



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



Александар Н. Арсенијевић

**ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ
БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: проф. др Марија Миловановић

КРАГУЈЕВАЦ 2017

Добро које добијаш од људи је појединачно, насупротив злу које је увек опште.

Често то Добро не можеш да узвратиш, али оно не сме остати сахрањено у теби.

Обавезан си да то Добро неокрњено сачуваш и поклониш ономе коме и кад буде требало.

То је зато, јер се доброта тешко умножава-форцепсом, а зло лако и брзо-партеногенезом.

Велико Добро у току израде ове дисертације примио сам од:

Проф. др Марије Миловановић, мог пожртвованог и племенитог ментора,

Проф. др емеритуса Миодрага Лукића, супервизора овог као и других наших истраживања,

асс. др Јелене Миловановић и асс. др Бојане Стојановић мојих пријатеља и лабораторијских сапатника.

Посвећујем оцу.

Садржај

1. УВОД	7
1.1.	Примарни билијарни холангитис
.....	7
1.1.1 Клиничке одлике примарног билијарног холангитиса.....	8
1.1.2 Дијагностички серумски параметри.....	10
1.1.3 Хистопатолошки налаз.....	10
1.1.4 Епидемиологија.....	10
1.1.5 Етиологија РВС-а.....	11
1.1.5.1 Генски фактори.....	11
1.1.6 Билијарне епителне ћелије.....	13
1.1.7 Имунски одговор у примарном билијарном холангитису.....	15
1.1.8 Иницијација примарног билијарног холангитиса.....	16
1.1.9 Анимални модели РВС.....	18
1.1.9.1 Генски модификовани мишеви.....	18
1.1.9.2 РВС индукован имунизацијом ксенобиотицима.....	21
1.1.9.3 Модел РВС индукованог инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	21
1.2 Структура и класификација галектинских молекула	24
1.2.1 Експресија и функција галектина.....	25
1.2.2 Структура галектина-3.....	27
1.2.3 Улога галектина-3 у контроли биолошких процеса.....	28
1.2.3.1 Улога <i>Gal-3</i> у регулацији ћелијског раста.....	29
1.2.3.2 Регулација апоптозе.....	30
1.2.3.3 Регулација ћелијског циклуса.....	30
1.2.3.4 Улога и значај галектина-3 у регулацији инфламацијског и имунског одговора.....	31
1.2.3.5 Улога <i>Gal-3</i> у адхезији и хемотакси.....	31
1.2.3.6 Утицај <i>Gal-3</i> на функције ћелија имунског система.....	32
1.2.4 Експресија галектина-3 у јетри.....	33
2. ЦИЉ РАДА	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	36
3.1. Лабораторијске животиње	36
3.1.1. Поступак добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3.....	36
3.2. Индукција примарног билијарног холангитиса и детекција аутоантитела	38
3.3. Апликација Gal-3INH	39

3.4. Хистолошка анализа ткива јетре	39
3.4.1. Бојење хематоксилином и еозином	40
3.4.2. Бојење хистолошких препарата на фиброзу (Sirius Red)	40
3.5. Процена хистолошког скорa.....	41
3.6. Одређивање концентрације ензима јетре у серуму.....	41
3.7. Одређивање концентрација цитокина у серуму.....	41
3.8. Изолација мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија	43
3.9. Изолација мононуклеара слезине	43
3.10. Проточна цитометрија.....	44
3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера	44
3.10.2. Интрацелуларно бојење цитокина.....	45
3.10.2.1 Стимулација ћелија	46
3.10.2.2. Бојење површинских антигена	46
3.10.2.3. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране	46
3.10.2.4. Бојење интрацелуларних цитокина	46
3.11. Имунохистохемија мишијих узорака јетре.....	47
3.12. Изолација NK ћелија позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица	48
3.13. Издвајање дендритских ћелија помоћу магнетних куглица	49
3.14. Продукција цитокина и експресија маркера активације након in vitro стимулације.....	49
3.15. Изолација холангиоцита и тестови апоптозе	50
3.16. Анализа експресија гена у ткиву јетре методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену	50
3.16.1. Изолација РНК из ткива јетре миша	50
3.16.2. Реверзна транскрипција.....	51
3.16.3. Квантификација експресије гена	51
3.17. Детекција галектина у хуманом серуму и хистолошким пресецима јетре.	52
3.18. Статистичка анализа	52
4. РЕЗУЛТАТИ	54
4.1. Концентрација Gal-3 у серуму и његова експресија у холангиоцитима су повећане код оболелих од РВС	54
4.2. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају тежу форму примарног билијарног холангитиса индукованог ксенобиотиком.....	55
4.2.1 Хистолошки параметри.....	55

4.2.2 Серумски параметри.....	60
4.3. Дефицијенција Gal-3 је удружена са знатно блажом формом примарног билијарног холангитиса индукованог инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>.....	61
4.3.1 Хистолошки параметри.....	61
4.3.2 Серумски параметри.....	65
4.4. Инфлукс инфламацијских CD8+ лимфоцита у јетру је већи код оболелих Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком	69
4.4.1 Субпопулације мононуклеарних ћелија.....	70
4.5. У јетрама оболелих Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком доминирају проинфламацијске дендритске ћелије.....	71
4.6. Индукција РВС ксенобиотиком повећава експресију Gal-3 у холангиоцитима ...	74
4.7. Тежи облик РВС индукованог ксенобиотиком код Gal-3 КО мишева је удружен са већом фреквенцом апоптозе холангиоцита	75
4.8. Веће оштећење билијарних каналића код Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком повезано је са појачаним Th1 имунским одговором у јетри.....	77
4.9. Појачан системски Th17 имунски одговор код Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком је удружен са већим оштећењем билијарних каналића и већом фиброзом јетре.....	81
4.9.1. У серуму Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком је присутна већа концентрација профибротских цитокина.....	81
4.9.2. Gal-3 дефицијентни мишеви имунизовани ксенобиотиком развијају значајнију фиброзу јетре.....	81
4.10. Одсуство галектина 3 значајно смањује проценат дендритских и NK ћелија и редукује проценат Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетри мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>.....	85
4.11. Галектин 3 модулише одговор дендритских а не NK ћелија на <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>.....	89
4.11.1. Дендритске ћелије јетре и слезине Gal-3 дефицијентних мишева три дана након инфекције бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> имају израженији инфламацијски фенотип у поређењу са WT мишевима	91
4.11.2. Већи проценат дендритских ћелија изолованих из слезина Gal-3 дефицијентних мишева по <i>in vitro</i> стимулацији бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> експримира маркере активације, проинфламацијске цитокине и компоненту инфламазома у поређењу са WT мишевима.....	93
4.12. Инхибитор галектина-3 значајно смањује оштећење билијарних канала изазвано инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>.....	99

4.12.1. Примена Gal-3 INH значајно смањује заступљеност и проценат активираних CD8+ лимфоцита у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	105
4.12.2. Примена Gal-3 INH значајно смањују заступљеност инфламацијских лимфоцита у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	106
4.12.3. Примена Gal-3 INH значајно смањује заступљеност NK ћелија у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	108
4.12.4. Примена Gal-3 INH значајно смањује проценат активираних и цитолитичких NK ћелија у јетри мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	108
4.12.5. Примена Gal-3 INH и делеција гена за галектин 3 значајно смањују проценат IFN- γ а повећавају проценат IL-10+ NK ћелија у јетри мишева са PBC-ом индукованом инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	112
4.12.6. Одсуство галектина 3 и примена Gal-3 INH значајно смањују проценат активираних дендритских ћелија које презентују антигене Т лимфоцитима и NKT ћелијама у јетри мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	114
4.12.7. Одсуство галектина 3 значајно смањује проценат проинфламацијских дендритских ћелија у јетри мишева са PBC-ом индукованом инфекцијом бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	116
5. ДИСКУСИЈА	119
5.1. Холангиоцити оболелих од примарног билијарног холангитиса експримирају Gal-3	120
5.2. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају тежу форму примарног билијарног холангитиса индукованог ксенобиотиком	121
5.3. Тежи облик болести, индуковане ксенобиотиком, код Gal-3 КО мишева је удружен се већом фреквенцом апоптозе холангиоцита	122
5.4. Gal-3 дефицијентни мишеви имунизовани ксенобиотиком развијају израженију фиброзу јетре	125
5.5. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са знатно блажом формом примарног билијарног холангитиса индукованог бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	126
5.6. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са значајно мањом фреквенцијом Th17 и Tc17 лимфоцита у јетрама C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	129
5.7. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са значајно слабијом активацијом дендритских ћелија код C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	130
5.8. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, значајно смањују активацију инфлазома код C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом <i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	134

6. ЗАКЉУЧЦИ.....	137
7. РЕФЕРЕНЦЕ	140
8. ПРИЛОГ	168
8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	168
8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION	171
8.3 Лични подаци	174
8.3.1 Подаци о објављеним радовима:	175
8.4 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	177

1. УВОД

Главни циљ овог истраживања је испитивање улоге и значаја галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса изазваног на два различита начина: ксенобиотицом, 2-октаноичном киселином коњугованом са серумским албумином говеда (*2 octanoic acid conjugated with bovine serum albumin; 2OA-BSA*) и бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* (NA). Зато у уводном делу постоје и детаљна објашњења структуре, експресије и биолошких ефеката галектина-3 и његове улоге у регулацији имунског одговора.

1.1 Примарни билијарни холангитис

Примарни билијарни холангитис (енг. *Primary Biliary Cholangitis; PBC*) је орган-специфично аутоимунско, холестатско обољење у чијој је основи хронични несупуративни деструктивни интрахепатични холангитис са деструкцијом малих интрахепатичних жучних канала која води у фиброзу и следствену билијарну цирозу. Болест су први описали *Addison* и *Gull* 1851. године (1, 2) а потом и *Hanot* 1876. године (2, 3). Донедавно је била позната под називом примарна билијарна цироза (од енг. *Primary Biliary Cirrhosis; PBC*), а 2015. године договорена је промена имена болести у примарни билијарни холангитис, тако да је скраћеница остала иста (2). PBC има подмукли асимптоматски почетак са дугим периодом латенције пре појаве типичних симптома. Главне карактеристике болести су прогресивна деструкција малих и средњих билијарних канала, која за резултат има хроничну холестазу, портну инфламацију и фиброзу која се неретко завршава инсуфицијенцијом и цирозом јетре са свим пратећим компликацијама (4, 5). Етиопатогенеза болести је и поред нагомиланих експерименталних података остала великим делом непозната. Иако се патогенеза делимично може објаснити аутоимунским механизмима усмерених на неколико кључних аутоантигена и њихових епитопа сами механизми деструкције малих жучних канала и даље остају недовољно разјашњени.

Дијагноза се заснива на класичном тријасу: клинички и лабораторијски знаци холестазе, присуство антимиохондријских антитела (АМА) у серуму и хистопатолошки налаз асиметричне деструкције интралобуларних жучних каналића. Ова аутоантитела су

специфична за епитоп E2 различитих субјединица комплекса дехидрогеназе (DC), лоциране на унутрашњој мембрани митохондрија, и то: *2-oxo-acid* (2OADC-E2), пируват (PDC-E2), рачвасти ланац *2-oxo-acid* (BCOADC-E2) и *2-oxo-glutarat* (OGDC-E2) (6). Ипак се PDC-E2 сматра имунодоминантним аутоантигеном (7; 8), јер је показано да је губитак имунске толеранције на овај митохондријски аутоантиген иницијални догађај у настанку PBC-а, као и да не постоји значајан доказ за ширење епитопа што ову орган-специфичну аутоимунску болест разликује од већине других аутоимунских болести (9).

1.1.1 Клиничке одлике примарног билијарног холангитиса

Клиничка слика и природна историја PBC-а значајно варирају од асимптоматских и споро прогресивних до симптоматских и брзо развијајућих форми болести. Болест је чешћа код жена, код којих се дијагностикује углавном у петој и шестој деценији. Инциденца асимптоматских облика болести је у порасту, што је вероватно последица повећане свести о PBC и широко распрострањенх рутинских биохемијских тестова за функције јетре. Многи асимптоматски пацијенти ће развити симптоматску болест јетре у року од пет година након постављања дијагнозе, иако трећина њих може бити без симптома дуги низ година (10).

Симптоми који најчешће прате PBC су замор и пруритус, а физички знаци могу укључити хиперпигментацију коже, хепатоспленомегалију и ретко ксантелазме. Иако није специфичан симптом, замор је најчешћа клиничка манифестација PBC-а и присутан је код скоро 80% пацијената (11, 12). Механизам развоја замора код ове болести остаје непознат упркос многим претпоставкама који укључују аутономну дисфункцију (13), оштећење мишића (14), прекомерну дневну сомноленцију (15), промене у кортикалној ексцитабилности (16), поремећеној хомеостази мангана у ЦНС-у (17). Умор код оболелих од примарног билијарног холангитиса одликује се прекомерном дневном сомноленцијом и погоршава квалитет живота. Упркос не тако константној корелацији између умора и степена оштећења јетре, умор се може повезати са смањеним генералним преживљавањем (18, 19).

Пруритус, симптом повезан са дуготрајном холестазом, је најтипичнија жалба пацијената и обично претходи иктерусу. Употреба урсодеоксихолне киселине значајно је смањила учесталост овог симптома иако механизам овог ефекта није сасвим јасан. Пруритус се

погоршава ноћу, ако је особа у контакту са вуном, или у топлијим крајевима. Постоје два могућа објашњења за појаву пруритуса у примарном билијарном холангитису: ретенција серумске билијарне киселине због хроничне холестазе или/и појачано ослобађање ендогених опиоида. Лечење пруритуса може бити изазовно, употреба холесирамина (4 g два до три пута дневно) ублажава пруритус. У случају слабог одговора на резине, користи се рифампицин како би се постигло брзо олакшање пруритуса, при чему дуготрајну употребу овог лека ипак треба избегавати. У третману пруритуса користе се и антагонисти опиоида као што је налтрексон (50 mg/дневно). Недавно је препоручена и употреба сертралина (20, 21).

Врло чест налаз код оболелих од РВС је и смањење густине костију које може попримити одлике остеопеније (33%), а ретко и остеопорозе (11%) (22).

Портна хипертензија је често присутна код оболелих од РВС и не мора увек да имплицира појаву цирозе јетре. Више од половине пацијената без терапије развија портну хипертензију у року од четири године. Превенција и третман портне хипертензије узроковане РВС-ом, не разликује се од третмана код осталих хроничних обољења јетре.

Хиперлипидемија, са повећаним концентрацијама и холестерола и триглицерида у серуму, је присутна код 85% пацијената. Интересанто је да упркос свему ове промене липидног профила серума нису праћене очекиваним пропорцијалним повећањем инциденце атеросклерозе и кардиоваскуларних обољења, а и нема корелације са стадијумом основне болести. Лечење билијарном киселином смањује липиде у крви непознатим механизмима. Коморбидитет је важна одлика РВС. Многи поремећаји, тачније други аутоимунски синдроми, повезани су са примарним билијарним холангитисом: Сјогренов синдром, Рејноов феномен, аутоимунски тиреоидитис, склеродерма, системски лупус еритематодес, док је преваленција реуматоидног артритиса иста као и у незахваћеној популацији (23).

Као и у цирозама јетре других етиологија, њен крајњи стадијум може да буде подлога за развој хепатоцелуларног карцинома, а важно је напоменути да РВС није повезан са холангиокарциномима (ССА) или карциномима дојке.

1.1.2 Дијагностички серумски параметри

Биохемијски холеостатски образац показује повећану концентрацију алкалне фосфатазе што није повезано са повећањем аминотрансфераза. Концентрација IgM у серуму је повећана али не корелира са концентрацијама АМА нити осталих антитела у серуму (24). Када се развије цироза, биохемијске промене исте су као и у другим цирозама.

1.1.3 Хистопатолошки налаз

РВС се, према класификацији Лудвига (25) и Шојера (26), хистолошки може поделити у четири стадијума. Стадијум 1 означен је као портни хепатитис; стадијум 2 као перипортни хепатитис, стадијум 3 као септална фиброза или брицинг некроза и стадијум 4 као цироза. У иницијалној фази патолошки процес захвата мале интерлобуларне жучне каналиће и одликује се едемом и дегенерацијом епитела каналића која полако прелази у ћелијску смрт која је главна одлика раног РВС-а (27). У овој фази постоји изражена инфилтрација моноклеарним ћелијама (углавном макрофаги и еозинофили) портних простора око захваћених каналића. Понекад могу да се детектују и грануломи или агрегати епителоидних ћелија у портним просторима или унутар лобулуса. Грануломи нису карактеристични само за ову фазу већ се могу детектовати у било ком стадијуму болести. Уочавају се хиперплазија Купферових ћелија и инфилтрација синусоида лимфоцитима. На прогресију болести указује перипортни хепатитис. У још каснијим стадијумима болести нестају оштећени каналићи, а ткиво се замењује фиброзним да би се на концу развила цироза. Почев од раних стадијума болести у хепатоцитима се детектује огромна количина акумулираног бакра (28).

1.1.4 Епидемиологија

Подаци о инциденци и преваленци примарног билијарног холангитиса пасивно се сакупљају и не дају релевантне податке који се могу екстраполирати на целокупне популације нити се њима могу објаснити регионалне разлике. Ипак, постојећи подаци указују да је инциденца РВС у сталном порасту. Обично се наводи да је болест учесталија

у северним крајевима северне популопте у поређењу са појавом болести у јужним топлијим крајевима (29-30). Просторне и географске разлике у преваленци РВС су описане у неколико студија, са груписањем оболелих у ограниченим подручјима (32-34). Ове разлике нису могле да се објасне демографским или географским факторима, али се претпоставља да је последица присуства већег броја оболелих на одређеном подручју последица деловања неког неидентификованог фактора околине (35). За већину аутоимунских болести карактеристична је већа учесталост обољевања у женској популацији али за примарни билијарни холангитис овај однос посебно је упечатљив јер жене у односу на мушкарце обољевају десет пута чешће (36).

1.1.5 Етиологија РВС-а

Каузална етиологија РВС-а као и разлог губитака толеранције на доминантне епитопе су још увек непознати, као и код других инфламацијских потенцијално аутоимунских болести. Наравно да се, као и у другим аутоимунским болестима, разматра: допринос генске предиспозиције (37) и фактора средине (38, 39). Преовлађује мишљење да фактори окружења (ксенобиотици и/или микроорганизми) код предиспонираних особа модификују аутоантиген и тако олакшавају прекид толеранције (40).

1.1.5.1 Генски фактори

Епидемиолошке студије указују да се РВС чешће јавља у одређеним породицама па је тако релативни ризик за настанак РВС-а у породицама у којима има оболелих 10,5х што је врло слично са ризиком у осталим аутоимунским болестима (41), односно уколико особа има рођака оболелог од РВС у првој линији сродства то је независни ризик за обољевање, а *odds ratio* износи 6.8-10.7 (42). Код монозиготних близанаца стопа конкордантности за РВС износи 0,63 што је највећа стопа међу свим аутоимунским болестима (43). Сви ови налази указују на јаку генску предиспозицију за развој РВС. Описана је удруженост одрђених HLA хаплотипова (DRB1*08:01-DQA1*04:01-DQB1*04:02 DRB1*04:04-DQB1*03:02) и већег ризика за развој РВС, али и протективни утицај других хаплотипова (DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01 и DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*0602) (44). Описан је и

предиспонирајући утицај варијанти гена чији производи конторлишу имунске и то гена за IRF5, IL-12RB2, IL-12A.

1.1.5.2 Фактори околине

Појава веће учесталости РВС-а у одређеним географским подручјима указује на утицај до сада још увек непознатог фактора околине који утиче на патогенезу РВС-а.

Инфекцијом и механизмима **антигенске мимикрије** могу се објаснити утицаји фактора околине на настанак РВС. Могући преклапајући епитоп микобактерија је hsp65 јер има исти мотив као и антиген РДС-Е2 (45). Идентичан мотив, на који се продукују IgG3 антитела код оболелих од РВС, је идентификован и у бактерији *Lactobacillus delbrueckii* (46). Међутим као највероватнији микроорганизам који доприноси развоју РВС услед молекуле мимикрије означена је интестинална коменсална протеобактерија присутна у хуманом фецесу *Novosphingobium aromaticivorans* (47, 48). *N. aromaticivorans* садржи два протеина, који су високо хомологи са имунодоминантним епитопом РДС-Е2. Такође је показано је да постоји унакрсна реакција између АМА из серума оболелих од РВС и *E. coli*, али је 1000 пута јача кросреактивност показана између РДС-Е2 и бактерије која метаболише ксенобиотик- *Novosphingobium aromaticivorans* (49). Значајан податак је и да мишеви инфицирани овом бактеријом развијају лезије налик РВС (50).

Пошто јетра има кључну улогу у метаболизму токсина, хепатоцити и билијарне епителне ћелије (енг. *Biliary Epithelial Cells*, BECs) су континуирано изложени хемијским нуспроизводима. Подаци о повезаности РВС и честе употребе лакова за нокте подржавају теорију о улози **ксенобиотика** у настанку болести. Ксенобиотик 2-октаноична киселина користи се као адитив у храни, а саставни је део козметичких препарата нарочито лакова за нокте. *In vitro* и *in vivo* анализе указују на потенцијалну улогу 2-октаноичне киселине у настанку РВС-а мада реактивност 2-октаноичне киселине са АМА и са липоичном киселином није показана (51). NOD и C57BL/6 мишеви имунизовани 2-октаноичном киселином коњугованом са албумином говеђег серума развијају хистолошке одлике аутоимунског холангитиса (портни инфилтрати у којима доминирају CD8⁺ лимфоцити и развој гранулома у јетри) са повећаним концентрацијама АМА (52-55). Овај модел пружа убедљиве доказе да су ксенобиотици узрочно повезани са настанком РВС.



Схема 1. Етиолошки фактори у примарном билијарном холангитису

1.1.6 Билијарне епителне ћелије

Најинтересантније питање у вези са етиопатогенезом РВС-а је постојање специфичног имунског одговора усмереног само на епител малих интрахепатичних билијарних канала, а не и на истородне холангиоците већих канала нити на било које друге ћелије, иако све ћелије имају митохондрије и у њима присутне аутоантигенске комплексе. Мали канали обложени су билијарним епителним ћелијама (холангиоцитима) које иницијално бивају погођене и деструиране специфичним имунским одговором у којем учествују и CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити (56; 57). Ова селективна деструкција указује на јединствене имунопатолошке карактеристике ове болести. Познато је да холангиоцити нису само пасивни посматрачи у примарној билијарној цирози, већ могу да повећају експресију адхезионих молекула као и продукцију TNF- α , IFN- γ и IL-1, после стимулације проинфламацијским цитокинима (58). Кроз варијабилну експресију адхезионих молекула и проинфламацијских цитокина, холангиоцити могу да модулишу интензитет и локализацију запаљењског процеса. Не мање важно је и да холангиоцити имају својства професионалних антиген презентујућих ћелија, јер током инфламације експримирају молекуле II класе МНС као и костимулаторне

молекуле CD80 и CD86 што им омогућује да интерреагују са Т лимфоцитима и тако допринесу настанку инфламације и оштећењу билијарних канала током иницијације и прогресије болести (59).

Холангиоцити малих билијарних канала су много вулнерабилнији него епителне ћелије већих канала. За разлику од холангиоцита већих канала у епителним ћелијама каналића, у одговору на оштећење, изостаје синтеза протеина TTF3 (енг. Trefoil Factor Family, TTF). Овај молекул припада породици TTF, коју чине мали протеини резистентни на протеазе, и одговоран је за повећање вискозитета заштитног слоја слузи (60).

Нови подаци указују да је током PBC-а вулнерабилност холангиоцита на перфоринско-гранзимску и Fas/FasL иницијацију апоптозе најодговорнија за дуктопенију. Поред тога недавно је показано и да су интактне билијарне епителне ћелије способне за фагоцитозу апоптотски усмрћених билијарних епителних ћелија што обезбеђује нове ендogene изворе аутоантигена. Ове чињенице наводе на претпоставку да је ткивно специфично оштећење PBC-а узроковано бар делимично специфичном осетљивошћу холангиоцита билијарних каналића на апоптозу као и да фагоцитовање апоптотских телашаца од стране неизмењених ВЕСs амплификује реакцију.

Ова јединствена карактеристика апоптозе холангиоцита делимично осветљава њихову могућу улогу у имунопатогенези PBC-а јер је могуће да неоантигени који су потекли из фагоцитованих апоптотских холангиоцита активирају лимфоците (61). Наиме, апоптозом холангиоцита се не уништава главни аутоантиген митохондрија PDC-E2 већ остаје интактан и доступан имунском систему (62; 63). Стално излагање PDC-E2 пристиглог од холангиоцита, а на површини захваћених холангиоцита је последица и неуспешног ковалентног везивања PDC-E2 за глутатион током апоптозе у овим ћелијама. Друго важно запажање које се односи на улогу апоптотских холангиоцита у патогенези PBC-а је интензивна продукција проинфламацијских цитокина у макрофагима код особа оболелих од PBC-а који су инкубирани са апоптотским телима из холангиоцита у присуству АМА (64). Битно је да се напомене да су холангиоцити који су коришћени у експериментима узети од два нормална донора, што указује да не постоји фенотип билијарних епителних ћелија специфичан за PBC и то може да буде објашњење за навраћање PBC-а после трансплантације (65).

Имунохистохемијско бојење билијарних канала моноклонским антителима која су усмерена на митохондријске аутоантигене су показала интензивну експресију PDC-E2 на апиклавној (луменској) површини ћелија малих билијарних канала (66; 67). Холангиоцити, као у осталом и ћелије других епитела, имају улогу у транспорту IgA у лумен билијарног дуктуса. IgA специфична за PDC-E2 улазе у холангиоците преко полиимуноглобулинског рецептора и формирају комплекс са PDC-E2, што може да допринесе излагању PDC-E2 на апикалној површини билијарних епителних ћелија. Такође, током транцитозе кроз ћелије које експримирају полиимуноглобулински рецептор, димерични IgA може да иницира активацију каспаза (68). Ниво анти-PDC-E2 IgA антитела у серуму оболелих од PBC је у директној корелацији са нивоом активације каспаза (68).

1.1.7 Имуноски одговор у примарном билијарном холангитису

Механизми билијарне деструкције нису до краја истражени, али специфичност патолошких промена у малим билијарним дуктусима, присуство инфилтрације у портним просторима и експресија молекула II класе MHC на холангиоцитима указује на интензиван имуноски одговор који усмерен на холангиоците. Ови налази указују да је деструкција билијарних ћелија посредована аутореактивним Т лимфоцитима који инфилтришу ткиво јетре (57). CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити могу да се детектују у портном простору особа оболелих од PBC-а (69-71). Осим повећане концентрације аутоантитела специфичних за PDC-E2 у серуму региструје се 100 до 150 пута већим бројем CD4⁺ Т и 10 пута већи број CD8⁺ Т лимфоцита специфичних за антиген у јетри и хилусним лимфним чворовима, него у циркулацији оболелих од PBC-а (72). Две значајне субпопулације CD4⁺Т лимфоцита имају улогу у патогенези PBC-а, а то су Th17 и Treg ћелије (73). Значајно мањи ниво CD4⁺ CD25^{high} лимфоцита је детектован у периферној крви оболелих од PBC и члановима њихове породице, такође FoxP3⁺ Treg ћелије могу да се детектују у лимфоидним инфилтратима у портном простору (74). Th17 ћелије имају проинфламацијску улогу у PBC-у, повећана фреквенца IL-17-позитивних лимфоцита је показана у оштећењу јетре код особа оболелих од PBC-а као и код IL-2R α ^{-/-} мишева који спонтано развијају холангитис (75).

У јетри оболелих од PBC-а постоји грануломатозна инфламација удружена са повећаном продукцијом поликлонских IgM. Културе хуманих холангиоцита експримирају TLR, па је

могућа стимулација ових рецептора липополисахаридом и липотеихоичном киселином које су присутне у билијарном тракту. У овако стимулираним холангиоцитима се активира NF- κ B, па холангиоцити на овај начин учествују директно у оштећењу билијарног тракта (76). У одговору на стимулацију TLR холангиоцити продукују проинфламацијске цитокине IL-6 и TNF- α и хемокине IL-8 и CX3CL1. CX3CL1 је хемоатрактант за ћелије које експримирају CX3CR1, а код оболелих од PBC у портном простору и унутар билијарних епитела оштећених билијарних канала могу да се нађу CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцити који експримирају CX3CR1 (77). У патогенезу PBC су укључене и NKT ћелије. Код оболелих од PBC-а регистрован је повећан број NKT ћелија које препознају антигене у склопу CD1d молекула, а број ових ћелија је већи у јетри него у периферној крви. Повећан број NKT ћелија које препознају антигене у склопу CD1d молекула је показан у јетри dnTGF- β RII мишева који развијају холангитис (78).

1.1.8 Иницијација примарног билијарног холангитиса

Како би се разумели сложени патогенетски механизми у настанку PBC важно је да поменути две чињенице које су критичне за развој болести. Прво, главни аутоантиген је компонента унутрашње митохондријске мембране и да би ћелије имунског система оствариле контакт са епитопима треба да превазиђу три различите мембране (Схема 2).

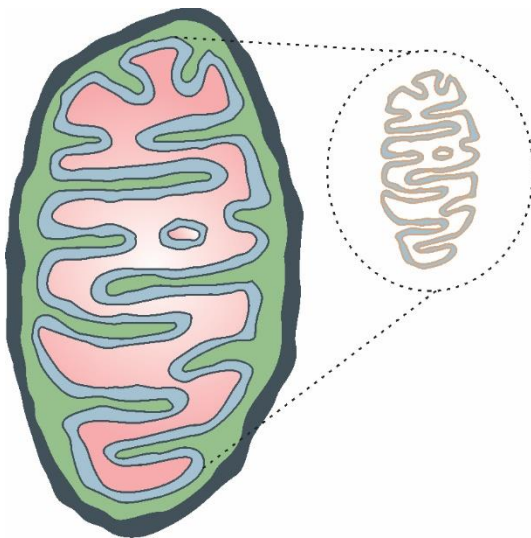


Схема 2. Митохонрија са издвојеном унутрашњом мембраном у склопу које се налази главни аутоантиген у примарном билијарном холангитису

Одговор на ово питање је делимично у јединственој карактеристици апоптозе билијарних епителних ћелија и задржавању имунски активних антигена унутар апоптотских телашаца. Иницијални догађај код генетски предиспонираних особа још увек није јасан. Друго, РВС иницијално захвата ћелије интрахепатичних билијарних дуктуса, док је антиген дистрибуиран у многим ткивима укључујући екстрахепатичке билијарне дуктусе. До сада предложени патогенетски модели указују да је кључни догађај прекид толеранције Т ћелија на епитопе РDC-E2. Продукција антитела специфичних за РDC-E2 није довољна за оштећење билијарних каналића као што се раније мислило (79). Први корак у патогенези болести је губитак ауто толеранције, вероватно услед молекулске мимикрије (80). Према овој теорији бактеријска или инфекција ретровирусима, вероватно покреће и усмерава имунски одговор тако да као последица ове активације настаје апоптоза епителних ћелија. Ендотоксин и други молекулски обрасци бактерија су снажни активатори имунског одговора. Ови производи бактерија се нормално елиминишу преко жучи (81). Липид А се дефосфорилише и инактивира алкалну фосфатазу жучи (82). Липид А је имуногени састојак LPS-а Грам негативних бактерија, и други PAMPs се акумулирају у хепатоцитима и билијарном епителу што доприноси инфламацији малих билијарних канала (83-86). Особе оболеле од РВС-а испољавају јак имунски одговор на LPS (87, 88). Осим бактеријских антигена, истраживана је и улога вируса као покретачких агенаса у РВС-у. Вирусне честице су описане унутар билијарних епителних ћелија код оболелих од РВС-а, а у серуму ових особа су детектована антитела која су усмерена на ретровирус (89, 90). Генетски материјал хуманог β ретровируса је идентификован у лимфним чворовима оболелих од РВС-а (91). У прилог поменутој хипотези говори појава РВС-а међу особама које су мигрирале из подручја са ниском преваленцом РВС-а у подручје са високом преваленцом РВС-а, као и случајеви РВС-а међу особама које нису у сродству а живе у истој кући. Даље, код пацијената лечених такролимусом поновно јављање РВС-а се десило раније и у тежој форми у поређењу са леченима циклоспоринима (92-94). Како било, улога ретровируса у етиологији настанка РВС је још увек дискутабилна (95). У складу са моделом молекулске мимикрије, Џонс је описао алтернативни патогенетски модел где су иницијални окидачи вирусни или бактеријски епитопи који су хомологи са РDC (96). Т лимфоцити специфични за сопствени РDC-E2 избегавају негативну селекцију у тимусу због ниског афинитета њихових Т ћелијских рецептора. Овај претпостављени модел подразумева да стање

активације антиген презентујућих ћелија промењеном ефикасношћу антигенске презентације може да промовише прекид толеранције (97). Као што је поменуто раније, у патофизиологију РВС-а су укључене и друге ћелије урођене имуности. Уобичајени налаз у РВС-у су грануломи, повећан ниво поликлонских IgM, хиперосетљивост на CpG олигодеоксинуклеотиде и повећан број NK ћелија што је све повезано са урођеним имунским одговором. Бактеријски и вирусни епитопи индукују урођен имунски одговор кроз везивање за TLR које експримирају хумани холангиоцити што је показано у културама ових ћелија (97-100). Ови налази указују да је активација урођене имуности обавезна у било ком моделу РВС-а. Други налаз повезује старење и скраћење теломера као јединствену карактеристику оштећења холангиоцитиа у РВС-у. Значајно скраћење теломера у погођеним холангиоцитима у поређењу са нормалним холангиоцитима у обе групе (оболелих од РВС-а и контролне групе) указује на ћелијско старење. Ове промене нису у супротности са хипотезом о ретровирусима јер вируси могу директно да оштете ДНК код подложних особа (101).

1.1.9 Анимални модели РВС

Описано је неколико животињских модела за РВС, а сви се могу поделити у три групе: спонтани развој РВС-*like* болести код генски модификованих мишева; имунизација мишева ксенобиотиком; индукција РВС-а бактеријама.

1.1.9.1 Генски модификовани мишеви

Трансфер лимфоцита периферне крви особа оболелих од РВС у **SCID** мишеве за последицу има настанак лимфоцитних инфилтрата око малих билијарних канала и продукцију анти-PDC-E2 (102).

Конгени **NOD.c3c4** мишеви добијени заменом гена осетљивости на дијабетес на хромозомима 3 и 4 са генима резистенције на дијабетес из В6 и В10 мишева (103) развијају аутоимунски холангитис са појавом АМА у серуму у 50% до 60% случајева. Цистична дилатација погођених билијарних канала, која карактерише овај холангитис, се не региструје код оболелих од РВС; када дилатација унапредује, билијарни епител NOD.c3c4

мишева је подложен ексфолијацији што омогућује инфилтрацију неутрофила и не личи на хистолошке одлике болести код људи.

dnTGF- β RII мишеви дизајнирани тако да појачано експримирају доминантно негативну форму рецептора II за TGF- β под контролом CD4 промотора. Одсуство TGF- β сигнализације узрокује различите имунске абнормалности укључујући колитис. dnTGF- β RII мишеви развијају типичне серолошке и хистолошке карактеристике примарног билијарног холангитиса који се развија код људи (104), што указује на значајну улогу сигналног пута TGF- β у патогенези РВС. Продукција АМА и хистолошки типичне лезије за РВС (лимфоцитна инфилтрација, деструкција интерлобуларних билијарних дуктуса, формирање гранулома у портном простору). У портним инфилтратима су заступљени В лимфоцити, плазмацитоидне дендритске и NK ћелије, макрофаги као и CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити.

