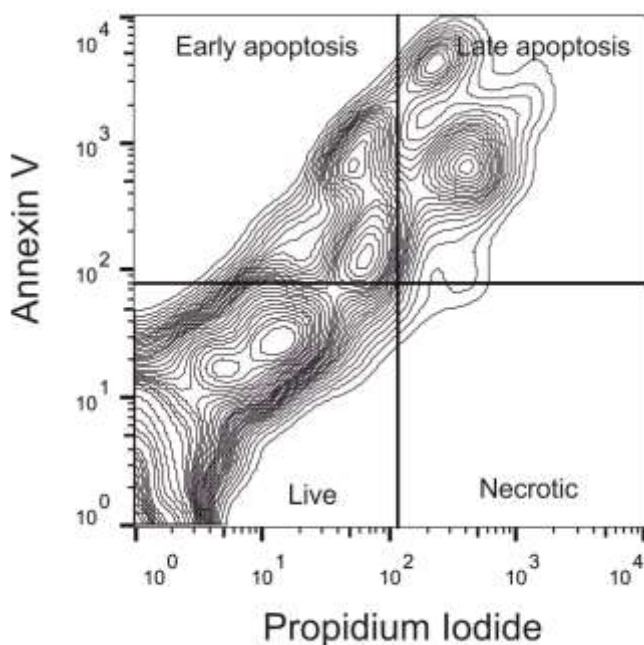
Слика 24. Запаљење острваца је удружено са повећаним бројем M1 макрофага а смањеним бројем M2 макрофага у лимфним чворовима TG мишева након 16 недеља исхране богате мастима.

Проточном цитометријом анализиран је (А) проценат и (Б) број F4/80+ макрофага, (В) проценат и (Г) број F4/80+ TNF-α + M1 макрофага. (Д) Процент и (Ђ) број F4/80+ CD11c- CD206+ M2 макрофага. (Е) Процент CD4+ лимфоцита и (Ж) Процент CD4+ IFN-γ+ прозапаљенских помоћничких лимфоцита у лимфном чвору. Представљени су репрезентативни плотови и резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама, доводи до значајно већег оштећења β ћелија, након 16 недеља исхране богате мастима

Обзиром на знатно већи степен инфилтрације панкреасних острваца уз значајно већи проценат прозапаљенских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима испитиван је ефекат ових догађаја на апоптозу и преживљавање β ћелија.

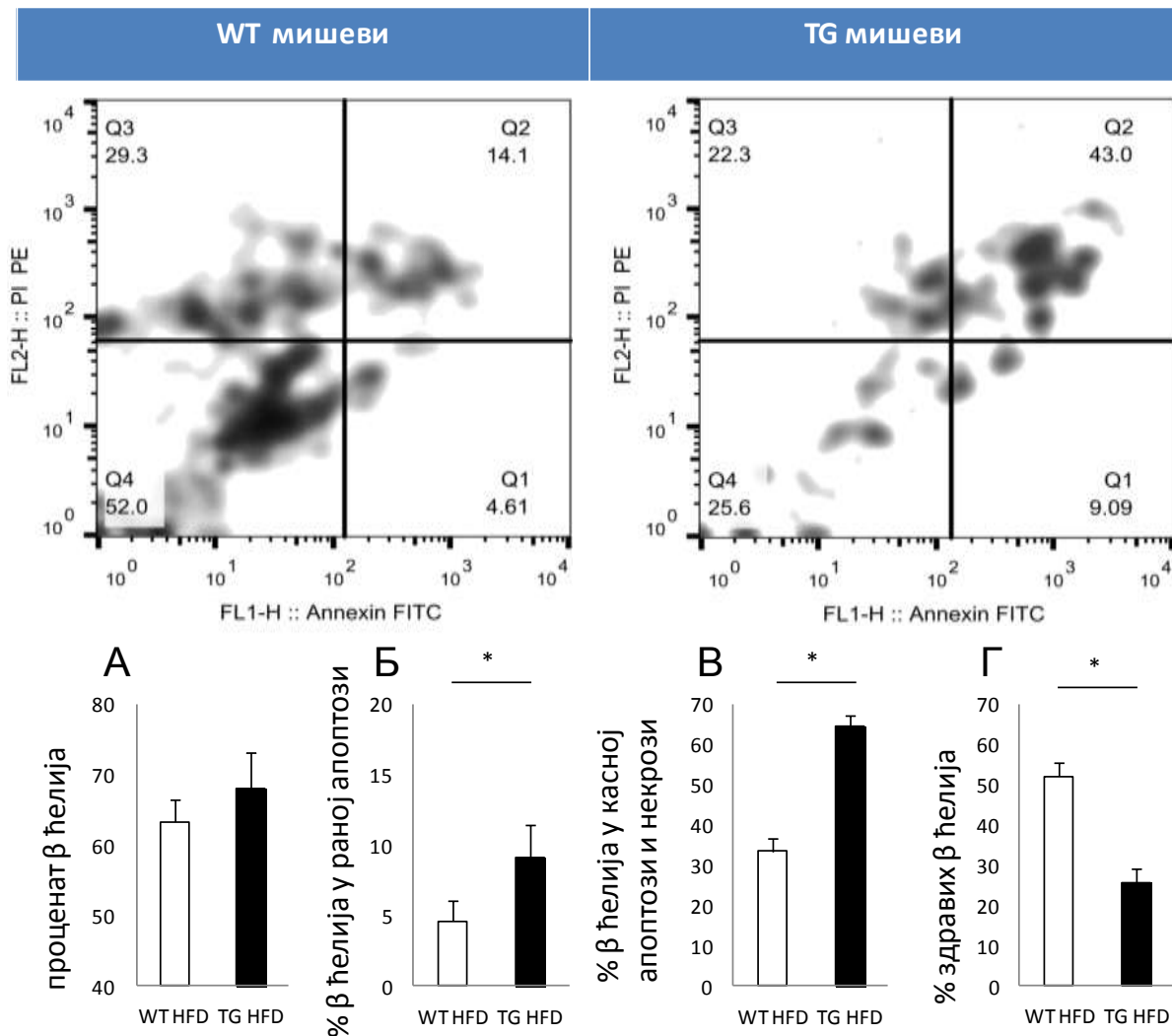
Фенотипска анализа ћелија панкреасних острваца показала је приближно исти проценат β ћелија у обе експерименталне групе на исхрани богатој мастима (Слика 26А).



Слика 25. Стратегија коришћена за анализу резултата проточне цитометрије.

У горњем левом квадранту приказане су AnnV+PI- ћелије, што указује на рану апоптозу. У горњем десном квадранту приказане су AnnV+PI+ ћелије, што указује на касну апоптозу. У доњем левом квадранту приказане су AnnV-PI- ћелије, што указује на живе ћелије. У доњем десном квадранту приказане су AnnV-PI+ ћелије, што указује на некрозу.

Међутим, детаљнија анализа ових ћелија показала је разлике у њиховим карактеристикама. Утврђена је статистички значајно већа заступљеност *Annexin V* позитивних ћелија, које представљају ћелије у раној фази апоптозе, у групи TG мишева у поређењу са контролном групом на истом режиму храњења (Слика 26Б). Затим је уочена и статистички значајно већа заступљеност *Annexin V* и *Propidium iodide* двоструко позитивних ћелија, које представљају ћелије у касној фази апоптозе, у групи TG мишева у поређењу са контролном групом на истом режиму исхране (Слика 26В). Истовремено је уочен мањи степен *Propidium iodide* позитивних, а *Annexin V* негативних β ћелија које представљају ћелије у фази некрозе, у групи TG мишева у поређењу са контролном групом на истом режиму исхране. Ови резултати праћени су и статистички значајно мањом заступљеношћу *Annexin V* и *Propidium iodide* двоструко негативних ћелија, које представљају здраве ћелије, у групи TG мишева у поређењу са контролном групом на истом режиму исхране (Слика 26Г).



Слика 26. Израженије оштећење β ћелија TG мишева након 16 недеља исхране богате мастима.

Проточном цитометријом ћелија изолованих панкреасних острваца, показано је да TG мишеви имају већу заступљеност β ћелија у раној и касној фази апоптозе, уз мању заступљеност здравих β ћелија острваца у поређењу са мишевима дивљег соја након 16 недеља HFD. Представљени су резултати здружених експеримента, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

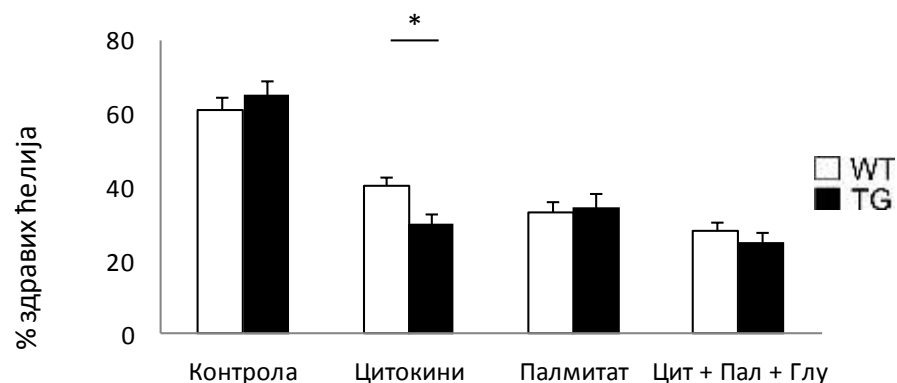
ЕФЕКАТ МЕТАБОЛИЧКИХ НОКСИ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ β ЋЕЛИЈА IN VITRO

Стимулација изолованих ћелија прозапаљенскихм цитокинима значајно смањује % здравих ћелија острвца у *in vitro* условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса

Након *in vivo* експеримената извршена је анализа преживљавања изолованих β ћелија у *in vitro* условима након стимулације прозапаљенским и метаболичким ноксама. Методом проточне цитометрије анализирана је заступљеност здравих ћелија у панкреасним острвцима након примене различитих метаболичких и имунских нокси, као и степен апоптозе ћелија.

Једна група изолованих острваца је третирана палмитатом (100mmol/l) у трајању од 24h. Друга група острваца третиране су коктелом прозапаљенских цитокина: IFN- γ (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml). Трећа група острваца, третирана је палмитатом, коктелом цитокина и глукозом. Након готове стимулације, из третираних бунарчића покупљен је супернатант који је коришћен за даљу анализу и мерење параметара оксидативног стреса, док је преостали ћелијски талог коришћен за анализу ћелија, употребом проточне цитометрије.

Анализа је показала сличан проценат здравих ћелија острваца у групама третираним палмитатом, истовременим третирањем цитокинима, палмитатом и повећаном вредношћу глукозе као и у контролној групи која није била третирана ноксама. Статистички значајно ниже вредности здравих ћелија виђене су у групи TG мишева у поређењу са WT групом мишева третираном на исти начин (Слика 27).

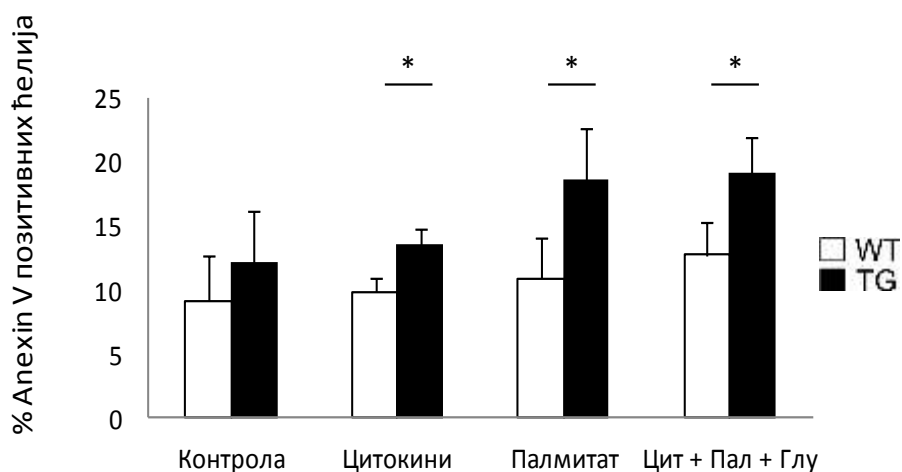


Слика 27. Мања заступљеност здравих ћелија панкреасних острваца TG мишева након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина.

Проточном цитометријом анализиран је проценат здравих ћелија у контролној групи - групи која није третирана, у групи која је третирана цитокинима, у групи која је третирана палмитатом и групи која је третирана истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, n=5-7 животиња по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Примена коктела прозапаљенских цитокина, палмитата и истовременим третирањем цитокинима палмитатом и повећаном вредношћу глукозе значајно повећава % ћелија острваца у стадијуму ране апоптозе у *in vitro* условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса

Након анализе преживљавања β ћелија у *in vivo* условима, где је након 16 недеља исхране богате мастима виђен значајно већи проценат β ћелија у стадијуму ране апоптозе испитана је заступљеност ћелија острваца у истом стадијуму у *in vitro* условима након стимулације имунских и метаболичких нокси. Методом проточне цитометрије одређена је заступљеност ћелија у стадијуму ране апоптозе у панкреасним острвцима након примене различитих метаболичких и имунских нокси. Анализа је показала сличан проценат ћелија у стадијуму ране апоптозе у панкреасним острвцима у контролним групама које нису биле третиране. Статистички значајно више вредности ћелија у стадијуму ране апоптозе у панкреасним острвцима виђене су у групама TG мишева које су третиране цитокинима, палмитатом и истовременим третирањем цитокинима палмитатом и повећаном вредношћу глукозе у поређењу са WT групом мишева третираном на исти начин (Слика 28).

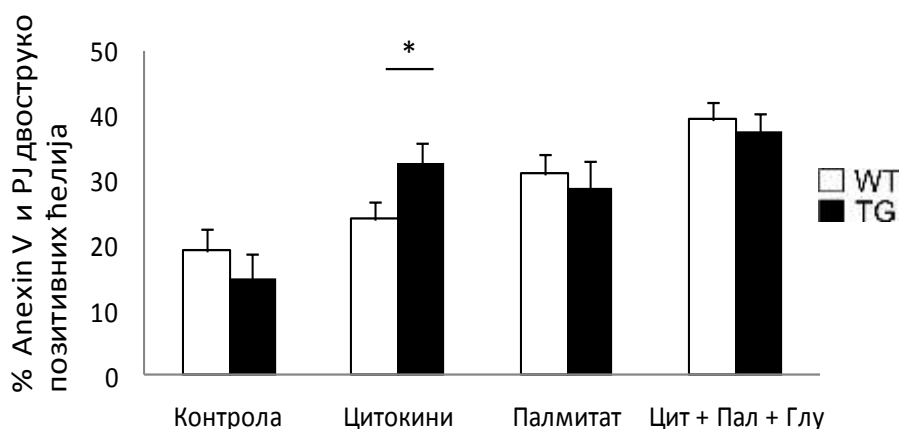


Слика 28. Већа заступљеност ћелија панкреасних острваца у фази ране апоптозе TG мишева након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина, палмитатом и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе.

Проточном цитометријом анализиран је проценат ћелија у фази ране апоптозе у контролној групи која није третирана, у групи која је третирана цитокинима, у групи која је третирана палмитатом и групи која је третирана истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Примена коктела прозапаљенских цитокина, значајно повећава % ћелија острваца у стадијуму касне апоптозе у *in vitro* условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса

Након анализе преживљавања β ћелија у *in vivo* условима, где је након 16 недеља исхране богате мастима виђено значајно већи проценат β ћелија у стадијуму касне апоптозе утврђена је и заступљеност ћелија острваца у истом стадијуму у *in vitro* условима након стимулације имунских и метаболичких нокси. Методом проточне цитометрије анализирана је заступљеност ћелија у стадијуму касне апоптозе у панкреасним острвцима након примене различитих метаболичких и имунских нокси. Анализа је показала сличан проценат ћелија у стадијуму касне апоптозе у панкреасним острвцима у контролним групама које нису биле третиране, као и групама третираним палмитатом и истовременим третирањем цитокинима палмитатом и повећаном вредношћу глукозе. Статистички значајно више вредности ћелија у стадијуму касне апоптозе у панкреасним острвцима виђена је у групи TG мишева, третираних цитокинима, у поређењу са WT групом мишева, третираном на исти начин (Слика 29).

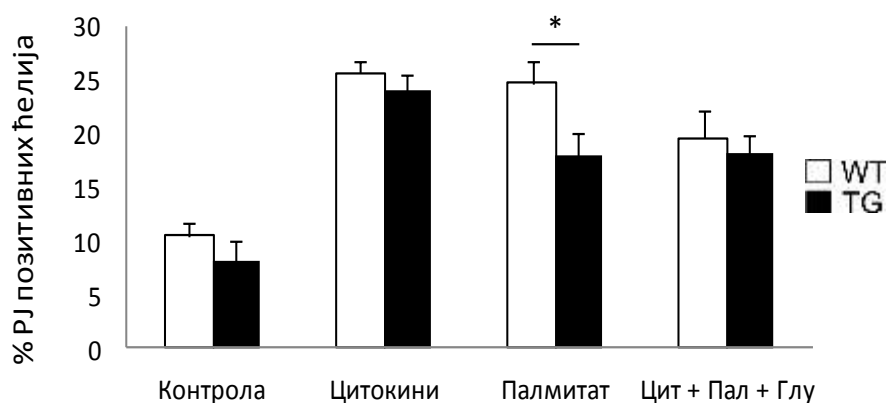


Слика 29. Већа заступљеност ћелија панкреасних острваца у фази касне апоптозе TG мишева након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина.