Код **IL-2R α -/-** мишева (105), сигнали са рецептора за IL-2 значајни за контролу судбине зрелих Т лимфоцита, су функционално блокирани и ови мишеви развијају запаљенску болест црева и лимфопролиферативну болест. У серуму свих IL-2R α -/- мишева су присутна анти-PDC-E2 антитела, у портном простору постоји изражена лимфоцитна инфилтрација, а интерлобуларни билијарни дуктуси су оштећени. У портним инфилтратима су највише заступљени CD8⁺ Т лимфоцити, а детектују се и CD4⁺ Т и В лимфоцити. Формирање гранулома је редак догађај.. У серуму ових мишева повећана је концентрација инфламацијских цитокина попут TNF- α , IFN- γ , IL-12p40, и IL-6. Коришћењем модела који је добијен укрштањем IL-2R α -/- мишева са CD4 KO и CD8 KO мишевима је показано да CD8⁺ Т лимфоцити учествују у патогенези РВС код IL-2R α -/- мишева (106).

Перутави мишеви имају мутацију гена који кодира транскрипциони фактор Foxp3 неопходан за настанак регулаторних Т лимфоцита, па ови мишеви имају дефицијентну функцију ових лимфоцита. Показано је да 100% ових мишева садржи АМА у серуму (107). Поред тога, јачина лимфоцитне инфилтрације као и спонтани развој опструкције билијарних каналића слични су променама које се виђају код људи оболелих од РВС-а. У перипортним просторима се акумулирају CD4⁺ Т лимфоцити, а цитотоксички CD8⁺ Т лимфоцити се накупљају око жучних канала. У серуму су повећане концентрације АМА (IgG, IgA и IgM) и проинфламацијских цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12p40, IL-18, IL-10, IL-23). Мана овог модела је кратак животни век мишева- само 3-4 недеље.

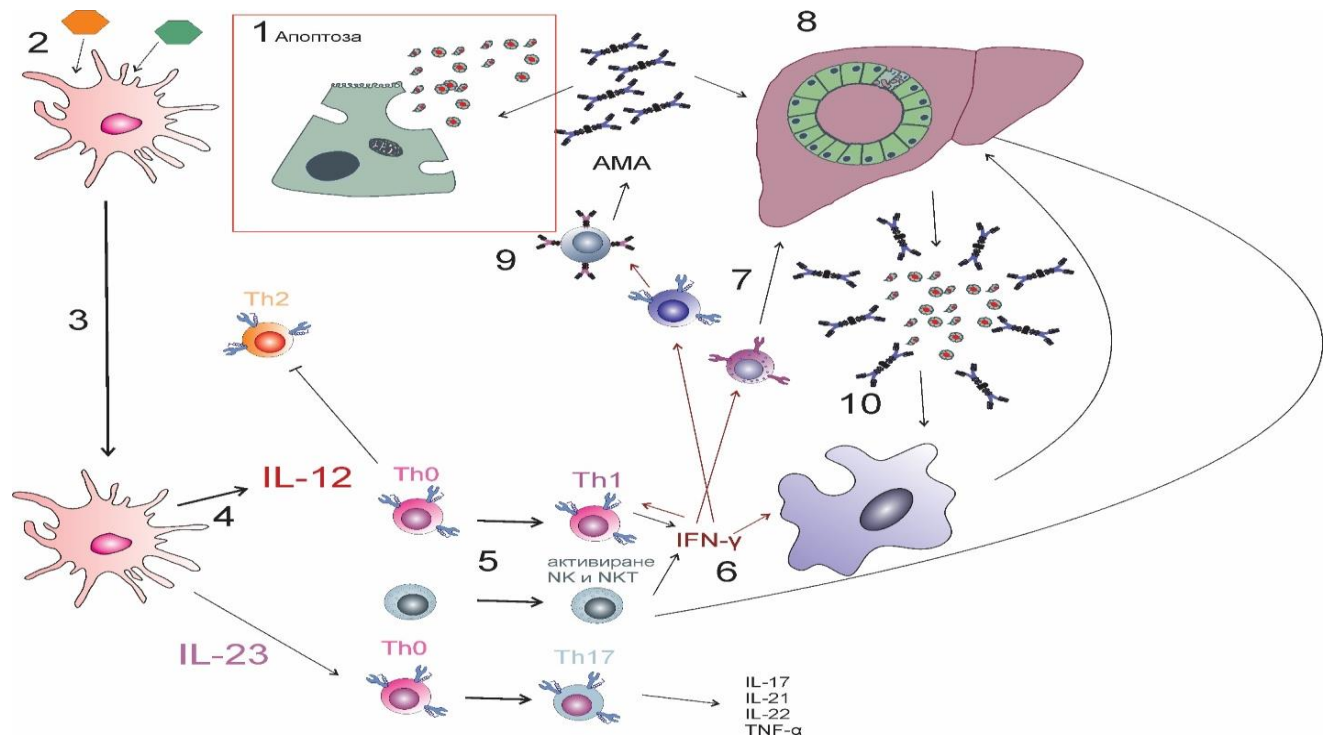
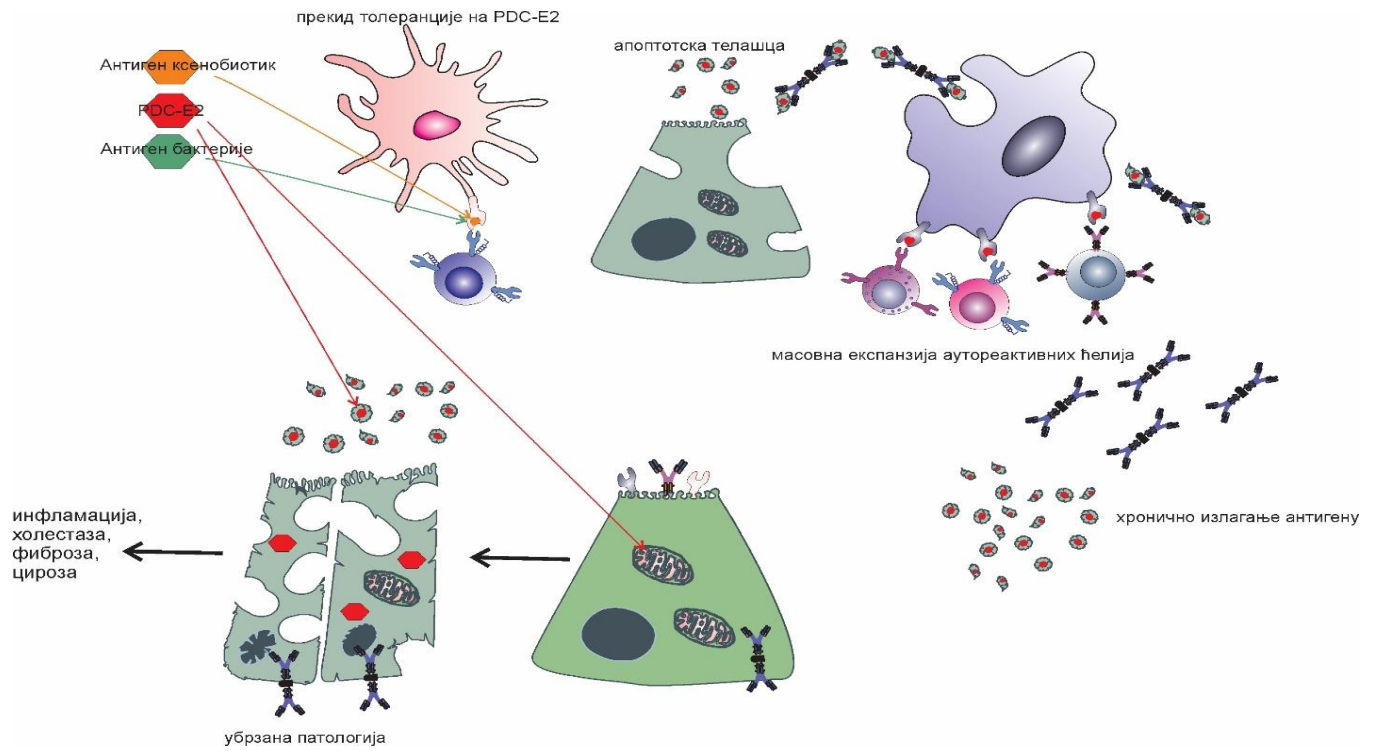


Схема 3 и 4. Кључни догађаји у патогенези примарног билијарног холангитиса

1.1.9.2 PBC индукован имунизацијом ксенобиотицима

E2 субјединице ензима имају заједничку структуру која садржи један N-терминални каталитички домен са два везујућа места за ковалентно везивање кофактора липоичне киселине. Ови липоил везујући домени су главни епитопи које препознају АМА (9) што указује на есенцијалну улогу липоичне киселине у етиологији PBC. Иmunска реактивност АМА је усмерена на конформационе епитопе који су осетљиви на хемијску модификацију што указује да ауто толеранција може да се ослаби модификацијом липоичног домена PDC-E2 ксенобиотицима. Показано је да се модификовани липоични домени PDC-E2 специфично везују антитета присутна у серумима оболелих од PBC (51, 108, 109). Ова опонашајућа једињења се користе у процесу добијања најразличитијих производа: парфема, кармина, појачивача укуса (108). Студије на животињама су указале да животиње које су имунизоване ксенобиотицима изабраним тако да интерреагују са АМА, продукују АМА и развијају оштећење јетре слично оном у PBC-у (110; 111). Показано је да и B6 и NOD.1101 (NOD.B6 Idd10 Idd18r2) мишеви имунизовани 2-октаноичном киселином (2-OA) конјугованом са BSA имају повећане концентрације АМА, TNF- α и IFN γ у серуму, већ четврте недеље после имунизације, грануломе, портну инфламцију и холангитис развијају 12-те недеље, а однос CD4/CD8 у јетри ових мишева је мањи у поређењу са контролним мишевима (52).

Овај модел добро илуструје рани стадијум PBC, а промене перзистирају што га чини атрактивним моделом за испитивање различитих аспеката PBC.

1.1.9.3 Модел PBC индукованог инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Анимални модел примарног билијарног холангитиса изазван бактеријском инфекцијом је описан 2008. године. Показана је болест која веома личи на PBC, а изазвана је инфекцијом C57BL/6, NOD, SJL мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. *Novosphingobium aromaticivorans* је Грам негативна бактерија која припада фамилији *Sphingomonadaceae* (112). Ова екстрацелуларна бактерија је убиквитарна, спада у коменсале који насељују

слузницу дигестивног тракта. Ћелијски зид ове бактерије нема LPS, али садржи α -аномерни гликофинголипиде (α -галактуронилцерамиде [aGalACer]) (113).

Бактерија поседује молекуле који исказују хомологију са PDC-E2. Инфекција мишева бактеријом *N. aromaticivorans* индукује продукцију IgG анти PDC-E2 и развој лезија јетре које подсећају на PBC код људи . Болест може да се пренесе са једног миша на другог само трансфером CD4⁺ и CD8⁺ Т. Оболели од PBC имају антитела специфична за PDC-E2 бактерије *N. aromaticivorans* и имају већи број NKT ћелија као и експресију CD1d молекула на ћелијама урођене имуности (49).

Инваријатне NKT ћелије (iNKT) се налазе у маргиналној зони слезине и обављају процес надзора у синусоидима јетре пошто патогени из крви улазе у периферне лимфне органе. Овде, iNKT ћелије реагују са гликолипидним антигенима попут aGalACer који су презентовани у склопу CD1d молекула и тако започиње урођени и стечени имунски одговор. Јединствени семи-инваријантни Т ћелијски рецептор iNKT ћелија препознаје α -аномерне главне групе у склопу молекулског обрасца гликолипида микроорганизама, попут aGalACer од *Sphingomonas spp.* и α -galactosyldiacylglycerol-a *Borreliae burgdorferi* и функционишу као рецептори за молекулске обрасце препознавања. Пошто их активитају молекулски обрасци микроорганизама iNKT ћелије се сврставају у лимфоците урођене имуности. По активацији ове ћелије брзо луче ефекторске цитокине и хемокине које активирају остале ћелије урођеног и стеченог имунског одговора (114).

N. aromaticivorans, налик бактеријама из исте фамилије, производи aGalACer, који покреће иницијални урођени имунски одговор који карактерише активација iNKT ћелија. Активирани iNKT ћелије потом потенцирају одговор Т и В лимфоцита, што кулминира покретањем продукције антитела која су усмерена на бактеријске PDC-E2 која касније унакрсно реагују са хомологим ензимом митохондрија. У експериментима са мишевима који су имунизовани овалбумином, а iNKT ћелије су стимулисане α -галактозилцерамидом [aGalCer], који је близак aGalACer-у, показано је да iNKT ћелије могу да помогну В лимфоцитима тако да касније плазмцити продукују антиген специфична антитела (115).

Још увек није у потпуности разјашњено да ли помоћ подразумева директну iNKT-В интеракцију или индиректно, утицај iNKT на конвенционалне Т-В интеракције. Резултати једне студије указују да iNKT ћелије могу да помогну у процесу промене изотипа антитела што захтева iNKT-В ћелијску интеракцију, која подразумева представљање aGalACer у

склопу CD1d молекула на истом В лимфоциту који ће и да одговори на ензим микроорганизама. Такође је показано да инфекција бактеријом *N. aromaticivorans* активира конвенционалне пептид реактивне Т лимфоците на iNKT ћелијски зависан начин. Међутим ови конвенционални Т лимфоцити остају активирани и по елиминацији већине бактерија и могу да изазову болест након трансфера у здраве животиње, без додатне инфекције или активације iNKT ћелија.

Стога, рана iNKT ћелијски зависна цитокинска олуја која је покренута контактом са *N. aromaticivorans*-ом је централни догађај у прекиду имунске толеранције који води у развој примарног билијарног холангитиса. Ови налази указују на постојање везе између урођеног имунског одговора који покрећу микроорганизми и хроничног одговора Т и В лимфоцита који је усмерен на мале жучне канале у РВС.

Механизам којим активација iNKT ћелија покреће конвенционални Т ћелијски одговор на аутоантигене није још увек добро дефинисан. Бројне студије су показале да iNKT ћелије које је активирао α GalCer трансактивирају CD4+Т ћелије и CD8+Т ћелије (115). Ова трансактивација захтева реципрочну активацију дендритских ћелија и iNKT ћелија (116).

Критичну улогу у иницијалној активацији и прајмовању аутоантиген специфичних конвенционалних Т ћелија имају поред IL-12 којег продукују активирани дендритске ћелије и костимулатори попут CD40L-CD40 интеракција између дендритских ћелија и аутореактивних Т лимфоцита, као и IFN- γ који секретују активирани iNKT ћелије (117).

В лимфоцити такође представљају МНС-рестриховане антигене Т лимфоцитима. Међутим ова интеракција често изазива нереактивност Т лимфоцита. Зато се сматра да је могуће да конвенционална интеракција Т-В лимфоцита у присуству активираних iNKT ћелија може да изазове активацију аутореактивних Т ћелија (5). Још увек није разјашњено са сигурношћу који је од ових догађаја у оптицају у примарном билијарном холангитису. Налаз да трансфер активираних аутореактивних Т ћелија такође подстиче продукцију аутоантитела специфичних за PDC-E2 указује да конвенционалне Т-В ћелијске интеракције могу да имају улогу у овој болести.

И даље је отворено неколико питања која су од фундаменталног и клиничког значаја за разумевање РВС. Прво питање је који лимфни орган има критичну улогу у активацији iNKT ћелија када је у питању *N. aromaticivorans*? Пошто инфекција бактеријом *N. aromaticivorans* узрокује хипертрофију јетре и спленомегалију (50) а CD1d експресија је појачана у јетри

оболелих од PBC, закључено је да целе бактерије или продукти бактерија могу да активирају iNKT на свим овим местима. Друго и уједно најважније питање је како активирани iNKT ћелије олакшавају прекид толеранције Т и В лимфоцита?

1.2 Структура и класификација галектинских молекула

Протеинску фамилију галектина данас чини 15 чланова карактеристичних по доменима којима везују галактозу. Ови молекули распрострањени у великом броју различитих ћелијских типова налазе се како у многим интрацелуларним одељцима тако и на ћелијској мембрани али се и секретују у екстрацелуларни простор. Први пут описани 1970-их година, као лектини који везују галактозид (118), ови молекули су названи “галаптени” и лектини типа S (119), јер је описано неколико молекула за које је заједничко да садрже неупарене цистеине у домену којим препознају угљене хидрате (енгл. *Carbohydrate recognition domains*, CRDs) и мањак остатака тиола важних за очување интегритета везујућег места (120, 121). Данашње име добили су 1994 године, а од тада креће и права експлозија информација о галектинима у патолошким стањима, нарочито у инфламацији, фибрози и туморима. Галектини су изоловани из бројних врста од кичмењака до сунђера што указује да кључну улогу ових молекула у основним функцијама ћелија (122). Галектини су активни учесници готово свих процеса имунског одговора, од задржавања пре-В лимфоцита у развојним нишама строме костне сржи (123), регулисања јачине сигнализације Т лимфоцитног рецептора током селекције у тимусу (124), регулисања миграције неутрофила, моноцита и дендритских ћелија кроз ендотел и екстраћелијски матрикс (125) (126), контроле секреције цитокина и сигнализације рецептора (127), помагања или блокирања препознавања патогена и причвршћивања за ћелије домаћина (128), до активације или инхибиције ћелијске смрти Т и В лимфоцита (129, 130). Све ове функције, за све типове ћелија, у свим облицима окружења, указују на завидну физиолошку улогу ове молекулске фамилије (131).

У природи постоји 15 различитих молекула галектина, до сада познатих човеку (означени су бројевима од 1 до 15), карактеришу их две кључне особине: способност да се везују за аминокиселинске јединице гликана и конзервирана структура CRD-а. У састав ових домена улази око 130 аминокиселинских остатака (132, 133), а кристалографија је показала

присуство високо конзервираних сендвич навоја, које образују две дугачке антипаралелно постављене β набране плоче. Ова β -сендвич структура прави чеп за који се везују гликан (134-137).

Чланови фамилије подељени су у три типа (Схема 5) (138):

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

Тандемско поновљени (галектини 4, 6, 8, 9 и 12): поседују два различита домена за препознавање угљених хидрата спојених кратким пептидом

Химерски (само галектин-3): поседује само један нелектински домен за препознавање угљених хидрата богат пролином, глицином и тирозином и лоциран на N-терминусу, (131) (139)

ТРИ СТРУКТУРНА ТИПА ГАЛЕКТИНА

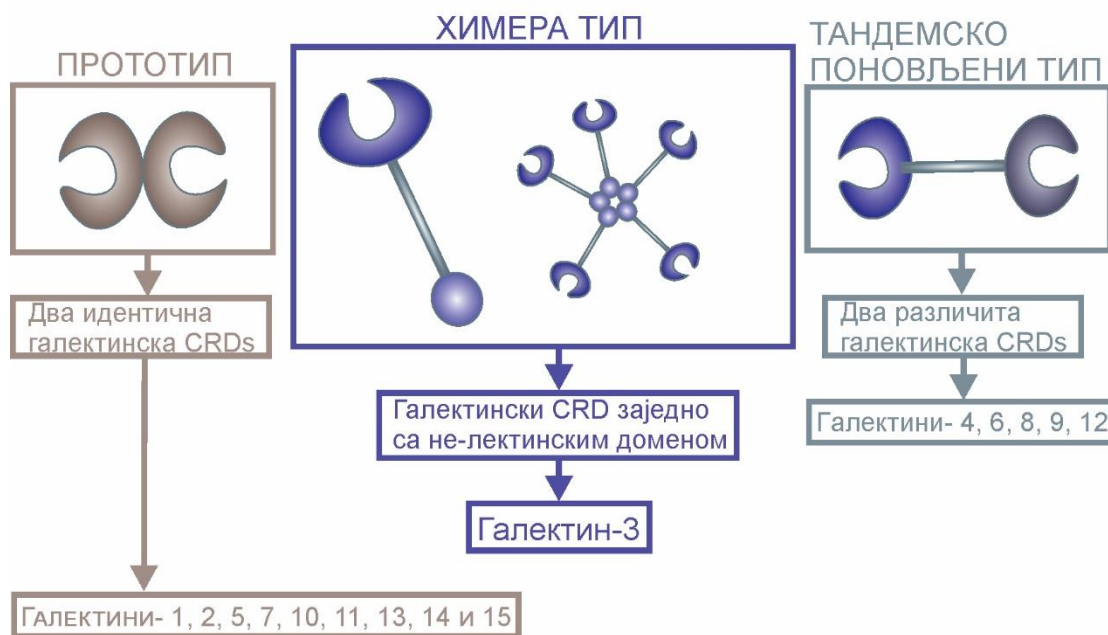


Схема 5. Структурни типови галектина

1.2.1 Експресија и функција галектина

Неки галектини експримирани су у свим типовима ћелија и ткива док су други присутни само у појединим органима или ћелијама, при чему сваки члан фамилије галектина има јединствени образац дистрибуције. Тако су на пример галектин 1 и 3 експримирани

убиквитарно, док је експресија других чланова галектинске фамилије углавном ограничена на одређено ткиво, па је тако галектин 2 експримиран само у дигестивном епителу (140), а галектин 7 у епидермису (141).

Галектини се синтетишу на слободним рибозомима у цитоплазми (142, 143). Синтетисани галектини могу остати у цитоплазми и учествовати у протеинским интеракцијама регулишући унутарћелијске догађаје (144). Па тако галектин 12 везујући се за липидне капљице у адипоцитима регулише липолизу и осетљивост на инсулин (145, 146), а галектин-3 спречава ослобађање цитохрома С из митохондрија и тако инхибише апоптозу (147) али може везати и цитоплазматски β -катенин и регулисати Wnt сигнализацију (148), док цитоплазматски галектин 8 (рецептор опасности) циља оштећене лизозоме и ендозоме и регулише аутофагију (149). Галектини су присутни и у већини ћелија урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, НК ћелије, $\gamma\delta$ T лимфоцити и В-1 лимфоцити), као и у ћелијама стечене имуности (активисани Т и В лимфоцити) (150).

Галектини су присутни и у разним ћелијским одељцима: једро, цитоплазма, ћелијска мембрана док су солубилни облици галектина присутни и у ткивним течностима (151).

Одлика свих галектина је постојање афинитета према галактози, а неки галектини су специфични и за различите олигосахариде који садрже галактозу (152, 153). Приликом везивања галектина за олигосахариде место на молекулу галектина које се везује за њих, доживљава промену у смислу прилагођавања структуре олигосахарида (152, 154). Галектини могу да препознају разне комплексне структуре угљених хидрата насталих процесом елонгације. Галектини најчешће повезују два гликопротеина, али некада и велики број молекула чиме настају мултивалентни гликоконјугати у форми решетке (151). Везивањем галектина за трансмембранске протеине и њиховим унакрсним повезивањем, галектини утичу на започињање читаве каскаде сигналних догађаја у различитим процесима као што су пролиферација, диференцијација и продукција цитокина. Молекули галектина се могу наћи у форми хомо- и хетеро-димера, а поменуто повезивање молекула се остварује преко гликана. Овако повезани, молекули галектина су битни у процесу одржавања хомеостазе имунског система (133, 139). Функција екстрацелуларних галектина је директно зависна од ензима гликозилтрансферазе (155) који се активира у различитим фазама диференцијације и активације ћелије (156). Услед појачане активности гликозилтрансферазе, повећава се експресија гликоконјугата на ћелијској мембрани за које

се потом веже галектин (150). Функција интрацелуларних галектина не зависи од повезивања са угљеним хидратима. Наиме, интрацелуларни галектини се директно вежу за различите протеинске лиганде и регулишу сигналне путеве који су важни у бројним ћелијским процесима (155). Показано је и да галектини везивањем за гликане на површини хелмината омогућавају ефекторске функције ћелија урођене имуности (157). Гликани са N-ацетиллактоаминским и полилактоаминским ланцима $[(Gal\beta 1, 4GlcNAc)_n]$ (као што су ламинин, фибронектин, мембрански протеини лизозома и муцини) имају повећан афинитет за галектине људи, птица и амфибија (158-162). Зависно од расположивости лиганда који су погодни за галектине, и биолошка функција одређених галектина може да варира од места до места. Експресија галектина се мења у процесу ембриогенезе, диференцијације ћелија, као и у различитим како физиолошким тако и патолошким условима (163). Зна се да пилећи галектини остварују учешће у процесу фузије миобласта, док галектин-1 и галектин-3 глодара имају улогу у развоју ното хорде и мишићног ткива, као и централног нервног система (164-167). На важност галектина указује и њихово учешће у регулацији урођене и стечене имуности (168-170).

1.2.2 Структура галектина-3

Галектин-3 (енгл. Galectin-3, Gal-3) (29-35-kD) је најпре идентификован као површински антиген који се под утицајем тиогликолата експримира на ћелијској мембрани макрофага мишева изолованих из перитонеума, и био је означен као Mac-2 (171). Касније су откривени структурно слични лектински молекули: CBP-35 (енгл. 35-kD *Carbohydrate Binding Protein*) (172), ϵ BP (енгл. ϵ -*Binding Protein*) (173), RL-29, лектин од 29-kD (174) HL-29 (175), L-34, лектин од 34-kD (176) и LBP (енгл. *Non-Integrin Laminin Binding Protein*) (177). Анализом генских као и аминокиселинских секвенци наведених молекула утврђено је постојање значајне хомологије међу овим молекулима и сви ови молекули се од 1994. године се "означавају" као Gal-3 (119).

Gal-3 има јединствени химерски тип структуре и састоји се од три различита структурна домена: кратког NH₂ терминалног домена (енгл. *N-terminal domain*, ND) који се састоји од 12 аминокиселина, садржи серин који подлеже фосфорилацији и тако учествује у регулацији спровођења сигнала; понављајућа секвенца која је слична колагену и која

садржи глицин, пролин и тирозин, супстрат је за металопроотеиназе матрикса и обезбеђује стабилну структуру молекулу; и COOH терминалног домена који се састоји од 130 аминокиселина и садржи место за препознавање угљених хидрата (CRD) (119, 178, 179). У везивању олигосахарида заједно са CRD регионом учествује и N-терминални домен и то преко тирозина на позицији 102 и суседних аминокиселина (180). Поред тога N-терминални домен у присуству угљенохидратних лиганата учествује у формирању угљено-хидратних пентамера који унакрсно повезују гликане на површини ћелије, Gal-3 олигомеризује и тако активира сигналне путеве у ћелији који утичу на промену експресије различитих гена што за последицу има промену функције ћелије (181-183). Gal-3 се разграђује и инактивира дејством колагеназа и матрикс металопроотеиназа MMP-2 и MMP-9 (енгл. *Matrix Metalloproteinase*, MMP) које делују на секвенцу галектина-3 сличну колагену- α (184). Афинитет CRD региона за лиганде се повећава кидањем везе између аланина (на позицији 62) и тирозина (на позицији 63), али се у исто време смањује способност међусобног повезивања молекула Gal-3 што онемогућава све биолошке функције које зависе од олигомеризације молекула (184). Секретију Gal-3 омогућава N-терминални домен (185). C-терминални домен има важну улогу и у антиапоптоској активности галектина-3. CRD регион садржи високо конзервиран (Asp-Trp-Gly-Arg) NWGR мотив, структурно хомологан са ВН1 доменом антиапоптоског протеина Bcl-2, са којим остварује интеракције и тако испољава своју антиапоптоску активност (186, 187).

Лиганди за Gal-3 су молекули који садрже поли-N-ацетиллактозаминске секвенце које са Gal-3 остварују интеракције високог афинитета (188, 189). Лиганди за Gal-3 који се налазе екстрацелуларно (на површини ћелије и у екстрацелуларном матриксу) су: фибронектин, интегрини, ламинин, витронектин, еластин и Мас-2 везујући протеин (177, 188, 190), а интрацелуларни лиганди галектина 3 су (налазе се у цитоплазми и једру): Bcl-2, K-Ras и annexin VII (190).

1.2.3 Улога галектина-3 у контроли биолошких процеса

Gal-3 је присутан је у бројним ћелијама као и екстрацелуларно, а ниво експресије Gal-3 зависи од ембрионалног порекла ткива. Експримирају га готово све ћелије имунског система, али и епителне и ендотелне ћелије (190, 191). У ћелији је Gal-3 детектован у једру,

цитоплазми, митохондријама, а присутан је и на површини ћелије где се налази везан за глукопротеине. Једарни Gal-3 игра улогу у регулацији обраде примарног транскрипта РНК (192), док екстрацелуларни Gal-3 учествује и међуцелуларној интеракцији као и интеракцији ћелије са екстрацелуларним матриксом (193, 138). Укључен је у бројне биолошке функције ћелије укључујући ћелијску адхезију, миграцију, преживљавање ћелија и тако учествује у инфламацијском и имунском одговору и у канцерогенези (139). На дистрибуцију Gal-3 утичу тип, статус пролиферације и малигна трансформација ћелије (194-198).

Gal-3 не садржи класичну сигналну секвенцу тако да се не секретује из ћелије класичним путем (199, 200). Иако није познат тачан начин секреције Gal-3 показано је да може да оствари директну интеракцију са липидима мембране и да спонтано прође кроз липидни двослој липозома у било ком правцу, а да тај процес није енергетски зависан (201). Претходно је поменута улога N терминалуса галектина 3 у секрецији, али су описани и егзозоми који садрже Gal-3 који омогућавају доспевање овог молекула у екстрацелуларни простор (202).

1.2.3.1 Улога Gal-3 у регулацији ћелијског раста

Екстрацелуларни Gal-3 стимулише раст фибробласта (203), мезангијалних ћелија (204) и неурона добијених из дорзалних ганглија (205). Такође *in vitro* Gal-3 стимулише формирање капиларних цеви од ендотелних ћелија хуманих умбиликалних вена и ангиогенезу *in vivo* (206). Интрацелуларни Gal-3 позитивно утиче на раст бројних ћелија: *Jurkat* Т лимфоцита (186), ћелија хуманог карцинома дојке (207, 208), пролиферацију Т лимфоцита индуковану митогенима (209) и контакт независни раст ћелија хуманог папиларног карцинома тироиде (210). Gal-3 може да буде и негативни регулатор ћелијског раста. Егзогени Gal-3 инхибира раст *Madin-Darby* ћелија бубрега пса (MDCK), али овај ефекат изостаје на мутантној ћелијској линији у којој је поремећена синтеза гликана услед чега недостају површински лиганди за Gal-3 (211). Gal-3 такође инхибира пролиферацију ћелије костне сржи стимулираних рекомбинантним GM-CSF-ом (212), успорава пролиферацију ћелијске линије карцинома простате LNCaP *in vitro* и успорава раст тумора код *nude* мишева (213). Показано је да Gal-3 интерреагује са транскрипционим фактором тироиде TTF-1 и тако га активира

(214). На сличан начин везивањем Gal-3 за протеин K-Ras активирају се Raf-1/MEK/ERK киназе што подстиче пролиферацију ћелија (215). Gal-3 такође стабилизује везивање транскрипционих фактора CREB и Sp1 за промотерски регион гена за циклин D₁ и тиме појачава његову експресију (216), а везујући се за β -catenin модулише сигнални пут Wnt (217).

1.2.3.2 Регулација апоптозе

Коришћењем метода трансфекције и утишавања експресије гена, показано је Gal-3 испољава антиапоптоски ефекат у бројним ћелијама (129, 218). Механизам антиапоптотске улоге Gal-3 није у потпуности јасан. Gal-3 се нагомилава у митохондријама ћелија изложених апоптоским стимулусима и сматра се да ту остварује своју улогу (147). Нагомилавање Gal-3 у митохондријама зависи од *supexin*-а па се претпоставља се да су расположивост и функционалност овог протеина важан ограничавајући фактор за антиапоптоску активност галектина-3 (147). С обзиром да садржи део хомологан антиапоптоском протеину Bcl-2 са којим *in vitro* остварује интеракцију (186) могуће је да је ова интеракција у митохондријама кључна за антиапоптоски ефекат галектина-3. Да би остварио антиапоптоску функцију неопходна је фосфорилација галектина-3 (219), а како је показано да галектин-3 транслокацијом пролази перинуклеарну мембрану (147) могуће је да је укључен у интрацелуларне механизме контроле апоптозе. Важно је напоменути да екстрацелуларни Gal-3 подстиче апоптозу (190).

Важну улогу Gal-3 игра и у процесу фагоцитозе и уклањања апоптотских тела у макрофагима *in vivo* (220) што указује на улогу овог молекула у имунским процесима ремоделовања ткива у којима апоптоза игра важну улогу.

1.2.3.3 Регулација ћелијског циклуса

Експресија галектина-3 зависи од ћелијског циклуса и усходно је регулисана у ћелијама које пролиферишу, првенствено у једру (194). Gal-3 модулише ћелијски циклус регулацијом транскрипције гена (216). Ћелије којима је индукована прекомерна експресија галектина-3 трансфекцијом, одговарају на губитак ћелијске адхезије уласком у G1 фазу ћелијског

циклуса без ћелијске смрти (221). Овај ефекат је повезан са нисходном регулацијом нивоа циклина Е и циклина А (киназе које су повезане са овим циклинима се активирају крајем G1 и у S фази ћелијског циклуса) под утицајем галектина-3. Показано је да галектин-3 усходно регулише нивое инхибиторних протеина (p21 и p27) за ове циклине. Штавише, ретинобластом (Rb) протеин постаје хипофосфорилисан када ћелије које прекомерно експримирају галектин-3 изгубе контакт са околином. Ове ћелије не могу да уђу у S фазу, пошто је Rb у хиперфосфориланом стању у S, G2 и у већем делу M фазе. Слично, експресија галектина-3 у BT549 ћелијама мења одговор на регулаторе ћелијског циклуса, као што је генистеин. Генистеин индукује експресију p21 у BT549 ћелијама које експримирају галектин-3, али не у контролним BT549 ћелијама (216), односно генистеин ефикасно индукује апоптозу без видљивог прекида ћелијског циклуса у BT549 ћелијама, док се у BT549 ћелијама којима је трансфекцијом индукована експресија галектина-3 уочава само застој ћелијског циклуса у G2/M фази без индукције апоптозе (216).

1.2.3.4 Улога и значај галектина-3 у регулацији инфламацијског и имунског одговора

Последњих десетак година је интензивном проучавана регулаторна улога галектина-3 у контроли имунских процеса и инфламације (222). Gal-3 регулише кључне процесе у имунском/инфламацијском имунском одговору: формирање имунске синапсе, организацију и репарацију ткива, апоптозу, активацију и миграцију ћелија.

1.2.3.5 Улога Gal-3 у атхезији и хемотакси

Екстрацелуларни Gal-3 је присутан на површини ћелије (везан за глукоконјугате ћелијске мембране) или у телесним течностима (у солубилном облику) (223-229). Gal-3 се везује за $\alpha 1\beta 1$ интегрин (220) и тако утиче на ћелијску атхезију. Рекомбинантни галектин-3 промовише атхезију хуманих неутрофила за ламинин (230) и ендотелне ћелије (231). Везујући се за угљено-хидратне молекуле на ћелијама или екстрацелуларном матриксу Gal-3 има улогу моста између ћелије и екстрацелуларног матрикса, та интеракција активира ћелију што за резултат има појачану атхезију (190). Такође Gal-3 модулише експресију интегрин, стимулише ендоцитозу $\beta 1$ интегрин (232, 233). Укључен је и у атхезију

лимфоцита који експримирају L селектин и дендритских ћелија (234). Показано је *in vitro* да рекомбинантни Gal-3 инхибира интеракцију тимоцита са микроокружењем и тако подстиче ослобађање тимоцита од ћелија дадиља тимуса и излазак тимоцита из тимуса на периферију (235).

Gal-3 делује и као хемотактички молекул, стимулише миграцију моноцитна, макрофага и алвеоларних макрофага *in vitro* и *in vivo* и подстиче њихову миграцију кроз ендотел (181). Ову функцију галектин-3 остварује везивањем за N и C домене рецептора који је удружен за G протеином, што је праћено инфлуksom јона калцијума у ћелију међутим, специфичан рецептор одговоран за описане ефекте још увек није откривен.

1.2.3.6 Утицај Gal-3 на функције ћелија имунског система

Gal-3 је експримиран у многим ћелијама имунског система. Експримиран је конститутивно у моноцитима, макрофагима, дендритских ћелијама, мастоцитима, неутрофилима, еозинофилима, док га T и B лимфоцити експримирају тек након активације (236), мада конститутивну експресију Gal-3 показују регулаторни T лимфоцити и CD4⁺ меморијски T лимфоцити (237). Gal-3 утиче на диференцијацију и пролиферацију разних ћелија имунског система. Индукује апоптозу у T лимфоцитима и неутрофила, активира различите ћелије лимфогеног и мијелогеног порекла: мастоците, неутрофиле, моноците и T лимфоците што резултује ослобађањем медијатора запаљења, супероксидних анјона и цитокина (150, 238). Галектин-3 супримира мијелоидне ћелије инхибицијом продукције IL-5 у хуманим еозинофилима (239), а интеракцијом са TCR комплексом T лимфоцита негативно регулише трансдукцију сигнала са TCR-а (240). Gal-3 у лимфном ткиву регулише организацију ниша B220⁺ и CD138⁺ ћелија (241) и инхибира диференцијацију у плазмоците *in vitro* (242) и *in vivo* у костној сржи, мезентеричним лимфним чворовима и слезини (241) (243). Поред тога Gal-3 има антитпоптотску улогу у неоплазмама B лимфоцита (244) и одржавању енергије B лимфоцита (245). Перитонеални макрофаги Gal-3 дефицијентних мишева су у поређењу са макрофагима *wild-type* мишева осетљивији на апоптозу индуковану помоћу липополисахарида и IFN- γ . Галектин-3 подстиче фагоцитозу која је стимулисана активацијом Fc γ рецептора (246), као и одговор мастоцита на стимулацију Fc ϵ рецептора (247). Такође, Gal-3 активира фагоците и појачава им фагоцитну и микробицидну

способност, делујући и као рецептор и опсонин који препознаје молекулске обрасце оштећених ћелија (DAMP) и микроорганизама (PAMP) (248-252). Експресија галектина-3 у дендритским ћелијама утиче на поларизацију имунског одговора (253-257).

Коришћење Gal-3 дефицијентних мишева је омогућило детаљније проучавање имуномодулаторних ефеката галектина-3. Одсуство Gal-3 појачава и Th1 али и Th2 имунски одговор у зависности од експерименталног модела (258). Прецизни механизми којима Gal-3 утиче на развој и прогресију аутоимунских болести нису разјашњени, али је јасно да у регулацији аутоимунског процеса може да испољи двојаку улогу.

1.2.4 Експресија галектина-3 у јетри

Експресија Gal-3 у хепатоцитима и холангиоцитима здравих јетри је немерљива (259). Међутим, у различитим инфламацијским и малигним болестима јетре се значајно повећава његова експресија у хепатоцитима (260-263). Такође, показана је значајна експресија галектина-3 у 93% узорака холангиокарцинома, при чему је експресија интензивнија у боље диферентованим туморима (259, 264). Инхибиција експресије галектина-3 у једру подстиче апоптозу и сензитивност на хемиотерапију малигнух ћелија холангиокарцинома (261). Скорије је показана и повећана експресија Gal-3 је у макрофагима јетре оболелих од РВС (265)

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса и то у два експериментална модела:

- ❖ РВС изазваном имунизацијом ксенобиотицом
- ❖ РВС изазваном бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

У складу са основним циљем постављени су следећи конкретни задаци:

- Утврдити утицај галектина-3 на развој РВС, а на основу хистолошког скорa, биохемијских и серолошких параметара, у два разлиита експериментална модела болести индуковане:
било имунизацијом C57BL/6 мишева ксенобиотицом, 20A-BSA;
било инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.
- Испитати утицај галектина-3 на састав мононуклеарних инфилтрата као и фенотипске карактеристике лимфоцита у ткиву јетре мишева имунизованих ксенобиотицом.
- Испитати утицај галектина-3 на цитокински профил у моделу РВС индукованог ксенобиотицом.
- Испитати експресију галектина-3 у холангиоцитима мишева са РВС индукованим ксенобиотицом.
- Испитати утицај галектина-3 на осетљивост холангиоцита на проапототске стимулусе.
- Анализирати утицај галектина-3 на процентуалну заступљеност и фенотипске карактеристике дендритских, НК и НКТ ћелија у инфилтратима јетре мишева којима је болест изазвана бактеријском инфекцијом.
- Анализирати утицај галектина-3 на процентуалну заступљеност и фенотипске карактеристике лимфоцита у инфилтратима јетре мишева којима је болест изазвана бактеријском инфекцијом.
- Испитати утицај галектина-3 на стимулацију дендритских и НК ћелија бактеријом *in vitro*

- Испитати утицај галекина-3 на експресију компоненти инфламазома у мијелоидним ћелијама јетре и слезине након индукције РВС бактеријом.
- Испитати да ли примена Gal-3 инхибитора може да ублажи испољавање болести у моделу РВС изазваном бактеријском инфекцијом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Лабораторијске животиње

Ова студија изведена је на женкама чистог соја C57BL/6 мишева (енгл. *Wild Type*, WT) и на женкама истог соја мишева који имају циљану делецију гена за галектин-3 (*Gal-3 knock-out* [KO] или Gal-3-/- C57BL/6), старим 8 недеља. Gal-3 KO мишеви набављени су из одгајалишта за мишеве универзитета Калифорније захваљујући проф. др Hsu-у (*Daniel K. Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA*). Сви мишеви који су коришћени су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Све процедуре које су рађене на мишевима одобрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу и спроведене су у сагласности са свим међународним смерницама о третирању лабораторијских животиња

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

Методологија стварања *knock-out* мишева се заснива на замени само једног дела или комплетног циљаног (нормалног) гена нефункционалним (мутираним) геном помоћу хомологе рекомбинације (266). У току хомологе рекомбинације дешава се замена гена између пара хомологих секвенци два молекула ДНК које имају сличне или идентичне нуклеотиде (267). Оваквом заменом оригиналног гена неактивним геном се елиминише или "искључује" функција постојећег гена (266).

Следећи корак у технологији добијања *knock-out* мишева је селекција оних ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација. Пре трансфекције у ембрионалне матичне ћелије, фрагмент ДНК са мутираним геном (или фрагмент ДНК са "искљученим" геном) најпре се угради у циљани вектор који садржи и два додатна гена којим се контролише рекомбинација: ген за резистенцију на неомицин (Нео ген) и ген за вирусну тимидин киназу

(ТК ген) (268, 269). Познато је да се Neo ген увек уграђује у геном ћелије, док се ТК ген губи само у оној ситуацији када се десила хомолога рекомбинација. Овај вектор убацује се у културу ћелија чији медијум садржи неомицин, као и ganciklovir или FIAU (енгл. 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil) који се под утицајем тимидин киназе метаболишу у токсични продукт. Уколико је жељени клонирани ген насумице интегрисан у ћелију, оваква ћелија биће резистентна на неомицин, али ће бити уништена помоћу ganciklovir-а или FIAU. Међутим, оне ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација биће резистентне и на неомицин и на ganciklovir или FIAU (268, 269). Показано је да мишији ген за галектин-3 садржи шест егзона, при чему егзон 2 и кодирају аминокиселински терминални домен молекула галектина-3, док егзони од 4 до 6 кодирају карбокси-терминални домен којим препознаје угљенохидрате (270). У лабораторији проф. др Hsu-а у циљу добијања Gal-3^{-/-} мишева направљен је прекид гена за галектин-3 на нивоу ембрионалних матичних ћелија (271). При томе је коришћен вектор који је конструисан тако да садржи фрагмент клониране ДНК за галектин-3, а стратегија за добијање Gal-3^{-/-} мишева се заснивала на прекиду оног генског региона који кодира домен за препознавање угљенохидрата. Другим речима, кратак сегмент (од 0.5 кило база) кога чине интрон-4 и егзон-5 је замењен геном за резистенцију на неомицин. Сегмент од егзона-4 до егзона-5 мишијег гена за галектин-3 је уграђен у рMC1Neo Poly(A) вектор (Stratagene, La Jolla, CA) и то на горњем крају у близини промотера за тимидин киназу-Neo касете. Други сегмент од егзона-5 до егзона-6 је уграђен низводно од Neo касете, док је у вектору сегмент на споју интрона-4 и егзона-5 прекинут Neo геном. Циљани вектор је уграђен у мишије матичне ћелије, D3, а затим су трансфектоване ћелије селектоване уз помоћ G418, док је хомолога рекомбинација у G418-резистентним ћелијама детектована помоћу две технике: PCR (енгл. Polymerase Chain Reaction) коришћењем прајмера специфичних за Neo ген, као и Southern- блот хибридизација. Скринингом 894 клонова ембрионалних матичних ћелија идентификована су само два клона 4A2 и 9A4 у којима је детектована хомолога рекомбинација помоћу пробе 4 (271).

Један клон ембрионалних матичних ћелија у коме се одиграла хомолога рекомбинација је најпре пропагиран а онда су овакве ћелије убризгане у 3,5 дана старе бластоцисте C57BL/6 мишева, а затим су овакве бластоцисте имплантиране у лажно гравидне CD1 женке (сурогат мајке). На тај начин су прво добијени химерични мишеви, а затим укрштањем химеричних

мужјака са C57BL/6 женкама најпре су добијени хетерозиготни knock-out мишеви (Gal-3 -/+ мишеви). Инбредним укрштањем оваквих хетерозиготних мишева након девет генерација добијени су хомозиготни knock-out мишеви који су генски дефицијентни у експресији молекула галектина-3 (Gal-3-/- мишеви) (271).

Код Gal-3 -/- мишева добијених на овакав начин изоловани су различити органи (надбубрежна жлезда, мозак, срце, јетра, плућа, лимфни чворови, слезина, тимус...) у којима хистолошком анализом нису уочене било какве промене. Такође није детектована разлика у броју ћелија крви између Gal- -/- и Gal-3+/+ мишева. Уз то, анализирани су и субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини и лимфним чворовима, и показано је да је укупан број лимфоцита као и однос CD4+/CD8+ ћелија приближно исти и код Gal-3 -/- и код Gal-3 +/+ мишева (271).

3.2. Индукција примарног билијарног холангитиса и детекција аутоантитела

Примарна билијарна цироза изазвана је имунизацијом **ксенобиотицом** (2-октиноичном киселином коњугованом са серумским албумином говеда) набављеним захваљујући проф. др *Gershwin*-у (*Eric M. Gershwin, Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California, Davis, School of Medicine, California, USA*). Женке мишева C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3 KO (n=10 у свакој групи), старих 8 недеља, имунизоване су микстуром конјугата 2-октиноичне киселине и серумског албумина говеда 2OA-BSA 100µg/25µl интраперитонеално у комплетном *Freund*-овом адјувансу (*CFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) који садржи 10 mg/ml Микобактеријума туберкулозе соја H37Ra и након тога на сваке 2 недеље даване су понављане дозе микстуре 2OA-BSA сада у некомплетном *Freund*-овом адјувансу (*IFA, Sigma-Aldrich*) (272). Као контроле коришћени су нетретирани мишеви.

У моделу болести који се индукује бактеријском инфекцијом женке C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3 KO мишева, старе 8 недеља, су интравенски примале $5 \cdot 10^7$ PFU (*Plaque-Forming Unit*) бактерије *Novosphingobium aromaticivorans* нултог и 15. дана експеримента.

Крв за анализе је сакупљана из фацијалне вене друге, четврте и 8 недеље након почетне имунизације/инфекције. Антитела на митохондријални аутоантиген PDC-E2 детектована су ELISA тестом како би се утврдило присуство и концентрација антитела усмерених на PDC-E2 у серуму. Коришћене су ELISA плоче са 96 бунара, у сваки од њих сипано је 10µg/ml чистог рекомбинантног PDC-E2 у 100µl карбонатног пуфера (pH 9.6), и остављено преко ноћи на 4°C, потом опрано са TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) и блокирано са 5% обраним млеком у TBS-у на 30 минута. У сваки бунар додато је 100µl дилутираног серума (1:250) и инкубирано 2 сата на собној температури. Након прања додавана је HRP (*horseradish peroxidase*) коњугована са анти-мишијим имуноглобулинима (A+M+G)(H+L) (1:3000)(*Invitrogen ZyMax™*). Плоче су инкубирани један сат на собној температури и поново пране, а развијач боје са 100µl супстрата TMB пероксидазе (*BD Biosciences, San Jose, CA*) додан је у сваки бунар. Оптичка густина (OD) читана је на 450nm уређајем *Zenith multimode detector 3100*. Претходно калибрирани позитивни и негативни стандарди укључени су у сваки тест.

3.3. Апликација Gal-3INH

Gal-3INH је, у складу са упутством, најпре растворен у 40% ди-метил сулфоксиду (енгл. *Dimethyl sulfoxide, DMSO*) чиме је направљен шток 4mM. DMSO је претходно дилутиран у NaCl-у. Пре апликавања у експерименталне животиње, шток смо NaCl-ом дилутирали 4 пута чиме смо добили 1mM шток. Појединачна доза коју смо користили у експериментима је била 300µg Gal-3INH (односно 462µL из 1mM штока). Gal-3^{+/+} мишеве су груписани случајним узорковањем у две групе и једна група мишева је примала интраперитонеално 300µg Gal-3INH од првог дана експеримента, три пута недељно, у трајању од четири недеље.

3.4. Хистолошка анализа ткива јетре

Мишеви су жртвовани 8 недеља после имунизације ксенобиотиком и четири, 8 и 24 недеље после инфекције бактеријом, а за хистопатолошку анализу коришћена су ткива јетре калупљена у формалину. За процену инфламацијске инфилтрације коришћени су исечци

бојени техником хематоксили-еозин, а за процену фиброзе јетре коришћено је бојење техником *Sirius red*. Након жртвовања животиња исечци ткива јетре фиксирани су 4% параформалдехидом на собној температури два дана и након тога уграђени у парафин. Блокови парафина донесени су на собну температуру где су сечени на ротирајућем микротому (*Leica RM2135*). 24 серијска 4-µm пресека потапана су у воду на 40°C, а потом стављени на стаклене микроскопске плочице.

3.4.1. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци претходно загрејани у термостату на +56°C у трајању од 45 минута су потапани у ксилол, а затим је урађен поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Након серије испирања препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а затим су испрани дестилованом а потом и текућом водом 5 минута. Након бојења препарата еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у трајању од два минута, урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата. За процес дехидратације су коришћене растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након дехидратације препарати су просветљени потапањем један минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом два пута по један минут само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Сlike хистолошких препарата добијене су на светлосном микроскопу (*Olympus BX51*) са дигиталним фотоапаратом.

3.4.2. Бојење хистолошких препарата на фиброзу (*Sirius Red*)

Третирани и рехидрирани исечци бојени су један сат са засићеним пикринским киселинама које садрже 0,1% *Sirius Red F3BA* (*Sigma-Aldrich, St. Louis*). Радни раствор *Sirius red* за бојењедобијен је мешањем 0,5 g боје *Sirius red* (*Direct Red 80, Sigma Aldrich*) и 500ml

засићеног раствора пикричне киселине (*Picric acid Solution, Sigma Aldrich*). Исечци су испирани два пута по 5 минута у 0,005% воденом раствору глацијалне сирћетне киселине (*Centrohem, 51 Србија*), а онда дехидрирани у 100% етанолу три пута, а онда просветљени 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Квантификација фиброзе у мишијим исечцима јетре обојених *Sirius Red*-ом на увећању од 10 пута у 10 поља одређивана је коришћењем софтвера ImageJ (*NIHh, Bethesda, MD*).

3.5. Процена хистолошког скорa

За сваки исечак су оцењивани следећи параметри: перипортна инфламација, инфилтрација билијарних канала без оштећења, инфилтрација са оштећењем билијарних канала и супкапсуларни инфилтрати. Сви поменуте патолошке промене су на основу хистолошке слике индексирани са: **0-нема; 1-блага; 2-умерена; 3-јака; 4-веома јака** патологија. **Хистолошки скор I** је израчунат као средња вредност сваког оцењеног индекса. Такође су анализирани и грануломи и фиброза и бодовани на следећи наин: **0-нема; 1-блага; 2-умерена; 3-јака**. **Хистолошки скор II** је израчунат као средња вредност последња два параметра. Хистолошка анализа и бодовање добијени су слепом методом.

3.6. Одређивање концентрације ензима јетре у серуму

Мишеви експерименталних и контролних група су жртвовани цервикалном транслокацијом и узета им је крв из трбушне аорте која је центрифугирана 15 минута на 1200 обртаја. Затим је серум ($V=150 \mu\text{L}$) издвојен за сваког појединачног миша ради одређивања концентрације трансминаза: аспартат трансминазе (AST) и аланин трансминазе (ALT). Концентрације трансминаза су измерене коришћењем специфичних колориметријских китова: *mouse* AST ELISA кита и *mouse* ALT ELISA кита (*Elabscience*).

3.7. Одређивање концентрација цитокина у серуму

Концентрације цитокина (IL-6, IL-13, IL-17 и IL-23, IL-17 и IFN- γ) у серумима мишева одређиване су комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишије цитокине (*Mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-13 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development kit, Mouse IFN- γ DuoSet ELISA*).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000pg/ml за IL-13 и IFN- γ ; 1000pg/ml за IL-6 и IL-17. Од оваквих штокова направљена су растућа серијска разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача.

100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) сипано је у бунарчиће микротитар плоча (енгл. *microtiter plate*- MTP) са 96 бунарчића са равним дном (*Sarstedt*). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у MTP, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања MTP, у све бунарчиће је додавано 100 μ l радне концентрације антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране па је у бунарчиће сипано 100 μ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем MTP-а. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. *Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B*, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50 μ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution: 2N H₂SO₄*) и очитана је оптичка густина на таласној дужини 450nm, на *Microplate reader*-у (*Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor, Anthos, Austria*).

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

3.8. Изолација мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија

Сви мишеви којима су изоловане мононуклеарне ћелије из јетре су жртвовани цервикалном дислокацијом. За изолацију мононуклеара из јетре коришћен је метод механичке разградње јетре. Након одстрањивања јетре уклоњана је жучна кеса, а јетра подвргнута перфузији апликовањем 7 mL PBS-а кроз портну вену. Јетра је потом уситњена маказицама и нежно здробљена кроз челичну мрежу (отвора од 200 μ m) коришћењем „полуге” шприца а затим је суспензија притиснута и кроз ћелијско сито (cell strainer BD Pharmingen, USA). Добијени садржај је ресуспендован у 50ml медијума RPMI-1640 (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES и 10% FCS) и центрифугован на 60g један минут на собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енгл. off break setting). Супернатант (45ml), који је садржао интрахепатичне ћелије, је пребациван у нову епрувету и центрифугован на 480g 8 минута на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енгл. high break setting). Добијени талог је ресуспендован у 10ml 37.5% Percoll-а у медијуму HBSS који је садржао 100U јединица хепарина/ml и онда центрифугован на 850g 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге. Овако добијени талог ресуспендован је у 5ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. Er Lysing buffer). Ћелије су потом инкубиране у 5ml lysing раствора у трајању од 5 минута, на леду (на +4°C). Након истека инкубације, додавано је 5ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом чиме је заустављено даље лизирање. Ћелије су затим центрифуговане на 480 g у трајању од 8 минута на 8°C, са активираним опцијом наглог кочења. Коначно, добијени талог ресуспендован је у 1ml PBS који садржи 1% FCS односно 0,1% NaN₃ (тзв пуфер за анализу проточном цитометријом, енгл. FACS buffer) или у 1ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES и 10% FCS).

3.9. Изолација мононуклеара слезине

Појединачне слезине изоловане из мишева су пребачене у епрувете од 50ml које су садржале медијум (RPMI-1640; PAA Laboratories GmbH са додатком 10% FBS-а) са додатком DNA-зе (*Sigma-Aldrich St. Louis, MO United States*) 120IU/ml. Најпре је клипом шприца протиснута слезина кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50ml уз

додавање 5ml медијума (RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH) са додатком 10%-ог FBS-а). Овако раздвојене појединачне ћелије су центрифугиране 5 минута на 1500rpm. Супернатант је одливен, а на ћелијски талог је додато 5 ml *lysing* раствора. У циљу лизирања еритроцита инкубација ћелија у *lysing* раствору је трајала 5 минута, такође на леду. Додавањем 5ml RPMI-1640 (10% FBS) заустављено је даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране, супернатант је одливен а талог ресуспендован у 8ml RPMI-1640 (10% FBS). Да би се избегла контаминација спленоцита хистиоцитима слезине, ћелије се још једном пропуштају кроз ћелијско сито. Добијена суспензија појединачних спленоцита користи се у даљим испитивањима (за стимулацију бактеријама). Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%.

3.10. Проточна цитометрија

3.10.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера.

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација мононуклеарних ћелија лимфног изолованих из јетре примењена су анти-мишја моноклонска антитела специфична за циљане маркере обележена различитим флуоресцентним бојама. На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додавана је одговарајућа количина моноклонских антитела примарно обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама. Испитиване мононуклеарне суспензије су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама.

Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле, коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији буду 1:100. Затим је талог ћелија са антителима краткотрајно вортексован и онда инкубиран у мраку на температури од +4°C у трајању 20 минута. По истеку инкубације, ћелије су "опране" додавањем 1,5ml

хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD*) и центрифуговањем 5 минута на 400g. Потом је супрнатант одливан, а талог ћелија ресуспендован у 350µl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur (BD)*. Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу софтвера FlowJo.

3.10.2. Интрацелуларно бојење цитокина

Бојење интрацелуларних цитокина спровођено је по BD *Cytofix/Cytoperm*TM методи. Како би се детектовале ћелије које продукују цитокине, према подацима из литературе, за стимулацију ћелија се користе различите *in vitro* методе (276; 277; 278; 279; 280; 281; 282; 283; 284; 285), које се углавном свде на употребу различитих поликлонских активатора као што су: конканавалин А (Con-A), фитохемаглутинин, стафилококни ентеротоксин β, липополисахарид (LPS), моноклонска антитела специфична за комплекс TCR/CD3 (са или без антитела на костимулаторне рецепторе, као што је CD28) и естри форбола са калцијум јонофором (енгл. *phorbol esters plus calcium ionophore*). У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma*) и јономицином (енгл. *Ionomycin; Sigma*), који покрећу активност протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C, PKC*) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији претходно активираној физиолошким стимулусима (286). Трајање инкубације од 4 до 6 часова је оптимално за већину цитокина, јер је дужа инкубација удружена са појавом цитотоксичних ефеката поменутих активатора. У току *in vitro* стимулације ћелија користе се инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, BD *GolgiStop*TM (садржи моненсин) и BD *GolgiPlug*TM (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта поменутих инхибиторима резултира акумулацијом већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџијевом комплексу, па је тако повећана могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксични ефекат, па излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, инкубације дуже од 12 часова су токсичне за ћелије.

3.10.2.1 Стимулација ћелија.

Суспензија појединачних моноклелера изолованих из јетре (1×10^6 /ml) припремљена у комплетном медијуму (RPMI 1640) је стимулирана инкубацијом на 37°C ($5\% \text{CO}_2$) у присуству PMA (*Sigma*; 50ng/ml) и јонофора (*Ionomycin, Sigma*; 500ng/ml). У суспензију је додаван и BD GolgyStop™ (0,7μl/ml) који блокира секрецију цитокина и повећава њихову интрацелуларну акумулацију. После 4 сата инкубације ћелије су опране и ресуспендоване у комплетном медијуму, а потом пребачене у пластичне епрувете (*FALCON round-bottom test tubes, BD*) за имунофлуоресцентно бојење.

Даље процедуре су обављане на $+4^\circ\text{C}$.

3.10.2.2. Бојење површинских антигена.

Епитопи површинских маркера могу да се оштете фиксацијом и пермеабилитацијом, па се површинско бојење обавља пре фиксације ћелија. Тако је на 1×10^6 моноклелера ресуспендованих у 50μl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додавана одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене. Ћелије су такође инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела за површинско бојење коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења, у суспензији ћелија буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута на $+4^\circ\text{C}$, у мраку.

3.10.2.3. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране.

Након инкубације са примарно конјугованим антителима за површинске антигене, моноклелери су опрани два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 250μl *Cytofix/CytoPerm™* раствора (BD *Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на $+4^\circ\text{C}$. Затим су ћелије опране два пута у *Perm/Wash™* пуферу (BD *Pharmingen*; 1ml/епрувети; 300G).

3.10.2.4. Бојење интрацелуларних цитокина.

Ћелијски талог је ресуспендован у 50μl *Perm/Wash™* пуфера и додата су примарно конјугована моноклонска антитела специфична за цитокине. Сва антитела коришћена су у

таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута на +4°C, у мраку. Након инкубације, ћелије су опране у *Perm/Wash™* пуферу (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. Gate) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo (Tree Star)* софтвера.

3.11. Имунохистохемија мишијих узорака јетре

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака јетре урађено је коришћењем зечијег специфичног конјугата (*Expose Rb-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) и специфичног мишијег конјугата (*Expose Ms-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*) за бојење цитокератина 7 (СК-7) и Gal-3. Депарафинизовани парафински исечци ткива јетре дебљине 5µm након рехидратације ткива, су најпре кувани 21 минут у 10mM Na-цитрату, а након хлађења интензивно испрани три пута у PBS-у. На ткивне исечке је потом додато 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block*-а са циљем да се инактивишу ендogene пероксидазе и након инкубације 10 минута на собној температури, препарати су два пута опрани у PBS-у. Затим је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block*-а који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS-у. На ткивне исечке су потом додато 150µl примарног антитела, зечијег анти-мишијег Gal-3 (Abcam) и мишијег анти-мишијег СК-7 (Abcam). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Након једносатне инкубације са примарним антителима у влажној комори на собној температури, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у, ткивни исечци су инкубирани 30 минута на собној температури у присуству биотинизованог секундарног антитела. Након инкубације, препарати су опрани три пута по 5 минута у PBS-у и на ткивне исечке је апликована *Streptavidin Peroxidase*-а. Након 10 минута инкубације са пероксидазом на собној температури исечци су испрани три пута по 5 минута у PBS-у и на њих је апликовано је 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20µl DAB Chromagen-а у 1ml DAB супстрат пуфера. Након развијања боје

препарати су испрани три пута у дестилованој води и обојени хематоксилином по Mayer-у два минута, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени воденим медијумом за покривање и покровном лъуспицом. Хистолошки пресеци јетре визуелизовани су и фотографисани је дигиталном камером на светлосном микроскопу (Olympus BX5).

3.12. Изолација НК ћелија позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица

НК ћелије су издвојени из јетре позитивном селекцијом коришћењем кита *Dynal[®] Mouse CD49b isolating kit* (Invitrogen). 10^7 претходно изолованих ћелија из јетре ресуспендовано је у 500 μ l пуфера 1 [PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)]. Затим је додато 25 μ l *FlowCompTM Mouse CD49b* антитела (Invitrogen). По истеку инкубације (15 минута на 2-8°C) уследило је прање ћелија у пуферу 1 (2ml/епрувети; 350 G). Пелет је ресуспендован у 500 μ l пуфера 1 на шта је додато 75 μ l претходно опраних магнетних куглица *m49b Dynabeads* (Invitrogen). Након инкубације (15 минута на 2-4°C уз повремено мешање) ћелије су ресуспендоване у 6ml пуфера, а епрувета са ћелијама постављена је у магнетно поље (Invitrogen) у трајању од два минута. Потом је одливен супернатант, а епрувета извађена из магнетног поља. На ћелије остале у епрувети (позитивно селековане НК ћелије) додат је 1ml пуфера *FlowCompTM Release buffer* (Invitrogen). Након инкубације (30 минута на 20-25°C уз повремено мешање) епрувета са ћелијама постављена је у магнетно поље у трајању од два минута, а затим је супернатант са слободним ћелијама (без магнетних куглица) пребачен у нову епрувету. Овако добијене ћелије су опране у комплетном медијуму (4ml/епрувети; 300 G), ресуспендоване у 500 μ l истог медијума, а затим је одређен њихов број и вијабилност. Добијене НК ћелије су даље коришћене као ефекторске ћелије у МТТ тесту цитотоксичности.

Прање магнетних куглица подразумева да се жељени волумен куглица помеша *ana partes* са пуфером 1, а епрувета са ресуспендованим куглицама остави се у снажном магнету (Invitrogen) један минут. После одливања супернатанта, епрувета се уклања из магнетног поља а пелет ресуспендује у почетном (жељеном) волумену пуфера 1.

3.13. Издвајање дендритских ћелија помоћу магнетних куглица

Дендритске ћелије су издвајане из мононуклеарних ћелијских суспензија слезине методом обогаћивања уз помоћ кита *Dynabeads® Mouse DC Enrichment Kit (Invitrogen)*, тако што је 1×10^7 претходно изолованих ћелија ресуспендовано у 100µl пуфера 1 [PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)]. Овако припремљене ћелије су инкубиране (20 минута на 2-8°C) у 20µl FBS-а са 20µl *Antibody Mix*-а (*Invitrogen*) који садржи различита антитела специфична за Т лимфоците, mIgM+ В лимфоците, NK ћелије, еритроците и већину гранулоцита. По истеку инкубације ћелије су пране у пуферу 1 (2ml по епрувети; 300G) а талог је ресуспендован у 800µl пуфера 1 и у суспензије је додавано по 200µl претходно опраних магнетних куглица *Mouse Depletion Dynabeads (Invitrogen)*. Прање магнетних куглица подразумева да се жељени волумен куглица помеша *ana partes* са пуфером 1, а епрувета са ресуспендованим куглицама остави у снажном магнетном пољу (*Invitrogen*) 1 минут. После одливања супернатанта, епрувета се уклања из магнетног поља а талог ресуспендује у почетном (жељеном) волумену пуфера 1. Ћелије су затим инкубиране 15 минута на 18-25°C уз повремено мешање, а затим ресуспендоване у 6ml пуфера и епрувета са ћелијама постављена у магнетно поље (*Invitrogen*) у трајању од два минута. Тако су у супернатанту остале само негативно селектоване дендритске ћелије, већином CD11c^+ , које су потом опране (4ml/епрувети; 300G), ресуспендоване у 500µl комплетног медијума. На крају је одређен број и вијабилност оваквих ћелија, које су даље коришћене за функционално испитивање.

3.14. Продукција цитокина и експресија маркера активације након *in vitro* стимулације

Дендритске ћелије изоловане описаном методом магнетне сепарације, из сваког миша појединачно, су ресуспендоване у комплетном медијуму до густине $10^6/\text{ml}$, а NK ћелије изоловане из јетри два миша су ресуспендоване до густине $10^5/\text{ml}$ и по 100µl суспензије је сипано у микротитар плоче са равним дном (100000 дендритских, односно 10000 NK ћелија по бунарчету). Тако припремљене ћелије су стимулисане TLR4 агонистом

(липополисахарид, LPS) финалној концентрацији 1µg/ml и посебно бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* у односу 1:10 ресуспендованом у комплетном медијуму у трајању од 24 сата. Сваки узорак је рађен у трипликату. По истеку инкубације плоче су центрифугиране 5 минута на 400G и покупљен је супернатант и издвојене ћелије које су анализирани на проточном цитометру. Одређиван је проценат ћелија које експримирају маркере активације и про- и анти- инфламацијске цитокине.

3.15. Изолација холангиоцита и тестови апоптозе

Како би изоловали интрахепатичне холангиоците, потребна је перфузија јетре у два корака. Јетра је након тога изолована, а хепатоцити су селективно уклоњени благим притиском кроз инцизију јетре. Холангиоцити су затим суспендовани у *DMEM* медијуму са додатком 10% *FBS*, 5% *NuSerum IV (BD)*, 0.5mg/ml *insulin-transferrin-sodium selenite (Gibco)*, 1 mmol/l аскорбинске киселине 2-фосфата, 10K7 М дексаметазона (*Sigma-Aldrich Corp.*), 10 ng/ml *EGF (R&D, Minneapolis, MN, USA)*, 10ng/ml *HGF (R&D, Minneapolis, MN, USA)*. Након 10 дана ћелије су изложене јономицину 1µg/ml 22 сата и проценат апоптотских ћелија одређиван је проточном цитометријом користећи анексин (*Annexin V FITC Detection Kit[BD Pharmingen, San Jose, CA, USA]*).

3.16. Анализа експресија гена у ткиву јетре методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену

3.16.1. Изолација РНК из ткива јетре миша

Изолација укупне РНК из ткива јетре миша урађена је употребом тризол реагенса. Део изолованог ткива јетре миша (100mg) је најпре исецкан маказицама, а потом потпуно механички хомогенизован у 1ml тризола (*TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) помоћу ручног хомогенизатора. Хомогенат је потом пребачен у нове епрувете величине 1,5ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубиран 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. У следећем кораку

на супернатант је додато 100µl бромхлорпропана (*1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich*), узорци су вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања је горњи провидни слој у којем се налази РНК пребачен у нове епрувете у које је додато 500µl расхлађеног изопропил алкохола чиме је РНК преципитирана. Узорци су благо промешани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 8 минута на 12000rpm на +4°C. Талог из епрувета је опран два пута са по 1 ml расхлађеног 70% етил алкохола и потом сушен 2 до 5 минута на собној температури. Талог је потом растворен у води која не садржи нуклеазе (*Nuclease free water, Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност RNA одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280 nm коришћењем апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

3.16.2. Реверзна транскрипција

Процес реверзне транскрипције урађен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)*, према упутству произвођача. У епрувете које су садржале РНК додат је мастер микс, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C, потом је реакција заустављена грејањем 5 минута на 85°C и узорци су потом охлађени на +4°C (*Mastercycler® ep realplex, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Овако добијена cDNA коришћена је за квантификацију експресије гена.