Проточном цитометријом анализиран је проценат ћелија у фази касне апоптозе у контролној група која није третирана, у групи која је третирана цитокинима, групи која је третирана палмитатом и групи која је третирана истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Примена палмитата значајно смањује проценат ћелија острвца у стадијуму некрозе у *in vitro* условима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама панкреаса

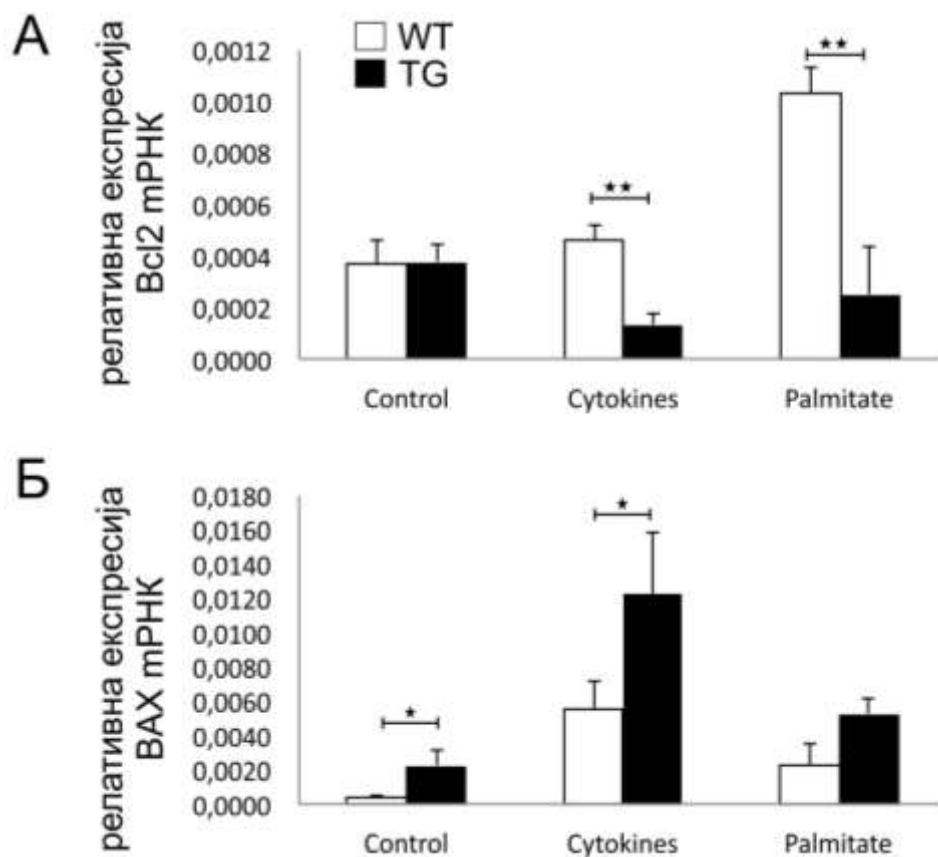
Након анализе преживљавања β ћелија у *in vivo* условима, где је након 16 недеља исхране богате мастима виђен мањи проценат β ћелија у стадијуму некрозе, желели смо да испитамо заступљеност ћелија острваца у истом стадијуму у *in vitro* условима након стимулације имунских и метаболичких нокси. Методом проточне цитометрије анализирали смо заступљеност ћелија у стадијуму некрозе у панкреасним острвцима након примене различитих метаболичких и имунских нокси. Анализа је показала сличан проценат ћелија у стадијуму некрозе у панкреасним острвцима у контролним групама које нису биле третиране, као и групама третираним коктелом прозапаљенских цитокина и истовременим третирањем цитокинима палмитатом и повећаном вредношћу глукозе. Статистички значајно ниже вредности ћелија у стадијуму некрозе у панкреасним острвцима виђене су у групи TG мишева, третираних палмитатом, у поређењу са WT групом мишева, третираном на исти начин (Слика 30).



Слика 30. Мања заступљеност ћелија панкреасних острваца у стадијуму некрозе TG мишева након стимулације палмитатом.

Проточном цитометријом анализиран је проценат ћелија у стадијуму некрозе у контролној група која није третирана, у групи која је третирана цитокинима, групи која је третирана палмитатом и групи која је третирана истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

У изолованим ћелијама панкреасних острваца, анализирали смо и експресију гена чији су производи укључени у механизме ћелијске апоптозе. RT-PCR анализа је показала да није било значајне разлике у релативној експресији антиапоптотског Bcl-2 између две испитиване групе у базалним условима (Слика 31А). Међутим, базална експресија гена за проапоптотски BAX је била статистички сигнификантно више изражена у панкреасним острвцима TG мишева у поређењу са мишевима дивљег соја (Слика 31Б). Након 24 сата стимулације прозапаљенским цитокинима или палмитинском киселином, релативна експресија Bcl-2 је била знатно мање изражена у острвцима TG мишева, док је експресија BAX била повећана у обе групе и сигнификантно већа у острвцима TG животиња (Слика 31А и 31Б).



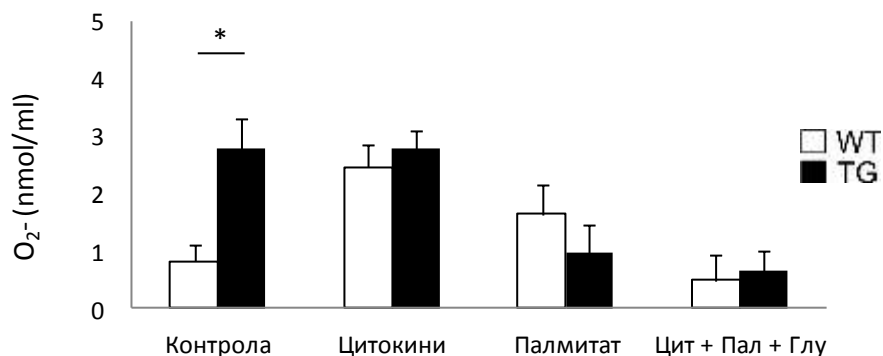
Слика 31. Релативна експресија гена који кодирају молекуле укључене у механизме апоптозе.

Ланчаном реакцијом полимеразе у реалном времену, на изолованим острвцима панкреаса испитивана је релативна експресија (А) антиапоптотског Bcl-2 и (Б) проапоптотског BAX. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

ЕФЕКАТ МЕТАБОЛИЧКИХ И ИМУНСКИХ НОКСИ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА IN VITRO

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем концентрације супероксид анјон радикала у острвцима, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат губи у поређењу са острвцима WT мишева

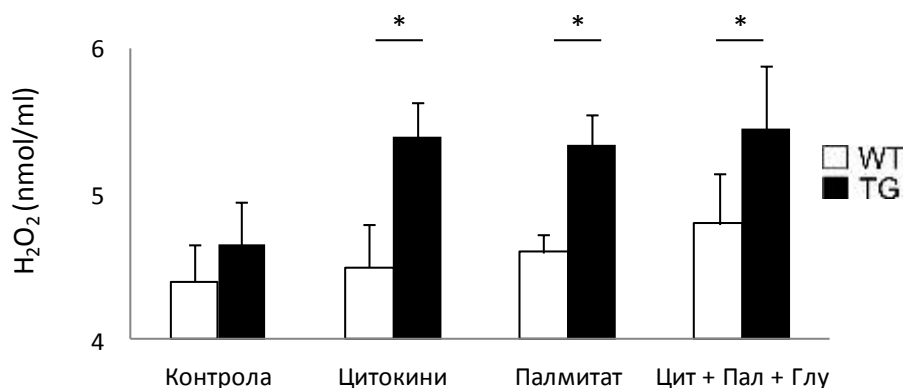
Параметри оксидативног стреса одређивани су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*) из прикупљених узорака супернатанта из панкреасних острваца. Биохемијска анализа показала је значајно већу заступљеност супероксид анјон радикала у контролној групи TG мишева који није третирана. Након стимулације имунским и метаболичким ноксама, ова разлика се губи, највише услед повећања заступљености супероксид анјон радикала у групи WT мишева (Слика 32).



Слика 32. Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује самостално прооксидантно мерењем вредности супероксид анјон радикала. Спектрофотометријски је одређивана концентрација супероксид анјон радикала из супернатанта панкреасних острваца у групи нетретираних острваца, третираних коктелом проинфламацијских цитокина, палмитатом као и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно након стимулације метаболичким и имунским ноксама, мерењем концентрације водоник пероксида у острвцима у поређењу са острвцима WT мишева

Параметри оксидативног стреса одређивани су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*) из прикупљених узорaka супернатанта из панкреасних острваца. Биохемијска анализа показала је значајно већу заступљеност водоник пероксида у групи TG мишева, третираној коктелом прозапаљенских цитокина, групи третираној палмитатом као и групи истовремено третираној цитокинима, палмитатом и повећаном вредношћу глукозе (Слика 33).

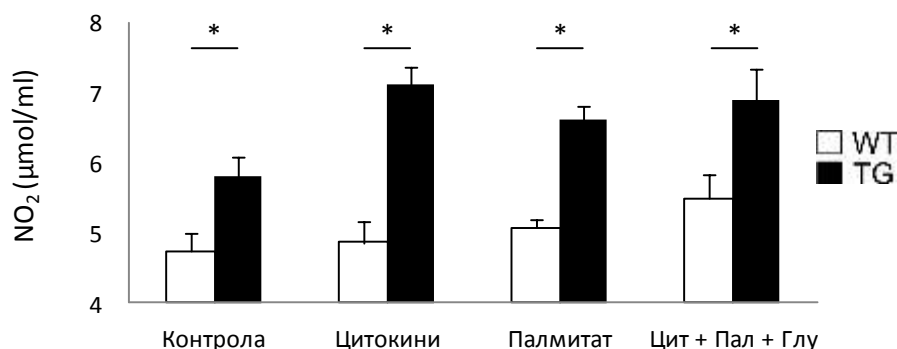


Слика 33. Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно након стимулације имунским и метаболичким ноксама, мерењем вредности водоник пероксида.

Спектрофотометријски је одређивана концентрација водоник пероксида из супернатанта панкреасних острваца у групи нетретираних острваца, третираних коктелом прозапаљенских цитокина, палмитатом као и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем концентрације нитрита у острвцима, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат чак и појачава у поређењу са острвцима WT мишева

Параметри оксидативног стреса одређивани су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*) из прикупљених узорка супернатанта из панкреасних острваца. Биохемијска анализа показала је значајно већу заступљеност нитрита у контролној групи TG мишева као и у групама третираним коктелом прозапаљенских цитокина, третираним палмитатом као и истовремено третираним цитокинима, палмитатом и повећаном вредношћу глукозе (Слика 34).

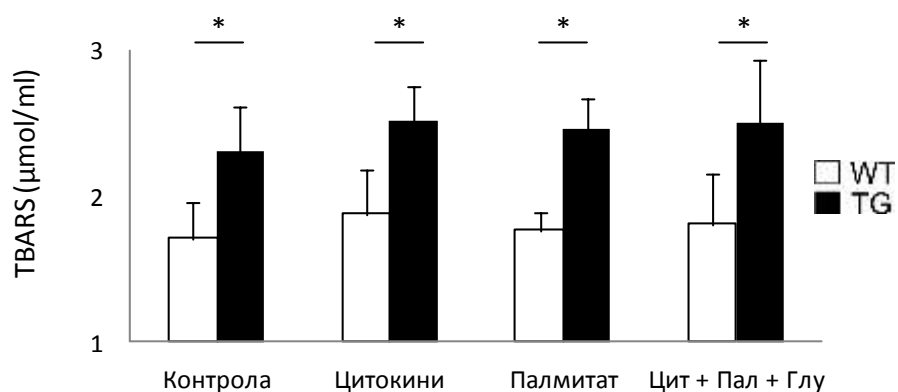


Слика 34. Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује самостално прооксидантно али и након стимулација имунским и метаболичким ноксама мерењем вредности нитрита.

Спектрофотометријски је одређивана концентрација нитрита из супернатанта панкреасних острваца у групи нетретираних острваца, третираних коктелом прозапаљенских цитокина, палмитатом као и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује прооксидантно, мерењем нивоа липидне пероксидације, док се након стимулације метаболичким и имунским ноксама тај ефекат чак и појачава у поређењу са острвцима WT мишева

Параметри оксидативног стреса одређивани су спектрофотометријски (*Specord S-600 Analytik Jena*) из прикупљених узорака супернатанта из панкреасних острваца. Биохемијска анализа показала је значајно већег степена липидне пероксидације у контролној групи TG мишева као и у групама третираним коктелом прозапаљенских цитокина, третираним палмитатом као и истовремено третираним цитокинима, палмитатом и повећаном вредношћу глукозе (Слика 35).



Слика 35. Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама делује самостално прооксидантно али и након стимулација имунским и метаболичким ноксама мерењем параметара липидне пероксидације.

Спектрофотометријски је одређиван степен липидне пероксидације из супернатанта панкреасних острваца у групи нетретираних острваца, третираних коктелом прозапаљенских цитокина, палмитатом као и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

ЕФЕКАТ ПРИМЕНЕ IL-33 У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ КОД МИШЕВА СА ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНОМ ЕКСПРЕСИЈОМ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА

Примена IL-33 не утиче на промене у телесној маси, док значајно смањује развој хипергликемија наше, код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести

У литератури нема података о примени IL-33 у експерименталном моделу T1DM код TG мишева. Обзиром на недостатак података, испитиван је ефекат примене IL-33 у патогенези T1DM. Са тим циљем формиране су две експерименталне групе TG и WT мишева које су поред стрептозотоцина добијале и IL-33, у четири дозе апликоване у размаку од два дана, од 12. до 18. дана експеримента, као и још две контролне групе TG и WT мишева које су добијале само стрептозототин.

Анализа промене у телесној маси мишева у све четири експерименталне групе, показала је да нема разлике у телесној маси између група, ни након примене IL-33 (Слика 36А).

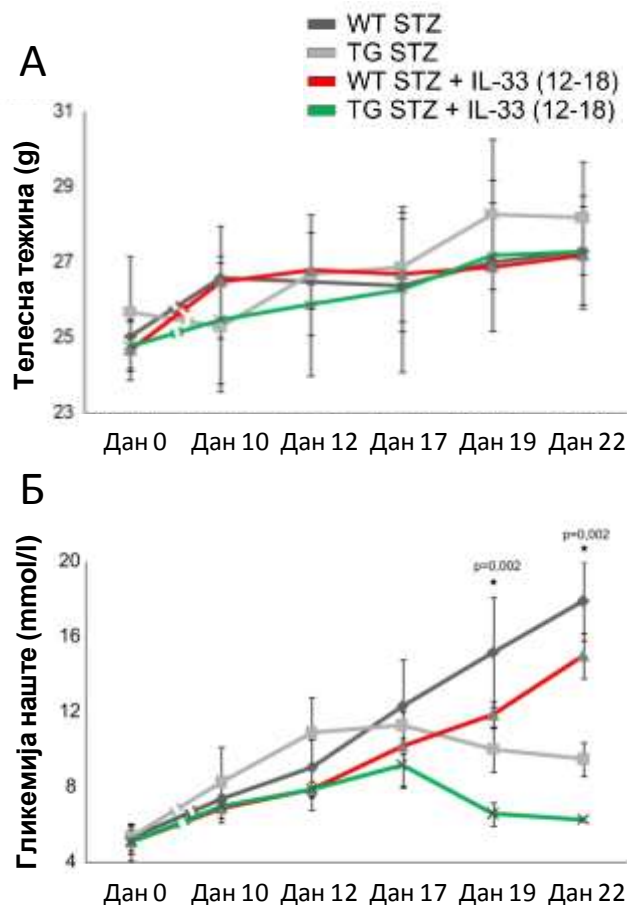
Након анализе телесне масе, испитан је ефекат IL-33 на параметре гликорегулације: гликемију наше, вредности гликемије током ГТТ-а, гликозурије и кетонурије. Након 22. дана експеримента дошло је до значајних разлика у вредностима гликемије наше између група. Анализа гликемија наше, након претходне припреме без хране у трајању од 4h, показала је да су у групи TG мишева који су третирани IL-33 од дванаестог до осамнаестог дана, вредности гликемија наше биле значајно мање у поређењу са контролном групом мишева. Након сличних вредности гликемије наше између група пре примене стрептозотоцина (на почетку експерименталног модела), седамнаестог дана од старта експерименталног модела, вредности гликемије наше биле су нешто мање у групи TG мишева третираних IL-33 у поређењу са вредностима у контролној групи али без статистичке значајности. Већ деветнаестог дана експерименталног модела, долази до статистички значајно мање вредности гликемије наше у групи TG мишева, у поређењу са резултатима у контролној групи животиња. Овакав тренд се одржао и додатно повећао двадесет другог дана експерименталног модела (Слика 36Б).

У поређењу са групама истог генотипа, које нису третиране IL-33, уочене су статистички мање вредност гликемије наше након давања IL-33 у групи TG мишева. Овај резултат говори о синергистичком ефекту трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама и примене IL-33.

Након гликемије наше, двадесет другог дана експерименталног модела урађен је ГТТ тест ради добијања вредности гликемије током оптерећења глукозом. Резултати ГТТ показали су значајно мање вредности гликемија, током свих времена ГТТ, у групи TG мишева третираних IL-33 од дванаестог до осамнаестог дана, у поређењу са контролном групом мишева. Вредности гликемија током ГТТ у групи TG мишева третираним IL-33 сматрају се нормалним и могу се наћи код потпуно здравих животиња у поређењу са контролном групом мишева где су вредности гликемија у рангу хипергликемија (Слика 37В).