3.16.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) у реалном времену (*Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*) мерена је експресија одређених гена од интереса. Реакција qRT-PCR је урађена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) у 96-коморним плочама (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Волумен од 20µl реакционе смеше по комори, садржао је: 2µl узорка cDNA, 10µl мастер микса (*Power SYBR Green PCR Master Mix(2x), Applied Biosystems*), 2µl смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и „reverse“) и 6µl воде која не садржи нуклеазе. Коришћени су комерцијално доступни прајмери за NLRP3 и ASC (*R&D Systems*,

Minneapolis, MN). Прајмери за β актин (sens 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3' и antisens 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3') су дизајнирани користећи Primer Express® software v2.0. Плоче су потом прелепљене оптичком адхезивном фолијом (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), центрифугиране 1 минут на 3000 rpm и смештене у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). Температурни профил реакције qRT-PCR апарат био је: 4 минута 57 на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Есеј је рађен у дупликату за сваки узорак. Просечне Ct вредности контролних трипликата (актин) су одузете од просечних Ct вредности трипликата гена од интереса и на тај начин је добијен Δ Ct, док је релативна експресија гена изражена као $2^{-\Delta Ct}$. Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, која је арбитрарно подешена на 1.

3.17. Детекција галектина у хуманом серуму и хистолошким пресецима јетре.

Концентрације Gal-3 у серуму пацијената са РВС-ом ($n=11$) и здравих контрола ($n=11$) одређене су користећи хумани Gal-3 *Quantikine ELISA kit (R&D)*.

Узорци биопсије хумане јетре добијени су са одељења за патологију, универзитета у Крагујевцу. Колекција узорака бојена је мишијим антихуманим Gal-3 антителима (*Abcam, Cambridge, UK*) и мишијим специфичним конјугатом (*Expose Ms-Specific HRP/DAB Detection IHC Kit; Abcam*), како је раније описано.

3.18. Статистичка анализа

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитивана правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује врсту теста који се користи). Уколико су вредности имале правилну расподелу коришћен је параметарски *Student*-ов t тест и ANOVA тестом где је било потребно, док је у случају неправилне расподеле коришћен непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна

грешка (SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматра се када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Концентрација Gal-3 у серуму и његова експресија у холангиоцитима су повећане код оболелих од РВС

Gal-3 модулише бројне ћелијске функције и показано је да има различите, често потпуно супротне улоге у патогенези многих хроничних инфламацијских болести и тумора (273-277). Познато је да епителне ћелије интрахепатичних билијарних канала конститутивно исказују низак ниво експресије Gal-3, а да се експресија овог молекула у холангиоцитима значајно повећава код оболелих од холангиокарцинома (269, 278). До сада није испитвана улога овог молекула у патогенези примарног билијарног холангитиса.

Да би се испитала евентуална улога Gal-3 у настанку и развоју РВС најпре је анализирана експресија овог молекула у узорцима ткива јетре као и његова концентрација у серуму оболелих и показано је да је средња вредност концентрације Gal-3 у серуму 11 оболелих у различитим хистолошким стадијумима болести статистички значајно већа ($p < 0.05$) у поређењу са средњом вредношћу концентрација у серуму здравих особа сличне старости и пола (Графикон 1). Имунохистохемијска бојења исечака јетре су указала на значајну експресија Gal-3 у цитоплазми и једру холангиоцита оболелих од РВС (Слика 1a). У узорцима ткива јетре оболелих од хепатитиса (изазваних вирусима В и С) се, такође, уочава повећана експресија Gal-3 и то и у једру и у цитоплазми холангиоцита и хепатоцита, али и у екстрацелуларном простору као и око запаљенских инфилтрата (Слика 1b и c). Са друге стране, Gal-3 се не детектује у једрима холангиоцита (постоји блага цитоплазматска експресија) оболелих од склерозирајућег холангитиса (Слика 1d).



Графикон 1. У серуму оболелих од PBC је повећана концентрација Gal-3. Концентрација Gal-3 у серуму оболелих од PBC је одређена ELISA методом. Анализирани су серуми 11 оболелих, без обзира хистолошки стадијум болести, а за контроле су узети серуми здравих особа. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом. * $p < 0.05$.

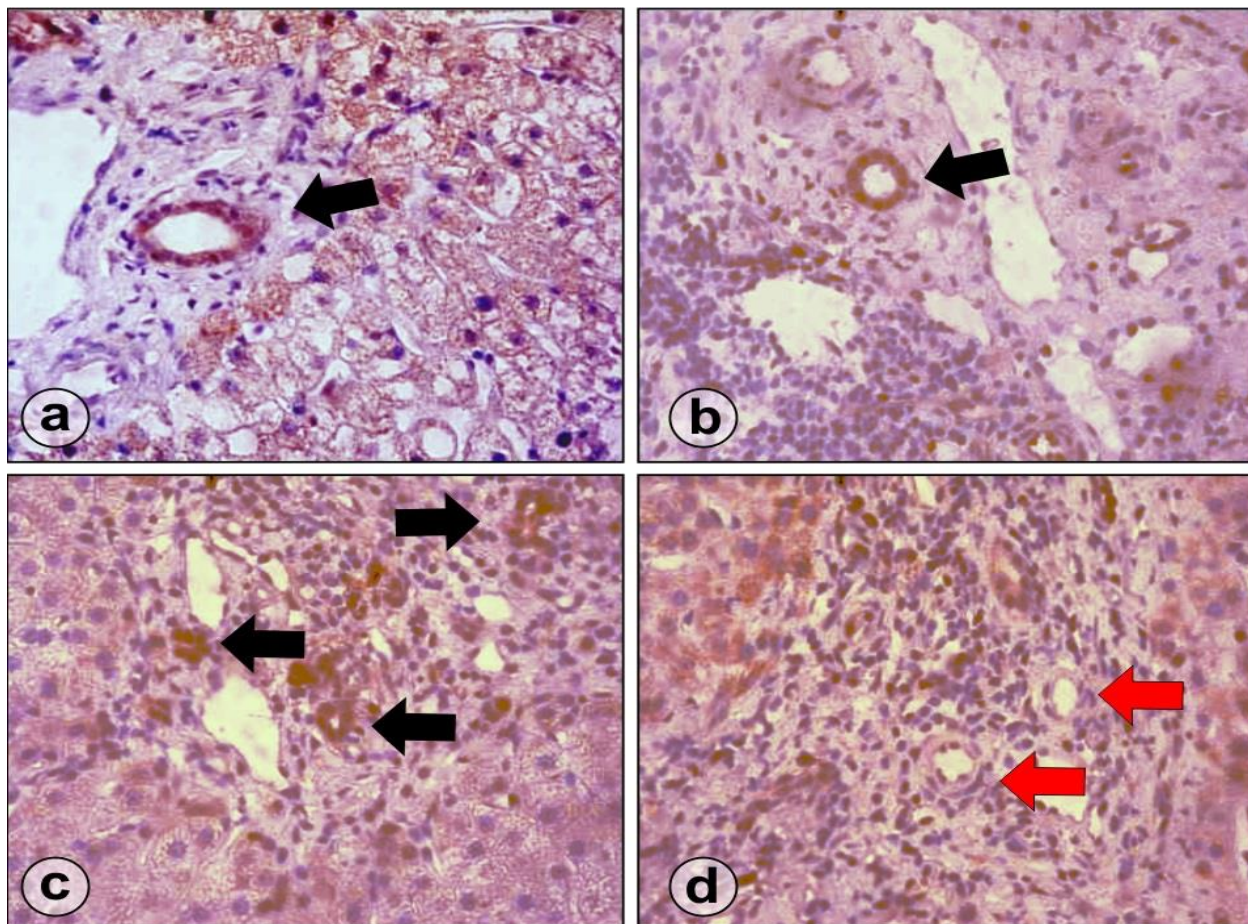
4.2. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају тежу форму примарног билијарног холангитиса индукованог ксенобиотиком

Пошто је утврђена појачана експресија Gal-3 у хепатоцитима и холангиоцитима и већа концентрација овог молекула у серуму оболелих од PBC у даљем раду испитивана је улога Gal-3 у патогенези болести и то коришћењем C57BL/6 мишева са делецијом гена за Gal-3 којима је болест индукована имунизацијом ксенобиотиком 2OA-BSA. Као контролне животиње коришћени су *wild type* мишеви соја C57BL/6. Током развоја болести праћени су параметри болести у серуму, а након жртвовања мишева одређивани су и хистолошки параметри инфламације.

4.2.1 Хистолошки параметри

Осам недеља након имунизације ксенобиотиком животиње су жртвоване, а у исечцима ткива јетре анализирани су хистолошки параметри инфламације: инфилтрација

перипортних простора, инфилтрација зида билијарних каналића са и без прекида континуитета епитела, субкапсуларна и инфилтрација паренхима- скор I и параметри оштећења (формирање гранулома и инципијентна фиброза)- скор II.

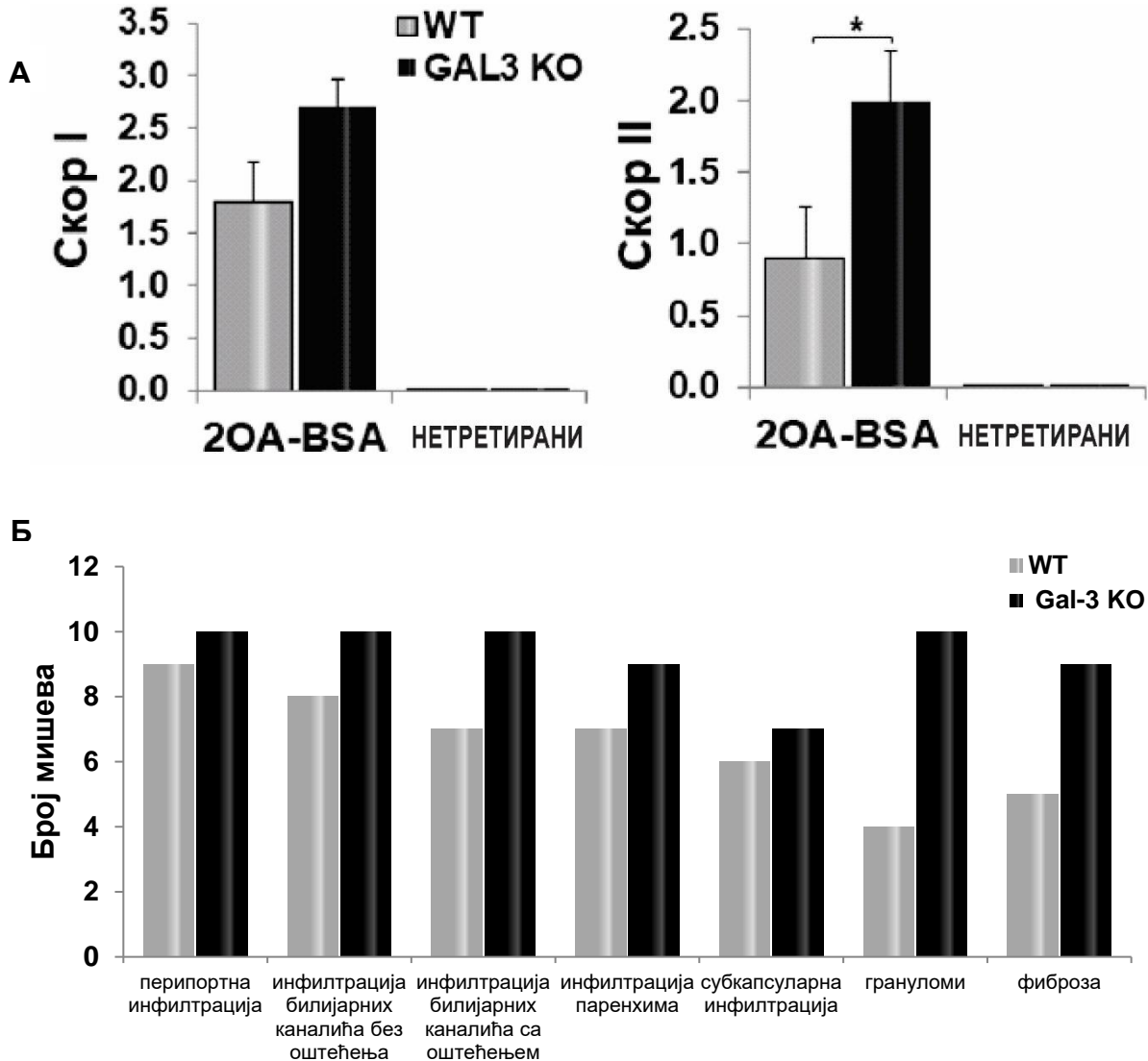


Слика 1. Упоредни приказ имунохистохемијски регистроване експресије Gal-3 у исечцима ткива четири различита обољења јетре: а) PBC; б) вирусни хепатитис В; с) вирусни хепатитис С; д) склерозирајући холангитис. Црне стрелице означавају експресију Gal-3 у холангиоцитима, а црвене стрелице показују холангиоците без експресије Gal-3 у склерозирајућим билијарним каналима.

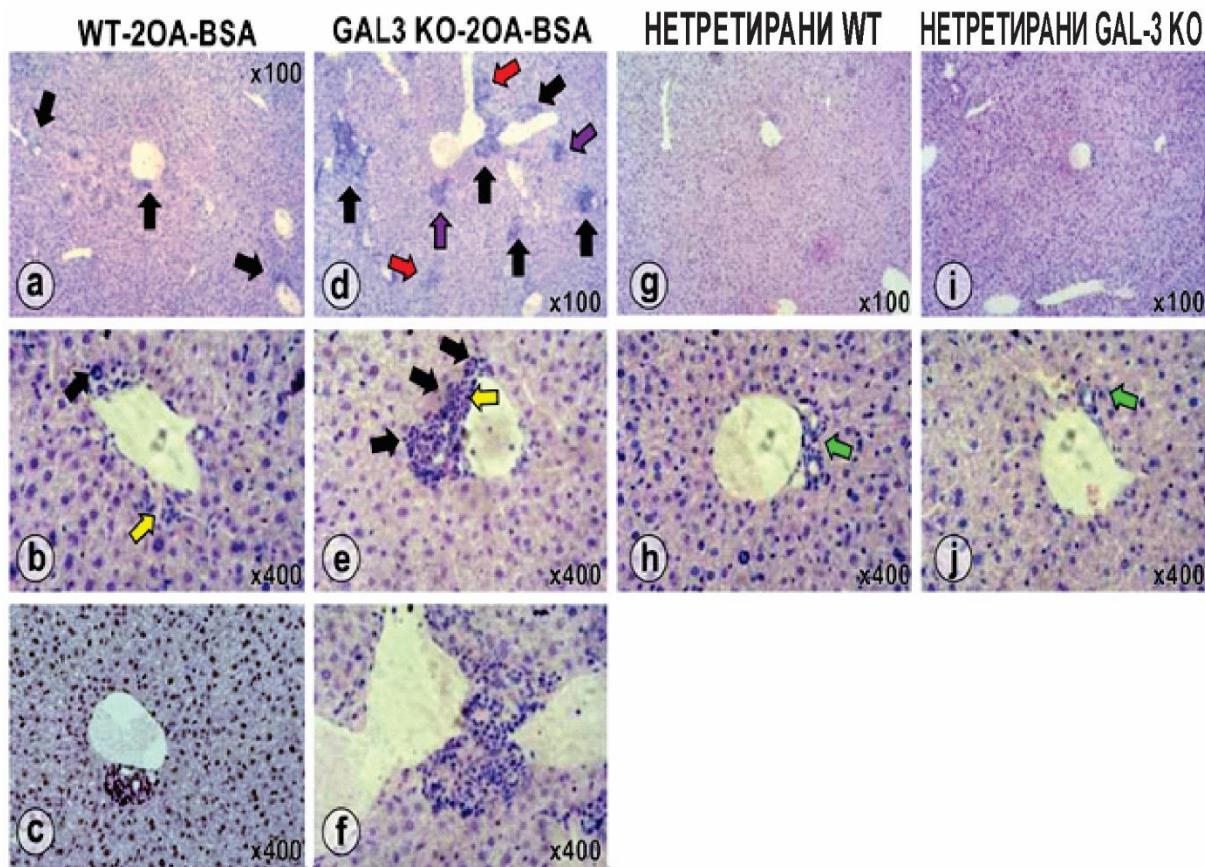
Осам недеља по имунизацији ксенибиотиком, свих 10 тестираних Gal-3 КО мишева развило је грануломе, а 9 од 10 је развило фиброзу јетре. За разлику од њих само у 5 од 10 WT мишева мишева третираних ксенобиотиком су детектовани грануломи, а код 4 од 10 фиброза (Графикон 2Б). У исечцима јетри WT мишева запажају се само ограничени перидуктални инфилтрати (Слика 2:а-с), док се код Gal-3 КО мишева региструју јасно

уочљиво већи и целуларнији инфламцијски фокуси, и то не само око билијарних канала, који су често облитерисали, (Слика 2: с,f) већ и у паренхиму (Слика 2: d-f).

Скор II који указује на оштећење ткива (формирање гранулома и фиброза) је статистички значајно већи у јетрама Gal-3 KO у поређењу са јетрама WT мишева ($p < 0.05$; Графикон 2А).

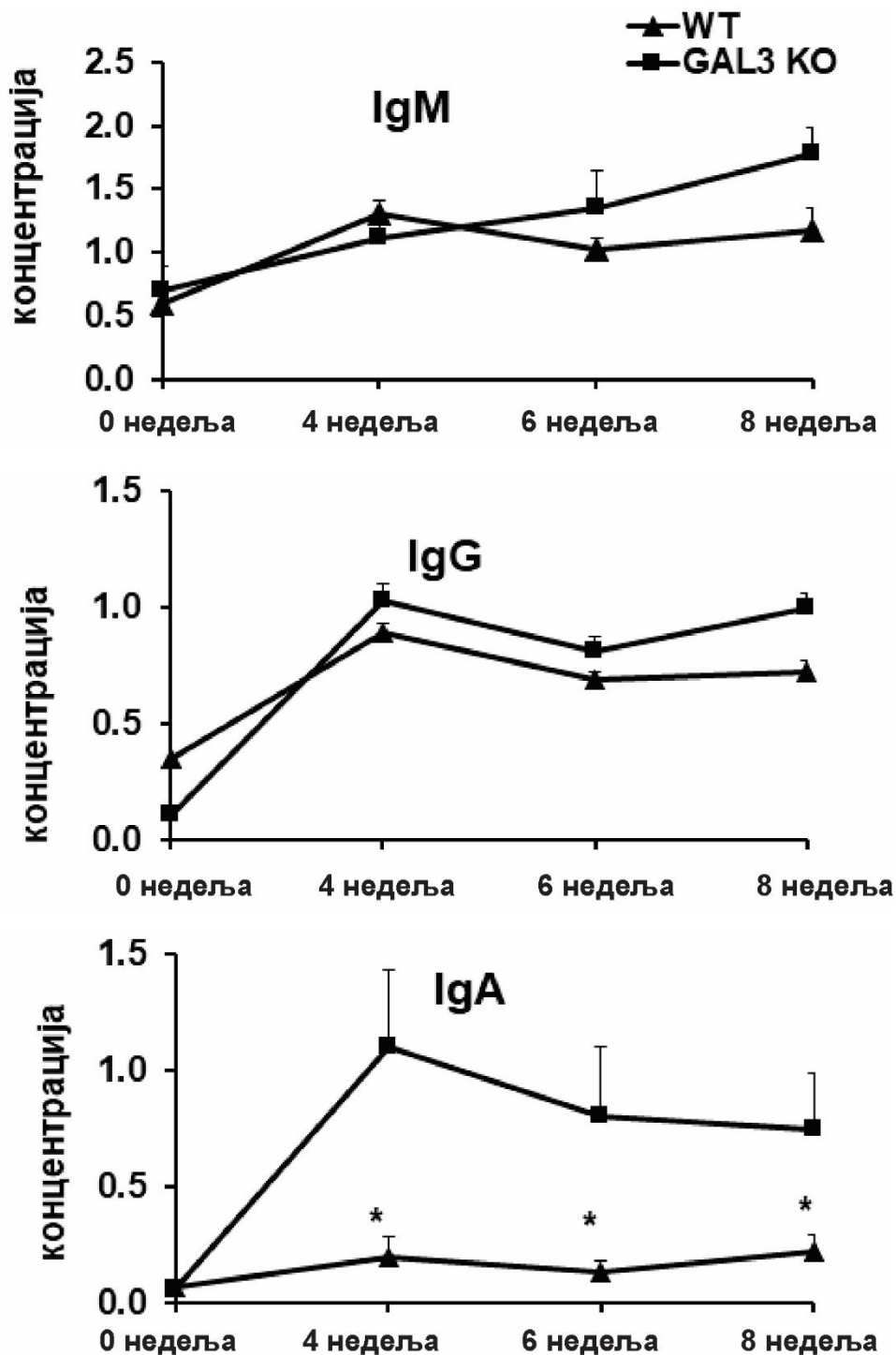


Графикон 2. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају израженија оштећења билијарних каналића након индукције РВС ксенобиотиком. Ткиво јетре C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева је изоловано 56 дана после имунизације ксенобиотиком, а исечци дебљине 5µm су обојени хематоксилин и еозином. А) Приказан је хистолошки скор I (инфилтрација и оштећење билијарних каналића) и скор II (фиброза јетре и формирање гранулома) као средња вредност + SE) једног експеримента са 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом. Б) Приказан је број мишева са позитивним параметрима инфламације у свакој од група. * $p < 0.05$.



Слика 2. Хистологија јетре WT (a-c) и Gal-3 KO (d-f) мишева 56 дана по имунизацији ксенобиотиком као и нетретираних WT (g и h) и Gal-3 KO (i и j) мишева. Црне стрелице показују перидукталне мононуклеарне инфилтрате, црвене инфилтрацију паренхиме, љубичасте инципијентне грануломе, жуте оштећења билијарних канала, зелене каналиће без инфилтрације у нетретираним мишевима.

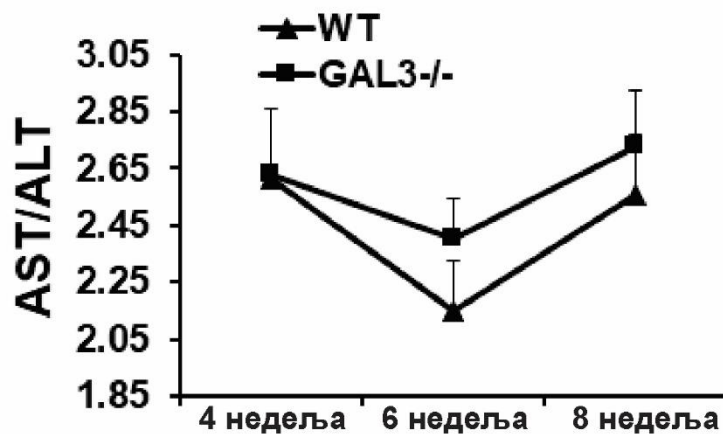
Јасно се уочава да су сви параметри инфламације и оштећења израженији у јетрама Gal-3 KO мишева имунизованих ксенобиотиком (Слика 2 и Графикон 2), међутим разлике за параметре скора I између WT и KO мишева не досежу ниво статистичке значајности (Графикон 2A).



Графикон 3. У серуму Gal-3 дефицијентних мишева је детектован значајно већи ниво IgA антитела специфичних за PDC-E2. Серумски нивои анти PDC-E2 антитела пре, 4, 6 и 8 недеља после имунизације ксенобиотиком одређени ELISA методом приказани као средња вредност +SE за укупно 9 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; * $p < 0.05$.

4.2.2 Серумски параметри

Будући да је златни стандард у дијагностици РВС појава антитела специфичних за антиген PDC-E2, ELISA тестом је одређивано присуство класа А, G и M ових антитела у серумима WT и Gal-3 KO мишева и то у четвртој, шестој и осмој недеље по имунизацији. Утврђено је значајно повећање концентрација ових антитела класе А, M и G у серуму обе групе мишева у поређењу са нетретираним мишевима (Графикон 3). Нема значајне разлике у нивоу анти-PDC-E2 IgM и IgG између WT и Gal-3 KO мишева, али је концентрација анти-PDC-E2 IgA значајно већа у серумима Gal-3 KO мишева ($p < 0.05$) у односу на групу WT мишева и то од четврте недеље по имунизацији (Графикон 3).



Графикон 4. Однос AST/ALT је већи у серуму Gal-3 дефицијентних мишева. Серумске концентрације ензима јетре су мерене колориметријском методом 4, 6 и 8 недеља после имунизације ксенобиотиком, а приказан је однос AST/ALT за укупно 9 мишева по групи.

Од шесте недеље након имунизације у серумима Gal-3 KO бележи се повећан индекс AST/ALT (Графикон 4). Иако разлика између група није статистички значајна, већи индекс у групи Gal-3 KO мишева може да укаже на веће оштећење првенствено хепатоцота у одсуству Gal-3.

4.3. Дефицијенција Gal-3 је удружена са знатно блажом формом примарног билијарног холангитиса индукованог инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Како су резултати истраживања утицаја галектина 3 на развој PBC у моделу индукованом ксенобиотиком супротни резултатима претходних студија које су испитивале улогу галектина 3 у патогенези аутоимунских болести желели смо да испитамо утицај овог молекула у патогенези и коришћењем другог модела за индукцију болести. PBC који се код мишева индукује инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, која се детектује код људи, највероватније да овај модел има више сличности са природним настанком, током и развојем болести код људи у поређењу са болешћу која се мишевима индукује имунизацијом ксенобиотиком у адјувансу. Бактерија садржи конзервирани епитоп PDC-E2 антигена и активира специфичне аутореактивне Т лимфоците (279) (280) (281). Ћелијски зид *Novosphingobium aromaticivorans*-а не садржи липополисахарид, него су главне компоненте зида α -глукуронозил- и α -галактурунозил-церамиди (113) (282) који активирају NKT ћелије. NKT ћелије препознају ове гликолипиде приказане у склопу CD1d молекула на дендритским ћелијама (283). Активирани NKT ћелије су кључне ћелије урођене имуности које играју улогу у покушају елиминације бактерија, а цитокини и хемокини које ослобађају ове и дендритске ћелије доприносе активацији PDC-E2 специфичних лимфоцита.

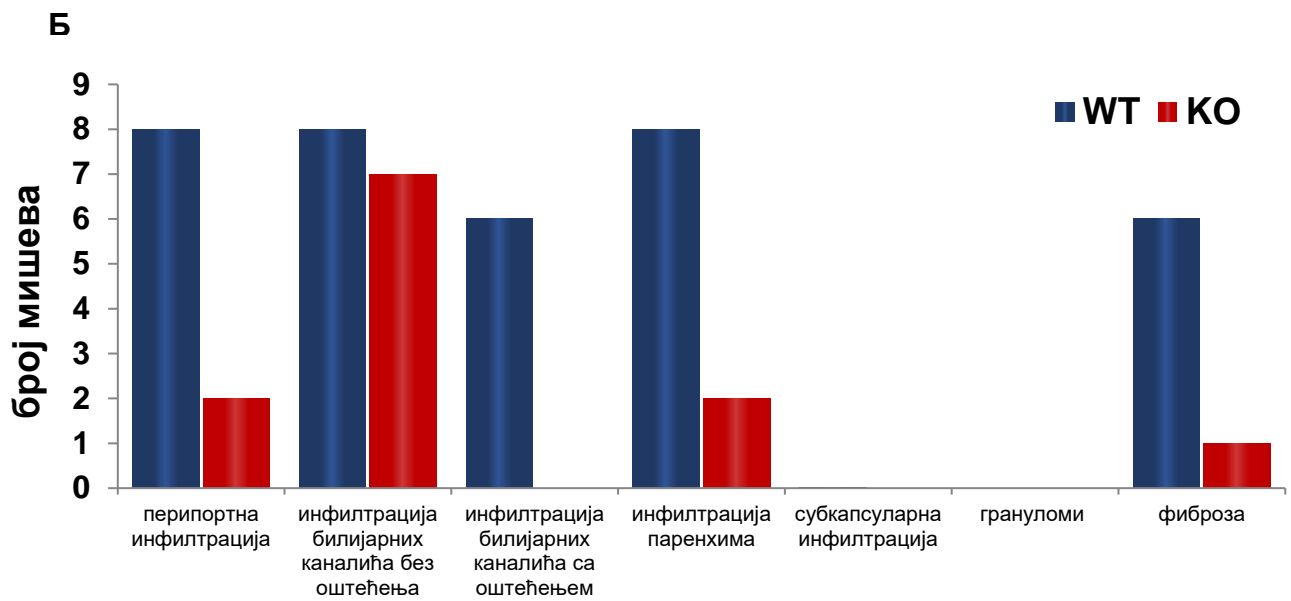
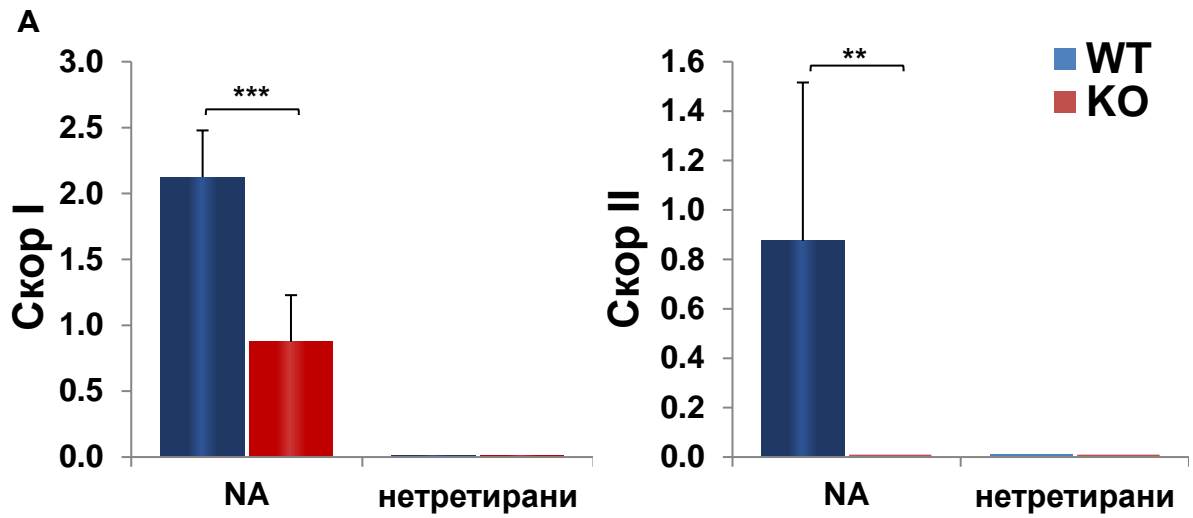
C57BL/6 “wild type“ и Gal-3 дефицијентним мишевима је интравенски апликована бактерија *Novosphingobium aromaticivorans* два пута у размаку од две недеље. Мишеви су жртвовани 8 недеља после прве дозе бактерија и анализирани су хистолошки и серумски параметри болести.

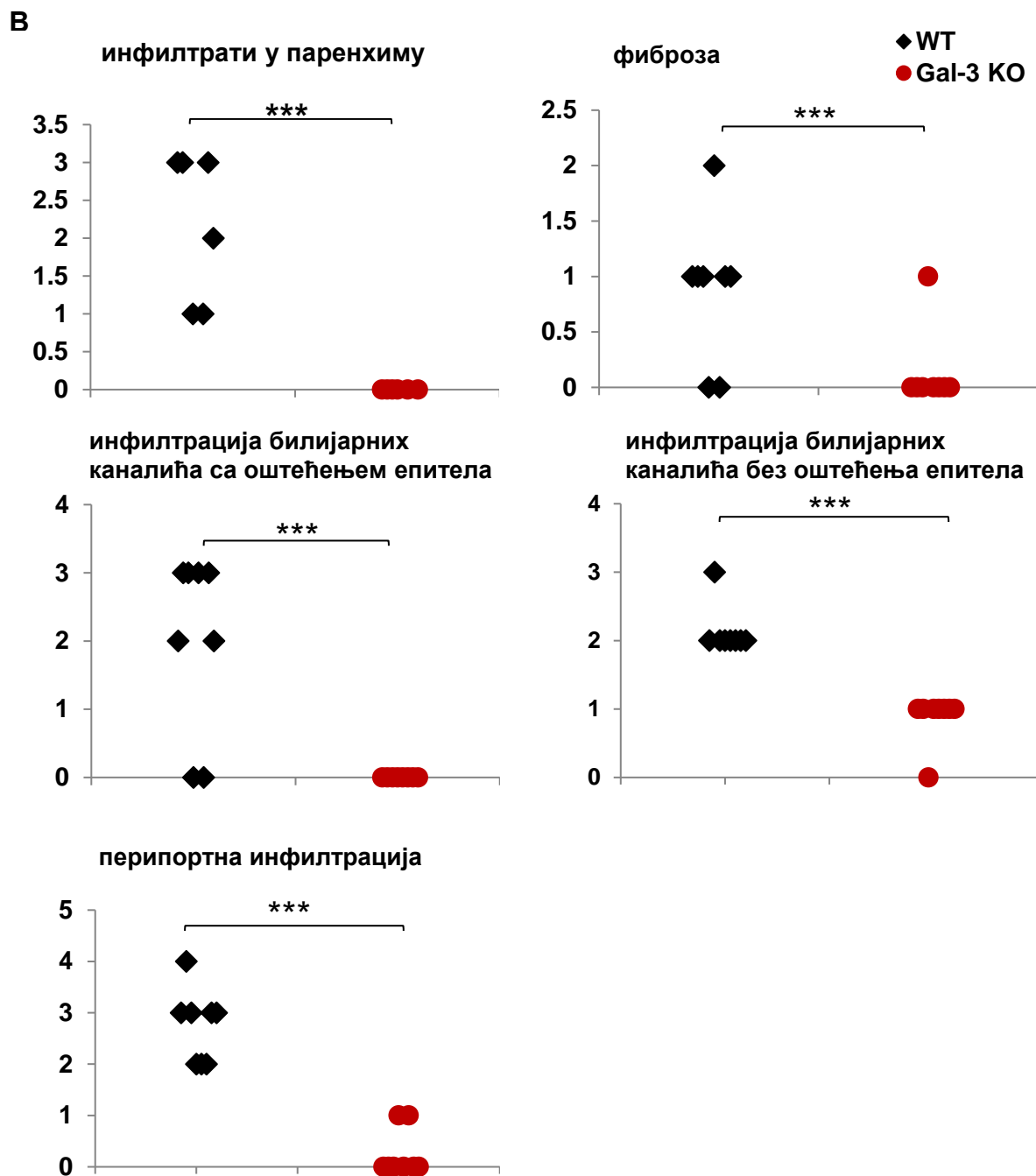
4.3.1 Хистолошки параметри

Хистолошки параметри који указују на инфламацију у ткиву јетре (инфилтрација перипортних простора, инфилтрација зида билијарних каналића са и без прекида континуитета епитела, субкапсуларна и инфилтрација паренхима) приказани кроз скор I су статистички значајано израженији ($p < 0.001$) у групи WT мишева у поређењу са Gal-3 KO

мишевима (Графикон 5А). Слично и параметри оштећења ткива (формирање гранулома и инципијентна фиброза) приказани кроз скор II су статистички значајно ($p < 0.05$) већи у групи WT мишева (Графикон 5А).

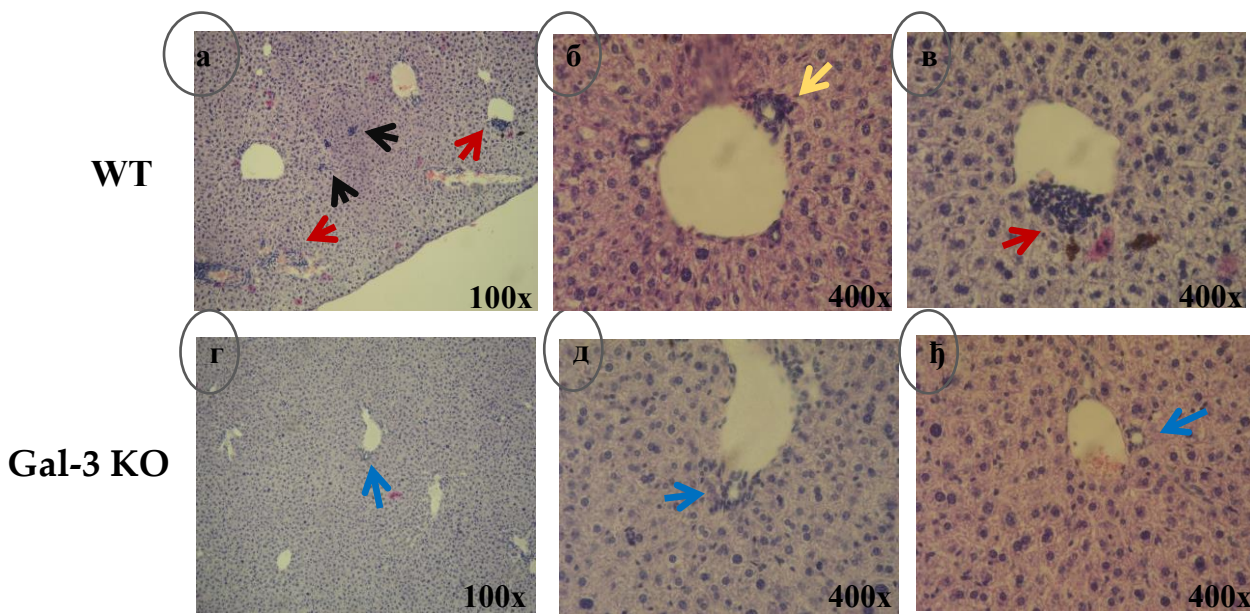
Ни у једном исечку јетре Gal-3 KO мишева није детектовано оштећење билијарних каналића док је код 6 од 8 WT мишева регистрована инфилтрација билијарних каналића праћена прекидом континуитета епитела (Графикон 5Б, Слика 3). Фиброза је детектована у јетри једног од 8 Gal-3 KO мишева за разлику од WT мишева код којих је у 6 од 8 анализираних мишева запажена фиброза. Формирање гранулома и субкаспуларна инфилтрација није забележена ни у једној групи мишева (Графикон 5Б, Слика 3).





Графикон 5. Оштећење билијарних каналића након индукције РВС бактеријом је значајно мање у групи Gal-3 дефицијентних мишева. Ткиво јетре C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева је изоловано 56 дана после инфекције бактеријом NA, а исечци дебљине 5 μ m су обојени техником хематоксилин-еозин. А) Приказан је хистолошки скор I (инфилтрација и оштећење билијарних каналића) и скор II (фиброза јетре и формирање гранулома) као средња вредност + SE) једног експеримента са 8 мишева у свакој групи. Б) Приказан је број мишева са позитивним параметрима инфламације у свакој од група. В) Приказане су вредности хистолошког скова за сваког миша појединачно за испитиване хистолошке параметре. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Хистолошки скор за сваки од испитиваних хистолошких параметара оштећења јетре је статистички значајно већи ($p < 0.001$) у групи WT мишева у поређењу са Gal-3 KO мишевима (Графикон 5B).



Слика 3. Хистологија јетре WT (а-б) и Gal-3 KO (г-ђ) мишева 56 дана по инфекцији бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Црне стрелице показују инфилтрације у паренхиму, жуте перидуктуларне инфилтрате, црвене плаве облитерације билијарних канала, плаве каналиће без инфилтрације.

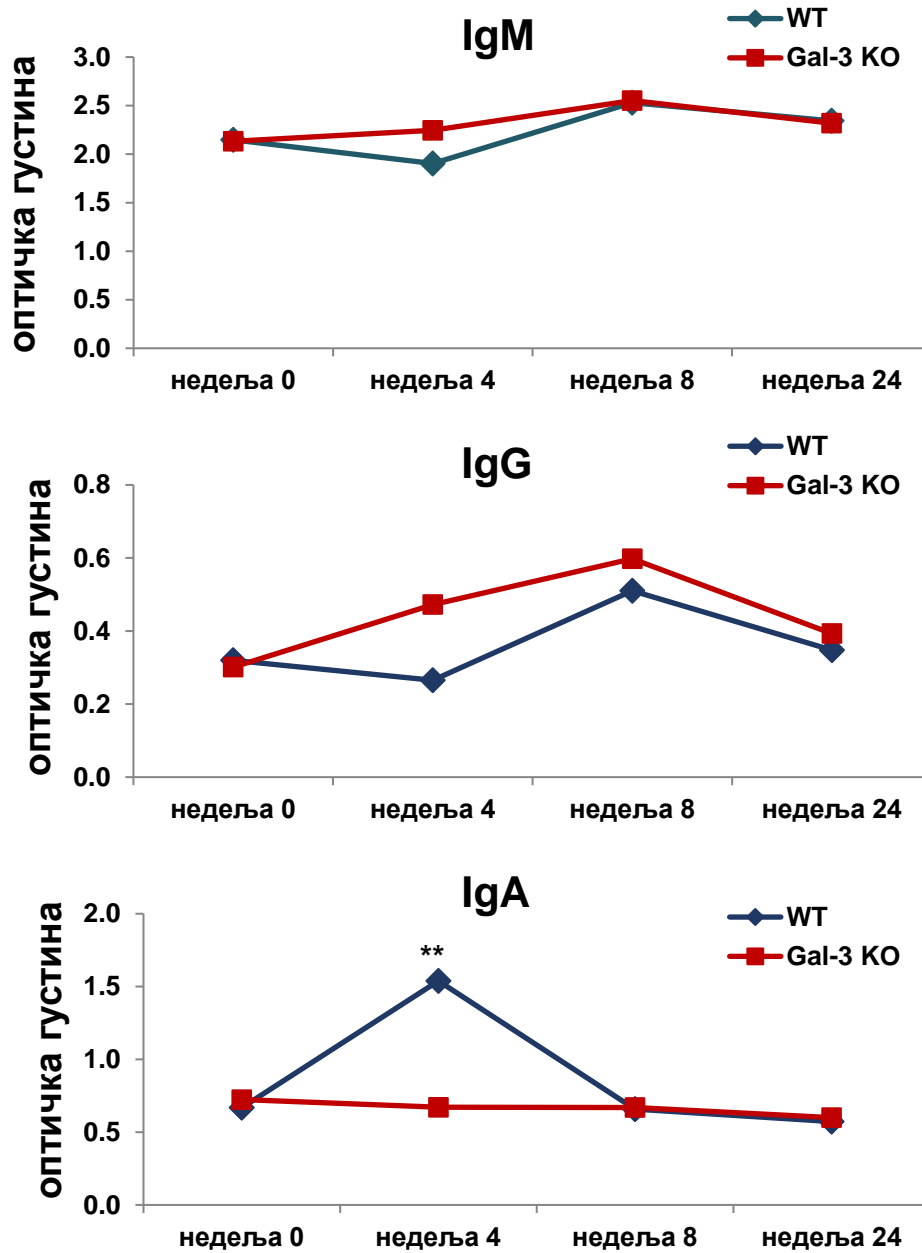
4.3.2 Серумски параметри

У серумима обе групе испитиваних мишева се од четврте недеље по инфекцији повећава ниво анти-PDC-E2 IgM и IgG, овај пораст траје до осме недеље, а пада у 24-ој недељи али је и даље већи у поређењу са нивоом код здравих мишева. Нема статистички значајне разлике у нивоу анти-PDC-E2 IgM и IgG између WT и Gal-3 KO мишева ни у једном времену испитивања (Графикон 6). Ниво анти-PDC-E2 IgA у серуму WT мишева четири недеље после инфекције бактеријом је статистички значајно ($p < 0.005$) већи у поређењу са групом Gal-3 KO мишева (Графикон 6). Од осме недеље по инфекцији међу групама нема разлике у нивоу анти-PDC-E2 IgA у серуму.

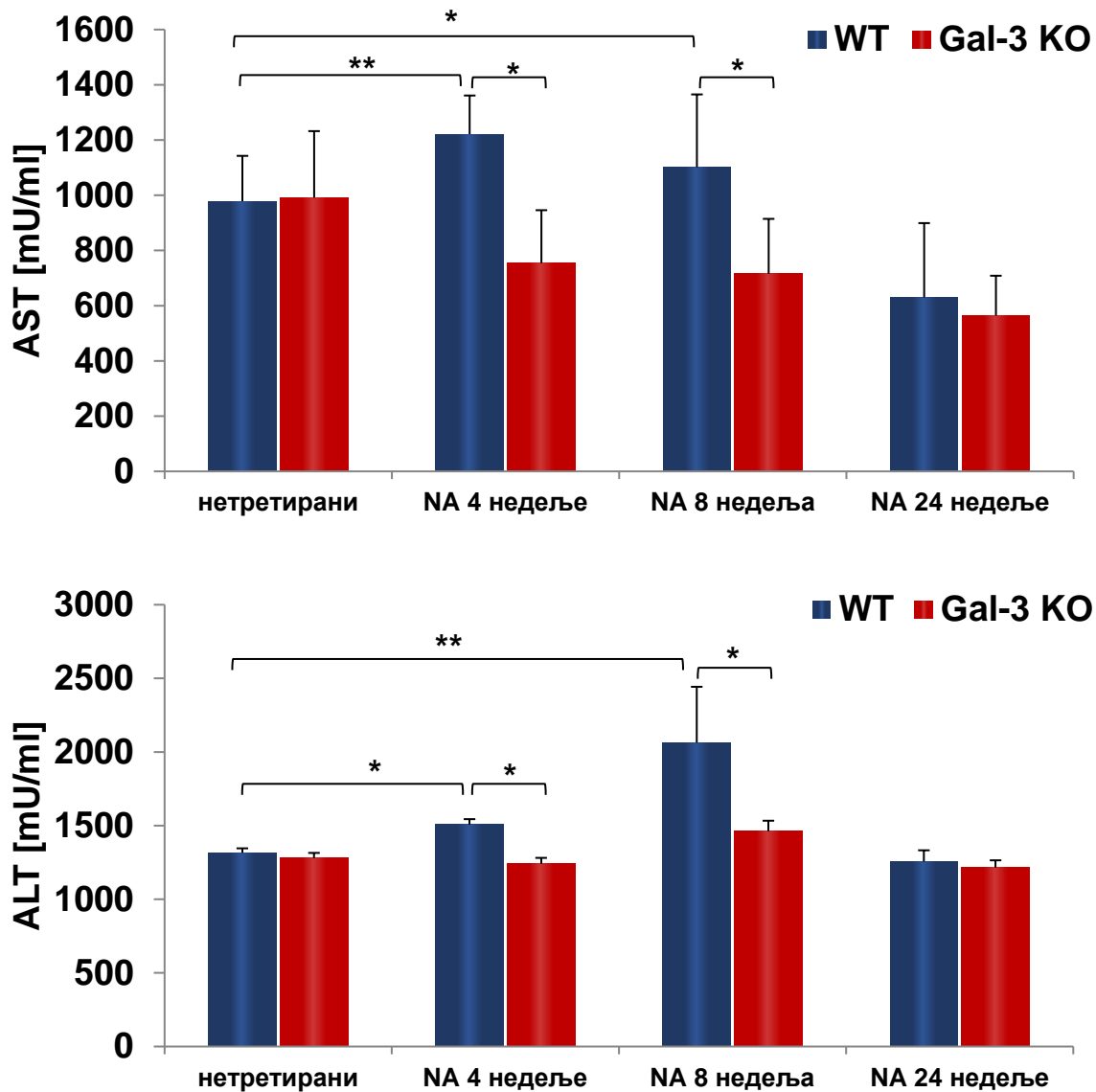
Мерена је и концентрација ензима који указују на оштећење јетре у серуму WT и Gal-3 KO мишева пре инфекције па четврте, 8. и 24. недеље после инфекције бактеријом

Novosphingobium aromaticivorans. Концентрације AST и ALT у серумима WT мишева статистички значајно расту четврте и 8. недеље после инфекције, док се 24. недеље после инфекције враћају на концентрације забележене код здравих мишева (Графикон 7). У серумима Gal-3 КО мишева није регистровано повећање концентрација AST и ALT четврте и 8. недеље после инфекције, а средња вредност концентрације ових ензима у код ових мишева је, у овим мерним тачкама, статистички значајно мања него у серумима WT мишева (Графикон 7).

Из свега је сасвим јасно да Gal-3 дефицијентни мишеви развијају значајно слабији примарни билијарни холангитис индукован инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.



Графикон 6. У серумима WT мишева је четврте недеље након инфекције бактеријом детектована значајно већа концентрација IgA антитела специфичних за PDC-E2. Серумске концентрације анти PDC-E2 антитела пре, четврте, 6. и 24. недеља после инфекције бактеријом одређени ELISA методом и приказани као средња вредност за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; ** $p < 0.005$.



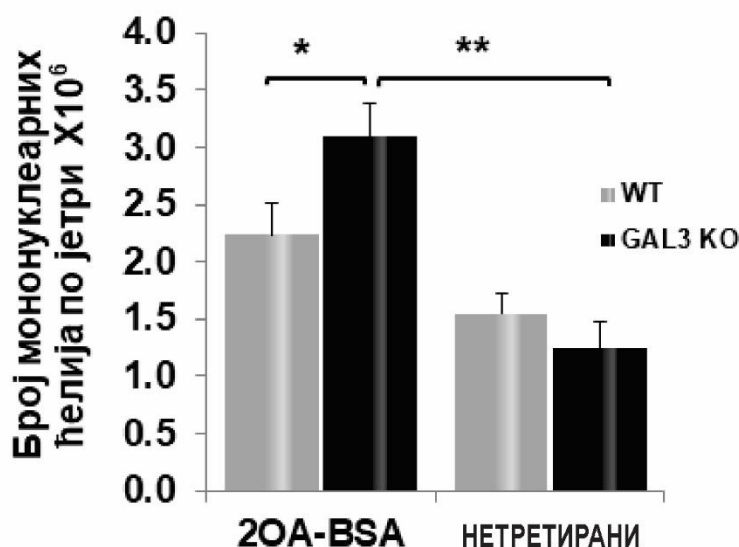
Графикон 7. Концентрација AST и ALT је већа у серуму инфицираних WT мишева. Серумске концентрације ензима јетре су мерене колориметријском методом пре инфекције као и четврте, 8. и 24. недеље после инфекције бактеријом. Приказана је средња вредност (+SD) концентрације AST и ALT за укупно 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Анализа хистолошких и серумских параметара примарног билијарног холангитиса је показала да су ефекти делеције гена за Gal-3 на развој PBC у два различита начина индукције болести супротни. Делеција гена за Gal-3 је повезана са тежом формом PBC у моделу индукованом имунизацијом ксенобиотикум, док у моделу изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* има протективни ефекат. Како би се утврдила

улога Gal-3 у развоју PBC даље су испитиване карактеристике болести у оба експериментална модела.

4.4. Инфлуks инфламцијских CD8⁺ лимфоцита у јетру је већи код оболелих Gal-3 KO мишева имунизованих ксенобиотиком

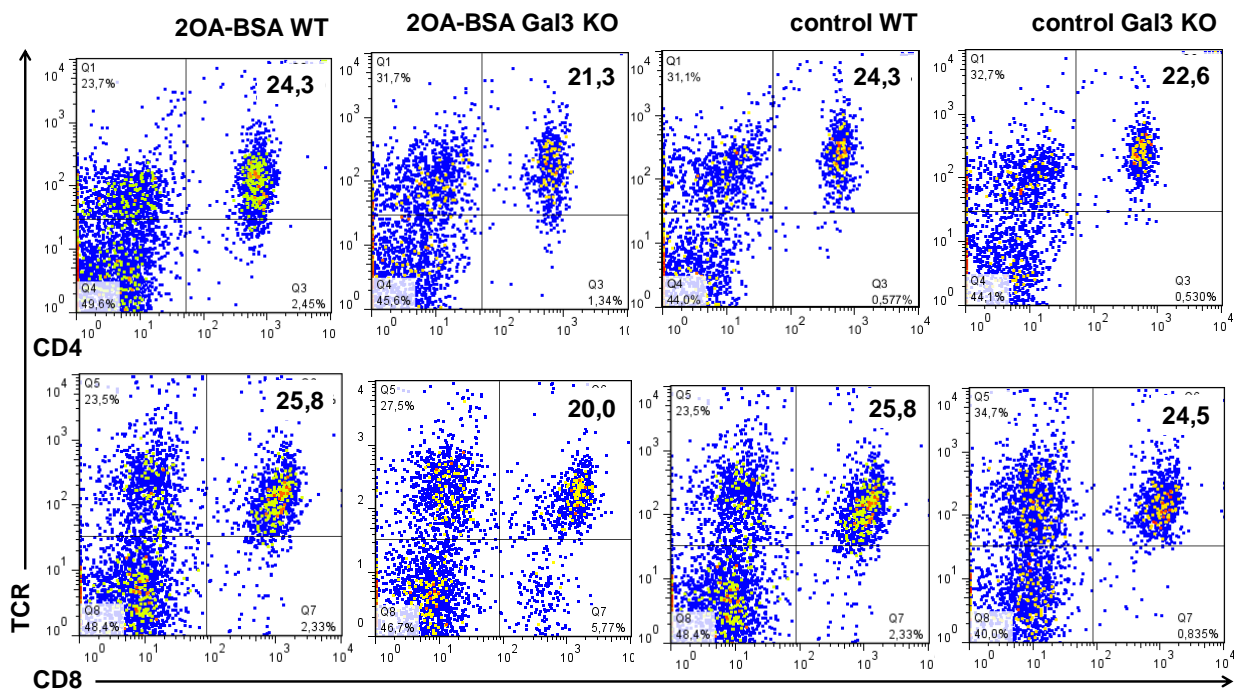
Претходни резултати, који су указали на значајано повећање инфилтрата у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком, потврђени су и анализом укупног броја мононуклеарних ћелија изолованих из јетри. На графикону 8 који приказује укупан број мононуклеарних ћелија изолованих из ткива јетре јасно се уочава да код Gal-3 дефицијентних мишева број изолованих ћелија статистички значајно већи ($p < 0.05$) у поређењу са бројем ћелија изолованих из јетри WT мишева.



Графикон 8. Већи број мононуклеарних ћелија је изолован из јетри Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком. Јетре C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева су изоловане 56. дана после имунизације ксенобиотиком. Свакој јетри је утврђена маса пре него што је подељена на половине. Из једне половине су изоловане мононуклеарне ћелије. Укупан број мононуклеарних ћелија по јетри је израчунат на основу формуле за пропорцију узимајући у обзир масу јетре и њене половине. Приказана је средња вредност броја изолованих мононуклеарних ћелија по групи +SE из једног експеримента са 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.4.1 Субпопулације мононуклеарних ћелија

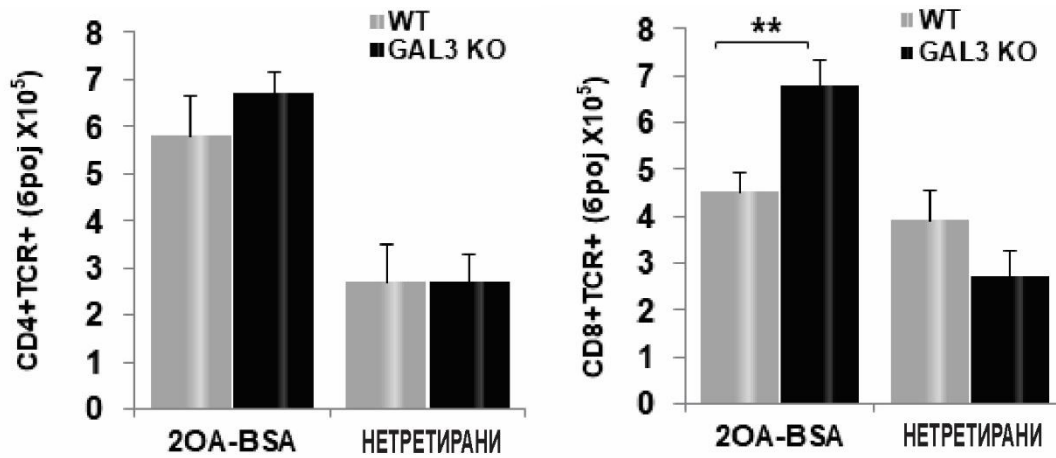
Даљом анализом је испитан целуларни састав инфилтрата јетре мишева имунизованих ксенобиотиком. Процентуалана заступљеност испитиваних ћелијских популација CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, CD11c⁺ дендритских ћелија, CD19⁺ В лимфоцита и F4/80⁺ макрофага се не разликује значајно међу групама имунизованих мишева (Слика 3). Разлике у процентима испитиваних популација нема ни између група имунизованих и нетретираних мишева.



Јетра	CD4+TCR+	CD8+TCR+	CD19+	F4/80+	CD11c+
2OA-BSA WT	26,21±3,26	23,24±4,67	24,64±4,29	3,25±1,57	16,19±2,97
2OA-BSA Gal-3/-	22,20±3,56	22,61±4,77	29,56±8,78	3,27±1,25	19,88±67,98
WT	25,25±3,92	25,80±2,23	26,54±7,88	3,31±0,84	15,18±3,22
Gal-3/-	23,30±2,81	23,88±6,07	31,10±6,30	3,38±1,29	13,00±2,64

Слика 4. Нема разлике у саставу инфилтрата јетре WT и Gal-3 дефицијентних мишева. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 56. дана после имунизације ксенобиотиком и након инкубације са анти -CD4 -CD8 -CD19 -F4/80 -TCR -CD11c антителима анализирани проточном цитометријом. А) Приказани су репрезентативни pseudocolor dot plot-ови за популације CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита. Б) Средња вредност +SE процената CD4⁺ CD8⁺ CD19⁺ F4/80⁺ и CD11c⁺ ћелија по групи, укупно 9 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом.

Како је укупни број мононуклеарних ћелија изолованих из јетре имунизованих Gal-3 KO мишева већи него број издвојених ћелија из јетри имунизованих WT мишевима и укупни број испитиваних популација је већи у групи мишева који испољавају јачу болест. Међутим, како је проценат CD4⁺ Т лимфоцита већи у групи WT мишевима (табела у оквиру слике 2) међу групама имунизованих мишева нема статистички значајне разлике у броју ових ћелија. Број CD8⁺ Т лимфоцита је статистички значајно већи у јетрама Gal-3 KO мишева у поређењу са WT мишевима ($p < 0.005$; Графикон 9).

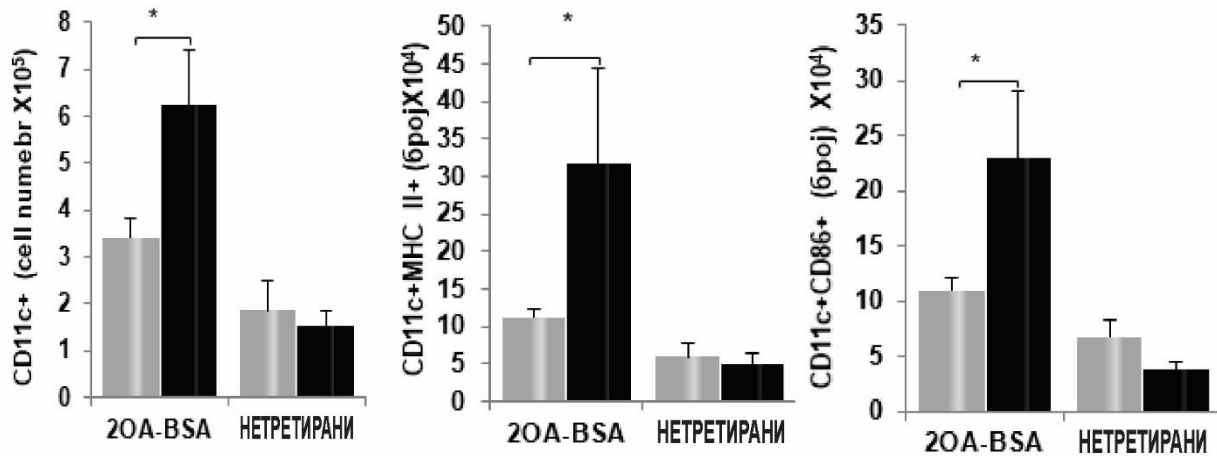


Графикон 9. Јетре имунизованих Gal-3 KO мишева садрже већи број CD8⁺ лимфоцита. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 56. дана после имунизације ксенобиотициком. Апсолутни бројеви CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита су израчунати као средња вредност броја испитиваних ћелија по групи. Приказана је средња вредност броја ћелија +SD репрезентативног експеримента са укупно 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t и Kruskal–Wallis тестом * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4.5. У јетрама оболелих Gal-3 KO мишева имунизованих ксенобиотициком доминирају проинфламацијске дендритске ћелије

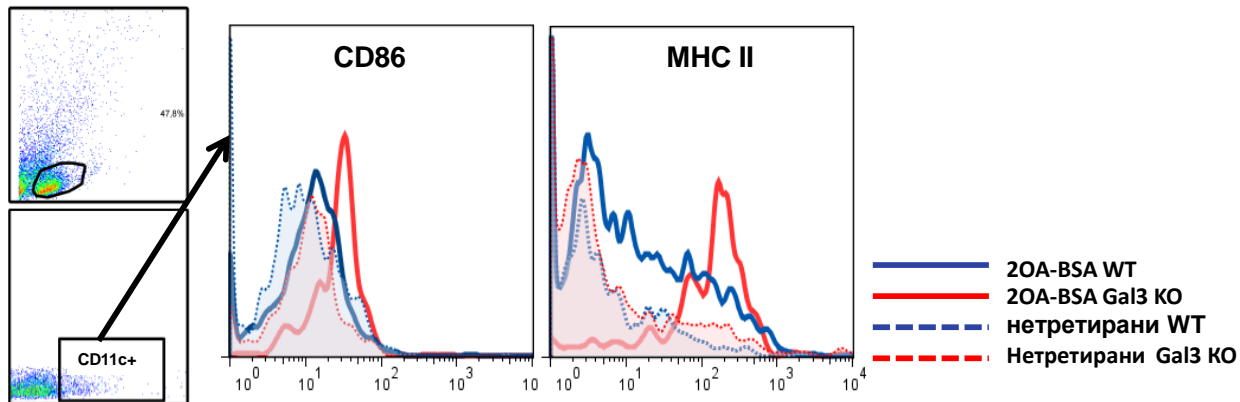
Иако нема разлике у процентуалној заступљености дендритских ћелија у јетрама како имунизованих тако и нетретираних мишева апсолутни број дендритских ћелија је највећи у групи имунизованих Gal-3 KO мишева и статистички је значајно већи ($p < 0.05$) у поређењу са бројем ових ћелија у групи имунизованих WT мишева (Графикон 10). Такође, апсолутни

број активираних дендритских ћелија, CD11c⁺CD86⁺ и CD11c⁺МНСII⁺ је статистички значајно већи (p<0.05) у јетрама имунизованих Gal-3 КО мишева у поређењу са групом WT мишева (Графикон 10).



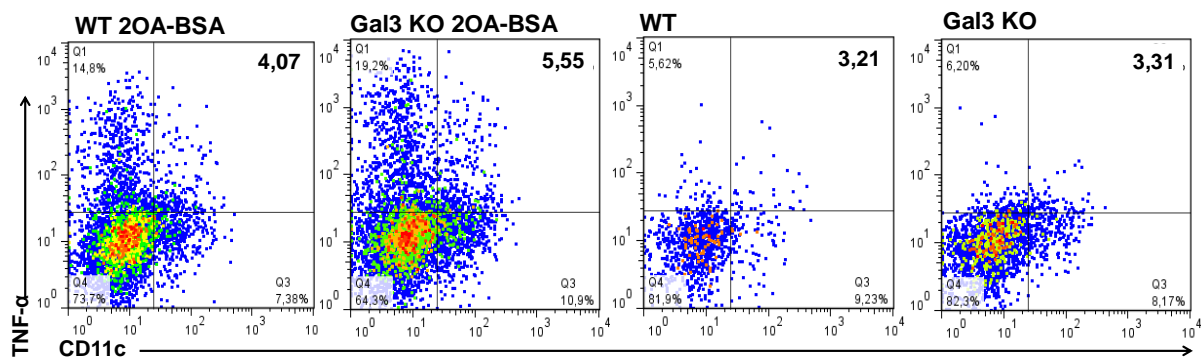
*Графикон 10. У јетрама оболелих Gal-3 КО мишева је присутан већи број активираних дендритских ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 56. дана после имунизације ксенобиотиком и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE броја CD11c⁺, активираних дендритских ћелија CD11c⁺CD86⁺ и CD11c⁺МНС II⁺ по групи са укупно 9 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t и Kruskal–Wallis тестом *p<0.05.*

Експресија маркера активације молекула II класе МНС и CD86 у популацији CD11c⁺ дендритских ћелија је већа у групи оболелих Gal-3 КО мишева у поређењу са групом оболелих WT мишева (Слика 4).

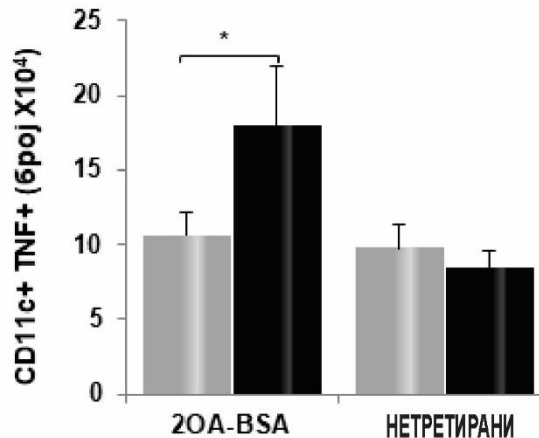


Слика 5 $CD11c^+$ дендритске ћелије у јетрама имунизованих $Gal-3$ KO мишева имају већу експресију маркера активације. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре $Gal-3$ KO и WT мишева 56. дана после имунизације ксенобиотиком и анализирани прорчном цитометријом. Изабрана је популација $CD11c^+$ ћелија у оквиру које је кроз MFI анализирана експресија CD86 и молекула II класе MHC. Приказани су репрезентативни хистограми.

Инфламацијска природа дендритских ћелија је потврђена анализом експресије проинфламацијских цитокина. Процент $CD11c^+$ ћелија које експримирају $TNF\alpha$ је већи међу мононуклеарним ћелијама изолованим из јетре $Gal-3$ KO мишева у поређењу са групом WT мишева (Слика 5), али без статистичке значајности док је укупан број таквих инфламацијских дендритских ћелија статистички значајно већи у групи $Gal-3$ KO мишева у поређењу са WT групом мишева (Графикон 11; $p < 0.05$).



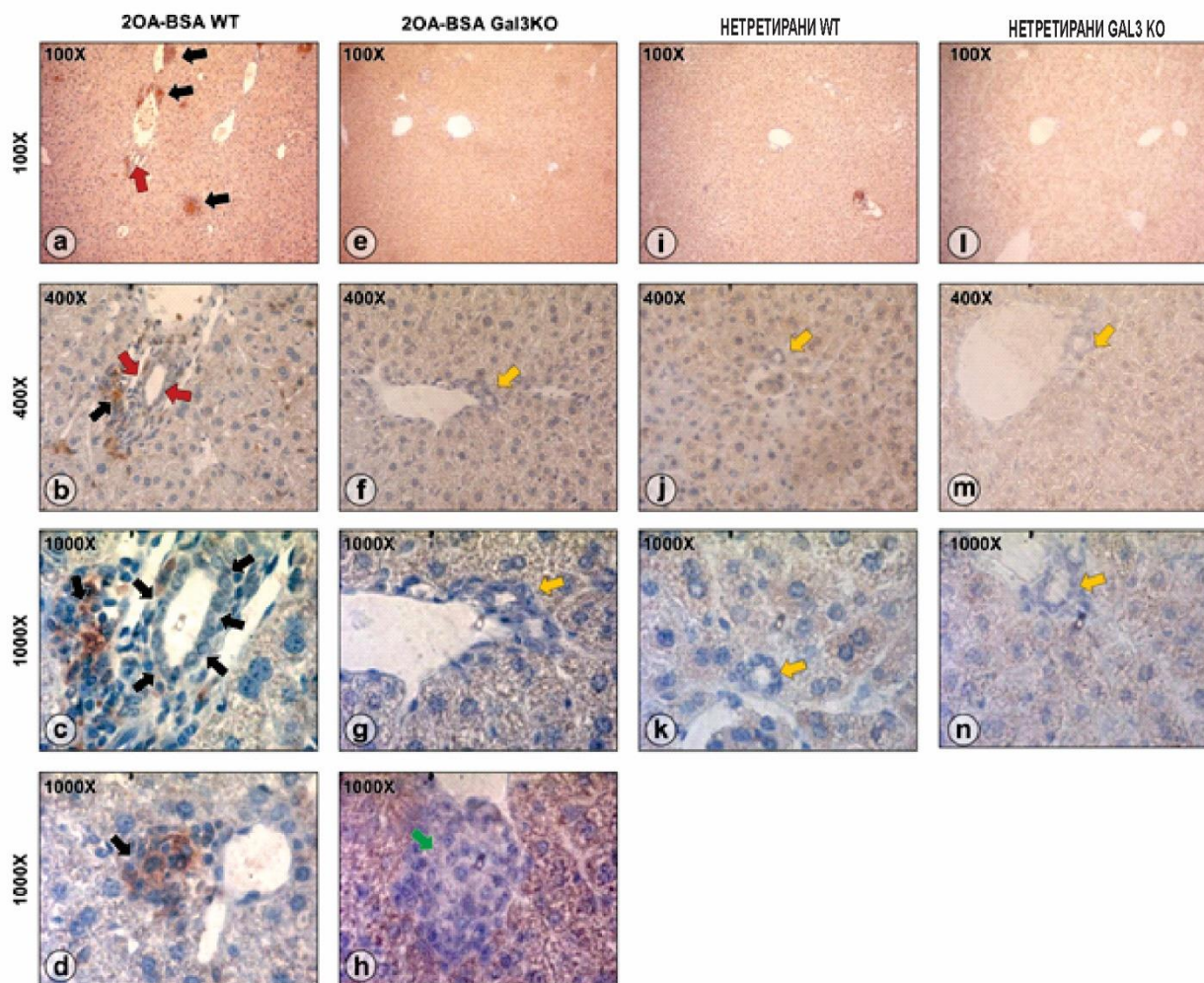
Слика 6. Нема разлике у проценту инфламацијских дендритских ћелија у инфилтратима јетрама WT и $Gal-3$ дефицијентних мишева. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 56. дана после имунизације ксенобиотиком и анализирани проточном цитометријом. Приказани су репрезентативни pseudocolor dot plot-ови $CD11c^+ TNF-\alpha^+$ ћелија.