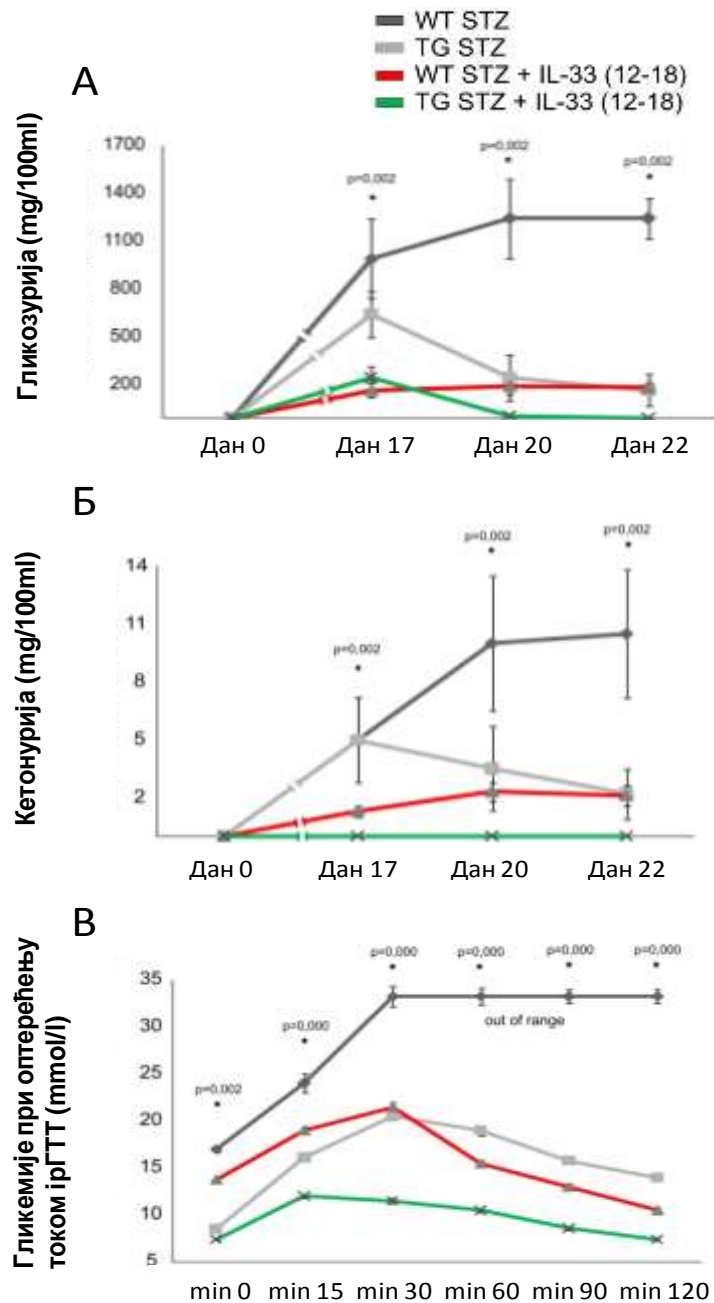
Измерене вредности гликозурије биле су статистички значајно мање у групи TG мишева третираних П-33 од дванаестог до осамнаестог дана, у поређењу са контролном групом мишева, двадесет другог дана експерименталног модела (Слика 37А).

Измерене вредности кетонурије биле су статистички значајно мање у групи TG мишева П-33 од дванаестог до осамнаестог дана, у поређењу са контролном групом мишева, све време експерименталног модела (Слика 37Б).



Слика 36. Разлике у метаболичким параметрима између група након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина и примене IL-33.

Приказане су промене у вредностима метаболичких параметара у експерименталном моделу T1DM. (А) Мерењем телесне масе и анализом података није утврђена разлика међу групама мишева третираних IL-33 и контролним групама у телесној маси у односу на почетак експерименталног модела. (Б) Значајно ниже вредности хипергликемије наште виђене су у TG групи животиња третираним IL-33 22. дана експерименталног модела, у односу на контролну групу а представљене су као вредности гликемије наште. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.



Слика 37. Разлике у параметрима гликорегулације између група након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина и примене IL-33.

Приказане су промене у вредностима параметара гликорегулације у експерименталном моделу T1DM. (А) Значајно ниже вредности гликозурије виђене су у групи TG мишева третираним IL-33 22. дана експерименталног модела у односу на контролну групу. (Б) Значајно ниже вредности кетонурије виђене су у групи TG мишева третираним IL-33 22. дана експерименталног модела у односу на контролну групу. (В) Значајно ниже вредности гликемије током ГТТ виђене су у групи TG мишева третираним IL-33 22. дана експерименталног модела у односу на контролну групу. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=15-20$ животиња по свакој групи, као средња вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Примена IL-33 додатно смањује развој запаљења панкреасних острваца код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести

Након праћења метаболичких параметара и уочених разлика у гликемији наше, нивоима гликемија током ГТТ, гликозурији и кетонурији, испитано је да ли су ови феномени праћени променама у острвацама и инфилтрацијом ћелија имунског система. Са тим циљем су патохистолошком анализом испитани ниво и степен инфилтрације као и дистробија инфилтрираних мононуклеарних ћелија у панкреасним острвцима експерименталних глодара.

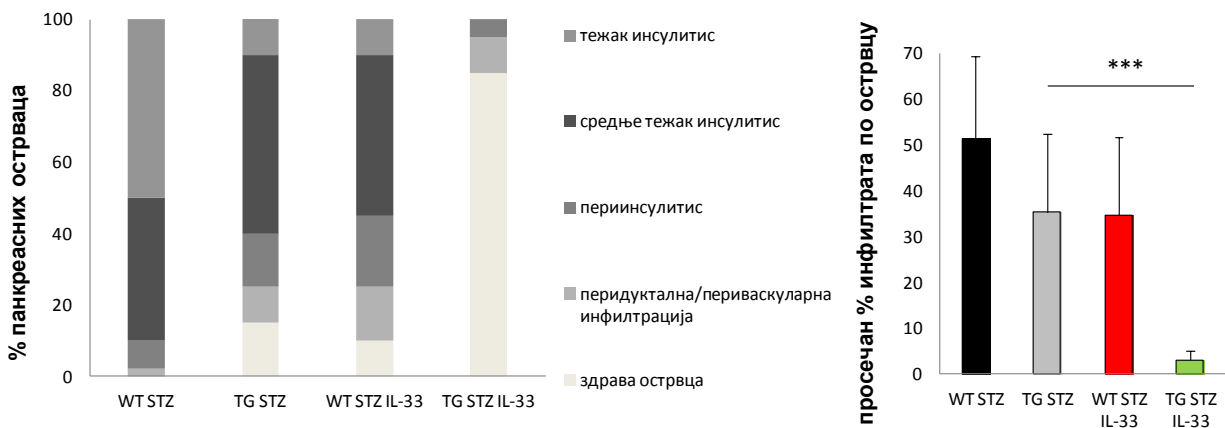
Анализа хистолошких препарата показала је да је проценат здравих острваца највећи у групи TG мишева који су поред стрептозотоцина третирани и IL-33 од 12. до 18 дана експерименталног модела (85%), наспрот групи WT мишева који су примали IL-33 у истом термину (10%), групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама који су третирани само стрептозотоцином (15%) или контролној WT групи мишева (0%) који су имали најмање здравих острваца (Слика 38).

Даља анализа хистолошких препарата показала је да је проценат острваца са периваскуларном односно перидукталном инфилтрацијом релативно сличан у групама TG мишева који су поред стрептозотоцина третирани и IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела (10%), групи WT мишева који су примали IL-33 у истом термину (15%), групи TG мишева који су третирани само стрептозотоцином (10%), док је најмања заступљеност оваквих острваца била у контролној WT групи мишева (2%) (Слика 38).

Даља анализа хистолошких препарата показала је да је проценат острваца са периинсулитисом најзаступљенији у групи WT мишева који су примали IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела (15%), као и групи TG мишева третираних само стрептозотоцином (10%). Нешто мања заступљеност оваквих острваца виђена је у контролној групи WT мишева (8%) а најмања заступљеност виђена је у групи TG мишева који су поред стрептозотоцина третирани и IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела (5%) (Слика 38).

Процент острваца са средње тешким запаљењем био је највећи у групи TG мишева третираних само стрептозотоцином (50%). Нешто мање вредности уочене су у групи WT мишева који су примали IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела (45%) а још мање у контролној групи WT мишева (40%). У групи TG мишева који су поред стрептозотоцина третирани и IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела није било острваца са средње тешким запаљењем (0%) (Слика 38).

Када говоримо о острвцима са највећим степеном инфилтрације, њихов проценат био је највећи у контролној групи WT мишева (50%), затим у групи TG мишева третираних само стрептозотоцином (20%), још мања заступљеност уочена је у групи WT мишева који су примали IL-33 од 12. До 18 дана експерименталног модела (10%) док у групи TG мишева који су поред стрептозотоцина третирани и IL-33 од 12. до 18 дана експерименталног модела није било острваца са тешким запаљењем (0%) (Слика 38).

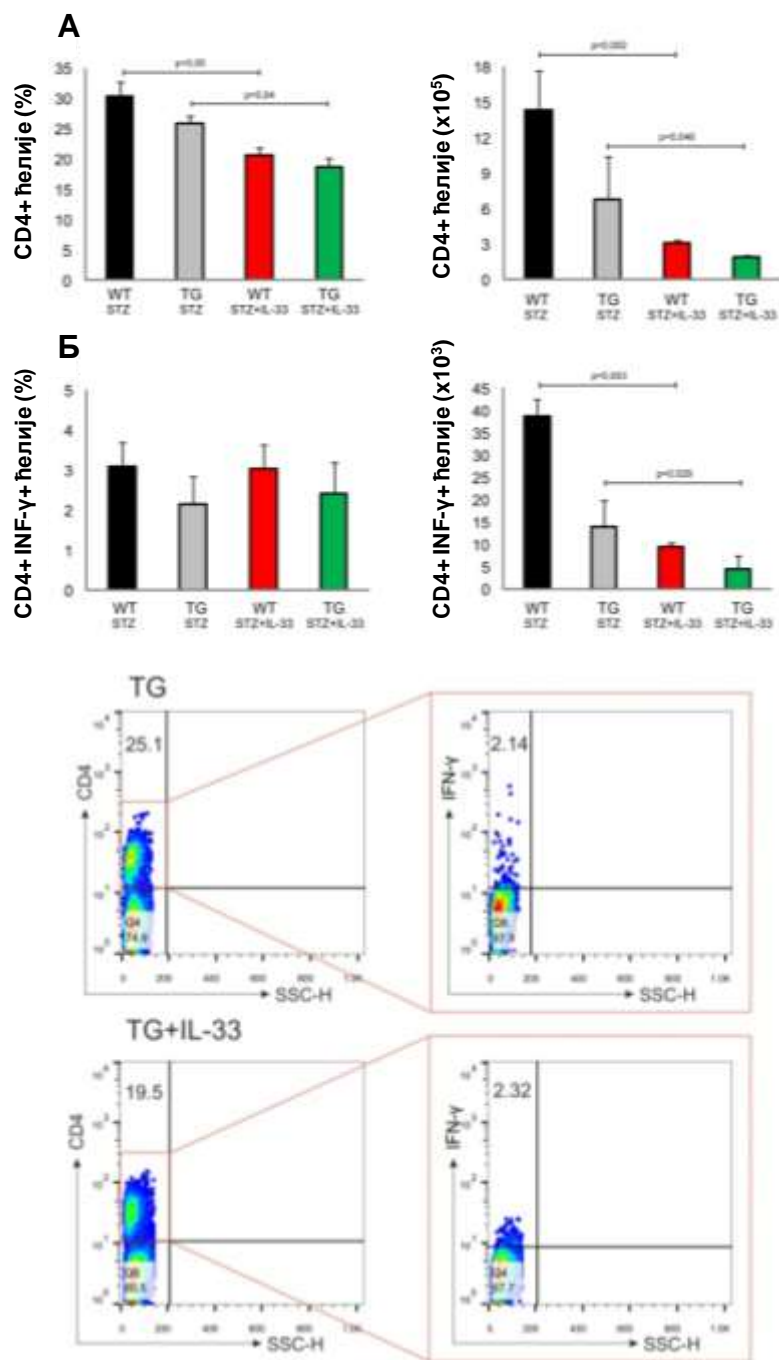


Слика 38. Слабије изражено запаљење панкреасних острваца TG мишева третираних IL-33 након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина у поређењу са контролном групом мишева 23. дана експерименталног модела.

Бојењем хематоксилин-еозином показали смо да мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама третираних IL-33, имају сигнификантно нижи степен запаљења панкреасних острваца, у односу на мишевима дивљег соја, третиране на исти начин. Репрезентативне слике хематоксилин-еозин бојења (коришћено је увеличање $\times 40$) ради квантификације инсулитиса. Представљени су резултати здружених експеримената, $n=5-7$ по свакој групи, као просечна вредност \pm SE, док је статистичка значајност изражена као * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

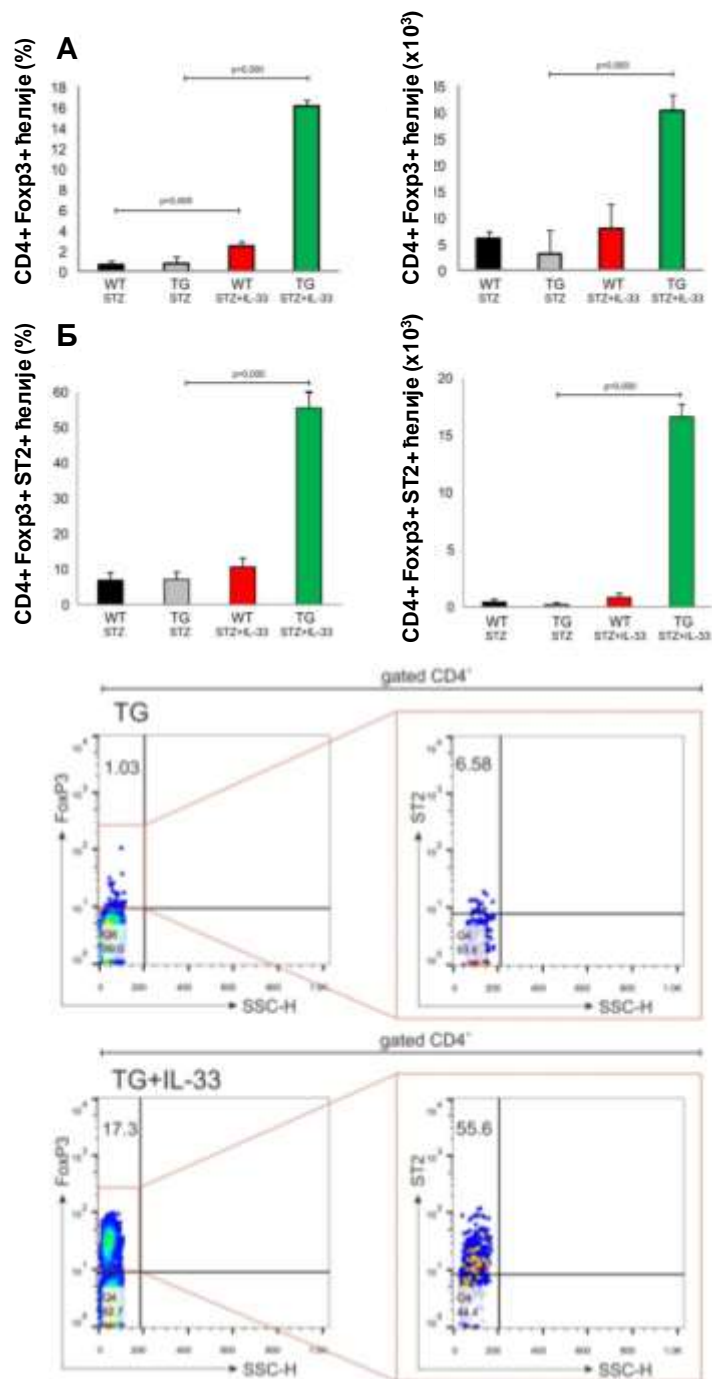
Примена IL-33 доводи до повећане заступљености регулаторних T ћелија а смањене заступљености прозапаљенских ћелија у дренажним панкреатичним лимфним чворовима код мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама након индукције типа 1 шећерне болести

Након анализе инфилтрације панкреасних острваца испитане су и фенотипске карактеристике ћелија у дренажним лимфним чворовима. Методом проточне цитометрије испитане су карактеристике ћелија стечене имуности. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама имали су значајно мањи проценат и број укупних помоћничких (Слика 39А) и активираних помоћничких Т лимфоцита (Слика 39Б), цитотоксичних лимфоцита (Слика 41). Насупрот томе, проценат и број регулаторних помоћничких лимфоцита као и ST2 позитивних регулаторних помоћничких лимфоцита био је сигнификантно већи у групи TG животиња, у поређењу са контролном групом (Слика 40А, 40Б).