*Графикон 11. У јетрама оболелих Gal-3 KO мишева је присутан већи број инфламацијских дендритских ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 56. дана после имунизације ксенобиотиком и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE броја инфламацијских дендритских ћелија, CD11c⁺TNF- α ⁺, по групи од укупно 9 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$.*

4.6. Индуција PBC ксенобиотиком повећава експресију Gal-3 у холангиоцитима

Како је анализа експресије Gal-3 у ткиву јетре указала да тип и степен патолошких промена у јетри може да корелира са експресијом Gal-3 у холангиоцитима испитана је експресија Gal-3 у ткиву јетре мишева имунизованих ксенобиотиком. Експресија Gal-3 није детектована у јетрама нетретираних- контролних WT и Gal-3 KO мишева, али је значајно повећање експресије Gal-3 детектована у холангиоцитима као и инфламацијским инфилтратима јетре WT мишева имунизованих са 20A-BSA (Слика 5). У јетрама имунизованих Gal-3 KO није детектована експресија Gal-3.

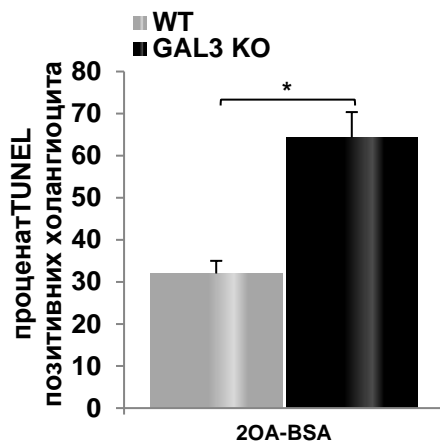


Слика 7. Репрезентативни примери експресије Gal-3 у јетрама имунизованих и здравих мишева. Gal-3 је експримиран у холангиоцитима и инфламацијским инфилтратима у јетрама WT мишева имунизованих 2-OA-BSA (a-c; црвене и црне стрелице) као и у грануломима (d; зелена стрелица). Експресија Gal-3 није детектована у холангиоцитима, инфилтратима (e-g; жуте стрелице) и грануломима (h, зелене стрелице) 2OA-BSA имунизованих Gal-3 KO и обе групе нетретираних мишева.

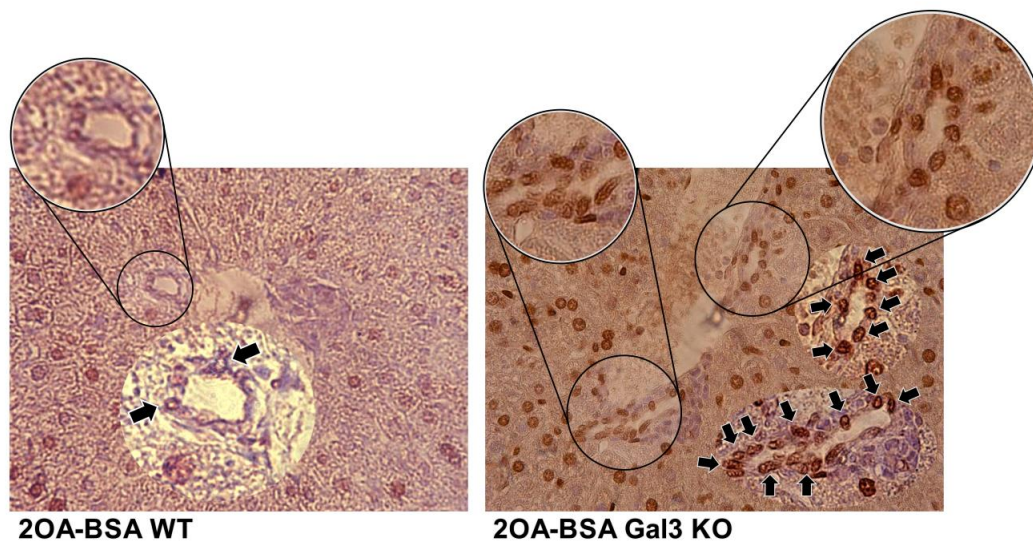
4.7. Тежи облик PBC индукованог ксенобиотиком код Gal-3 KO мишева је удружен се већом фреквенцом апоптозе холангиоцита

Познато је да Gal-3, експримиран у епителним ћелијама, има антиапоптотске ефекте (151). Како је уочено да се у холангиоцитима WT мишева након индукције PBC ксенобиотиком, повећава експресија Gal-3, а да у холангиоцитима оболелих Gal-3 KO мишева који по свим параметрима имају тежу болест, нема Gal-3 у епителним билијарним каналићима, даља анализа се односила на испитивање апоптозе холангиоцита у Gal-3 KO и WT мишевима. Процент апоптотских, TUNEL позитивних холангиоцита, у исечцима јетре Gal-3 KO

мишева 56. дана после имунизације ксенобиотицом је статистички значајно већи ($p < 0.05$) у поређењу са процентом апоптотских холангиоцита у групи WT мишева (Графикон 12). На Слици 10 се уочава мноштво TUNEL позитивних холангиоцита унутар билијарног каналића на исечку јетре имунизованог Gal-3 KO миша, док је у исечцима јетре имунизованих WT мишева TUNEL позитивно само један до два холангиоцита унутар једног билијарног каналића.

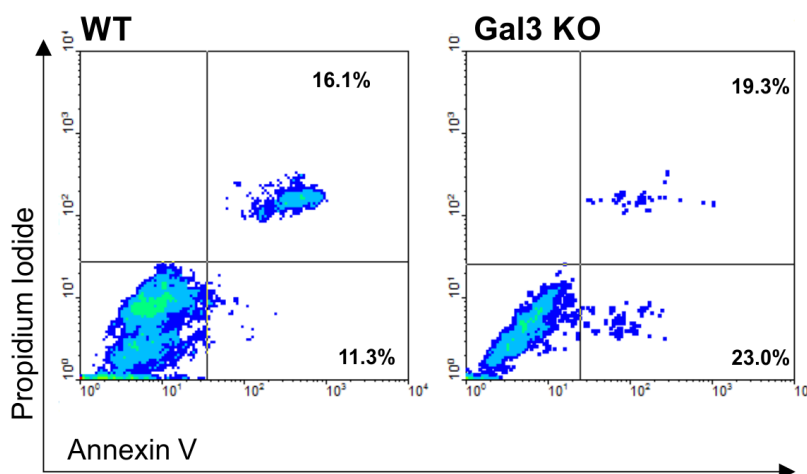


Графикон 12. Процент апоптотичних холангиоцита је статистички значајно већи у групи Gal-3 KO мишева имунизованих ксенобиотицом. Исецци јетре имунизованих мишева обе групе су 56. дана после имунизације обојени TUNEL методом, проценат апоптотичних холангиоцита је приказан као средња вредност +SE за укупно 9 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом $*p < 0.05$.



Слика 8. Репрезентативни примери TUNEL позитивних холангиоцита у јетри имунизованих мишева. Стрелице указују на апоптотичне холангиоците.

Како би се потврдила појачана апоптоза холангиоцита Gal-3 KO мишева изоловани су холангиоцити нетретираних WT и Gal-3 KO мишева и изложени *in vitro* апоптотском стимулусу (јономицин) након чега је мерен проценат апоптотских ћелија проточном цитометријом. Већи проценат апоптотских (Annexin V+) холангиоцита након 22 сата *in vitro* изложености јономицину је детектован међу ћелијама добијеним из Gal-3 KO мишева у поређењу WT групом мишева (Слика 11).



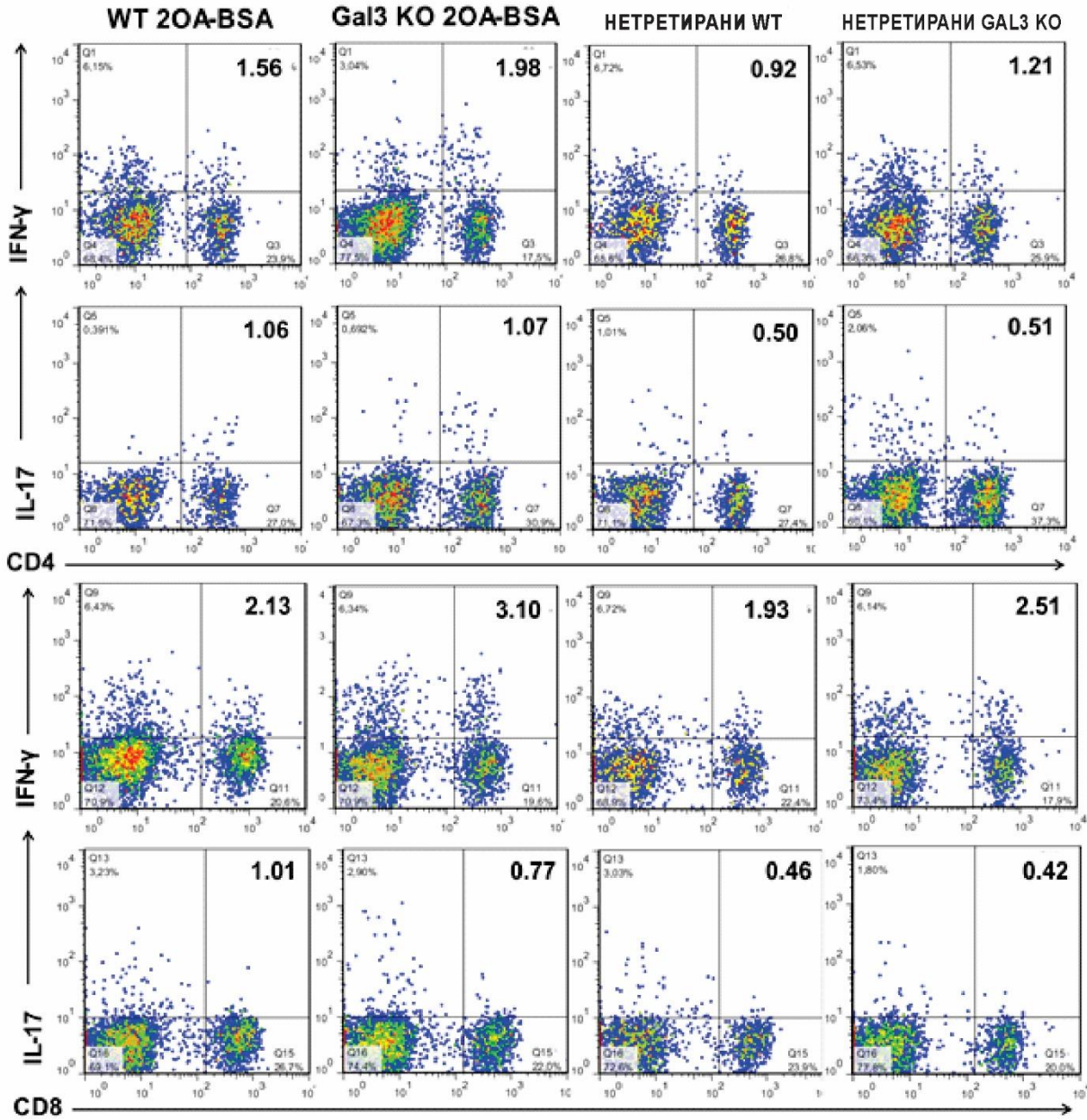
Слика 9. Репрезентативни дот плотови апоптотичних холангиоцита изолованих из нетретираних WT и Gal-3 KO мишева овојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом након излагања јономицину.

4.8. Веће оштећење билијарних каналића код Gal-3 KO мишева имунизованих ксенобиотику повезано је са појачаним Th1 имунским одговором у јетри

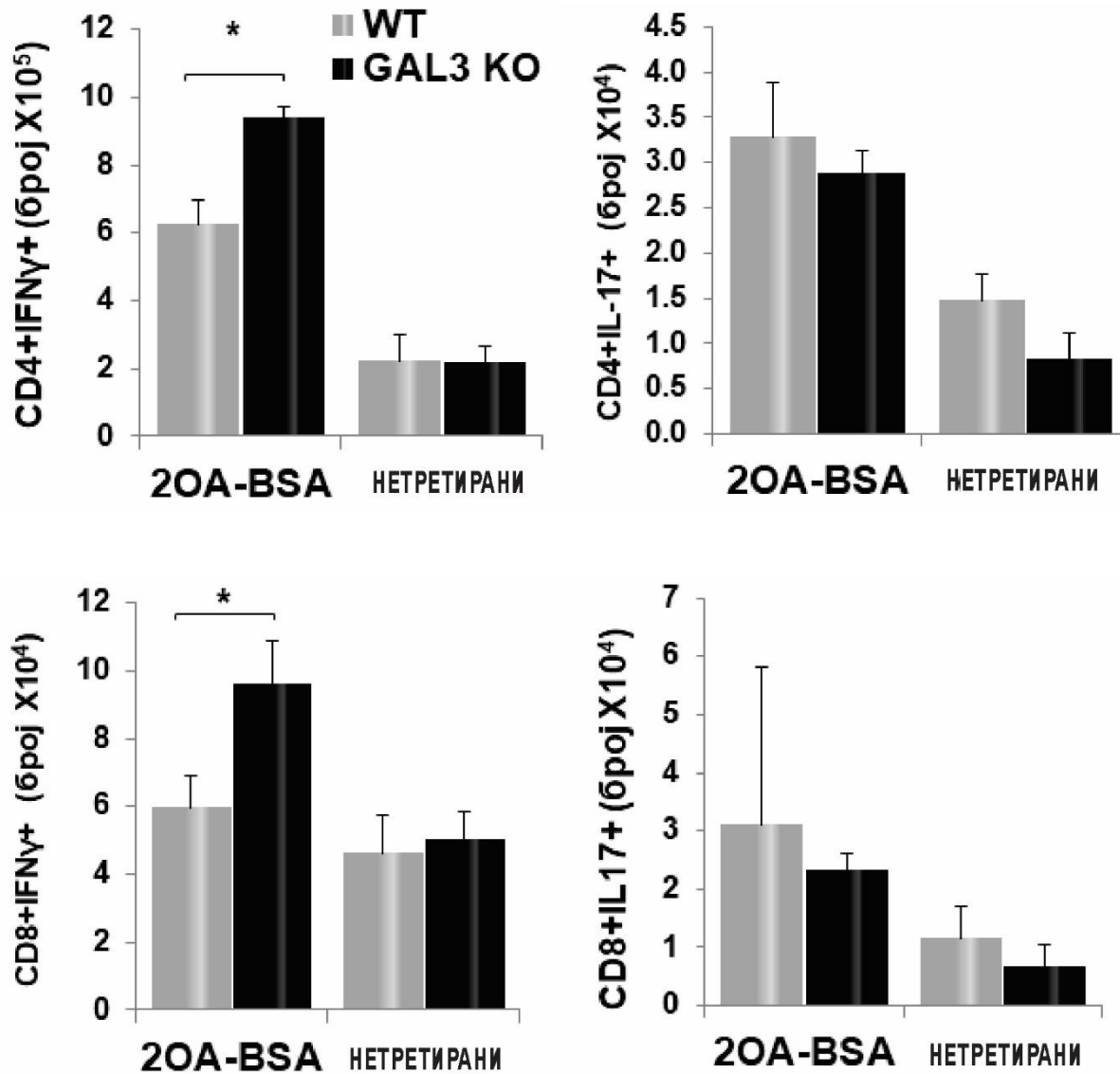
Развој PBC зависи од инфламацијских лимфоцита који инфилтришу јетру. Зато је у мононуклеарним ћелијама које инфилтришу јетру оболелих животиња анализирана експресија цитокина који имају улогу у патогенези PBC. Проточном цитометријом је 56. дана након имунизације ксенобиотику анализирана заступљеност CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита који експримирају проинфламацијске цитокине IL-17 и IFN- γ .

Међу моноклеарним ћелијама изолованим из јетре обе групе мишева имунизованих ксенобиотиком нема разлике у проценту CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита који садрже Th1 и Th17 цитокине (Слика 12).

Апсолутни број CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита који садрже IFN- γ је статистички значајно већи ($p < 0.05$) у групи Gal3 KO мишева имунизованих ксенобиотиком у поређењу са WT групом имунизованих мишева (Графикон 13). Нема статистички значајне разлике у апсолутном броју ни CD4⁺ ни CD8⁺ лимфоцита који садрже IL-17 изолованих из јетри Gal3 KO и WT мишева имунизованих ксенобиотиком (Графикон 13).



Слика 10. Репрезентативни дот плотови CD4+ и CD8+ лимфоцита који садрже Th1 и Th17 цитокине.



Графикон 13. У јетрама Gal-3 KO мишева, након индукције PBC ксенобиотиком, је више лимфоцита који садрже IFN- γ . Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетри 56. дана после имунизације ксенобиотиком и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE броја CD4⁺ и CD8⁺ ћелија које садрже проинфламацијске цитокине IL-17 и IFN- γ , по групи, са укупно 9 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* **p*<0.05.

4.9. Појачан системски Th17 имунски одговор код Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком је удружен са већим оштећењем билијарних каналића и већом фиброзом јетре

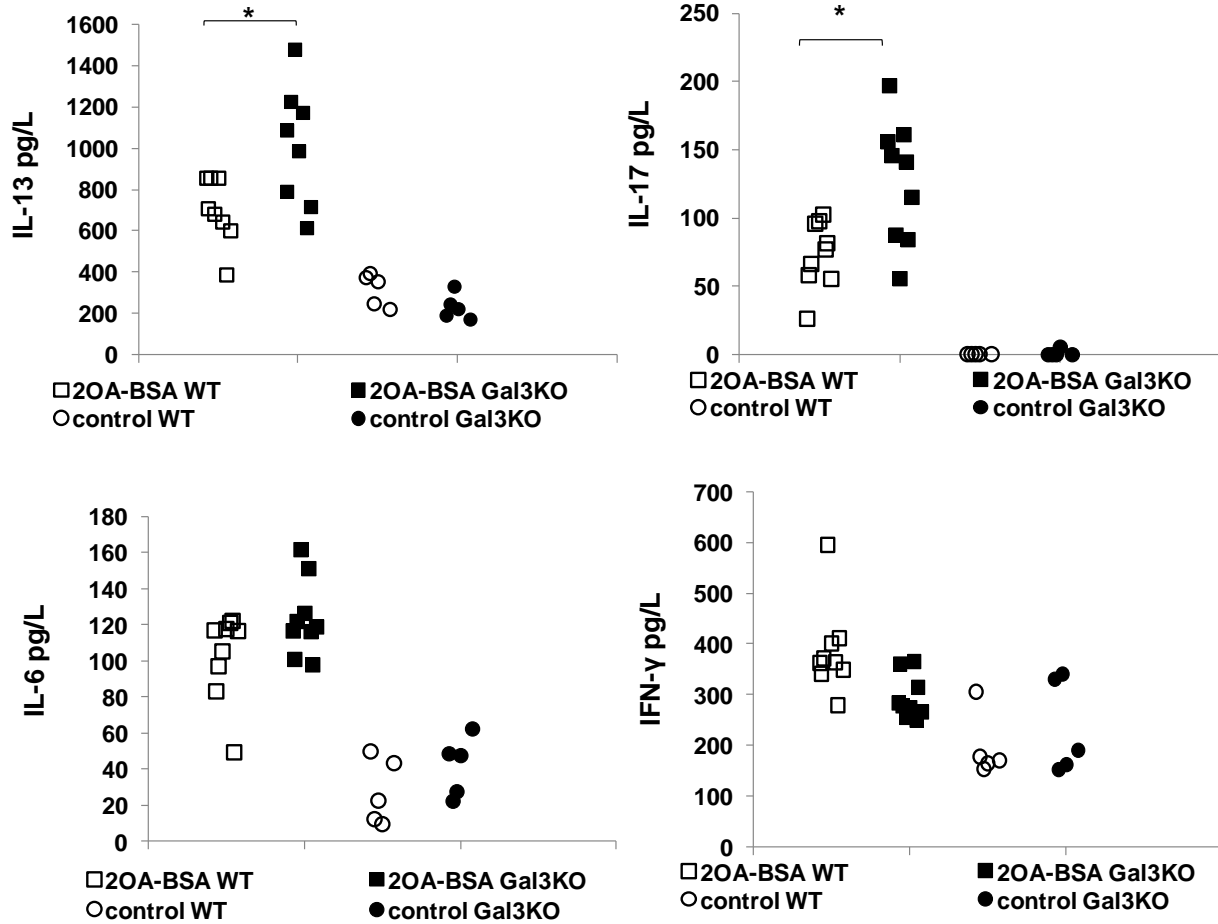
4.9.1. У серуму Gal-3 КО мишева имунизованих ксенобиотиком је присутна већа концентрација профибротских цитокина

У серуму и WT и Gal-3 КО мишева је 56. дана након имунизације ксенобиотиком присутна статистички значајно већа концентрација IL-6, IL-17 и IL-13 у поређењу са обе групе неимунизованих мишева (Графикон 14). Концентрација IFN- γ у серуму имунизованих WT мишева је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијом овог цитокина у серуму нетретираних WT мишева, али статистички значајне разлике у концентрацији IFN- γ у серуму нема између имунизованих и нетретираних Gal-3 КО мишева. Нема статистички значајне разлике у концентрацијама IFN- γ и IL-6 у серуму између ксенобиотиком имунизованих Gal-3 КО и WT мишева, али имунизовани Gal-3 КО мишеви у серуму имају значајно већу ($p < 0.05$) концентрацију профибротских цитокина IL-13 и IL-17 (Графикон 14).

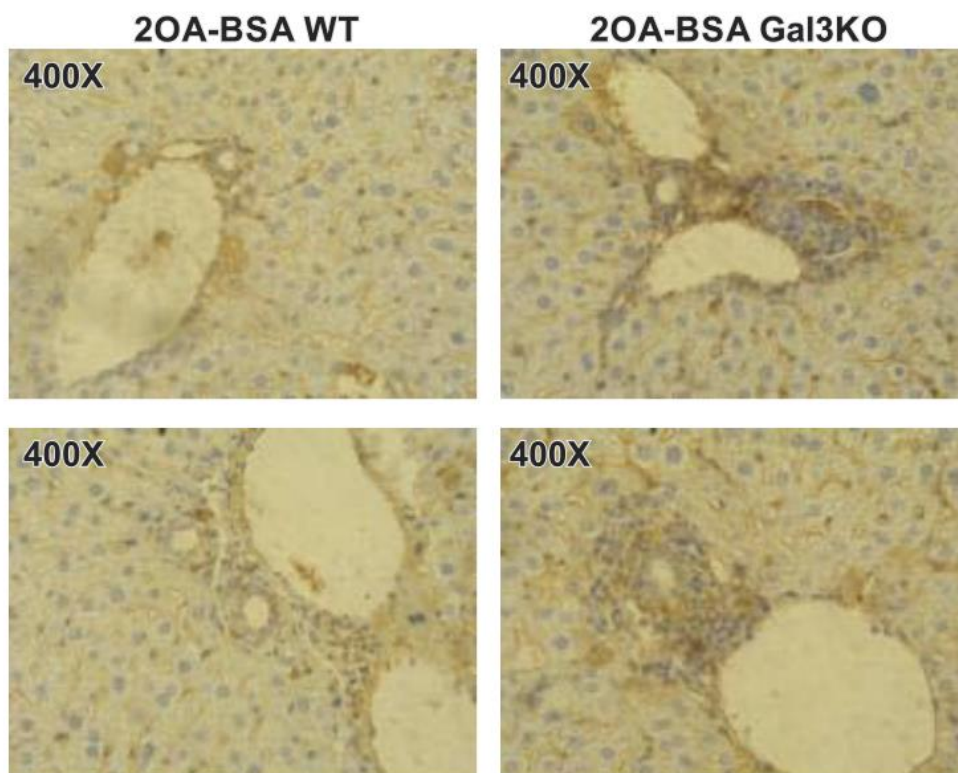
4.9.2. Gal-3 дефицијентни мишеви имунизовани ксенобиотиком развијају значајнију фиброзу јетре

Слика 12 илуструје имунохистохемијску експресију цитокератина 7. Уочава се мања експресија цитокератина 7 у исечцима јетре Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком што указује на израженије оштећење ових ћелија. Како оштећење ткива јетре прати фиброза испитано је да ли је веће оштећење ткива јетре у групи имунизованих Gal-3 дефицијентних праћено и израженијом фиброзом, Исечци јетре имунизованих мишева су обојени техником *Sirius red* и анализиран је проценат ткива јетре захваћен фиброзним процесом. На графикону 15 се види да је статистички значајно већи ($p < 0.005$)

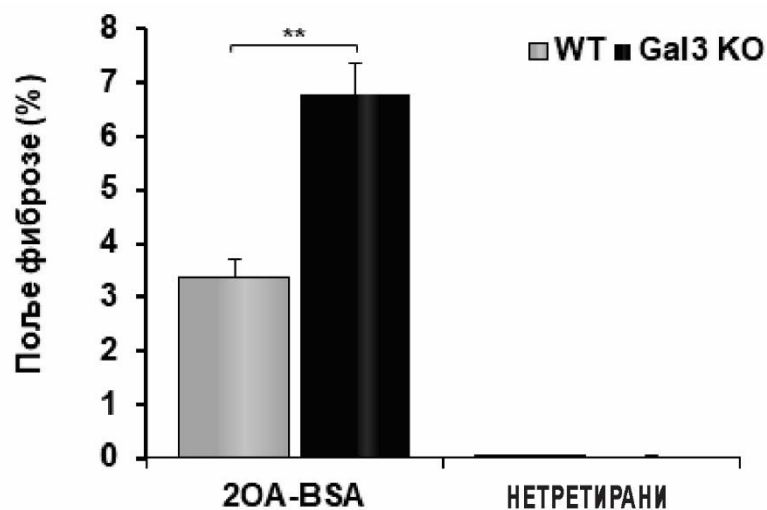
процент ткива јетре захваћеним фиброзом у групи имунизованих Gal-3 дефицијентних мишева, што је илустровано сликом 13.



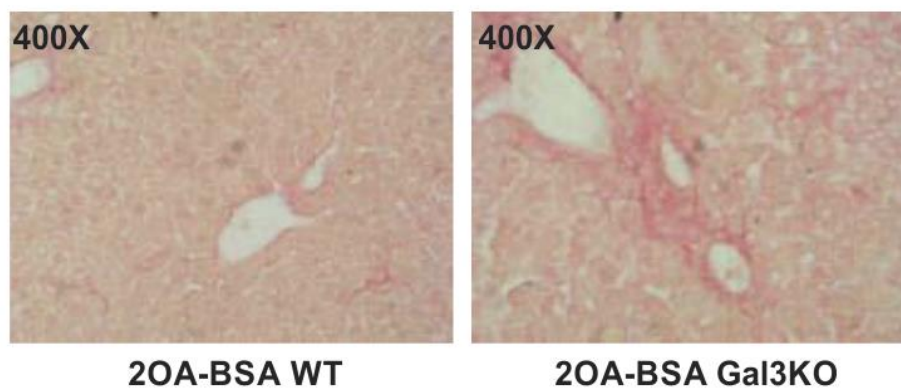
Графикон 14. Делеција Gal-3 је повезана са повећаном концентрацијом профибротских цитокина IL-13 и IL-17 у серуму мишева са PBC индукованим ксенобиотиком. Концентрација IL-13, IL-6, IL-17 и IFN-γ у серуму мишева је одређена ELISA методом 56. дана после имунизације ксенобиотиком. Приказане су вредности концентрације цитокина у серуму за сваког миша појединачно. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t $*p < 0.05$.



Слика 11. Репрезентативни примери експресије цитокератина 7 у јетри имунизованих мишева.



Графикон 15. Процент ткива јетре захваћен фиброзом је већи у групи Gal-3 дефицијентних имунизованих мишева. Приказана је средња вредност +SE процента ткива захваћеног фиброзом израчунат анализом исечака јетре обојених техником Sirius red у Image J. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t $**p < 0.005$.



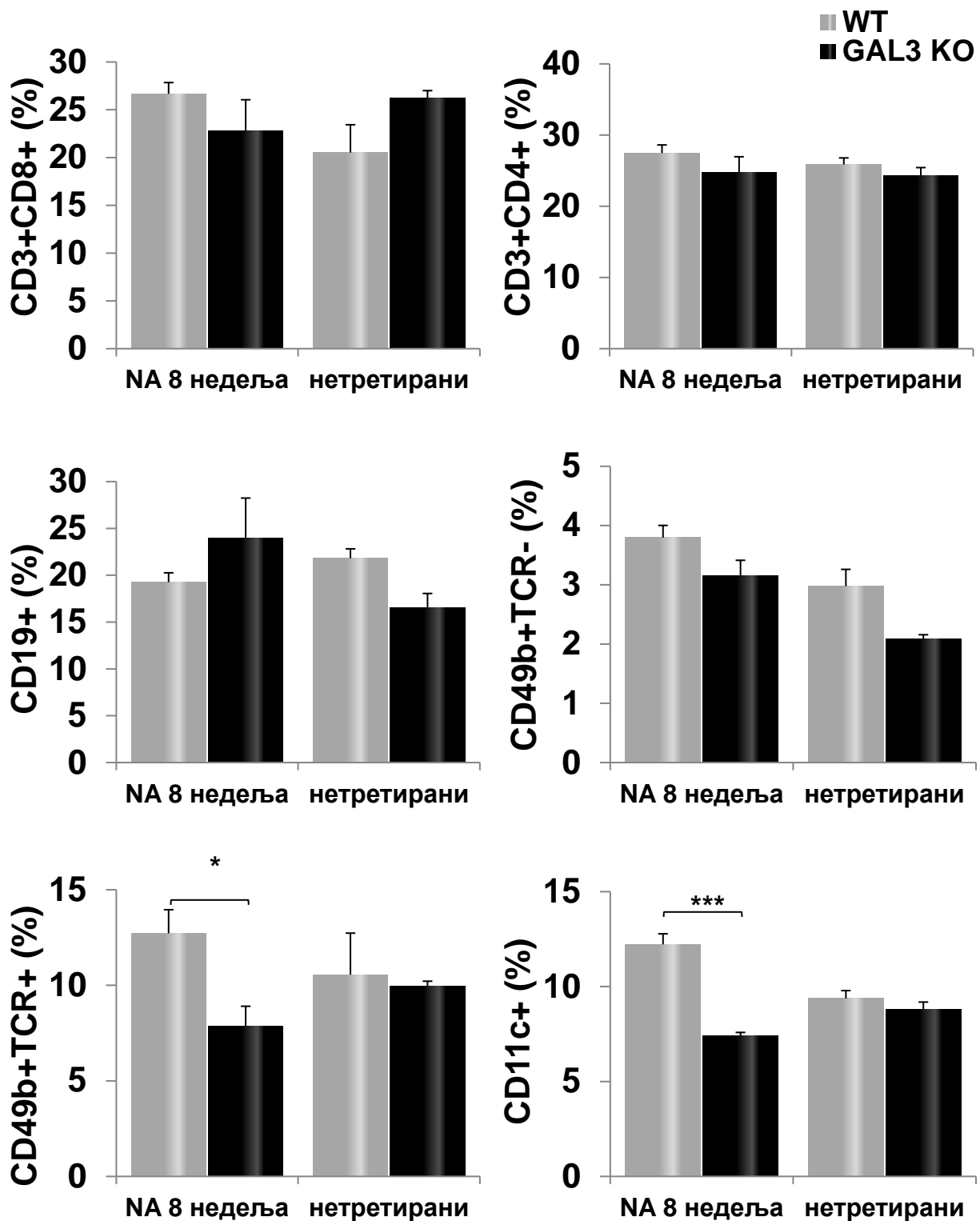
Слика 12. Репрезентативни примери исечака јетре имунизованих мишева обојених техником Sirius red.

4.10. Одсуство галектина 3 значајно смањује проценат дендритских и НК ћелија и редукује проценат Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетри мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

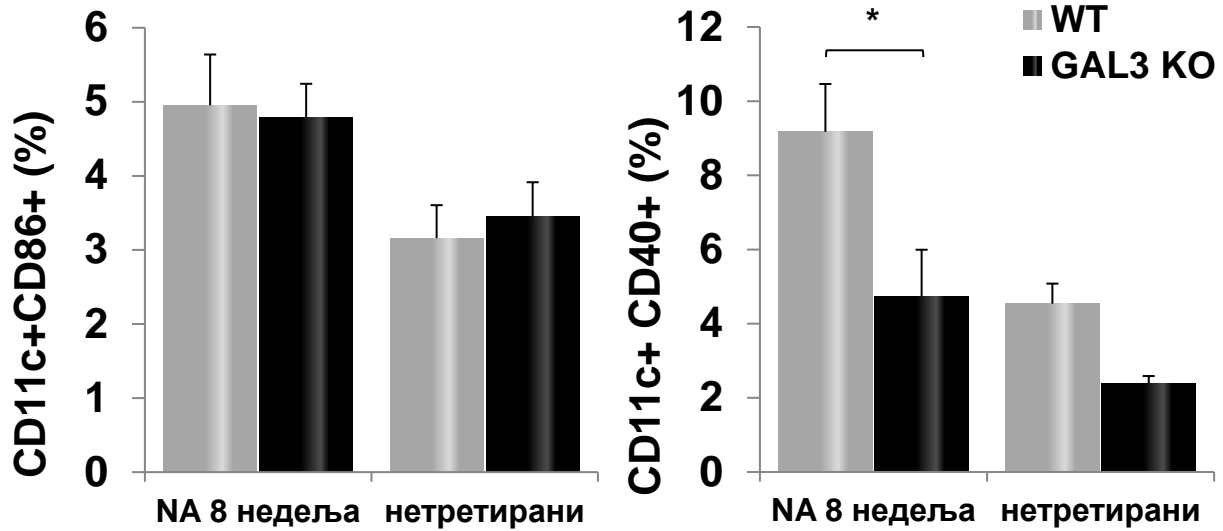
Како је показано да је дефицијенција галектина 3 удржена са значајном редукцијом оштећења билијарних канала и ткива јетре даље су детаљније испитане карактеристике болести коју развијају мишеви инфицирани бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* (NA). Проточном цитометријом је анализиран састав инфилтрата у ткиву јетре 8 недеља после NA инфекције. Забележене су значајне разлике у процентуалној заступљености ћелија урођене имуности у инфилтратима између WT и галектин-3 дефицијентних мишева, које нису забележене међу групама мишева имунизованих ксенобиотиком. Иако постоје значајне разлике у тежини болести између WT и галектин-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком, међу њима нема разлике у саставу инфилтрата јетре, постоји само већи апсолутни број појединих ћелијских популација.

У инфилтратима јетре галектин-3 дефицијентних мишева 8 недеља после NA инфекције присутан је значајно мањи проценат НК и дендритских (CD11c+) ћелија (Графикон 16) у поређењу са групом WT. Мађу групама нема разлике у заступљености НКТ ћелија и CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т лимфоцита и CD19+ В лимфоцита.

Даљом анализом фенотипа дендритских ћелија показано је да је дефицијенција галектина 3 удружена са значајно мањим процентом активираних дендритских ћелија у јетри мишева инфицираних бактеријом (Графикон 17). Међу групама нема разлике у проценту дендритских ћелија које продукују IL-12 (графикон није приказан).



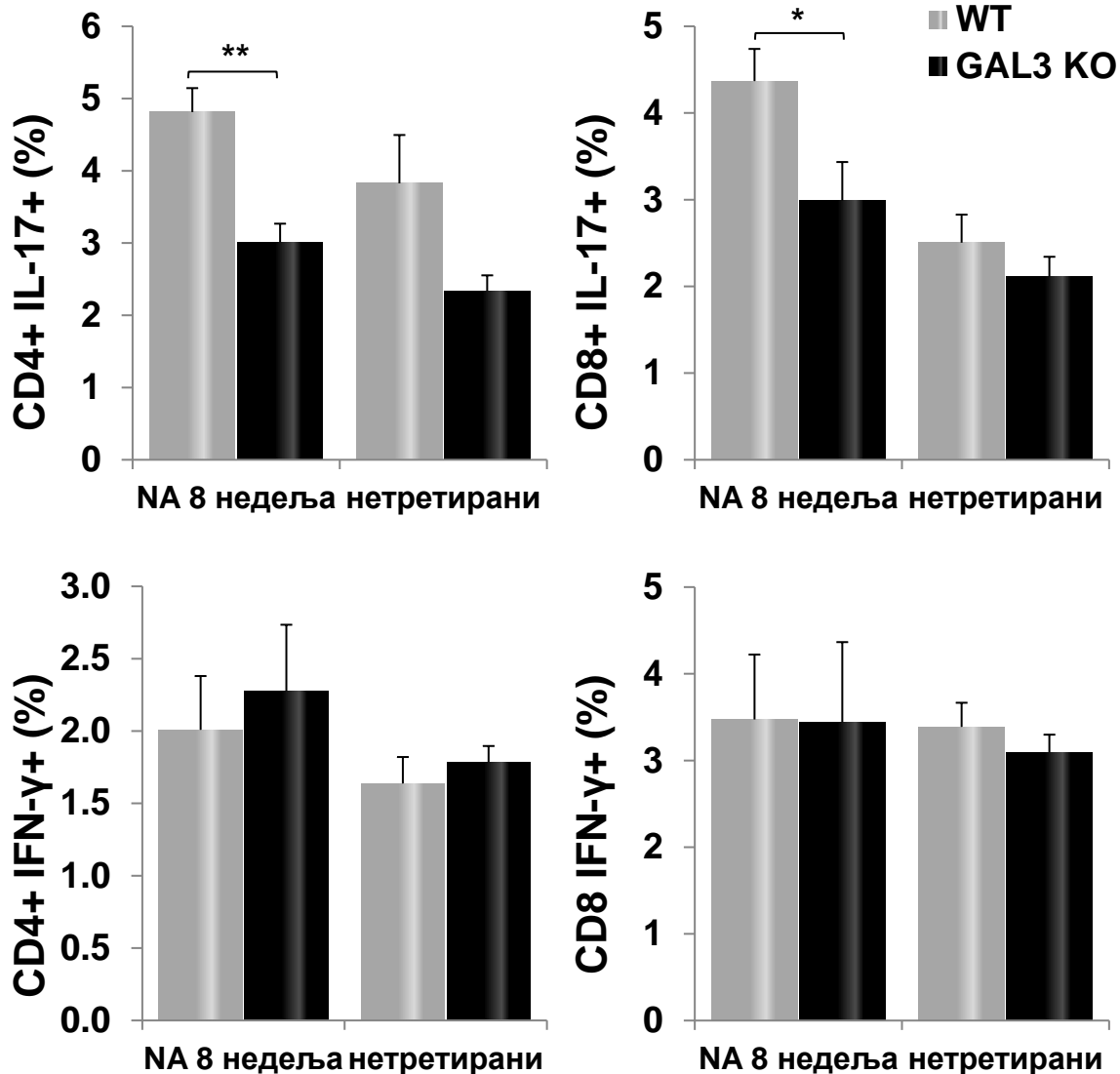
Графикон 16. У јетрама инфицираних Gal-3 KO мишева присутан је мањи проценат дендритских и NKT ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 8 недеља дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелијај по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.



Графикон 17. Одсуство галектина 3 је удружено са мањим процентом активираних CD40+ дендритских ћелија у јетри мишева инфицираних бактеријом. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 8 недеља дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности \pm SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом $*p < 0.05$ $***p < 0.001$.

Иако нема разлике у процентима CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т лимфоцита у јетрама галектин 3 дефицијентних и WT мишева инфицираних бактеријом анализа фенотипа ових ћелија је указала на постојање разлика.

Процент и CD4+ и CD8+ Т лимфоцита који садрже IL-17 је статистички значајно мањи у групи галектин 3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева инфицираних бактеријом (Графикон 18). Међу испитиваним групама нема разлике у проценту Т лимфоцита који продукују IFN- γ . У јетри галектин 3 дефицијентних мишева инфицираних бактеријом нема пораста процента инфламацијских лимфоцита у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 18).



Графикон 18. Одсуство галектина 3 је удружено са мањим процентом инфламацијских, IL-17+, CD4+ и CD8+ лимфоцита у јетри мишева инфицираних бактеријом. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 8 недеља дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

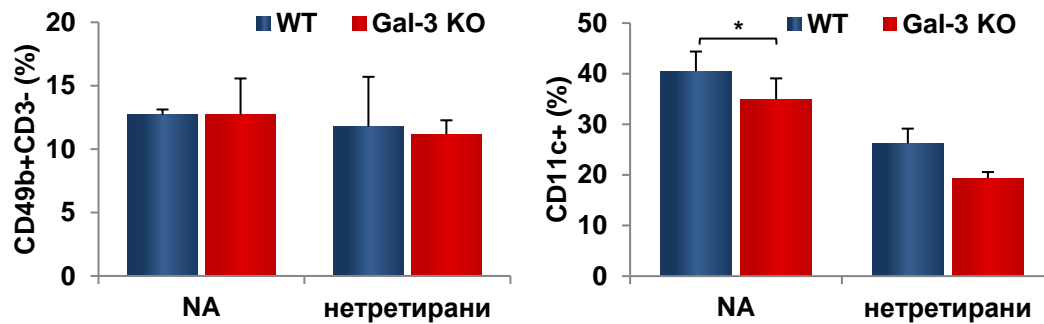
4.11. Галектин 3 модулише одговор дендритских а не НК ћелија на *Novosphingobium aromaticivorans*

До сада је показано да одсуство галектина 3 чини C57BL/6 мишеве готово резистентним на индукцију РВС бактеријом Узимајући у обзир ову чињеницу као и уочене разлике у заступљености ћелија урођене имуности у јетри међу испитиваним групама, наредним експериментима су испитане фенотипске разлике дендритских и НК ћелија три дана након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. С обзиром да се испитује веома рана фаза имунског одговора на бактерију и да се бактерија апликује интраперитонеално и да је још увек није јасно да ли се имунски одговор који покреће развој РВС дешава у јетри или слезини анализирани су наведене популације у јетри и слезини WT и Gal-3 дефицијентних мишева.

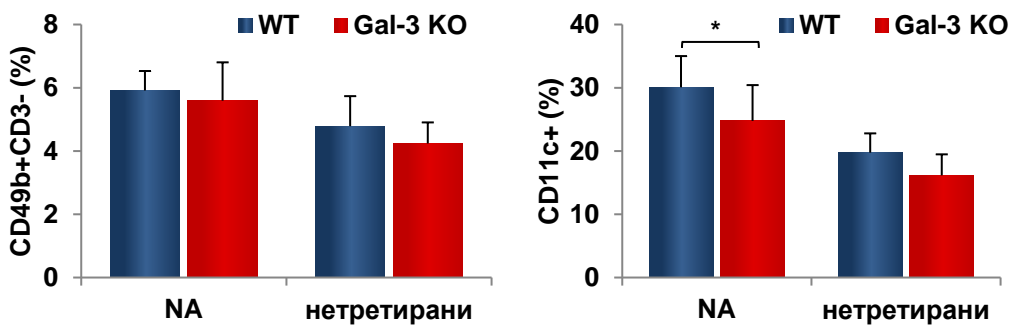
Три дана после инфекције бактеријом нема разлике у проценту НК ћелија у јетри и слезини, али је проценат дендритских CD11c⁺ ћелија статистички значајно већи ($p < 0.05$) и у јетри и у слезини у групи инфицираних WT мишева у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева (графикон 19).

Даљом анализом фенотипа НК ћелија (CD49b⁺CD3⁻) рано по инфекцији бактеријом уочено је да поред тога што нема разлике у заступљености ових ћелија у јетри и слезини WT и Gal-3 дефицијентних мишева, међу групама нема разлике ни у заступљености НК ћелија које експримирају маркере цитотоксичности (перфорин гранзим В), проинфламацијске цитокине (IFN- γ , IL-17), маркере активације (NKG2D, KLRG1) (подаци нису приказани).

Јетра



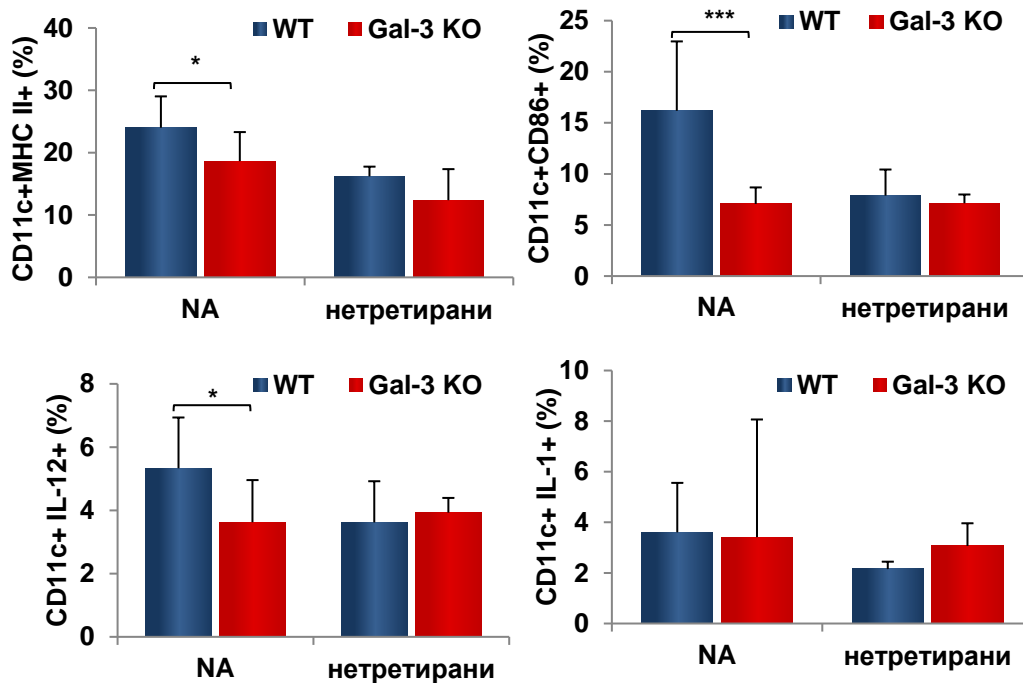
Слезина



Графикон 19. Три дана по инфекцији бактеријом проценат дендритских ћелија у јетри и слезини WT мишева је значајно већи у поређењу са Gal-3 дефицијентним мишевима. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре и слезине три дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD процента испитиваних ћелијај по групи са укупно 6 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом $*p < 0.05$.

4.11.1. Дендритске ћелије јетре и слезине Gal-3 дефицијентних мишева три дана након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* имају израженији инфламацијски фенотип у поређењу са WT мишевима

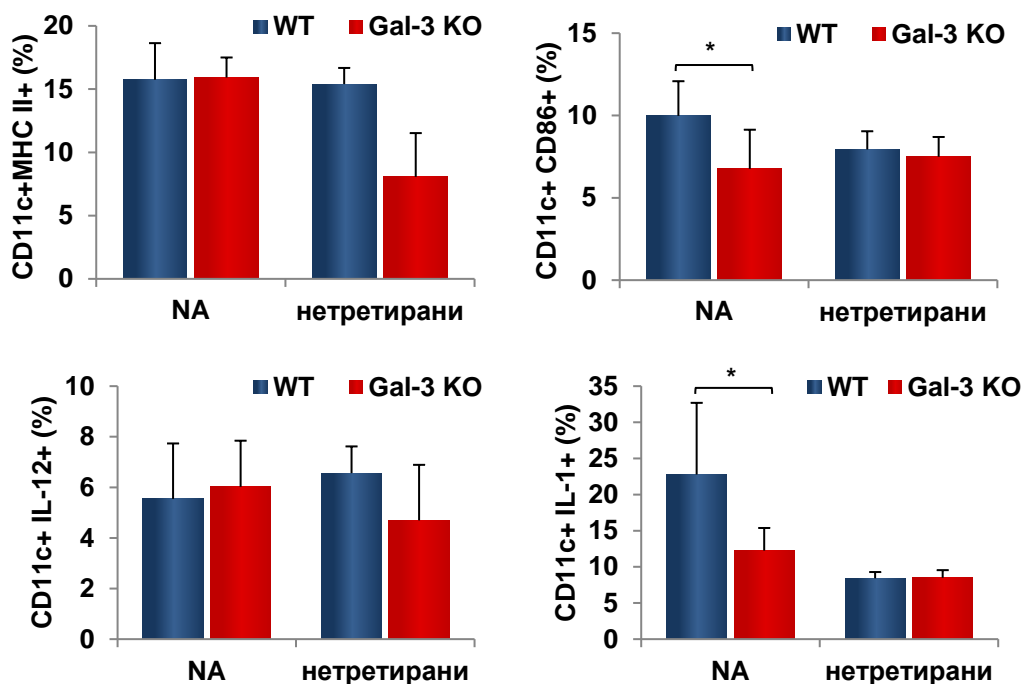
У слезини WT мишева је три дана по инфекцији бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* забележен значајно већи проценат активираних дендритских ћелија, које експримирају CD86 ($p < 0.05$) и МНС II ($p < 0.001$) (Графикон 20). Такође у слезини инфицираних WT мишева у поређењу са Gal-3 дефицијентним мишевима је присутан и значајно већи проценат дендритских ћелија које експримирају проинфламацијски цитокин IL-12, а међу групама нема разлике у проценту IL-1+ CD11c+ ћелија (Графикон 20).



Графикон 20. Слезине Gal-3 дефицијентних мишева три дана после инфекције бактеријом садрже значајно већи проценат активираних и IL-12+ дендритских ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре и слезине три дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD процента испитиваних ћелија по групи са укупно 6 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

Јетре инфицираних WT мишева садрже у поређењу са инфицираним Gal-3 дефицијентним мишевима значајно већи проценат ($p < 0.05$) дендритских ћелија које експримирају маркер

активације CD86 и проинфламацијски цитокин IL-1 (Графикон 31). Међу инфицираним Gal-3 дефицијентним и WT мишевима у јетри нема разлике у проценту дендритских ћелија које експримирају MHC II и проинфламацијски цитокин IL-12 (Графикон 21).



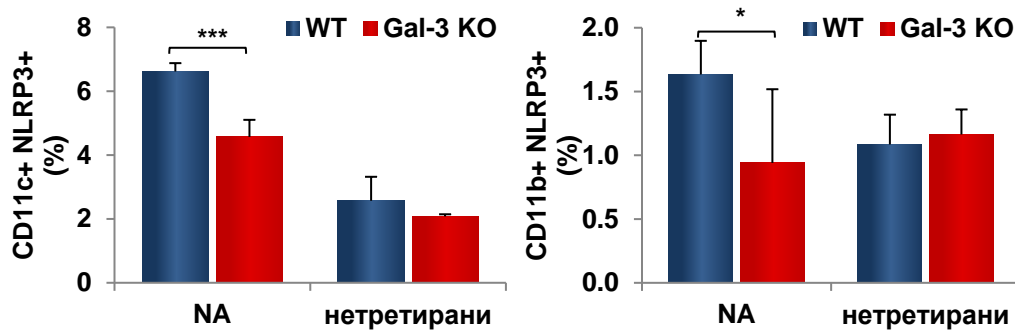
Графикон 21. Јетре WT мишева три дана после инфекције бактеријом садрже значајно већи проценат CD86+ и IL-12+ дендритских ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре и слезине три дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD процента испитиваних ћелија по групи са укупно 6 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$.

Како је међу испитиваним групама инфицираних мишева уочена значајна разлика у проценту IL-1 у јетри, а и познато је да Gal-3 активира инфламацију даље је проточном цитометријом међу мононуклеарним ћелијама изолованим из јетре и слезине анализиран проценат дендритских CD11c и мијелоидних CD11b ћелија које садрже NLRP3.

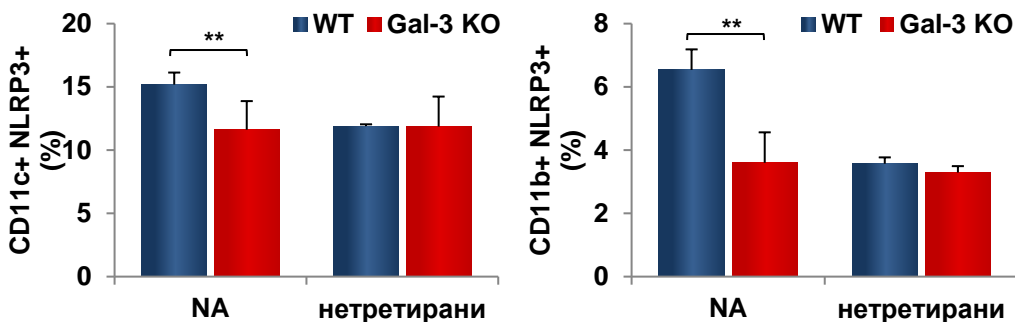
Како се уочава на графикону 22 проценат и дендритских CD11c+ и мијелоидних CD11b+ ћелија које садрже NLRP3 је статистички значајно већи у групи WT мишева садрже у поређењу са инфицираним Gal-3 дефицијентним мишевима. У оба органа се уочава да, ако се упореде популације ћелија које експримирају NLRP3, овај молекул више експримирају дендритске CD11c+ ћелија него CD11b+ ћелије. Такође много већи проценти NLRP3+ и

CD11c+ и CD11b+ ћелија су присутни у јетри у поређењу са слезином. У групи Gal-3 дефицијентних мишева три дана након инфекције бактеријом уопште и нема пораста заступљености ћелија које експримирају NLRP3, ни у јетри ни у слезини (Графикон 22).

Слезина



Јетра



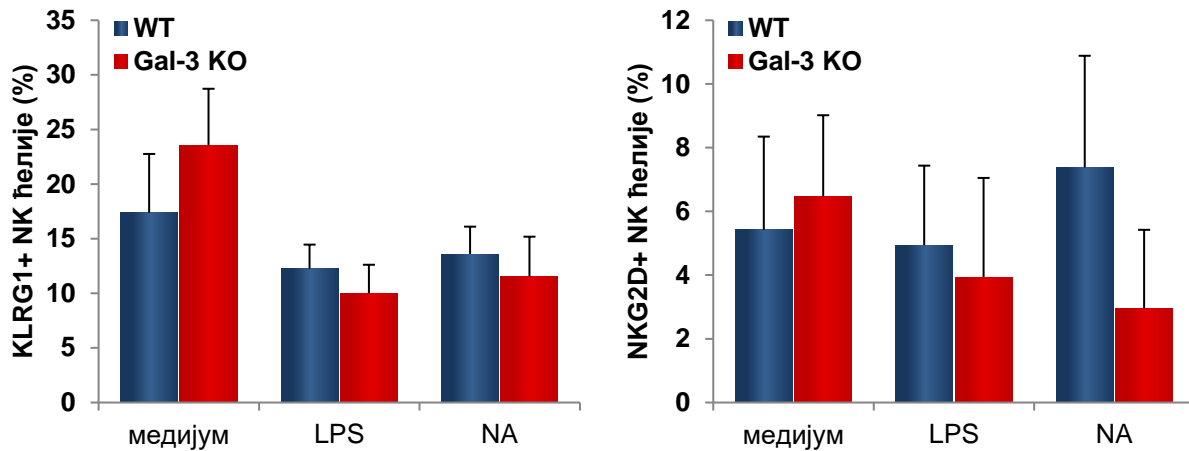
Графикон 22. Инфекција бактеријом значајно повећава проценат мијелоидних и дендритских ћелија WT мишева које експримирају NLRP3. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре и слезине три дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD процента испитиваних ћелиј по групи са укупно 6 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$

4.11.2. Већи проценат дендритских ћелија изолованих из слезина Gal-3 дефицијентних мишева по *in vitro* стимулацији бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* експримира маркере активације, проинфламацијске цитокине и компоненту инфлазома у поређењу са WT мишевима

Досадашњи резултати указују да је одсуство галектина 3 у раној фази развоја болести, три дана после инфекције, првенствено утиче на функционални фенотип дендритских ћелија и

јетре и слезине. Раније приказани резултати указују да је у каснијим фазама болести значајано повећање процента активираних инфламацијских НК ћелија у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са WT мишевима.

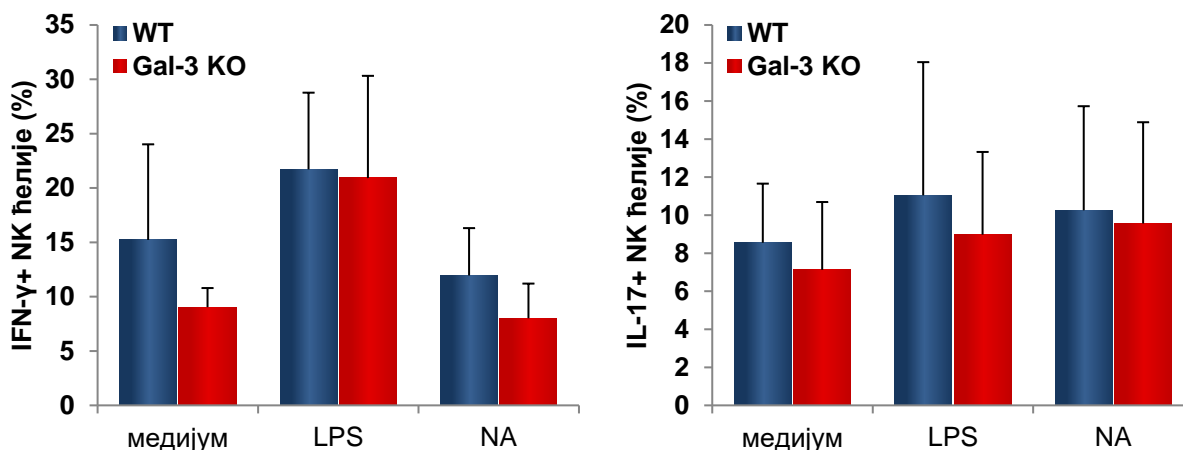
Како би утврдили директни ефекат бактерија на ћелије урођене имуности изоловане су НК ћелије изоловане из јетри нетретираних WT и Gal-3 дефицијентних мишева и дендритске ћелије из слезина истих мишева и *in vitro* третиране липополисахаридом и живом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* 24 сата. Након *in vitro* стимулације проточном цитометријом је испитивана експресија маркера активације и цитокина у поменутиим ћелијама.



Графикон 23. Галектин 3 не утиче на експресију активационих маркера на НК ћелијама након *in vitro* излагања бактеријама. НК ћелије су изоловане из јетри нетретираних животиња магнетном сепарацијом и *in vitro* излагане LPS-у (1 μ g/ml) и бактерији (однос 1:5) 24 сата и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD процент третираних ћелија које експримирају KLRG1 и NKG2D, 6 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом * $p < 0.05$.

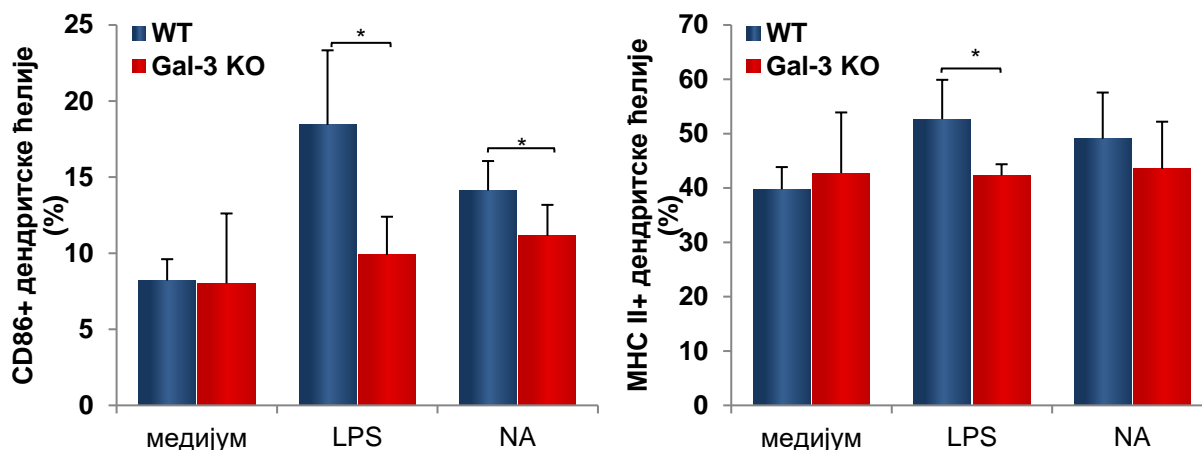
Нема разлике у проценту НК ћелија изолованих из јетри WT и Gal-3 дефицијентних мишева које експримирају маркере активације NKG2D и KLRG1, ни без стимулације, ни након стимулације ни липополисахаридом ни бактеријом (Графикон 23).

Као што се види на графикону 24 нема разлике ни у проценту ћелија изолованих из јетри WT и Gal-3 дефицијентних мишева које експримирају проинфламацијске цитокине IFN- γ и IL-17, ни на стимулацију липополисахаридом ни бактеријом.



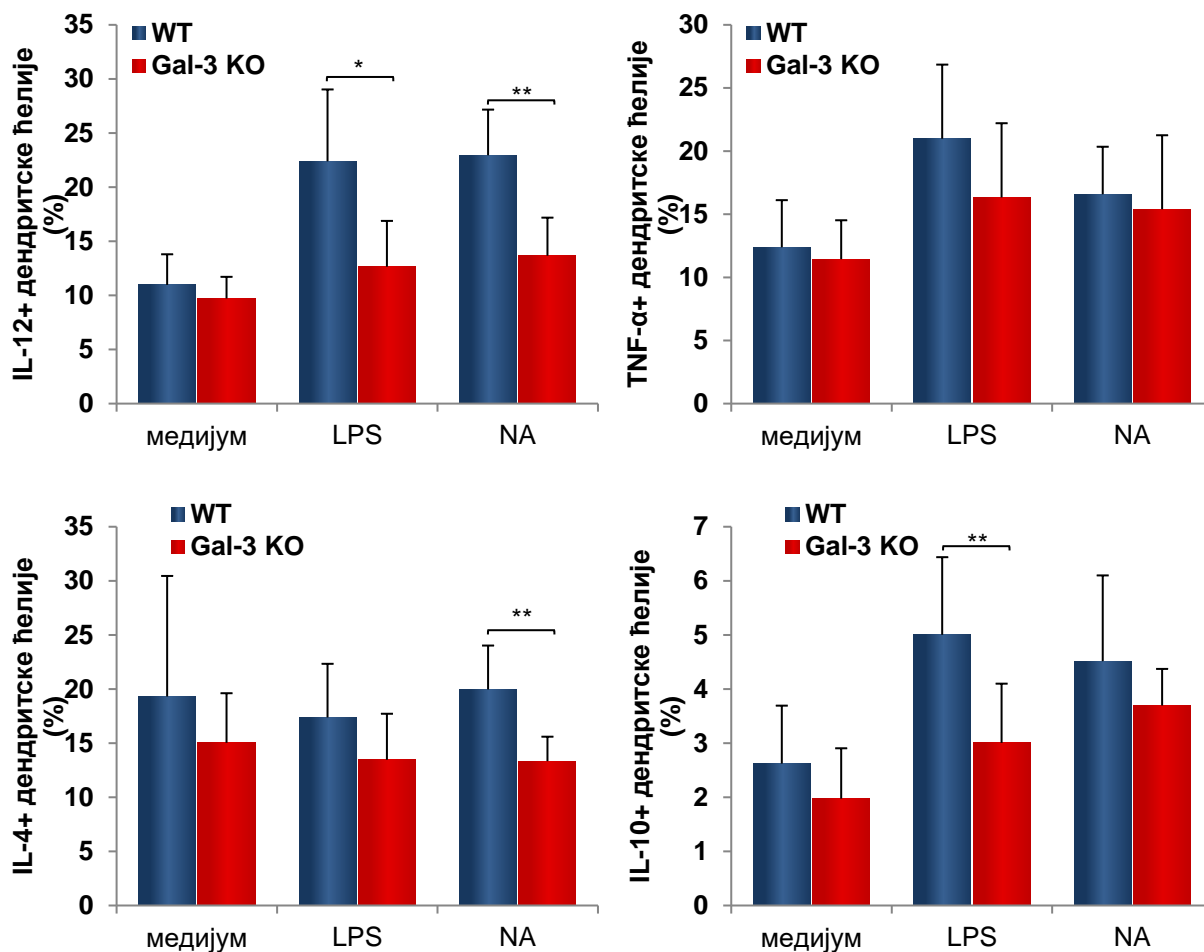
Графикон 24. Галектин 3 не утиче на продукцију инфламацијских цитокина у NK ћелијама након *in vitro* излагања бактеријама. NK ћелије су изоловане из јетри нетретираних животиња магнетном сепарацијом и *in vitro* излагане LPS-у (1 μg/ml) и бактерији (однос 1:5) 24 сата и анализиране проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD проценат третираних ћелија које експримирају IFN-γ и IL-17, 6 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом **p*<0.05.

Дендритске ћелије изоловане из WT мишева су на *in vitro* стимулацију липополисахаридом одговориле значајним (*p*<0.05) повећањем експресије маркера активације CD86 и МНС II, а у одговору на стимулацију бактеријом значајно је повећана (*p*<0.05) експресија само CD86 молекула (Графикон 25). Нема разлике у експресији наведених маркера активације међу нетретираним (медиијум) дендритским ћелијама изолованим из слезини WT и Gal-3 дефицијентних мишева.



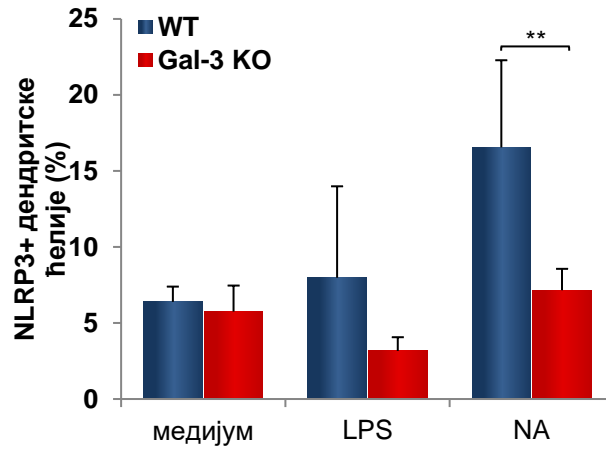
Графикон 25. Одсуство галектина 3 смањује експресију CD86 молекула након *in vitro* излагања дендритских ћелија бактеријама. Дендритске ћелије су изоловане из слезина нетретираних животиња магнетном сепарацијом и *in vitro* излагане LPS-у (1µg/ml) и бактерији (однос 1:5) 24 сата и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD проценат третираних ћелија које експримирају CD86 и MHC II, 6 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом * $p < 0.05$.

Такође, дендритске ћелије WT мишева су на *in vitro* стимулацију бактеријом одговориле значајно већом ($p < 0.005$) интрацелуларном експресијом цитокина IL-12 и IL-4 ($p < 0.05$) у поређењу са дендритским ћелијама Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 26). Међу групама нема разлике у проценту дендритских ћелија које експримирају цитокине TNF- α и IL-10 након стимулације бактеријом. Значајно већи проценат ($p < 0.05$) дендритских ћелија које експримирају галектин 3 је на стимулацију липополисахаридом одговорио продукцијом IL-12 и IL-10 (Графикон 26).



Графикон 26. Одсуство галектина 3 смањује продукцију IL-12 и IL-4 након *in vitro* излагања дендритских ћелија бактеријама. Дендритске ћелије су изоловане из слезина нетретираних животиња магнетном сепарацијом и *in vitro* излагане LPS-у (1 µg/ml) и бактерији (однос 1:5) 24 сата и анализирале проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD проценат третираних ћелија које експримирају цитокине IL-12, IL-4, TNF-α и IL-10; 6 мишевава по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Значајан налаз је и статистички значајно ($p < 0.005$) повећање процента дендритских ћелија изолованих из WT мишева које на *in vitro* стимулацију бактеријом експримирају NLRP3 (Графикон 27). Такође је већи проценат WT дендритских ћелија стимулираних LPS-ом у поређењу са ћелијама Gal-3 дефицијентних мишева експримирао NLRP3, али без статистичке значајности.



Графикон 27. *Одсуство галектина 3 смањује експресију NLRP3 након in vitro излагања дендритских ћелија бактеријама.* Дендритске ћелије су изоловане из слезина нетретираних животиња магнетном сепарацијом и in vitro излагане LPS-у (1µg/ml) и бактерији (однос 1:5) 24 сата и анализиране проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SD проценат третираних ћелија које експримирају NLRP3; 6 мишеваа по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

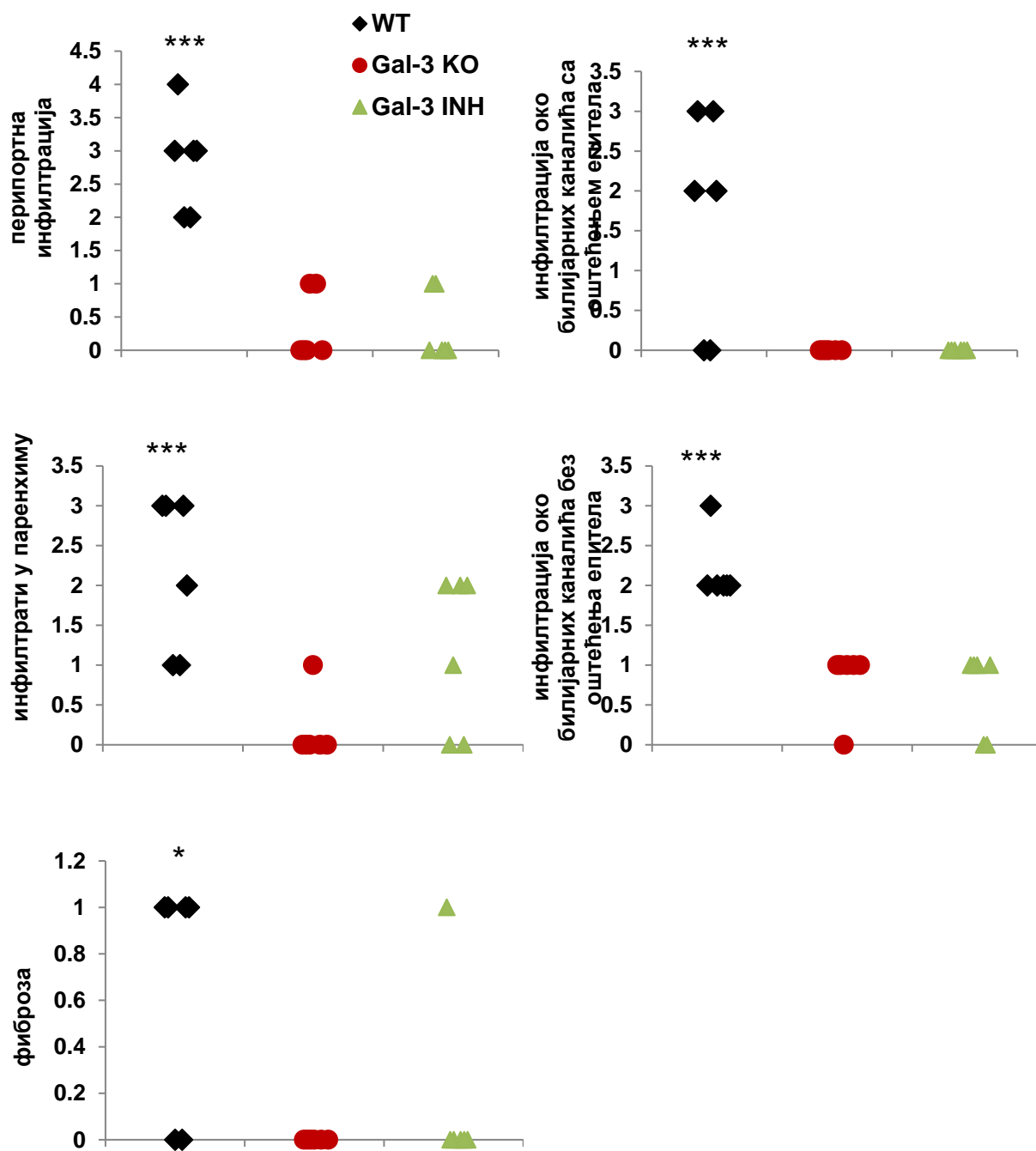
4.12. Инхибитор галектина-3 значајно смањује оштећење билијарних канала изазвано инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Након што је показано да делеција Gal-3 гена значајно смањује оштећење билијарних канала јетре мишева са PBC индукованим инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, а да је то мање оштећење праћено и мањим присуством дендритских и NK ћелија и инфламацијских Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетри, наредним експериментима је испитано да ли превентивна примена инхибитора галектина-3 (Gal-3INH) такође може да редукује оштећење билијарних канала код WT мишева.