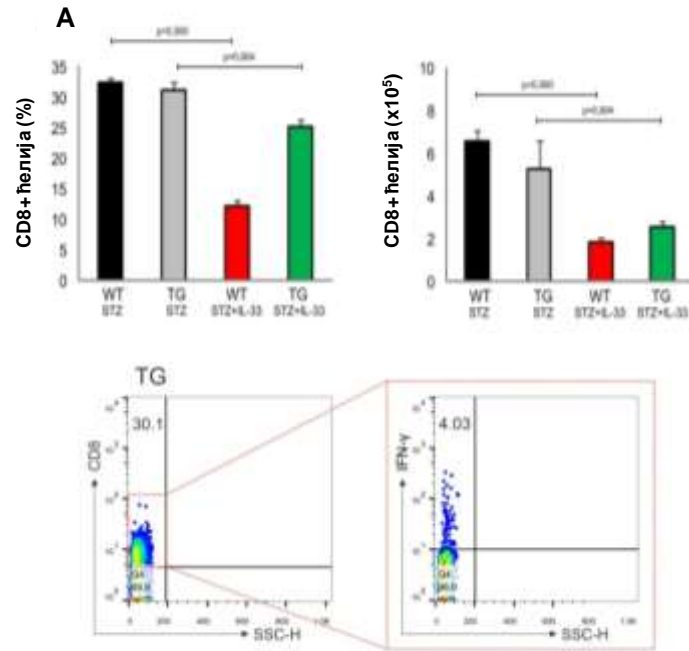
Слика 39. Мања заступљеност помоћничких Т лимфоцита у лимфним чворовима TG мишева третираних IL-33 након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 23. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је проценат и број (А) укупних помоћничких лимфоцита (Б) активираних ефекторских помоћничких лимфоцита. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Слика 40. Већа заступљеност регулаторних Т лимфоцита у лимфним чворовима TG мишева третираних IL-33 након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 23. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је проценат и број (А) регулаторних помоћничких лимфоцита (Б) ST2 позитивних регулаторних помоћничких лимфоцита. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



Слика 41. Мања заступљеност цитотоскичних прозапањенских ћелија у лимфним чворовима TG мишева третираних IL-33 након примене пет узастопних ниских доза стрептозотоцина 23. дана експерименталног модела.

Проточном цитометријом анализиран је проценат и број (А) укупних цитотоскичних Т ћелија. Представљени су резултати здружених експеримената, n=15-20 животиња по свакој групи, као средња вредност ± SE, док је статистичка значајност изражена као *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

ДИСКУСИЈА

ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

У литератури нема података о ефекту трансгено појачане експресије галектина-3 у *in vivo* експерименталном моделу T1DM. Резултати нашег истраживања показали су да трансгено појачана експресија галектина-3 штити β ћелије од оштећења узрокованог хемијским агенсима и спречава започињање аутоимунског процеса. Ефекат је праћен променама у фенотипу и заступљености инфламацијских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима и острвцима.

Наши резултати показују слабије почетно оштећење β ћелија након апликације стрептозотоцина TG мишевима у поређењу са WT мишевима (дан 10 и 16). Овај ефекат резултат је повећане интраћелијске експресије галектина-3. Нормално, у ћелијама, галектин-3 се претежно налази у цитоплазми. (244) Овај ефекат заснован је на сличности дела молекула галектина-3 са *bcl* молекулом, што омогућава да галектин-3 има анти апоптотски ефекат. На тај начин галектин-3 може спречити фатално оштећење митохондрија, што додатно повећава шансу ћелије да преживи. Количина галектина-3 у ћелији директно утиче на унутрашњи пут апоптозе, смањујући његову активност, продужавајући њихов живот, што омогућава боље функционисање ћелија и ткива. (103, 242, 245, 246)

Сматра се да галектин-3 може утицати и на молекуларне образце повезане са оштећењем ћелија (енгл. *damage associated molecular patterns*, DAMP). (247) Карлсен и сарадници (енгл. *Karlsen et al.*), испитивањем β ћелија пацова и људи, показали су да галектин-3 има ефекат природно регулисаног одбрамбеног протеина. Такође су показали да након стимулације цитокинима, као одговор, у β ћелијама долази до значајног повећања концентрације галектина-3. Међутим, упркос повећању интраћелијског галектина-3 у β ћелијама, након стимулације цитокинима који подстичу запаљење, β ћелије не успевају да преживе. (248)

Анализом добијених резултата приметили смо да се вредности хипергликемије, кетонурије и гликозурије нису одржале високим у групи TG мишева као и да су на крају експерименталног модела ови мишеви имали значајно више инсулинемије у поређењу са мишевима дивљег соја (дан 10, 16 и 20). У литератури смо наишли на податке о ефекту галектина-3 на преживљавање β ћелија добијени коришћењем мишева са циљаном делецијом гена, односно недостатком галектина-3 (Гал 3^{-/-} мишеви). Саксиди и сарадници (енгл. *Saksida et al.*) *in vitro* испитивањем панкреасних острваца мишева показали су да недостатак галектина-3 штити ћелије острваца од апоптозе. Показали су да недостатак галектина-3, било наслеђен или индукован коришћењем хемијских инхибитора галектина-3, промовише преживљавање и функцију β ћелија третираних прозапањенским стимулусом, коктелом TNF- α , IFN- γ и IL-1 β . Инхибиција галектина-3 применом инхибитора смањује цитокинима изазвану апоптозу β ћелија, што води до закључка да ендогени галектин-3 заправо пропагира апоптозу β ћелија у присуству инфламаторног окружења. Испитивајући експресију молекула повезаних са апоптозом у β ћелијама острваца, пре и после третмана цитокинима, открили су да аблација галектина-3 утиче на експресију главних компоненти митохондријског апоптотичког пута. (249) Менсах-Браун и сарадници (енгл. *Mensah-Brown et al.*) указали су на то да смањење активности гена за галектин-3 резултира смањеном осетљивошћу ка развоју T1DM у експерименталном моделу индукованим СТЗ-ом Гал 3^{-/-} мишева. Показали су да су мишеви са циљаном

делецијом гена за галектин-3 били релативно отпорни на настанак и прогресију T1DM што је потврђено вредностима гликемије, квантитативном хистологијом и садржајем инсулина. Такође су приметили слабију експресију IFN- γ и потпуно одсуство TNF- α и IL-17 у дренираним лимфним чворовима панкреаса. Макрофаги у острвацима, стварају мање TNF- α и азот оксида у групи галектин-3 дефицијентних мишева. Ови налази, дакле, јасно указују да је галектин-3 укључен у оштећење β ћелија од стране ћелија имунског система и да је неопходан за патогенезу шећерне болести у овом експерименталном моделу. (118) Ови подаци се морају тумачити индиректно и са посебном пажњом, обзиром на значајне ефекте које галектин-3 има на ћелије имунског система, који смањењем активности гена за галектин-3 недостају код ових животиња. Ова констатација је посебно значајна за активацију и функцију Т помоћничких лимфоцита као и макрофага. (250-252)

Поред значајно бољих параметара гликорегулације, трансгени мишеви имали су значајно мању инфилтрацију панкреасних острваца ћелијама имунског система. Узето заједно, анализа параметра гликорегулације и степена инфилтрације инфламаторних ћелија у острвцима, показали су значајно мање оштећења β ћелија у групи трансгених мишева.

Следећи овај закључак, желели смо да анализирамо заступљеност и фенотипске карактеристике инфилтрисаних ћелија у панкреасним острвцима. Анализа заступљености и фенотипских карактеристика инфилтрисаних ћелија острваца показала је значајно мање прозапаљенских ћелија у острвцима трансгених мишева. Ово је посебно изражено у заступљености Th1 ћелија, Th17 ћелија, као и укупних и активираних цитотоксичних CD8⁺ ћелија. Присуство регулаторних ћелија било је мање код трансгених мишева, али је однос између регулаторних и прозапаљенских ћелија у острвцима био повољнији у групи трансгених мишева. Ови резултати могу се објаснити ефектом галектина-3 на професионалне APC, на самом почетку експерименталог модела, одмах након давања СТЗ, и могућим последичним модификацијама имунског одговора. Ендогени галектин-3 има значајне ефекте на функцију различитих ћелија имунског система. На Т ћелије делује тако што промовише раст Т ћелијских линија али и блокира њихову апоптозу. На В ћелије делује на сличан начин, тако што индукује диференцијацију В ћелија док истовремено блокира њихову апоптозу. Такође на различите начине модификује апоптозу макрофага. Са друге стране егзогени галектин-3 на нивоу Т ћелија условљава настанак апоптозе Т ћелија. Потпуно другачије ефекте егзогени галектин-3 има на мијелоидне ћелије. Код ове ћелијске лозе, егзогени галектин-3 промовише раст ћелија, затим промовише адхезију и појачава снагу оксидативног праска код неутрофила. Такође појачава миграцију моноцита и макрофага. (253)

Након ових анализа, анализирани су заступљеност и фенотипске карактеристике ћелија у дренираним лимфним чворовима панкреаса. Анализа фенотипских карактеристика ћелија јасно је показала смањену заступљеност прозапаљенских Т ћелија, цитотоксичних Т ћелија и макрофага, али и повећану заступљеност толерогених дендритичних ћелија код трансгених мишева. Број укупних Т ћелија, INF- γ позитивних Т ћелије, укупних цитотоксичних ћелија, INF- γ позитивних цитотоксичних ћелија, укупних макрофага, IL-6 позитивних макрофага био је значајно нижи код трансгених мишева. Није уочена разлика у броју регулаторних Т ћелија између група, али трансгени мишеви су имали значајно већи број укупних дендритских ћелија, као и IL-12p40 позитивних дендритских ћелија.

Ови резултати јасно указују на значајан ефекат појачане експресије галектина-3 у β ћелијама на патогенезу T1DM. У поређењу са мишевима дивљег соја, трансгени мишеви имају значајно боље параметре гликорегулације, мању инфилтрацију панкреасних

острваца ћелијама имунског система, мање прозапаљенских ћелија у острвцима и лимфним чворовима. Чини се да главно месту у овом феномену припада ефекту појачане експресије галектина-3 у β ћелијама на иницијалну активацију дендритских ћелија након примене СТЗ. Од раније је познато, да повећано присуство галектина-3 у ћелијама може имати ефекат који друге ћелије пажљиво усмерава ка диференцирању и обављању специфичних функција. (254)

Обзиром да је концентрација интраћелијског галектина-3 повећана, верујемо да у раним фазама експерименталог модела, након примене СТЗ-а, утиче на обим оштећења β ћелија али и да повећана концентрација галектина-3 у β ћелијама може привући одређене ћелије имунског система које су одговорне за контролу догађаја унутар ћелија острваца. Функција дендритских ћелија у презентацији антигена и активација Т лимфоцита у лимфним чворовима је врло значајна у патогенези T1DM. Надаље, одлука дендритске ћелије да покрене одговарајући одговор (поларизација у правцу Th1 / Th2 / Th17) или толеранције зависи од сигнала изведених из патогена и/или микросредине. Дендритске ћелије имају главну улогу у повезивању урођене и стечене имуности, а посебно место у овом повезивању имају плазмацитоидне дендритичке ћелије (енгл. *plasmacytoid dendritic cells*, pDC) (255)

pDC се стварају у коштаног сржи, након чега циркулишу у организму. У нормалним околностима, када дендритске ћелије обрађују делове апоптотских ћелија, углавном се доминантно јавља незапаљенски и толерогени фенотип незрелих ћелија (256) Током вирусних инфекција или упале, pDC се акумулирају у упалним ткивима и дренажним лимфним чворовима. (257) Њихова главна улога је да реагују на интраћелијске поремећаје, углавном током вирусних инфекција. Ова улога и реакција настаје након активације рецептора сличних толу (енгл. *Toll-like receptors*) нарочито TLR7 и TLR9, које се активирају интерреакцијом са вирусним нуклеинским киселинама доспелим ендоцитозом и/или цитоплазматском вирусном РНК. (258) TLR7 и TLR9 рецептори се селективно приказују само у pDC. (259, 260)

Улога pDC-а у патогенези T1DM је контроверзна. Неки аутори дефинишу их као ћелије које имају заштитну улогу (261-263), док други верују да ове ћелије доприносе напредовању болести. (264, 265) Коначно, Диана и сарадници (енгл. *Diana et al.*) (266) показали су да су pDC ћелије које производе $INF-\alpha$ потребне за активирање Т ћелијског одговора и развој T1DM код NOD мишева. Јасно су показали да активирање TLR9 у pDC ћелијама доводи до локалне производње $IFN-\alpha$, што је од суштинског значаја за покретање имунског процеса и T1DM.

Код трансгених мишева, плазмацитоидне pDC, бивају привучене повећаном концентрацијом галектина-3 у β ћелијама, а затим учествују у обради и анализи апоптотских тела β ћелија оштећених СТЗ-ом. Након апоптозе β ћелија садржај апоптотских тела приказује се TLR7 и TLR9 рецепторима унутар pDC, али обзиром да ови рецептори препознају само вирусне антигене који нису присутни у β ћелијама трансгених мишева, не долази до њиховог активирања. Тада pDC, које одлазе у дрениране лимфне чворове, инхибирају експресију костимулаторних молекула CD80/86 (молекула B7/B7-2) на себи и почињу да стварају и отпуштају IL-12p40. (267) Ослобођени IL-12p40 блокира прозапаљенски ефекат IL-12p35/70 на Т ћелије, везујући се за исти рецептор на Т ћелији и компетитивно га блокирајући. (268) IL-12 је хетеродимер формиран од лаког ланца од 35 кДа (познатог као p35 или IL-12 α) и тешког ланца од 40 кДа (познатог као p40 или IL-12 β). P35 има хомологију са другим једноланчаним цитокинима, док је p40 хомологан ванћелијском домену чланова породице рецептора хематопоетских цитокина. (269)

IL-12 (IL-12p70) подстиче наивне CD4+ T ћелије на сазревање управцу Th1 ћелија, које су затим укључене у патогенезу многих аутоимуних болести код људи. Бернардес и сарадници (енгл. *Bernardes et al.*) показали су да су дендритске ћелије мишева дефицитарних галектином-3 имале већу производњу прозапаљенског IL-12p70 и јачи Th1 одговор. (270) Подјединица IL-12p40 може се ослободити самостално или заједно са другим подјединицама. (271) Като и сарадници (енгл. *Kato et al.*) сугеришу да локална производња IL-12p40 подјединице може сузбити Th1 одговор. Ову тврдњу су доказали испитујући брзину одбацивања трансплантираних ћелија мишева миобласти након третирања животиње IL-12p40. Показали су смањен одговор касног типа преосетљивости на трансплантиране ћелије код прималаца IL-12p40. Такође су показали смањену концентрацију антитела у серуму против ових ћелија чије стварање зависи од T помоћничких ћелија. Ови резултати јасно указују да локално произведен IL-12p40 има снажан имуносупресивни ефекат на имунске реакције посредоване T помагачким ћелија који доводе до одбацивања алографта. Према томе, поставили су хипотезу да би трансдукција гена за IL-12p40 била корисна за спречавање одбацивања алографта и генетски модификованих сопствених ћелија. (272) Јасуда и сарадници (енгл. *Yasuda et al.*) су показали да повећање експресије гена за IL-12p40 локално у панкреасу, продужава преживљавање трансплантираних панкреасних острваца код NOD мишева. NOD мишеви са трансплантираним острвцима, која су стварала IL-12p40 одржавали су нормогликемију код свих мишева у групи преко 4 недеље након трансплантације. PCR анализа показала је да је локална производња IL-12p40 довела до смањењог IFN- γ и повећања TGF- β на месту трансплантата. Ови резултати јасно сугеришу да IL-12 игра важну улогу у оштећењу ћелија острваца у току реакције аутоимуности. Таква локална блокада ефекта IL-12 била би корисна генска терапија за T1DM код људи. (273) Николети и сарадници (енгл. *Nicoletti et al.*) показали су да ендогени IL-12 игра кључну улогу у патогенези болести NOD мишева у почетном стадијуму болести. Третирајући NOD мишеве неутралишућим антителом за IL-12, спречавање клиничких манифестације болести добили су само код животиња које су јако рано третиране овим блокатором. (274) Трамбло и сарадници (енгл. *Trembleau et al.*) су третирањем NOD мишева антагонистим IL-12 (p40), показали скретање ћелија које инфилтришу панкреас у Th2 правцу уз истовремено смањење присуства Th1 ћелија, што смањује учесталост спонтаног развоја болести. (275) Ванг и сарадници (енгл. *Wang et al.*) сугерисали су да је подјединица IL-12p40 са подјединицом IL-12p28 може спречити експериментални аутоимуни увеитис спречавајући Th1 одговор и промовишући T регулаторне ћелије. (276)

Сматрамо да је као резултат апоптозе β ћелија, након примене СТЗ-а у групи трансгених мишева, а касније и њихове обраде од дендритских ћелија, дошло је до индукције толеранције дендритских ћелија и очувања β ћелија. (256, 268) Коначно, показали смо да трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама спречава покретање аутоимуног процеса у експерименталном моделу T1DM индукованим СТЗ-ом. Чини се да је превенција развоја аутоимуности последица повећаног броја IL12p40+ и IL-6+ CD11c+ дендритских ћелија у дренираним лимфним чворовима. Ове ћелије имају толерогени потенцијал и спречавају даљу презентацију аутоантигена T ћелијама. На овај начин спречава се покретање аутоимуности и животиње са трансгеном појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама остају здраве после почетног оштећења насталог након примене СТЗ.

Анализа концентрације солубилног галектина-3 у експерименталном моделу T1DM показала је да нема разлика у вредностима концентрације солубилног галектина-3 између TG и WT мишева. Ниске вредности солубилног галектина-3 у групи TG мишева показале

су да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама, у експерименталном моделу који кратко траје (3 недеље), не утиче на концентрацију солубилног галектина-3. Након анализе концентрације галектина-3 у групи NOD мишева, а обзиром на сличне вредности у поређењу са концентрацијама у групи TG мишева (без статистички значајне разлике), у експерименталном моделу у ком солубилни галектин-3 нема значајну улогу у патогенези T1DM, одустало се од примене инхибитора галектина-3 у групи NOD мишева.

ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ НА ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Експериментални модели у којима се животиње третирају исхраном богатом мастима представљају одличне моделе за испитивање метаболичког синдрома и T2DM. (159) (277) Овакви модели, осим што дуго трају и имитирају патогенезу T2DM код људи, могу нам дати нове податке о могућим ефектима нових молекула у патогенези ове болести. Постоје бројни докази да галектин-3 има улогу у регулацији апоптозе. У зависности од типа ћелије и ћелијских стимулуса, галектин-3 може имати анти- или про-апоптотску активност. (278, 279)

До сада у литератури нема података у ефекту трансгено појачане експресије галектина-3 искључиво у панкреасним β ћелијама на патогенезу T2DM. Поједине групе аутора, испитивале су ефекте недостатака галектина-3 у *in vivo* и *in vitro* условима. Пејновић и сарадници су (енгл. *Pejnovic et al.*) јасно су показали да недостатак галектина-3 убрзава настанак гојзности која је индукована исхраном са високим садржајем масти као и да појачава запаљење масног ткива, висцералног масног ткива, запаљење панкреасних острваца и нарушава глукозну хомеостазу. Резултати Саксиде и сарадника (енгл. *Saksida et al.*) указују на значајан утицај и улогу ендеогеног галектина-3 у апоптози β ћелија у прозапаљенском миљеу и имплицира кључно место унутрашњег апоптотског пута у заштити β ћелија од апоптозе у одсуству галектина-3. Менини и сарадници (енгл. *Menini et al.*) указали су да су студије на људима показале су да је концентрација галектина-3 већа код гојазних и пацијената са T2DM и да позитивно корелира са са поремећајем глукозне хомеостазе. Са друге стране, нивои галектина-3 позитивно корелирају са осетљивошћу на инсулин а негативно са нивоом HbA1c код пацијената са T2DM. Узети заједно, ови подаци сугеришу да је галектин-3 посредник у метаболичким поремећајима, у којем би могао играти заштитну улогу, као део адаптивног одговора. Штавише, чини се да је галектин-3 модулатор адипогенезе стимулишући диференцијацију преадипоцита у зреле адипоците. Одсуство повећања масних ћелија код галектин-3 дефицијентних мишева сугерише да овај лектин може играти улогу у складишном капацитету масног ткива. (121, 249, 280-282)

Ранија истраживања, у којима је фокус био испитивање функције галектина-3 у ћелији, показала су да у стањима којима је ћелија изложена имунским ноксама, долази до повећаног стварања галектина-3. (248) Ефекат појачаног стварања и концентрације галектина-3 у ћелији, повезује се са дужим преживљавање ћелије. Овај ефекат остварује се стабилизацијом мембрана митохондрија и смањењем стреса ендоплазматског ретикулума у цитоплазми ћелија. (283, 284) Карлсен и сарадници (енгл. *Karlsen et al.*) показали су да појачана експресија галектина-3 не може да заштити β ћелије након стимулације прозапаљенским цитокинима у *in vitro* условима, али не и тачан механизам пропадања β ћелија. Такође су показали да је галектин-3 молекула који чија се концентрација природно повећава у β ћелијама када су изложене различитим ноксама (248) Поред овог ефекта уочено је да се одређена количина галектина-3, у условима његове повећане концентрације у ћелији, секретује из ћелије. (106, 107)

Бројне студије су показале да екстраћелијски ефекат галектина-3 заправо потенцира инфламацију ткива. Бургилос и сарадници (енгл. *Burguilos et al.*) показали су

да галектин-3 ослобођен из микроглије делује као ендогени паракрини лиганд за TLR4. Да да је интеракција галектина-3 и TLR4 је потврђена у неуроинфламаторном мишијем моделу (са апликацијом липополисахарида (LPS)) али и код људи са можданим ударом. Недостатак галектина-3 имао је неуропротективне и антизапаљенске ефекте након глобалне исхемије мозга код људи и у неуроинфламаторном LPS моделу код експерименталних животиња. Ови резултати сугеришу да активирање TLR4 галектином-3 води дуготрајној активацији микроглија, што продужава запаљенски одговор у мозгу. Шин је показао (енгл. *Shin.*) да је галектин-3 неопходан за нормалан развој мозга као и да галектин-3 има различите биолошке улоге, укључујући улогу у адхезији и миграцији ћелија. Галектин-3 такође има плеотропне ефекте код запаљења ЦНС-а, комбинујући прозапаљенску улогу са улогом у ремоделовању у оштећеним ткиву ЦНС-а. (285-287) Да би показали ефекат трансгено појачане експресије галектина-3 у панкреасним β ћелијама у настанку гојазности и T2DM, комбиновали смо *in vivo* и *in vitro* методолошки приступ.

Анализе ћелија острваца хистолошким, имунохистохемијским техникама и коришћењем проточне цитометрије, показале су да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама убрзава настанак оштећења β ћелија и њихово пропадање, што је приказано смањењем површином инсулин позитивних ћелија у острвцима и већим процентом укупних апоптотских β ћелија (у стадијуму ране и касне апоптозе).

У експерименталном моделу T2DM, мишева на исхрани богатој мастима, развој гојазности има јак утицај на развој хипергликемија. (122) Развој гојазност, сам по себи, води настанку хроничног запаљења ниског степена у ткивима која имају битну метаболичку улогу али и самом панкреасу. Запаљење ниског степена локализовано у масном ткиву, јетри и панкреасу, поред настанка инсулинске резистенције ремети и функцију β ћелија и секрецију инсулина. (288)

Концентрација галектина-3 у крви је јако битна за развој инсулинске резистенције што су показали *Li* и сарадници (енгл. *Li et al.*), давањем егзогеног галектина-3 мишевима. Експерименталне групе мишева које су добијале егзогени галектин-3 имале су већи степен инсулинске резистенције који је био праћен поремећајем толеранције на глукозу. (159) Повећана количина галектина-3 у серуму, у нашем експерименталном моделу, заједно са од раније познатом повећаном продукцијом прозапаљенских цитокина у крви (289, 290) условљава настанак инсулинске резистенције која је јаче изражена у групи TG мишева. Наши резултати су у корелацији са подацима из литературе где је показано да циркулишући галектин-3 има прозапаљенску улогу.

Стање смањене сензитивности на инсулин, у ком су β ћелије присиљене да раде више да би постигле нормалан ефекат, назива се стање хиперинсулинемије. У стању хиперинсулинемије, због повећања напрезања повећава се и стрес самих β ћелија што у дужем временском периоду доводи до додатног пропадања β ћелија и додатног смањења њиховог броја. Постоје студије које су показале да је појачана експресија галектина-3 повезана са стањем појачаног оксидативног стреса у ћелијама, при повећаној функцији тих ћелија. (291) Поред тога што узрокује гојазност, исхрана богата мастима, доводи и до повећања концентрације триглицерида и незасићених масних киселина у крви експерименталних животиња. Повећане вредности триглицерида и незасићених масних киселина у крви експерименталних животиња, смањују функцију β ћелија (где услед накупљања масних честица долази до поремећаја енергетског баланса β ћелија и њиховог последичног пропадања), а уколико су повишени у хроничном току, доводе до оштећења и пропадања β ћелија, односно појаве липотоксичности. Иако је најзаступљенији процес

пропадања β ћелија апоптоза, потврђено је да липотоксичност може довести до развоја некрозе једног дела оштећених β ћелија. (292-295)

Поред наведеног ефекта, повећане концентрације триглицерида и слободних масних киселина у патогенези T2DM, масне киселине делују и директно, независно од других фактора на поједине рецепторе на β ћелијама и доводе до даљег пропадања β ћелија. Активација TLR4 рецептора на β ћелијама, засићеним масним киселинама у групама мишева на исхрани богатој мастима, доводи до активације инфлазама у β ћелијама и њиховог оштећења. (296, 297) Овако узроковано оштећење β ћелија, могло би да буде један од нових механизма који додатно смањују број здравих β ћелија у групи мишева на исхрани богатој мастима.

Хистолошка анализа острваца показала је повећану количина екстраћелијског галектина-3 у острвцима TG мишева. Повећана количина екстраћелијског галектина-3 у острвцима настала је ослобађањем галектина-3 из β ћелија TG мишева након исхране богате мастима. Раније студије показале су да екстраћелијски галектин-3 делује као алармин и паракрини фактор хемотаксе за ћелије имунског система у ткивима у којим је до секреције галектина-3 дошло. (161, 254, 298) У нашем експерименталном моделу, показали смо знатно већи степен инфилтрације ћелија имунског система у острвцима мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама.

Појачан степен пропадања β ћелија, у групи TG мишева, може се повезати са повећаним инфлуксом прозапаљенских ћелија, тачније макрофага. Поједине студије су показале да је повећана заступљеност прозапаљенских макрофага последица насељавања острваца овим ћелијама из крви. (299) Истовремено су показале да у T2DM долази до значајног отпуштања хемокина у панкреасним острвцима, који затим привлаче макрофаге и моноците. (161) Друге студије су пак, показале да је у питању активација и прелазак резидуалних ткивних макрофага у M1 фенотип. (300) Овај прелазак највероватније је узрокован развојем гојазности и независан је од доласка моноцита из крви. Један од главних маркера M1 фенотипа прозапаљенских макрофага, који насељавају острваца је експресија галектина-3 на њиховој површини. У нашем истраживању нисмо испитивали порекло ових ћелија већ само заступљеност и фенотип.

Појачан степен пропадања β ћелија, у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама, може се повезати са повећаним инфлуксом прозапаљенских ћелија а посебно макрофага који на својој површини приказују галектин-3 и TLR4 рецепторе. Новије студије су показале да галектин-3 може бити ендогени лиганд за TLR4 рецептор што подстиче неуроинфламацију. (285)

Ми смо показали да истовремена појачана експресија TLR4 рецептора и галектина-3 на β ћелијама и макрофагама у острвцу повезана са већим степеном инфламације у острвцима у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама. Овај резултат наводи на закључак да галектин-3 делује као лиганд за TLR4 рецептор и да њихова експресија и међусобна интеракција на β ћелијама и макрофагама, као главним ефекторским ћелијама имунског система у типу 2 шећерне болести, значајно утиче на патогенезу ове болести.

Поремећај на нивоу острваца, одражава се и на ћелијску заступљеност у панкреатичним лимфним чворовима и клиничким и хистолошким параметрима T2DM. Фенотипска анализа ћелија панкреатичних лимфних чворова показала је сигнификантно већи проценат, и број прозапаљенских M1 (F4/80+ TNF- α +) макрофага док је процентуална заступљеност, али и број M2 (F4/80+ CD11c- CD206+) макрофага, била сигнификантно мања у лимфним чворовима панкреаса мишева са трансгено појачаном

експресијом галектина-3 у β ћелијама на исхрани јако богатој мастима, у односу на WT мишеве који су користили исту храну.

Када говоримо о параметрима гликорегулације, наша анализа је показала да нема разлике у вредностима гликемије наше између група на исхрани богатој мастима али да постоји значајно већа компензаторна хиперинсулинемија у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама. Одавно је познато да се у условима компензаторне хиперинсулинемије у β ћелијама повећава стварање кисеоничних слободних радикала, оксидативног стреса који води пропадању β ћелија. (301, 302)

Утисак је да компензаторна хиперинсулинемија успева да одржи релативно нормалне вредности гликемија наше након претходне припреме, али да не успева одржи гликемију у нормалним опсезима након оптерећења глукозом, у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама у поређењу са контролном групом. Глукотоксичност, која се јавља као резултат израженије постпрандијалне хипергликемије, јаче је изражена у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама што даље води оштећењу β ћелија у поређењу са контролном групом. (303-305)

Саксида и сарадници (енгл. *Saksida et al.*) показали су да генетска делеција галектина-3 у β ћелијама повећава отпорност на цитокине и покреће апоптозу, а посебно мењајући ефекат на компоненте митохондријског апоптотског пута (унутрашњег пута апоптозе). (249) Резултати нашег истраживања показали су да је трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама повећала проценат апоптотских ћелија острваца у *in vivo* експерименталном моделу. У *in vitro* условима показали смо да у ћелијама острваца које су стимулисане цитокинима и палмитинском киселином, трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама појачава експресију проапоптотичног ВАХ молекула и води у апоптозу. Наши налази су у складу са претходним резултатима да делеција или инхибиција галектина-3 промовишу преживљавање и чувају функцију β ћелија. (249) Трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама такође повећава апоптозу, било да је индукована цитокинима или засићеним FFA.

Стиче се утисак да иницијално оштећење β ћелија у острвцима мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 али и секреција самог галектина-3 доводи до повећаног нивоа галектина-3 у острвцима, а затим и циркулишућег галектина-3 у серуму, што на крају води до системских промена гликорегулације. Ово сазнање потврђује хипотезу да су заправо ћелије острваца активни учесници у развоју T2DM.

Један од значајних фактора који утиче на оштећење и пропадање β ћелија су нивои слободних радикала и оксидативног стреса у β ћелијама. Улога азот оксида у патофизиологији β ћелија је испитивана годинама. Поједине студије су указале да је азот оксид, као ефекторски молекул, одговоран за штетне ефекте прозапаљенских цитокина на функцију β ћелија. (306, 307) Са друге стране, недавно објављени радови указују на његову двоструку улогу у функциосању β ћелија. Са једне стране препознат је као молекул који инхибира секрецију инсулина, док је са друге стране препознат као активатор заштитних путева који штити β ћелије од оштећења. (308, 309)

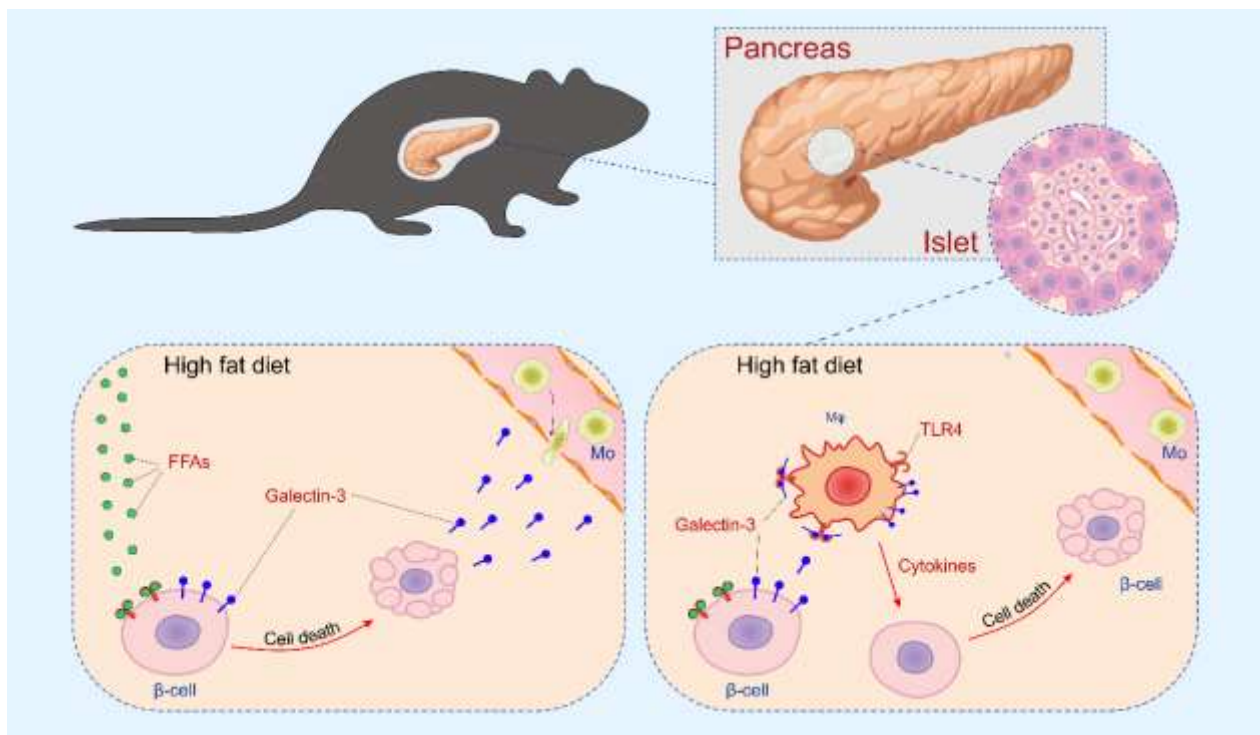
Наши резултати су показали да је трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама повезана са повећаним нивоима азот оксида, где и поред вероватно заштитног ефекта, азот оксид у β ћелијама не успева да очува β ћелије, што је праћено њиховим значајно већим оштећењем у групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама.

У патогенези T2DM већи број фактора истовремено доводи до оштећења и пропадања β ћелија. У групи мишева са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у

панкреасним β ћелијама имамо значајно мањи проценат здравих а значајно већи проценат апоптотских бета ћелија, што је праћено развојем хипергликемија током теста оптерећења глукозом, уз истовремено значајно већи степен инсулинске резистенције, значајну хиперинсулинемију, већи степен оксидативног стреса β ћелија и степен инфилтрације острваца ћелијама имунског система.

Претпостављени механизам развоја T2DM био би следећи (Слика 42) :

1. Иницијално оштећење β ћелија које се дешава само у трансгеним β ћелијама, које настаје услед токсичног ефекта масних честица – директно (услед накупљања масних честица и промене енергетске равнотеже у самим β ћелијама) или индиректно (активацијом TLR4 рецептора на β ћелијама и активацијом инфламазома), које иницијално смањује број здравих β ћелија,
2. иницијално оштећење праћено је погоршањем метаболичког миљеа, дефинисаног значајно тежим степеном инсулинске резистенције, услед запаљења ниског степена метаболички активних ткива и панкреаса, као и отпуштања галектина-3 из трансгених β ћелија, што узрокује додатно оптерећење β ћелија,
3. развој компензаторне хиперинсулинемије, која доводи до већег напрезања преосталих здравих β ћелија, што је праћено значајно већом продукцијом кисеоничних слободних радикала у β ћелијама, што додатно оптерећује већ смањени проценат здравих ћелија у групи трансгених мишева, након чега долази до додатног смањења процента здравих β ћелија у групи трансгених мишева,
4. ослобођени галектин-3 значајно повећава инфилтрацију ћелија имунског система у острвцима у групи трансгених мишева, које затим активацијом спољашњег пута апоптозе узрокују додатно смањење процента здравих β ћелија и појаву хипергликемија при оптерећењу глукозом.
5. глукотоксичност се јавља као резултат високих постпрандијалних гликемија, које су изражене доминантно у групи TG мишева, што води новом оштећењу и додатном смањењу процента преосталих здравих β ћелија, у односу на WT мишеве који су користили исту храну.



Слика 42. Претпостављени механизам којим трансгено појачана експресија галектина-3 појачава тежину T2DM.

У условима исхране богате мастима масне киселине активирају TLR4 рецепторе експримиране на β ћелијама, у којима се затим активира инфламазом и води апоптози одређеног процента β ћелија. Обзиром да β ћелије са трансгено појачаном експресијом галектина-3 имају већу количину галектина, долази до отпуштања галектина-3 у острвца, а затим и циркулацију, што појачава инфлукс макрофага у острвца. Повећана концентрација солубилног галектина-3 повећава инсулинску резистенцију а преостале β ћелије, у циљу компензације, повећано стварају инсулин што у самим β ћелијама појачава стварање кисеоничних слободних радикала, што додатно смањује проценат здравих β ћелија. Ћелије имунског система пристигле у острвца, фагоцитују апоптска тела пропалих β ћелија, активирају се а затим ступају у интеракцију својим TLR4 рецепторима са молекулама галектина-3 на β ћелијама. Ова интеракција доводи до додатног пропадања β ћелије са трансгено појачаном експресијом галектина-3.

Иако постоје бројне студије у којима је испитивана функција галектина-3, до сада нема података о ефекту трансгено појачане експресије галектина-3 у β ћелијама на патогенезу T2DM.

У закључку, пружамо директне доказе да трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама промовише инвазију ћелија имунског система у острвца а затим и олакшава оштећење β ћелија изазвано ћелијама имунског система, тачније проинфламацијским M1 макрофагама у *in vivo* условима, као и да олакшава настанак оштећења β ћелија изазвано цитокинима и FFA у *in vitro* условима и тиме промовише настанак T2DM.

ЕФЕКАТ ТРАНСГЕНО ПОЈАЧАНЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАНКРЕАСНИМ β ЋЕЛИЈАМА И ПРИМЕНЕ ЕГЗОГЕНОГ IL-33 У ПАТОГЕНЕЗИ ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Анализа података експерименталног модела T1DM у групи TG мишева који су третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела, јасно је показала додатан, независан протективни ефекат примене IL-33. Овај феномен јасно је подржан вредностима параметара гликорегулације који су значајно бољи у групи TG мишева, који су третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела у поређењу са мишевима истог генотипа који нису третирани IL-33. Укупан ефекат праћен је променама у фенотипу и заступљености регулаторних и запаљенских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима и острвцима.

Објашњење овог феномена може се потражити у значајно већој заступљености регулаторних Foxp3+ ћелија у панкреасним острвцима TG мишева третираних IL-33. Потврду овог феномена показали су Павловић и сарадници (енгл. *Pavlovic et al.*) који су код C57Bl/6 мишева у експерименталном моделу T1DM показали да примена IL-33 има значајан ефекат на повећање заступљености регулаторних Foxp3+ ћелија, које супримирају прозапаљенски одговор. (310) Наши резултати су у сагласности са истраживањем који су спровели Павловић и сарадници (енгл. *Pavlovic et al.*).

Стиче се утисак да је у групи TG мишева који су третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела постоји синергистички ефекат два независна механизма. Први механизам представљао би ефекат трансгено појачане експресија галектина-3 у β ћелијама на сазревање и диференцијацију DC (индукцију толеранције) услед стварања и ослобађања IL-12p40 у pDC, који везивањем за рецептор за IL-12 на T ћелијама, блокира спречава његов прозапаљенски ефекат и започињање аутоимунског процеса. Други механизам, који се активира након примене IL-33, има директан ефекат на повећано стварање регулаторних T ћелија везивањем за IL-33R рецептор. Ефекат примене IL-33 се заправо може сматрати терапијским, обзиром да је примена IL-33 започета тек након појаве првих хипергликемија, што би у будућности могло бити значајно у третирању пацијената са T1DM у почетној фази болести.

Након ових резултата, поставља се хипотеза, коју је неопходно испитати, о потенцијалном ефекту примене егзогеног IL-33 код људи (и најбољем начину апликовања) након појаве првих знакова хипергликемије и евентуалном спречавању или успоравању аутоимунског процеса код пацијената са извесним T1DM.

ЗАКЉУЧАК

ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама, штити од настанка T1DM, у експерименталном моделу индукованом давањем пет ниских узастопних доза стрептозотоцина. Овај ефекат би се могао објаснити кратким трајањем експерименталног модела (21 дан), као и значајним антиапоптоским ефектом који галектин-3 има у ћелији. Када је у ћелији заступљен у великој мери, попут β ћелија са трансгено појачаном експресија галектина-3, из цитоплазме прелази у једро, где спречава оштећење ДНК молекула и продужава живот ћелије. Ово може бити посебно битно у експерименталним моделима у којима је болест изазвана хемијским агенсима, попут СТЗ-а у нашем моделу. Када је у цитоплазми заступљен у великој мери, доказано регулише стабилност митохондрија и ендоплазматског ретикулума и блокира унутрашњи пут апоптозе, тако што је аналог Bcl 2 и Bcl XL молекула. Обзиром да ћелије са повећаном количином галектина-3, ослобађају овај молекул, који затим делује као алармин, не треба занемарити нешто већу заступљеност лимфоцита (укупних лимфоцита у острвцу) али са значајно мањом заступљеношћу активираних прозапаљенских лимфоцита и макрофага у острвцима код TG мишева. Смањена заступљеност прозапаљенских ћелија у острвцима TG мишева може се објаснити значајно већом заступљеношћу толерогених дендритских ћелија које стварају (IL-12p40+) у панкреатичним лимфним чворовима на крају експерименталног модела.

Закључак смо донели на основу следећих резултата:

1. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама развијају значајно слабију хипергликемију, гликозурију и кетонурију након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела
2. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно веће инсулинемије након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела
3. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама развијају значајно мањи степен запаљења острваца након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела
4. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно мању заступљеност активираних помоћничких и цитотоксичних лимфоцита у острвцима након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела
5. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већу заступљеност активираних дендритских ћелија у острвцима након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела

6. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно мању заступљеност активираних цитотоксичних лимфоцита у панкреатичним лимфним чворовима након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела
7. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већу заступљеност толерогених дендритских ћелија (IL-12p40+) у панкреатичним лимфним чворовима након примене пет узастопних доза стрептозотоцина 20. дана експерименталног модела

ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 2 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ

Добро је познато да повећана концентрација галектина-3 у ћелијама спречава њихову апоптозу доминантно остварујући тај ефекат блокирањем унутрашњег пута апоптозе. До сада нема података да концентрација галектина-3 у ћелијама утиче на спољашњи пут апоптозе ћелија. Бројни фактори доводе до настанка T2DM: липотоксичност, гликотоксичност, повећане концентрације FFA у крви, инсулинска резистенција, стварање слободних радикала, ниво оксидационог стреса, индукција апоптозе прозапаљенским цитокинима, директан ефекат ћелија имунског система и др.

Од бројних фактора који доводе до настанка T2DM директан ефекат на оштећење β ћелија, посредством спољашњег пута апоптозе имају ћелије имунског система и прозапаљенски цитокини. За разлику од ових фактора остали фактори који доводе до оштећења β ћелија свој ефекат испољавају активацијом унутрашњег пута апоптозе. Обзиром да највећи број фактора оштећење β ћелија изазива унутрашњим путем апоптозе, у чијој модулацији галектин-3 испољава доминантни ефекат, било је очекивано да трансгено појачана експресија галектина-3 у β ћелијама штити о настанка T2DM. Међутим, не треба занемарити ослобађање галектина-3 из ћелија, када је његова концентрација у ћелијама јако повећана. Ефекат ослобођеног галектина-3 из ћелија је управо супротан, и делује прозапаљенски, привлачећи ћелије имунског система у острвца, доминантно макрофаге који затим директно доводе до оштећења. Овај ефекат је израженији у групи TG мишева од старта експерименталног модела.

Претпостављамо да су β ћелије TG мишева од самог почетка експерименталног модела отпуштале галектин-3 у острвца, који је затим алармирао и привлачио ћелије имунског система. Други независан ефекат, који такође доводи до почетног оштећења β ћелија, представља ефекат исхране богате мастима у трајању од 16 недеља. Након иницијалног пропадања β ћелија услед липотоксичности, долази до додатне активације ћелија имунског система и њиховом додатном привлачењу у острвца, а сумарно све већем оштећењу β ћелија и развоја T2DM. Обзиром да се ефекат директног оштећења β ћелија, ћелијама имунског система и прозапаљенских цитокина, остварује преко спољашњег пута апоптозе, на који интраћелијски галектин-3 не утиче, TG мишеви имају теже манифестације болести.

Закључак смо донели на основу следећих резултата:

1. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама развијају значајно израженију хипергликемију у свим временима ГТТ након 16 недеља исхране богате мастима
2. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно виши ниво солубилног галектина-3 у серуму, значајно вишу хиперинсулинемију као и степен инсулинске резистенције (НОМА-IR индекс) након 16 недеља исхране богате мастима
3. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већи број TLR4 позитивних ћелија и галектин-3 позитивних ћелија у острвцима након 16 недеља исхране богате мастима

4. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама развијају значајно већи степен запаљења острваца након након 16 недеља исхране богате мастима
5. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већи проценат CD 68+ ћелија у острвцима након након 16 недеља исхране богате мастима
6. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно мањи проценат здравих β ћелија у острвцима након након 16 недеља исхране богате мастима
7. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већи проценат β ћелија у стадијуму ране и касне апоптозе у острвцима након након 16 недеља исхране богате мастима
8. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно мањи проценат β ћелија у стадијуму некрозе у острвцима након након 16 недеља исхране богате мастима
9. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама имају значајно већи проценат активираних помоћничких лимфоцита, укупних макрофага и прозапаљенских M1 макрофага, а мањи проценат антизапаљенских M2 макрофага у панкреатичним лимфним чворовима након након 16 недеља исхране богате мастима

ЗАКЉУЧАК ИСТРАЖИВАЊА НА ИЗОЛОВАНИМ ОСТВРЦИМА *IN VITRO*

Ефекат имунских и метаболичких нокси на оштећење β ћелија

Досадашњи подаци из литературе указали су да недостатак галектина-3 у β ћелијама након стимулације имунским ноксама штити од апоптозе β ћелија. Наши резултати указују да су β ћелије са трансгено појачаном експресијом галектина-3 осетљивије на деловање коктела прозапаљенских цитокина. Делује да наши резултати у потпуности, индиректно, подржавају податке из литературе. Острвца са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у панкреасним β ћелијама су осетљивија на ефекат имунских нокси што је показано значајно мањим процентом нормалних β ћелија након стимулације имунским ноксама као и значајно већим процентом апоптотских β ћелија (рани и касни стадијум апоптозе). Са друге стране, β ћелије са трансгено појачаном експресијом галектина-3 су мање осетљиве на ефекат палмитата када је реч о пропадању процесом некрозе. Феномен слабије осетљивости би се могао објаснити протективним ефектом повећане концентрације галектина-3 у β ћелијама, модификацијом активности унутрашњег пута апоптозе те TG β ћелије доминантно пропадају процесом апоптозе.

Закључак смо донели на основу следећих резултата:

1. У *in vitro* експериментима показали смо значајно мањи проценат здравих β ћелија изолованих из TG мишева, након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина
2. У *in vitro* експериментима показали смо значајно већи проценат β ћелија изолованих из TG мишева, у стадијуму ране апоптозе након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина, палмитатом и истовремено цитокинима, палмитатом и повећаном концентрацијом глукозе
3. У *in vitro* експериментима показали смо значајно већи проценат β ћелија изолованих из TG мишева, у стадијуму касне апоптозе након стимулације коктелом прозапаљенских цитокина
4. У *in vitro* експериментима показали смо значајно мањи проценат β ћелија у стадијуму некрозе изолованих из TG мишева, након стимулације палмитатом

Ефекат имунских и метаболичких нокси на степен оксидативног стреса у β ћелијама

У литератури су јако оскудни подаци о ефекту галектина-3 на стварање оксидативног стреса β ћелија. Студија која је мерила стварање оксидативног стреса показала је да је ниво галектина-3 повезан са повећањем оксидативног стреса у ћелијама. Мерењем параметара оксидативног стреса, показали смо да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама самостално, независно од стимулације, делује прооксидантно и да накнадна стимулација имунским и метаболичким ноксама значајно повећава стварање оксидативног стреса у β ћелијама.

Закључак смо донели на основу следећих резултата:

1. У *in vitro* експериментима показали смо да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама самостално, независно од стимулације, делује прооксидантно мерењем концентрације супероксид анјон радикала, нитрита и степена липидне пероксидације
2. У *in vitro* експериментима показали смо да трансгено појачана експресија галектина-3 у панкреасним β ћелијама након стимулације имунским и метаболичким ноксама делује прооксидантно мерењем концентрације водоник пероксида, нитрита и степена липидне пероксидације

ЗАКЉУЧАК ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ТИПА 1 ШЕЋЕРНЕ БОЛЕСТИ СА ПРИМЕНОМ IL-33

У литератури нема података заједничком о ефекту трансгено појачане експресије галктина-3 у β ћелијама и примене егзогеног IL-33. Сматрамо да је у питању синергистички ефекат два независна механизма. Први механизам представљао би ефекат трансгено појачане експресија галктина-3 у β ћелијама на сазревање и диференцијацију DC (индукцију толеранције) који спречава започињање аутоимунског процеса. Други, подједнако битан механизам, који се активира након примене IL-33, има директан ефекат на повећано стварање регулаторних Т ћелија и одржавање имунске толеранције. Овај ефекат IL-33 је заправо терапијски, обзиром да је примена IL-33 започета тек након појаве првих хипергликемија.

Закључак смо донели на основу следећих резултата:

1. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галктина-3 у панкреасним β ћелијама третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела имају значајно боље параметре гликорегулације (гликемија наште, гликемија током оптерећења глукозом, гликозурија, кетонурија) након примене пет узастопних доза стрептозотоцина
2. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галктина-3 у панкреасним β ћелијама третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела имају значајно мањи степен инфилтрације острваца након примене пет узастопних доза стрептозотоцина
3. Мишеви са трансгено појачаном експресијом галктина-3 у панкреасним β ћелијама третирани IL-33 од 12.-18. дана експерименталног модела имају значајно већу заступљеност регулаторних Foxp3+ ћелија и значајно мању заступљеност прозапаљенских ћелија у панкреатичним лимфним чворовима након примене пет узастопних доза стрептозотоцина

Постављена је хипотеза, коју је неопходно испитати, о потенцијалном терапијском ефекту примене егзогеног IL-33 код људи (и најбољем начину локалног апликовања) након појаве првих знакова хипергликемије и евентуалном спречавању или успоравања аутоимунског процеса код пацијената са T1DM у почетним фазама развоја болести.

СКРАЋЕНИЦЕ

APC	антиген презентујуће ћелије (енгл. <i>antigen presenting cell</i>)
CoA	ацетил коензим А (енгл. <i>acetyl-coenzyme A</i>)
CRD	енгл. <i>carbohydrate-recognition-binding domain</i>
DC	дендритичне ћелије (енгл. <i>dendritic cells</i>)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
FFA	слободне масне киселина (енгл. <i>free fatty acids</i>)
FoxP3	енгл. <i>forkhead box P3</i>
GDM	гестацијска шећерна болест (енгл. <i>gestational diabetes mellitus</i>)
HFD	дијета са високим садржајем масти (енгл. <i>high-fat diet</i>)
HRP	енгл. <i>horseradish peroxidase</i>
НОМА-IR	енгл. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
H₂O₂	водоник пероксид (енгл. <i>hydrogen peroxide</i>)
IL-1β	интерлеукин 1-β (енгл. <i>interleukin 1-β</i>)
IL-33	интерлеукин 33 (енгл. <i>interleukin 33</i>)
INF-γ	интерферон- γ (енгл. <i>interferon-γ</i>)
ILC2	тип 2 лимфоидних ћелија урођене имуности (енг. <i>innate lymphoid cells type 2</i>)
mРНК	информациона рибонуклеинска киселина (енгл. <i>messenger RNA</i>)
LPS	липополисахарид (енгл. <i>lipopolysaccharide</i>)
MODY	енгл. <i>maturity onset diabetes of the young</i>
myD88	енгл. <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
МНС I	(енгл. <i>major histocompatibility complex 1</i>)
МНС II	(енгл. <i>major histocompatibility complex 2</i>)
NF-κβ	нуклеарни фактор-κВ (енгл. <i>nuclear factor-κB</i>)
NO₂	азот-диоксид (енгл. <i>nitric dioxid</i>)
NO	азот-моноксид (енгл. <i>nitric oxid</i>)

NOD мишеви	енгл. <i>non obese diabetic mice</i>
O₂⁻	супероксид анјон радикала (енгл. <i>superoxide anion radical</i>)
PDX1	енгл. <i>insulin promoter factor 1</i>
PHK	рибонуклеинска киселина (енгл. <i>ribonucleic acid</i>)
STAT-1	енгл. <i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
T1DM	тип 1 шећерне болести (енгл. <i>type 1 diabetes mellitus</i>)
T2DM	тип 2 шећерне болести (енгл. <i>type 2 diabetes mellitus</i>)
TNF-α	фактор некрозе тумора- α (енгл. <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TG	мишеви са трансгено појачаном експресијом галектина-3 у β ћелијама
TLRs	рецептори слични Toll -у (енгл. <i>Toll-like receptors</i>)
TBARS	енгл. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
VAT	висцерално масно ткиво (енгл. <i>visceral adipose tissue</i>)
WT	мишеви дивљег соја (енгл. <i>wild type</i>)

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ta S. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37(1):81-90.
2. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. *Saudi medical journal*. 2002;23(4):373-8.
3. Kumar A, AK A. Fausto. *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005;7:556.
4. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature reviews endocrinology*. 2012;8(4):228-36.
5. Kronenberg H. *Williams textbook of endocrinology*: Elsevier Health Sciences; 2007.
6. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;94(3):311-21.
7. Association AD. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics*. 2000;105(3):671-80.
8. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes care*. 1999;22(2):345-54.
9. Grinstein G, Muzumdar R, Aponte L, Vuguin P, Saenger P, DiMartino-Nardi J. Presentation and 5-year follow-up of type 2 diabetes mellitus in African-American and Caribbean-Hispanic adolescents. *Hormone Research in Paediatrics*. 2003;60(3):121-6.
10. Soltesz G, Patterson C, Dahlquist G, Group ES. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence—what can we learn from epidemiology? *Pediatric diabetes*. 2007;8:6-14.
11. Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *Jama*. 2004;291(21):2616-22.
12. Organization WH. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization, 1999.
13. Daneman D. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2006;367(9513):847-58.
14. Yoon J-W, Jun H-S. Autoimmune destruction of pancreatic β cells. *American journal of therapeutics*. 2005;12(6):580-91.
15. You W-P, Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. *BMJ open diabetes research and care*. 2016;4(1).
16. Wällberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in immunology*. 2013;34(12):583-91.
17. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52(2):156-65.

18. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*. 2009;27:519-50.
19. Boni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, et al. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*. 2009;150(12):5218-29.
20. Thomas HE, Irawaty W, Darwiche R, Brodnicki TC, Santamaria P, Allison J, et al. IL-1 receptor deficiency slows progression to diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*. 2004;53(1):113-21.
21. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clinical & Translational Immunology*. 2020;9(3):e1122.
22. Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *The Journal of Immunology*. 1998;160(7):3585-93.
23. Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNF α in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity*. 1998;9(5):733-43.
24. Green EA, Wong FS, Eshima K, Mora C, Flavell RA. Neonatal tumor necrosis factor α promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent antigen presentation to CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(2):225-38.
25. Lee L-F, Xu B, Michie SA, Beilhack GF, Warganich T, Turley S, et al. The role of TNF- α in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(44):15995-6000.
26. Sobel DO, Han J, Williams J, Yoon J-W, Jun H-S, Ahvazi B. Gamma interferon paradoxically inhibits the development of diabetes in the NOD mouse. *Journal of autoimmunity*. 2002;19(3):129-37.
27. Campbell IL, Wong GH, Schrader JW, Harrison LC. Interferon- γ enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. *Diabetes*. 1985;34(11):1205-9.
28. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell*. 1988;52(5):773-82.
29. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(1):205-13.
30. Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes care*. 1991;14(12):1132-43.
31. Arner P. Obesity and the adipocyte. Regional adiposity in man. *J Endocrinol*. 1997;155:191-2.

32. Cersosimo E, Triplitt C, Solis-Herrera C, Mandarino L, DeFronzo R. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Endotext* [Internet]: MDText. com. Inc; 2018.
33. DeFronzo RA. The triumvirate: β -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988;37(6):667-87.
34. DEFRONZO RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes reviews*. 1997;5:177-266.
35. Cherrington AD. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*. 1999;48(5):1198-214.
36. DeFronzo RA, Ferrannini E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetes/metabolism reviews*. 1987;3(2):415-59.
37. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes*. 1987;36(3):274-83.
38. Felig P, Wahren J, Hendler R. Influence of maturity-onset diabetes on splanchnic glucose balance after oral glucose ingestion. *Diabetes*. 1978;27(2):121-6.
39. Foley JE. Rationale and application of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1992;15(6):773-84.
40. Golay A, Felber JP, Jequier E, DeFronzo RA, Ferrannini E. Metabolic basis of obesity and noninsulin- dependent diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism reviews*. 1988;4(8):727-47.
41. Matsuda M, DeFronzo RA, Glass L, Consoli A, Giordano M, Bressler P, et al. Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 2002;51(9):1111-9.
42. Campbell PJ, Mandarino LJ, Gerich JE. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1988;37(1):15-21.
43. Firth R, Bell P, Rizza R. Insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus: the relationship between hepatic and extrahepatic insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 1987;36(11):1091-5.
44. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*. 1999;48(2):292-8.
45. Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(3):619-24.
46. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76(1):149-55.

47. DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Felig P, Wahren J. Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes*. 1983;32(1):35-45.
48. DeFronzo R, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber J. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981;30(12):1000-7.
49. Wasserman DH, Kang L, Ayala JE, Fueger PT, Lee-Young RS. The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *Journal of Experimental Biology*. 2011;214(2):254-62.
50. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Nelson DE, Engelgau MM, Vinicor F, et al. Diabetes trends in the US: 1990-1998. *Diabetes care*. 2000;23(9):1278-83.
51. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng C-Y, Wu MS, Chen Y-DI. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1988;37(8):1020-4.
52. Jansson P-A, Larsson A, Smith U, Lönnroth P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(1):240-6.
53. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(1):3-10.
54. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(1):7-18.
55. Santomauro A, Boden G, Silva M, Rocha DM, Santos RF, Ursich M, et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 1999;48(9):1836-41.
56. Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(3):399-408.
57. KASHYAP S, BELFORT R, PRATIPANAWATR T, BERRIA R, PRATIPANAWATR W, BAJAJ M, et al. Chronic elevation in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in non-diabetic offspring with a strong family history of T2DM. *Diabetes*. 2002;51.
58. Reaven G. The fourth musketeer—from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*. 1995;38(1):3-13.
59. Goodpaster BH, Thaete FL, Kelley DE. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(4):885-92.
60. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, et al. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes*. 2002;51(1):144-51.

61. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(6):2784-91.
62. Ryysy L, Häkkinen A-M, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, et al. Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000;49(5):749-58.
63. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995;44(8):863-70.
64. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes care*. 2019;42(Supplement 1):S13-S28.
65. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11):3342.
66. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2003;19(4):259-70.
67. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;165(6):1667-72.
68. Phelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy: XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1981;140(7):730-6.
69. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2008;4(4):200-13.
70. Anık A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *Journal of pediatric endocrinology and metabolism*. 2015;28(3-4):251-63.
71. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes*. 2009;10:3-12.
72. Kushner JA, Ye J, Schubert M, Burks DJ, Dow MA, Flint CL, et al. Pdx1 restores β cell function in *Irs2* knockout mice. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(9):1193-201.
73. Reardon W, Pembrey M, Trembath R, Ross R, Sweeney M, Harding A, et al. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *The Lancet*. 1992;340(8832):1376-9.
74. Chen N, Unnikrishnan R, Anjana RM, Mohan V, Pitchumoni CS. The complex exocrine–endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders. *Journal of clinical gastroenterology*. 2011;45(10):850-61.

75. Pezzilli R, Calculli L. Pancreatic steatosis: is it related to either obesity or diabetes mellitus? *World journal of diabetes*. 2014;5(4):415.
76. Larger E, Philippe M, Barbot- Trystram L, Radu A, Rotariu M, Nobécourt E, et al. Pancreatic exocrine function in patients with diabetes. *Diabetic Medicine*. 2012;29(8):1047-54.
77. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002;1572(2-3):209-31.
78. Drickamer K, Dell A, Fadden AJ, editors. *Genomic analysis of C-type lectins*. Biochemical Society Symposia; 2002: Portland Press.
79. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(21):13047-52.
80. Kim B-W, Hong SB, Kim JH, Kwon DH, Song HK. Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nature communications*. 2013;4(1):1-8.
81. Lee RT, Lee YC. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate journal*. 2000;17(7-9):543-51.
82. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1999;1473(1):172-85.
83. Jones JL, Saraswati S, Block AS, Lichti CF, Mahadevan M, Diekman AB. Galectin-3 is associated with prostasomes in human semen. *Glycoconjugate journal*. 2010;27(2):227-36.
84. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators of inflammation*. 2018;2018.
85. Wells V, Mallucci L. Identification of an autocrine negative growth factor: mouse β -galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. *Cell*. 1991;64(1):91-7.
86. Houzelstein D, Gonçalves 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.
87. Nabi IR, Shankar J, Dennis JW. The galectin lattice at a glance. *Journal of cell science*. 2015;128(13):2213-9.
88. Stowell SR, Arthur CM, Dias-Baruffi M, Rodrigues LC, Gourdiere J-P, Heimburg-Molinaro J, et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature medicine*. 2010;16(3):295-301.
89. Hirabayashi J, Kasai K-i. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*. 1993;3(4):297-304.
90. 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.

91. Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology*. 1994;4(1):5-12.

92. Wang JL, Laing JG, Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology*. 1991;1(3):243-52.

93. Huflejt M, Turck C, Lindstedt R, Barondes S, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(35):26712-8.

94. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the β -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):36311-5.

95. 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.

96. 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 (BBA)-General Subjects*. 2002;1572(2-3):232-54.

97. Dunic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006;1760(4):616-35.

98. Gupta G. *Animal lectins: form, function and clinical applications*: Springer Science & Business Media; 2012.

99. Liu F-T, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002;1572(2-3):263-73.

100. 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 research*. 2001;29(17):3595-602.

101. Missotten M, Nichols A, Rieger K, Sadoul R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death & Differentiation*. 1999;6(2):124-9.

102. Vito P, Pellegrini L, Guet C, D'Adamio L. Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca²⁺-dependent reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(3):1533-40.

103. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim H-RC, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer research*. 1997;57(23):5272-6.

104. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001;83(7):667-76.

105. 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.
106. Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Experimental cell research*. 1993;207(1):8-18.
107. Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *Journal of cell science*. 1997;110(10):1169-78.
108. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(10):2109-19.
109. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Olivieri A, Magi F, De Francesco GP, et al. Galectin-3: one molecule for an alphabet of diseases, from A to Z. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2):379.
110. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN, et al. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(3):1404-11.
111. Jin Q-h, Lou Y-f, LI T-l, Chen H-h, Qiang L, HE X-j. Serum galectin-3: a risk factor for vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Chinese medical journal*. 2013;126(11):2109-15.
112. Ozturk D, Celik O, Satilmis S, Aslan S, Erturk M, Cakmak HA, et al. Association between serum galectin-3 levels and coronary atherosclerosis and plaque burden/structure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coronary artery disease*. 2015;26(5):396-401.
113. Seferovic JP, Lalic NM, Floridi F, Tesic M, Seferovic PM, Giga V, et al. Structural myocardial alterations in diabetes and hypertension: the role of galectin-3. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2014;52(10):1499-505.
114. Yilmaz H, Cakmak M, Inan O, Darcin T, Akcay A. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor? *Journal of endocrinological investigation*. 2015;38(5):527-33.
115. Darrow AL, Shohet RV, Maresh JG. Transcriptional analysis of the endothelial response to diabetes reveals a role for galectin-3. *Physiological Genomics*. 2011;43(20):1144-52.
116. Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT, Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity*. 2007;15(1):32-9.
117. Baek J-H, Kim S-J, Kang HG, Lee H-W, Kim J-H, Hwang K-A, et al. Galectin-3 activates PPAR γ and supports white adipose tissue formation and high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2015;156(1):147-56.

118. Mensah-Brown E, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu D, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clinical Immunology*. 2009;130(1):83-8.
119. Pugliese G, Iacobini C, Ricci C, Fantauzzi CB, Menini S. Galectin-3 in diabetic patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2014;52(10):1413-23.
120. Ohkura T, Fujioka Y, Nakanishi R, Shiochi H, Sumi K, Yamamoto N, et al. Low serum galectin-3 concentrations are associated with insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2014;6(1):106.
121. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes*. 2013;62(6):1932-44.
122. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, et al. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PloS one*. 2013;8(2):e57915.
123. Rhodes DH, Pini M, Castellanos KJ, Montero- Melendez T, Cooper D, Perretti M, et al. Adipose tissue- specific modulation of galectin expression in lean and obese mice: Evidence for regulatory function. *Obesity*. 2013;21(2):310-9.
124. Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, et al. Galectin- 3/AGE- receptor 3 knockout mice show accelerated AGE- induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin- 3 as an AGE receptor. *The FASEB journal*. 2004;18(14):1773-5.
125. Pugliese G, Pricci F, Iacobini C, Leto G, Amadio L, Barsotti P, et al. Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin- 3/AGE receptor 3 knockout mice. *The FASEB Journal*. 2001;15(13):2471-9.
126. Munro J, Cotran R. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1988;58(3):249.
127. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-9.
128. Geer JC, McGill Jr HC, Strong JP. The fine structure of human atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology*. 1961;38(3):263.
129. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *The American journal of pathology*. 1981;103(2):181.
130. Faruqi RM, DiCorleto PE. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *British heart journal*. 1993;69(1 Suppl):S19.
131. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull Jr W, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart

Association. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1992;12(1):120-34.

132. Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M. Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology*. 1998;152(5):1199.

133. Sharma UC, Pokharel S, Van Brakel TJ, Van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110(19):3121-8.

134. Liu Y-H, D'Ambrosio M, Liao T-d, Peng H, Rhaleb N-E, Sharma U, et al. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009.

135. Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovascular research*. 2011;89(2):265-72.

136. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(6):1217-24.

137. Shah RV, Chen- Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RR, Januzzi JL. Galectin- 3, cardiac structure and function, and long- term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. *European journal of heart failure*. 2010;12(8):826-32.

138. De Boer R, Van Veldhuisen D, Gansevoort R, Muller Kobold A, Van Gilst W, Hillege H, et al. The fibrosis marker galectin- 3 and outcome in the general population. *Journal of internal medicine*. 2012;272(1):55-64.

139. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin- 3: a novel mediator of heart failure development and progression. *European journal of heart failure*. 2009;11(9):811-7.

140. McCullough PA, Olobatoke A, Vanhecke TE. Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2011;12(4):200-10.

141. Lok DJ, Van Der Meer P, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clinical Research in Cardiology*. 2010;99(5):323-8.

142. Peacock WF, DiSomma S. Emergency department use of galectin-3. *Critical pathways in cardiology*. 2014;13(2):73-7.

143. Teichman SL, Maisel AS, Storrow AB. Challenges in acute heart failure clinical management: optimizing care despite incomplete evidence and imperfect drugs. *Critical pathways in cardiology*. 2015;14(1):12.

144. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;70(6):776-803.
145. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey Jr DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128(16):1810-52.
146. Kemp HG. Left ventricular function in patients with the anginal syndrome and normal coronary arteriograms. *Am J Cardiol*. 1973;32:375-6.
147. Vermeltfoort I, Raijmakers P, Riphagen I, Odekerken D, Kuijper A, Zwijnenburg A, et al. Definitions and incidence of cardiac syndrome X: review and analysis of clinical data. *Clinical research in cardiology*. 2010;99(8):475-81.
148. Gulati M, Cooper-DeHoff RM, McClure C, Johnson BD, Shaw LJ, Handberg EM, et al. Adverse cardiovascular outcomes in women with nonobstructive coronary artery disease: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation Study and the St James Women Take Heart Project. *Archives of internal medicine*. 2009;169(9):843-50.
149. Arroyo-Espliguero R, Mollicelli N, Avanzas P, Zouridakis E, Newey VR, Nassiri DK, et al. Chronic inflammation and increased arterial stiffness in patients with cardiac syndrome X. *European heart journal*. 2003;24(22):2006-11.
150. Eroglu S, Sade LE, Yildirim A, Demir O, Bozbas H, Muderrisoglu H. Serum levels of C-reactive protein and uric acid in patients with cardiac syndrome X. *Acta cardiologica*. 2009;64(2):207-11.
151. Li J-J, Zhu C-G, Nan J-L, Li J, Li Z-C, Zeng H-S, et al. Elevated circulating inflammatory markers in female patients with cardiac syndrome X. *Cytokine*. 2007;40(3):172-6.
152. Bozcali E, Polat V, Aciksari G, Opan S, Bayrak IH, Paker N, et al. Serum concentrations of galectin-3 in patients with cardiac syndrome X. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):259-63.
153. Se S, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-801.
154. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(1):240-5.
155. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Biomolecules*. 2015;5(3):1563-79.
156. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1821-30.

157. Huang J-Y, Chiang M-T, Yet S-F, Chau L-Y. Myeloid heme oxygenase-1 haploinsufficiency reduces high fat diet-induced insulin resistance by affecting adipose macrophage infiltration in mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e38626.
158. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008;57(12):3239-46.
159. Li P, Liu S, Lu M, Bandyopadhyay G, Oh D, Imamura T, et al. Hematopoietic-derived galectin-3 causes cellular and systemic insulin resistance. *Cell*. 2016;167(4):973-84. e12.
160. Dabelic S, Supraha S, Dumic J. Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006;1760(4):701-9.
161. 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. *The Journal of Immunology*. 2000;165(4):2156-64.
162. Swarte VV, Mebius RE, Joziassse DH, Van den Eijnden DH, Kraal G. Lymphocyte triggering via L- selectin leads to enhanced galectin- 3- mediated binding to dendritic cells. *European journal of immunology*. 1998;28(9):2864-71.
163. Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. IgE- binding molecules (Mac- 2/εBP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE- dependent eosinophil cytotoxicity. *European journal of immunology*. 1993;23(12):3230-5.
164. Frigeri LG, Liu F-T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *The Journal of Immunology*. 1992;148(3):861-7.
165. Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O- glycans. *The EMBO journal*. 2011;30(15):3173-85.
166. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang R-F. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer research*. 2008;68(17):7228-36.
167. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu F-T, 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. *The Journal of Immunology*. 2004;172(1):493-502.
168. Elliott M, Strasser A, Metcalf D. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *The Journal of Immunology*. 1991;147(9):2957-63.
169. Chen HY, Liu F-T, Yang R-Y. Roles of galectin-3 in immune responses. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2005;6(53):497-504.
170. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning'sweet'on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(5):338-52.

171. Thiemann S, Baum LG. Galectins and immune responses—just how do they do those things they do? *Annual review of immunology*. 2016;34:243-64.
172. Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Björstad Å, 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.
173. 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.
174. Liu F-T, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson Jr WR. 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.
175. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasić R, Vuk-Pavlović S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(3):731-8.
176. Helming L, Gordon S. Macrophage fusion induced by IL- 4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. *European journal of immunology*. 2007;37(1):33-42.
177. 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. *The Journal of Immunology*. 2002;168(4):1813-22.
178. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu F-T, Baum LG. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific β -1, 2-linked mannans. *The Journal of Immunology*. 2006;177(7):4718-26.
179. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *Journal of dermatological science*. 2003;31(2):119-28.
180. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma *N Engl J Med*. 2001;344:350-62.
181. Stanworth D. The discovery of IgE. *Allergy*. 1993;48(2):67-71.
182. Finkelman FD, Vercelli D. Advances in asthma, allergy mechanisms, and genetics in 2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;120(3):544-50.
183. Sullivan AL, Grimley PM, Metzger H. Electron microscopic localization of immunoglobulin E on the surface membrane of human basophils. *The Journal of experimental medicine*. 1971;134(6):1403-16.
184. 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.
185. 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*. *The Journal of Immunology*. 2008;180(4):2466-73.

186. Riccio AM, Mauri P, De Ferrari L, Rossi R, Di Silvestre D, Benazzi L, et al. Galectin-3: an early predictive biomarker of modulation of airway remodeling in patients with severe asthma treated with omalizumab for 36 months. *Clinical and translational allergy*. 2017;7(1):6.
187. Gao P, Simpson JL, Zhang J, Gibson PG. Galectin-3: its role in asthma and potential as an anti-inflammatory target. *Respiratory research*. 2013;14(1):136.
188. Ge XN, Bahaie NS, Kang BN, Hosseinkhani MR, Ha SG, Frenzel EM, et al. Allergen-induced airway remodeling is impaired in galectin-3-deficient mice. *The Journal of Immunology*. 2010;185(2):1205-14.
189. López E, del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, et al. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *The Journal of Immunology*. 2006;176(3):1943-50.
190. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen H-Y, Sheldon HK, Yu L, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The American journal of pathology*. 2004;165(6):2045-53.
191. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(42):15539.
192. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(13):5060-5.
193. Li L-c, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014;351(2):336-43.
194. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Fantauzzi CB, Scipioni A, Salvi L, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *Journal of hepatology*. 2011;54(5):975-83.
195. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz H, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, et al. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2006;210(4):469-77.
196. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(1):282-7.
197. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.
198. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *The American journal of pathology*. 2003;163(1):69-79.

199. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-90.
200. Cayrol C, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(22):9021-6.
201. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009;31(1):84-98.
202. Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends in immunology*. 2012;33(8):389-96.
203. Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, et al. Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *The Journal of Immunology*. 2009;183(12):7890-7.
204. Talabot- Ayer D, Calo N, Vigne S, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. The mouse interleukin (Il) 33 gene is expressed in a cell type- and stimulus- dependent manner from two alternative promoters. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(1):119-25.
205. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL- 33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket. *EMBO reports*. 2008;9(10):1006-12.
206. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(9):6941-8.
207. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B–stimulated gene transcription. *The Journal of Immunology*. 2011;187(4):1609-16.
208. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(2):103-10.
209. Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(47):18660-5.
210. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *The Journal of Immunology*. 2007;179(4):2051-4.
211. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science*. 2012;335(6071):984-9.
212. Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1-and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International immunology*. 2008;20(8):1019-30.

213. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *European journal of immunology*. 2011;41(6):1675-86.
214. Barlow JL, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman CS, Camelo A, et al. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(4):933-41.
215. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *The Journal of Immunology*. 2011;186(4):2584-91.
216. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *The Journal of Immunology*. 2008;181(7):4780-90.
217. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6469-77.
218. Silver MR, Margulis A, Wood N, Goldman SJ, Kasaian M, Chaudhary D. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflammation research*. 2010;59(3):207-18.
219. Jung M-Y, Smrž D, Desai A, Bandara G, Ito T, Iwaki S, et al. IL-33 induces a hyporesponsive phenotype in human and mouse mast cells. *The Journal of Immunology*. 2013;190(2):531-8.
220. Aoki S, Hayakawa M, Ozaki H, Takezako N, Obata H, Ibaraki N, et al. ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010;335(1-2):75-81.
221. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *The Journal of Immunology*. 2010;185(6):3472-80.
222. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy*. 2012;67(10):1203-14.
223. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *The Journal of Immunology*. 2008;180(4):2443-9.
224. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway—a new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2011;131(2):179-86.
225. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(2):339-46.
226. Verri WA, Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(7):2723-8.

227. Xu D, Jiang H-R, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(31):10913-8.
228. Ouziel R, Gustot T, Moreno C, Arvanitakis M, Degré D, Trépo E, et al. The ST2 pathway is involved in acute pancreatitis: a translational study in humans and mice. *The American journal of pathology*. 2012;180(6):2330-9.
229. Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;299(4):G821-G32.
230. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of inflammation*. 2011;8(1):22.
231. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circulation research*. 2010;107(5):650-8.
232. Fousteris E, Melidonis A, Panoutsopoulos G, Tzirogiannis K, Foussas S, Theodosis-Georgilas A, et al. Toll/interleukin-1 receptor member ST2 exhibits higher soluble levels in type 2 diabetes, especially when accompanied with left ventricular diastolic dysfunction. *Cardiovascular Diabetology*. 2011;10(1):101.
233. Miller AM, Purves D, McConnachie A, Asquith DL, Batty GD, Burns H, et al. Soluble ST2 associates with diabetes but not established cardiovascular risk factors: a new inflammatory pathway of relevance to diabetes? *PloS one*. 2012;7(10):e47830.
234. Zdravkovic N, Shahin A, Arsenijevic N, Lukic ML, Mensah-Brown EP. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Molecular immunology*. 2009;47(1):28-36.
235. Rui T, Zhang J, Xu X, Yao Y, Kao R, Martin CM. Reduction in IL-33 expression exaggerates ischaemia/reperfusion-induced myocardial injury in mice with diabetes mellitus. *Cardiovascular research*. 2012;94(2):370-8.
236. Pei C, Barbour M, Fairlie-Clarke KJ, Allan D, Mu R, Jiang HR. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*. 2014;141(1):9-17.
237. Hall TR, Bogdani M, LeBoeuf RC, Kirk EA, Maziarz M, Banga JP, et al. Modulation of diabetes in NOD mice by GAD65-specific monoclonal antibodies is epitope specific and accompanied by anti-idiotypic antibodies. *Immunology*. 2008;123(4):547-54.
238. Li D-S, Yuan Y-H, Tu H-J, Liang Q-L, Dai L-J. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nature protocols*. 2009;4(11):1649-52.
239. Halliwell B, Gutteridge J, Grootveld M. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985.
240. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods*. 1980;38(1-2):161-70.

241. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 1982;126(1):131-8.
242. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
243. Glastras SJ, Chen H, Teh R, McGrath RT, Chen J, Pollock CA, et al. Mouse models of diabetes, obesity and related kidney disease. *PloS one*. 2016;11(8):e0162131.
244. Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2010;1800(2):181-9.
245. Harazono Y, Kho DH, Balan V, Nakajima K, Zhang T, Hogan V, et al. Galectin-3 leads to attenuation of apoptosis through Bax heterodimerization in human thyroid carcinoma cells. *Oncotarget*. 2014;5(20):9992.
246. Patterson RJ, Wang W, Wang JL. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):499-506.
247. Sato S, St- Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble β - galactoside- binding lectins as damage- associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen- associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological reviews*. 2009;230(1):172-87.
248. Karlsen AE, Størthing ZM, Sparre T, Larsen MR, Mahmood A, Størthing J, et al. Immune-mediated β -cell destruction in vitro and in vivo—A pivotal role for galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;344(1):406-15.
249. Saksida T, Nikolic I, Vujicic M, Nilsson UJ, Leffler H, Lukic ML, et al. Galectin- 3 deficiency protects pancreatic islet cells from cytokine- triggered apoptosis in vitro. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(7):1568-76.
250. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin- 3 regulates T- cell functions. *Immunological reviews*. 2009;230(1):114-27.
251. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, Von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin- 3, a β - galactoside- binding protein in activated T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(4):555-64.
252. Yang R-Y, Hsu DK, Liu F-T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(13):6737-42.
253. Liu F-T. Regulatory roles of galectins in the immune response. *International archives of allergy and immunology*. 2005;136(4):385-400.
254. 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(1):1-13.

255. Díaz-Alvarez L, Ortega E. The many roles of galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Mediators of inflammation*. 2017;2017.
256. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(3):411-6.
257. Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. *Immunity*. 2019;50(1):37-50.
258. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*. 2007;315(5817):1398-401.
259. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*. 2002;168(9):4531-7.
260. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*. 2001;31(11):3388-93.
261. Brod SA. Ingested type I interferon: a potential treatment for autoimmunity. *Journal of interferon & cytokine research*. 2002;22(12):1153-66.
262. Sobel DO, Ahvazi B. Alpha-interferon inhibits the development of diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 1998;47(12):1867-72.
263. Tanaka-Kataoka M, Kunikata T, Takayama S, Iwaki K, Fujii M, Ohashi K, et al. Oral use of interferon-alpha delays the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetes mice. *Journal of interferon & cytokine research*. 1999;19(8):877-9.
264. Alba A, Puertas MC, Carrillo J, Planas R, Ampudia R, Pastor X, et al. IFN β accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to β cells in nondiabetes-prone mice. *The Journal of Immunology*. 2004;173(11):6667-75.
265. Stewart T, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science*. 1993;260(5116):1942-6.
266. Diana J, Brezar V, Beaudoin L, Dalod M, Mellor A, Tafuri A, et al. Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell–plasmacytoid dendritic cell interplay. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(4):729-45.
267. Takahashi M, Kobayashi Y. Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cellular immunology*. 2003;226(2):105-15.
268. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(2):133-46.
269. Merberg DM, Wolf SF, Clark SC. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunology today*. 1992;13(2):77-8.

270. 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.
271. Heinzl FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *The Journal of Immunology*. 1997;158(9):4381-8.
272. Kato K, Shimozato O, Hoshi K, Wakimoto H, Hamada H, Yagita H, et al. Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(17):9085-9.
273. Yasuda H, Nagata M, Arisawa K, Yoshida R, Fujihira K, Okamoto N, et al. Local expression of immunoregulatory IL-12p40 gene prolonged syngeneic islet graft survival in diabetic NOD mice. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(10):1807-14.
274. Marco D, Mauro D. Endogenous interleukin- 12 only plays a key pathogenetic role in non- obese diabetic mouse diabetes during the very early stages of the disease. *Immunology*. 1999;97(3):367-70.
275. Trembleau S, Penna G, Gregori S, Gately MK, Adorini L. Deviation of pancreas- infiltrating cells to Th2 by interleukin- 12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *European journal of immunology*. 1997;27(9):2330-9.
276. Wang R-X, Yu C-R, Mahdi RM, Ekwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(43):36012-21.
277. Heydemann A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*. 2016;2016.
278. 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):100-10.
279. Radosavljevic GD, Pantic J, Jovanovic I, Lukic ML, Arsenijevic N. The two faces of galectin-3: roles in various pathological conditions. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;17(3):187-98.
280. Jeftic I, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Galectin-3 deletion enhances visceral adipose tissue inflammation and dysregulates glucose metabolism in mice on a high-fat diet. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;17(3):231-40.
281. Menini S, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Pesce CM, Pugliese G. Role of galectin-3 in obesity and impaired glucose homeostasis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.

282. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Djukic AL, Arsenijevic NN, et al. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte*. 2013;2(4):266-71.
283. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews*. 2008;29(1):42-61.
284. Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, Nangia-Makker P, Elsamman E, Kasai T, et al. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer research*. 2006;66(6):3114-9.
285. 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;10(9):1626-38.
286. 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*. 2015;240(8):1019-28.
287. Shin T. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review. *Acta histochemica*. 2013;115(5):407-11.
288. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(2):463-78.
289. Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci*. 2008;13(1):5187-94.
290. Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *Journal of hypertension*. 2010;28(10):2111-9.
291. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu F-T. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *The Journal of Immunology*. 1995;154(7):3479-87.
292. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current biology*. 1999;9(17):967-S1.
293. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes*. 2001;50(8):1771-7.
294. Donath MY, Ehes JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, et al. Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(suppl 2):S108-S13.
295. Mathis D, Vence L, Benoist C. β -Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001;414(6865):792-8.

296. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell metabolism*. 2012;15(4):518-33.
297. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(39):37041-51.
298. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):575-81.
299. Cucak H, Grunnet LG, Rosendahl A. Accumulation of M1- like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology*. 2014;95(1):149-60.
300. Ying W, Lee YS, Dong Y, Seidman JS, Yang M, Isaac R, et al. Expansion of islet-resident macrophages leads to inflammation affecting β cell proliferation and function in obesity. *Cell metabolism*. 2019;29(2):457-74. e5.
301. Acharya J, Ghaskadbi SS. Islets and their antioxidant defense. *Islets*. 2010;2:225-35.
302. Poitout V, Robertson RP. Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*. 2002;143(2):339-42.
303. Eizirik DL, Korbitt GS, Hellerström C. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(4):1263-8.
304. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(1):514-9.
305. Poitout V, Olson LK, Robertson RP. Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(4):1041-6.
306. Lukic M, Stosic-Grujicic S, Ostojic N, Chan W, Liew F. Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;178(3):913-20.
307. Southern C, Schulster D, Green I. Inhibition of insulin secretion by interleukin- 1β and tumour necrosis factor- α via an L- arginine- dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS letters*. 1990;276(1-2):42-4.
308. Oleson BJ, Corbett JA. Dual role of nitric oxide in regulating the response of β cells to DNA damage. *Antioxidants & redox signaling*. 2018;29(14):1432-45.
309. Rahman FU, Park D-R, Joe Y, Jang KY, Chung HT, Kim U-H. Critical roles of carbon monoxide and nitric oxide in Ca^{2+} signaling for insulin secretion in pancreatic islets. *Antioxidants & redox signaling*. 2019;30(4):560-76.

310. Pavlovic S, Petrovic I, Jovicic N, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Arsenijevic N, et al. IL-33 prevents MLD-STZ induction of diabetes and attenuate insulinitis in prediabetic NOD mice. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2646.

Биографија аутора:

Кандидат др Ивица Петровић, рођен је 29.09.1985. године у Краљеву, где је завршио основну и средњу школу. Интегрисане академске студије медицине на Медицинском факултету у Крагујевцу уписао је школске 2004/2005. године, а завршио их на истом факултету у децембру 2011. године, са просечном оценом 8,97 (осам и 97/100), чиме је стекао стручно звање доктора медицине. По завршетку основних студија обавио је приправнички стаж и положио стручни испит за доктора медицине. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и клиничка интерна медицина - подподручје ендокринологија, уписао је школске 2012/2013. године. Усмени докторски испит је положио 2015. године. Од 2013. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где до данас обавља послове сарадника у настави у звању асистента за ужу научну област Патолошка физиологија. Од априла 2014. године на специјализацији из уже научне области Интерне медицине. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ивица Петровић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса

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, 2020. године

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Петровић Ивица,

дозвољавам

не дозвољавам

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

" Улога галектина-3 у патофизиологији β ћелија панкреаса "

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, 2020. 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 понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>