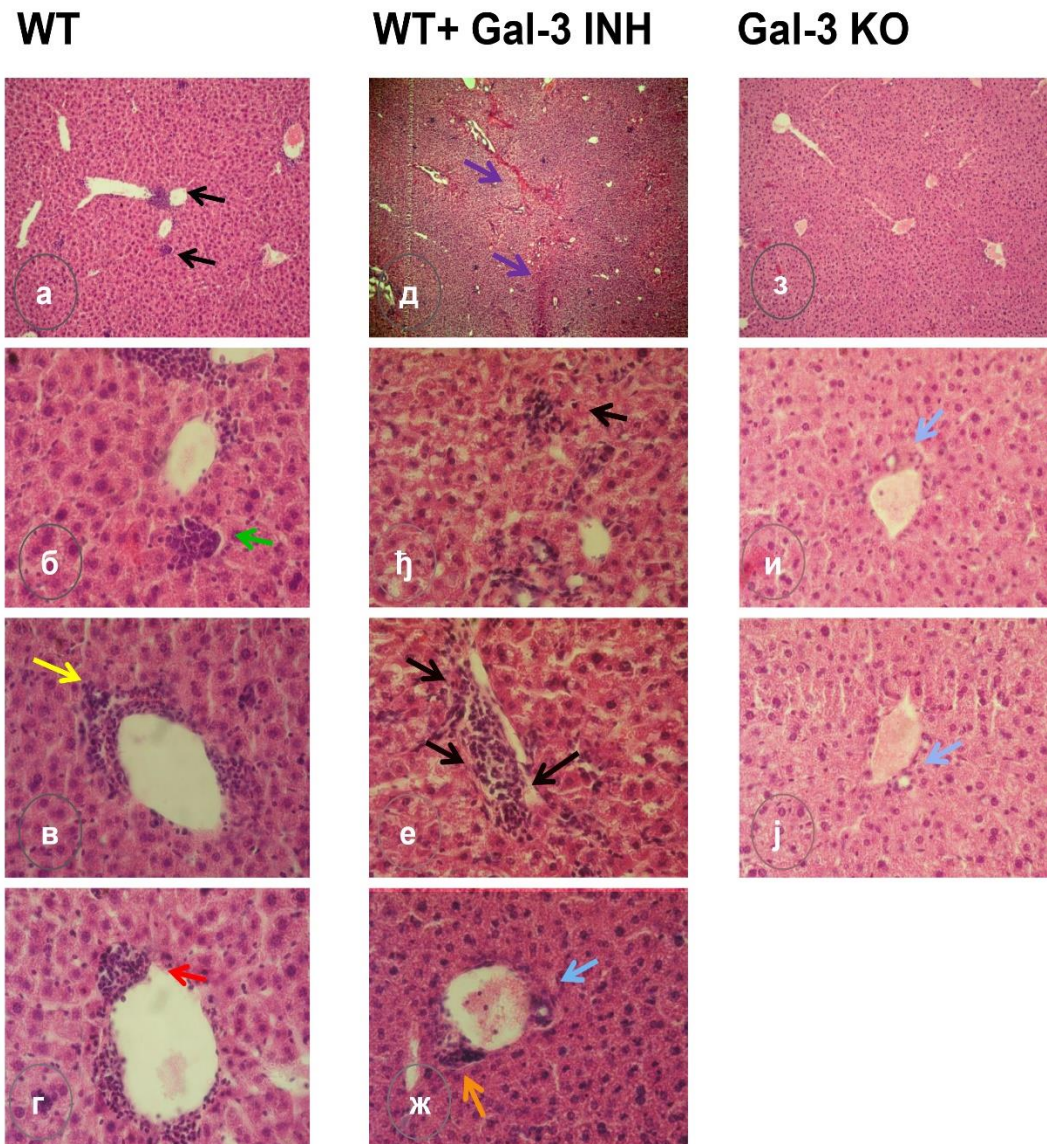
Како би се испитао утицај Gal-3INH на ток PBC након инфекције бактеријом уведена је група WT мишева који су недељно примали 300µg овог инхибитора интраперитонеално почев од првог дана инфекције, а у току прве 4 недеље, Хистолошки и серумски параметри болести као и састав инфилтрата са фенотипским карактерикама ћелија присутних и инфилтратима праћени су у групи мишева која прима инхибитор и упоређивани са групама инфицираних WT и Gal-3 KO.

У јетрама мишева третираних инфицираних бактеријом и третираних инхибитором галектина 3 је детектована значајно мања инфилтрација билијарних каналића (Графикон 28). У јетрама Gal-3 KO мишева четири недеље после инфекције бактеријом готово да нема никаквог инфилтрата (Графикон 28, Слика 13). У јетри WT мишева четири недеље после инфекције бактеријом се уочавају инфилтрати у паренхиму, око билијарних канала, као и облитерисани билијарни каналићи (Слика 13г). Четири недеље после инфекције бактеријом, мишеви третирани инхибитором развијају значајне инфилтрате у паренхиму јетре. Такође уочавају се тракаста поља некрозе у јетри мишева третираних 4 недеље инхибитором галектина 3 (Слика 13д) и периваскуларни инфилтрати (слика 13ж).

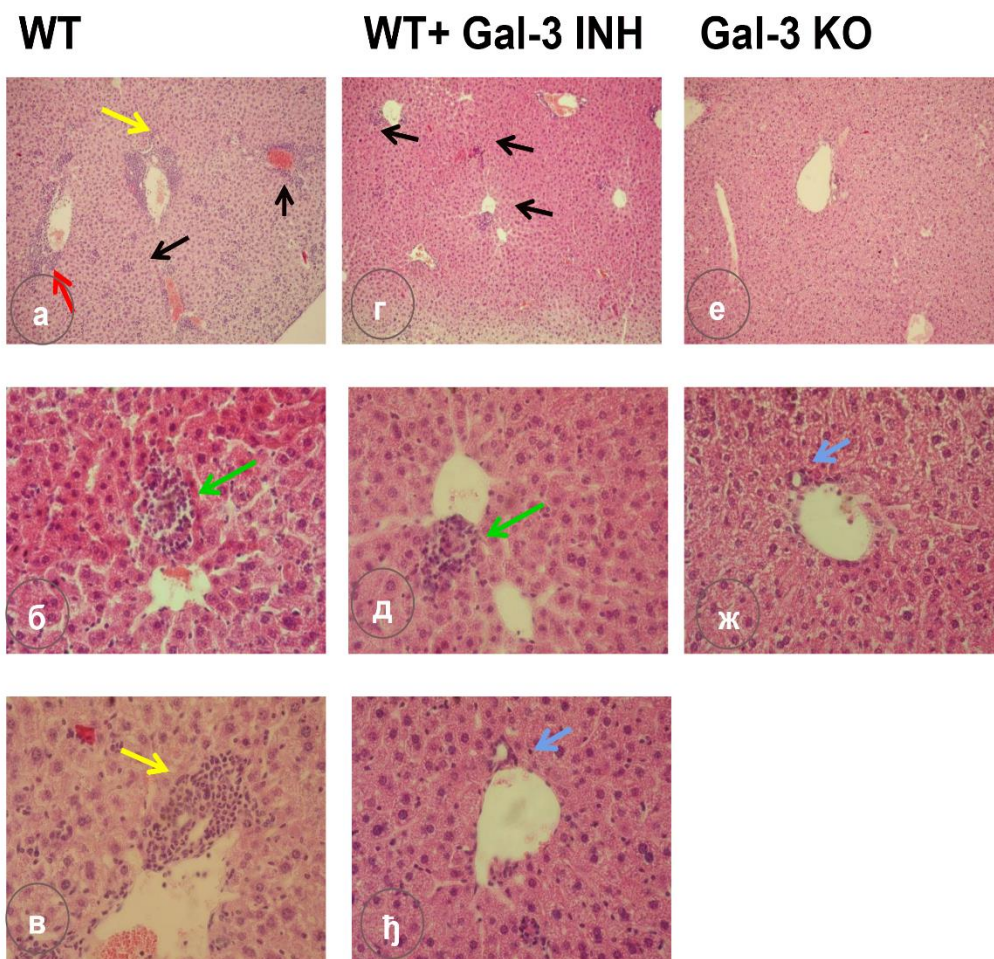
Перибилијарни инфилтрати се задржавају у јетрама WT мишева и 24 недеље после инфекције бактеријом, док Gal-3 KO мишева не развијају хистолошке параметре болести (Слика 14). У паренхиму ове групе мишева (WT) се 24 недеље након бактеријске инфекције уочавају грануломи у паренхиму (Слика 14). У јетрама мишева третираних инхибитором галектина-3 се 24 недеље од почетка индукције болести региструју само грануломи у паренхиму, нема поља некрозе нити инфилтрације билијарних каналића (Слика 14).



Графикон 28. Инхибитор галектина 3 значајно смањује оштећење билијарних каналића четири недеље после инфекције бактеријом. Ткиво јетре C57BL/6 WT и C57BL/6 Gal-3^{-/-} мишева је екстирпирано 28 дана после инфекције бактеријом NA, а исечци дебљине 5 μ m су обојени техником хематоксилин-еозин. Приказане су вредности хистолошког скора за сваког миша појединачно за испитиване хистолошке параметре. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом. *** $p < 0.001$.

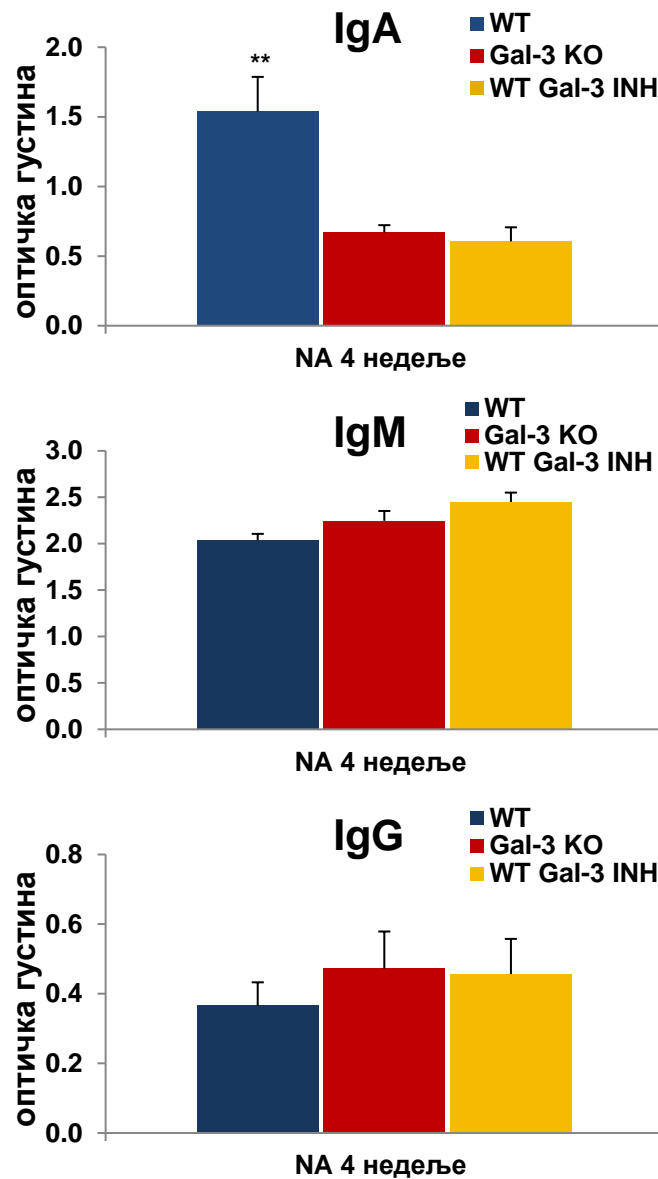


Слика 13. Хистологија јетре WT (а-г), WT+Gal-3 INH (д-ж) и Gal-3 KO (з-ј) мишева 28 дана по инфекцији бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Црне стрелице показују инфилтрације у паренхиму, жуте перидуктуларне инфилtrate, црвене облитерације билијарних канала, зелене организоване инфилtrate у паренхиму, љубичасте некротично оштећење паренхима, наранџасте периваскуларне инфилtrate, плаве каналиће без инфилтрације.



Слика 14. Хистологија јетре WT (а-б), WT+Gal-3 INH (з-ђ) и Gal-3 KO (е-ж) мишева 24 недеље по инфекцији бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*. Црне стрелице показују инфилтрације у паренхиму, жуте перидуктуларне инфилтрате, црвене облитерације билијарних канала, зелене грануломе у паренхиму, плаве каналиће без инфилтрације.

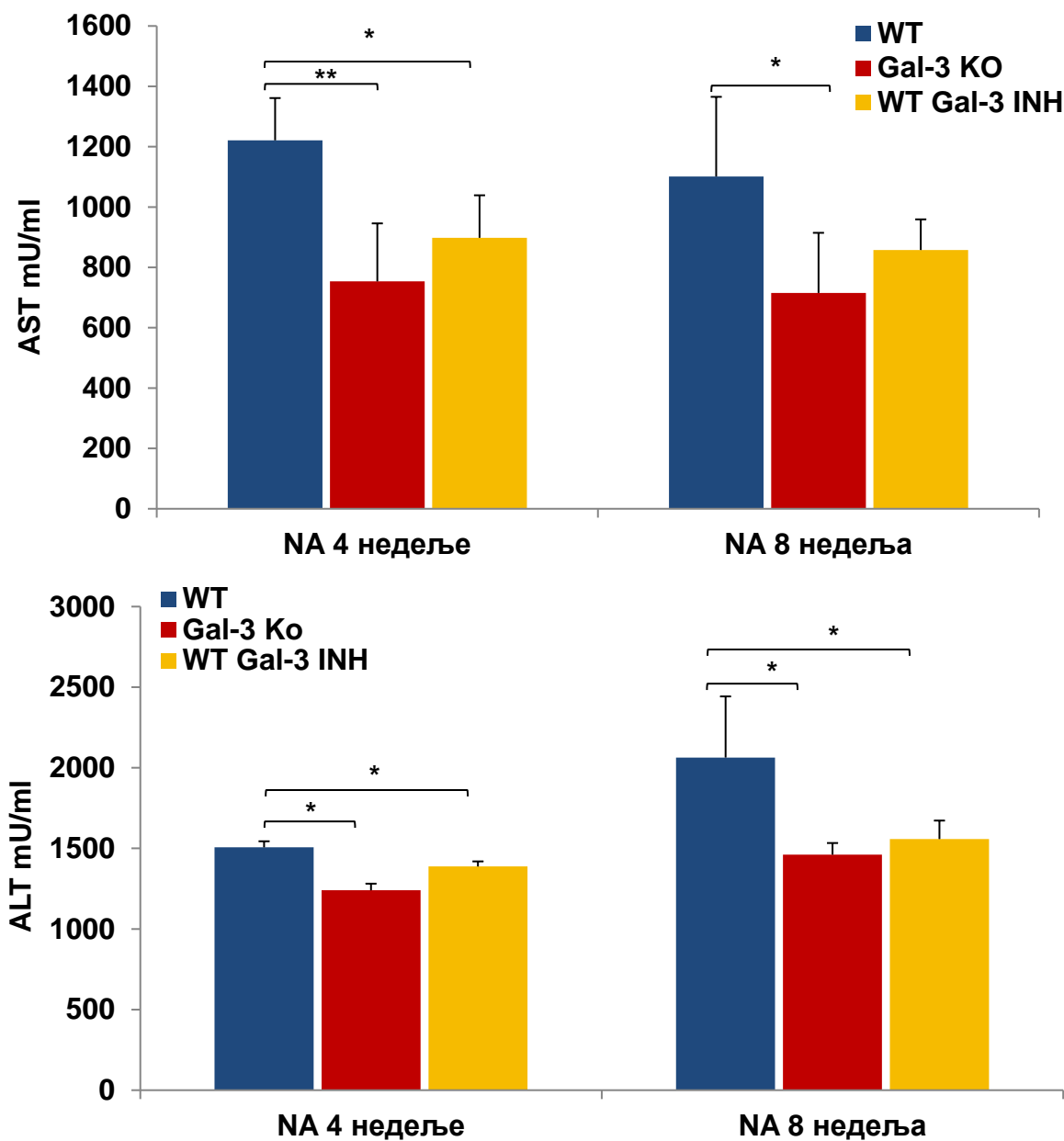
Детекцијом анти PDC-E2 антитела у серуму WT, WT+Gal-3 INH и Gal-3 KO мишева четири недеље после инфекције бактеријом је уочено да примена инхибитора галектина 3 значајно смањује ($p < 0.005$) количину анти PDC-E2 антитела класе А у серуму у поређењу са WT групом мишева (Графикон 20). Нема статистички значајне разлике у нивоу анти PDC-E2 антитела класе А у серуму WT+Gal-3 INH и Gal-3 KO мишева. Међу групама нема разлика у нивоу анти PDC-E2 антитела класе М и G (Графикон 28).



Графикон 28. У серумима WT мишева третираних инхибитором Gal-3 су, 4 недеље након инфекције бактеријом, детектоване значајно мање концентрације антитела класе А специфичних за PDC-E2. Серумске концентрације анти

PDC-E2 антитела, 4 недеље после инфекције бактеријом, одређене *ELISA* методом приказане су као средња вредност за 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена *Student*-овим *t* тестом; $**p < 0.005$.

Даља анализа биохемијских параметара у серуму је указала на значајно смањење оштећења јетре у групи мишева третираних инхибитором галектина-3 у поређењу са нетретираним WT мишевима инфицираних бактеријом.



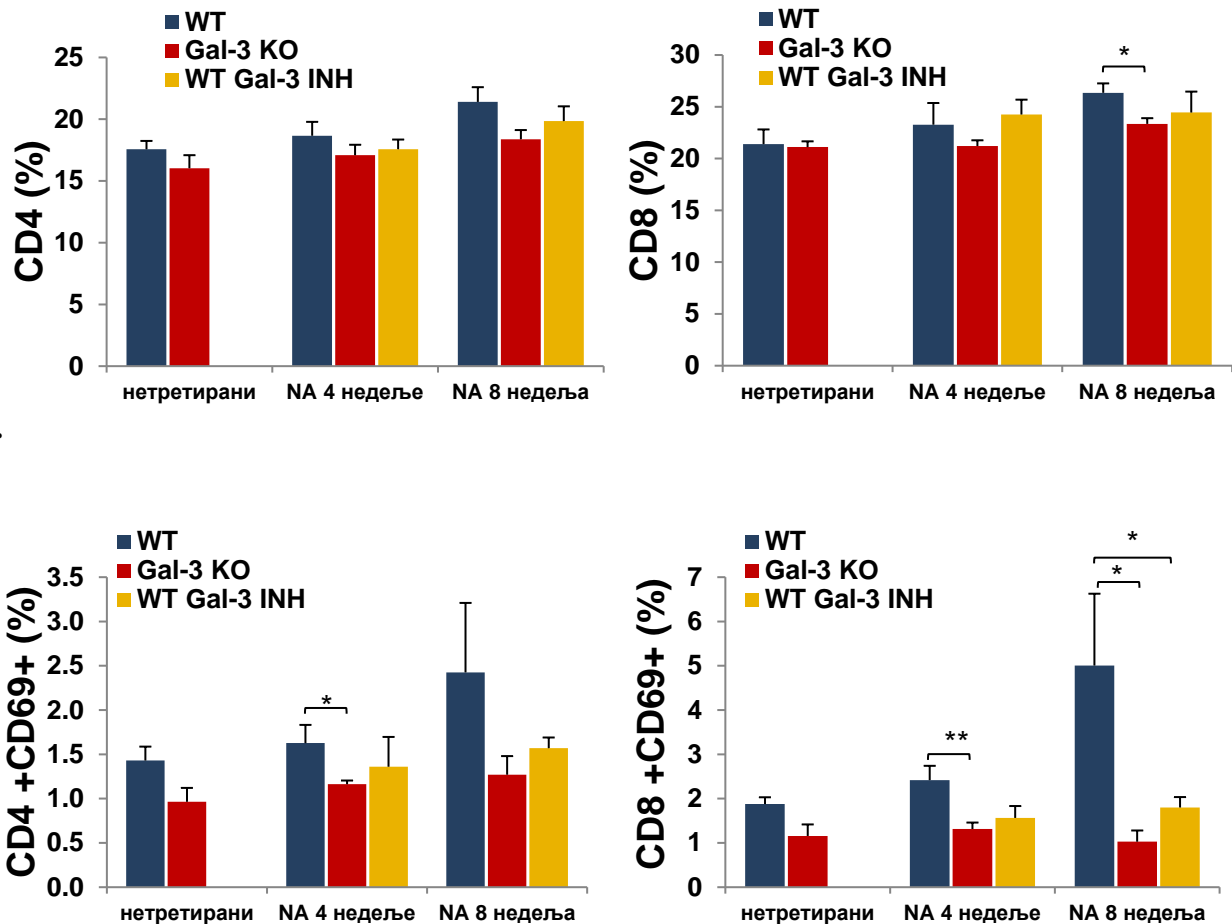
Графикон 29. Концентрација AST и ALT је значајно мања у серуму инфицираних мишева третираних инхибитором галектина-3. Серумске концентрације ензима јетре су мерене 4 недеље после инфекције бактеријом колориметријском методом. Приказана је средња вредност (+SD) концентрације AST и ALT за укупно 5 мишева по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Као што се види на графикону 29 концентрација AST и ALT је статистички значајно мања у серуму инфицираних мишева третираних инхибитором галектина-3 у поређењу са нетретираним инфицираним мишевима четири недеље после инфекције. И осме недеље после инфекције концентрација оба ензима је и даље мања у серуму мишева третираних инхибитором галектина-3 у поређењу са групом нетретираних WT мишева али је статистички значајна само за ALT (Графикон 29).

4.12.1. Примена Gal-3 INH значајно смањује заступљеност и проценат активираних CD8⁺ лимфоцита у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Како је показано да примена инхибитора галектина-3 значајно смањује како ошећење билијарних канала тако и серумске параметре болести индуковане бактеријском инфекцијом у даљем току је испитано да ли примена инхибитора утиче на заступљеност и фенотип Т лимфоцита у инфилтратима јетре.

Није показана разлика у процентима CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита у јетрама мишева третираних инхибитором галектина-3 и нетретираних животиња као и у поређењу са остале две групе инфицираних мишева (WT Gal-3 и KO) како четврте тако и 8. недеље после инфекције бактеријом (Графикон 30). Међутим, даља анализа је показала да је проценат активираних CD8⁺CD69⁺ лимфоцита статистички значајно мањи ($p < 0.05$) у јетри мишева третираних инхибитором галектина-3 у поређењу са процентом ових ћелија у групи нетретираних WT мишева 8. недеље после инфекције бактеријом (Графикон 30). Исти ефекат има и делеција гена за Gal-3, ови мишеви имају статистички значајно мањи проценат CD8⁺CD69⁺ лимфоцита у поређењу са WT мишевима и четврте ($p < 0.005$) и 8. недеље ($p < 0.05$) после инфекције бактеријом.

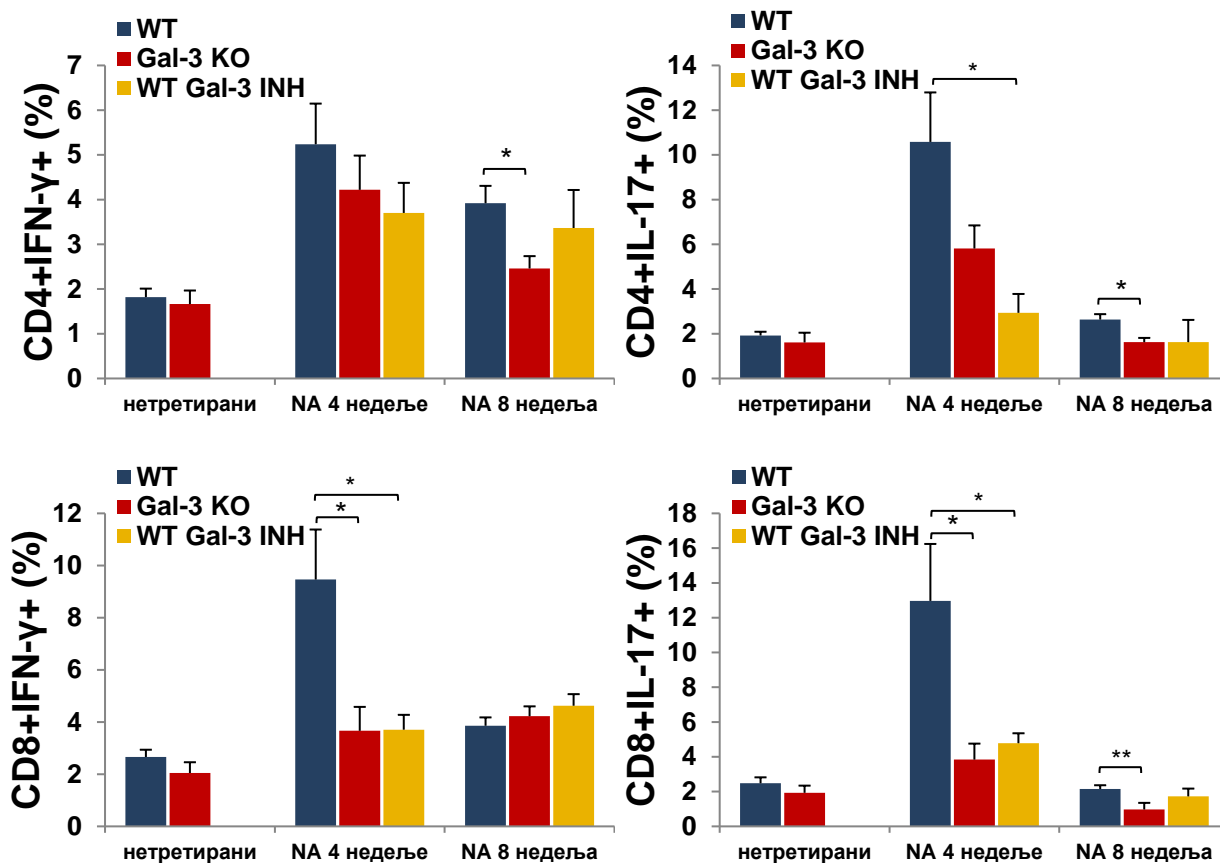


Графикон 30. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат активираних CD8+ лимфоцита у јетри. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четири и 8 недеља после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

4.12.2. Примена Gal-3 INH значајно смањују заступљеност инфламацијских лимфоцита у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Како у патогенези РВС учествују Т лимфоцити који продукују Т1 и Т17 тип цитокина даље је анализиран утицај примене инхибитора галектина-3 на присуство проинфламацијских IL-17+ и IFN- γ + CD4+ и CD8+ лимфоцита у јетри све три групе мишева. Показано је значајно ($p < 0.05$) смањење процента CD4+ и CD8+ лимфоцита који продукују IL-17 и CD4+ лимфоцита који продукују IFN- γ у јетри мишева третираних инхибитором галектина-3 у

поређењу са процентом ових ћелија у јетри нетретираних WT мишева, четири недеље после инфекције бактеријом (Графикон 31). Сличне разлике су забележене и међу групама WT и Gal-3 дефицијентних мишева четири недеље после инфекције.

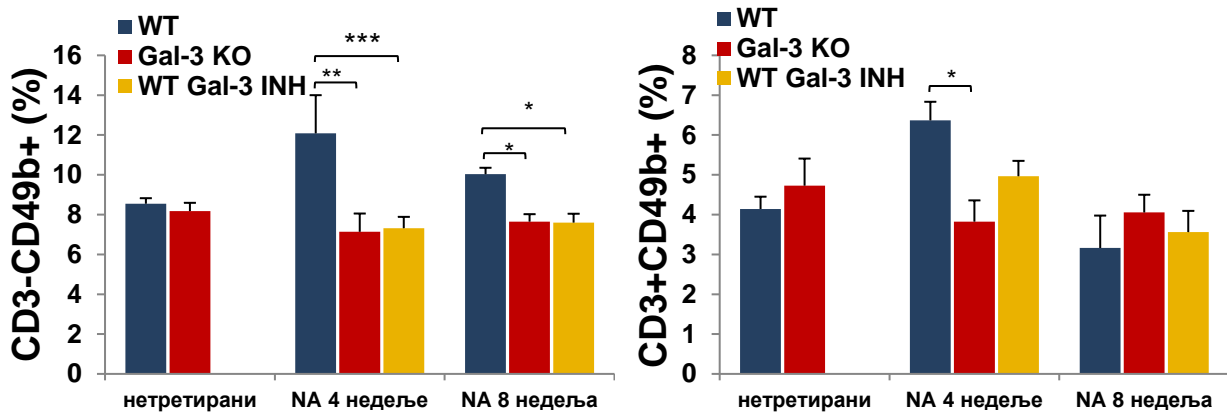


Графикон 31. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат инфламацијских IL-17+ лимфоцита у јетри. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четири и 8 недеља после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности ±SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

Осам недеља после инфекције проценат инфламацијских лимфоцита је и даље мањи у групи мишева третираних инхибитором у поређењу са групом нетретираних WT али не достиже статистичку значајност. Процент инфламацијских CD4+ и CD8+IL-17+ лимфоцита је 8 недеља после инфекције мањи у групи Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева.

4.12.3. Примена Gal-3 INH значајно смањује заступљеност NK ћелија у инфилтратима јетре мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Како је раније показано да је слабије изражен PBC у групи Gal-3 дефицијентних мишева праћен статистички значајно мањим процентом NK ћелија даље је испитан утицај примене инхибитора галектина-3 на присуство ових ћелија у јетри. Као што се види на Графикону 32 и примена инхибитора галектина-3 као и делеција гена за галектин-3 значајно смањују проценат NK ћелија у јетри и четири и 8 недеља после инфекције бактеријом.



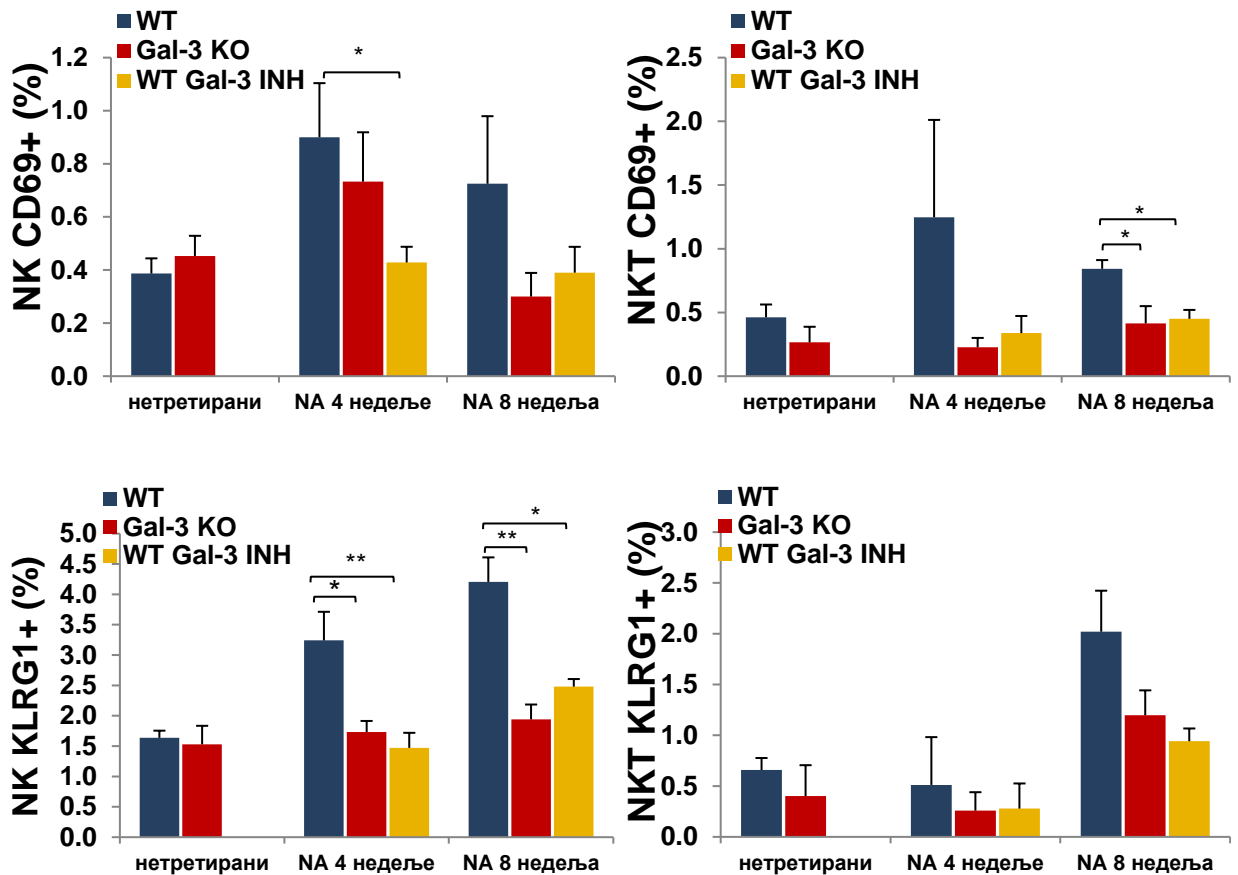
Графикон 32. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат NK ћелија у јетри. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четири и 8 недеља после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

Процент NKT ћелија је статистички значајно мањи у групи Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева само четврте недеље после бактеријске инфекције (Графикон 32).

4.12.4. Примена Gal-3 INH значајно смањује проценат активираних и цитолитичких NK ћелија у јетри мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

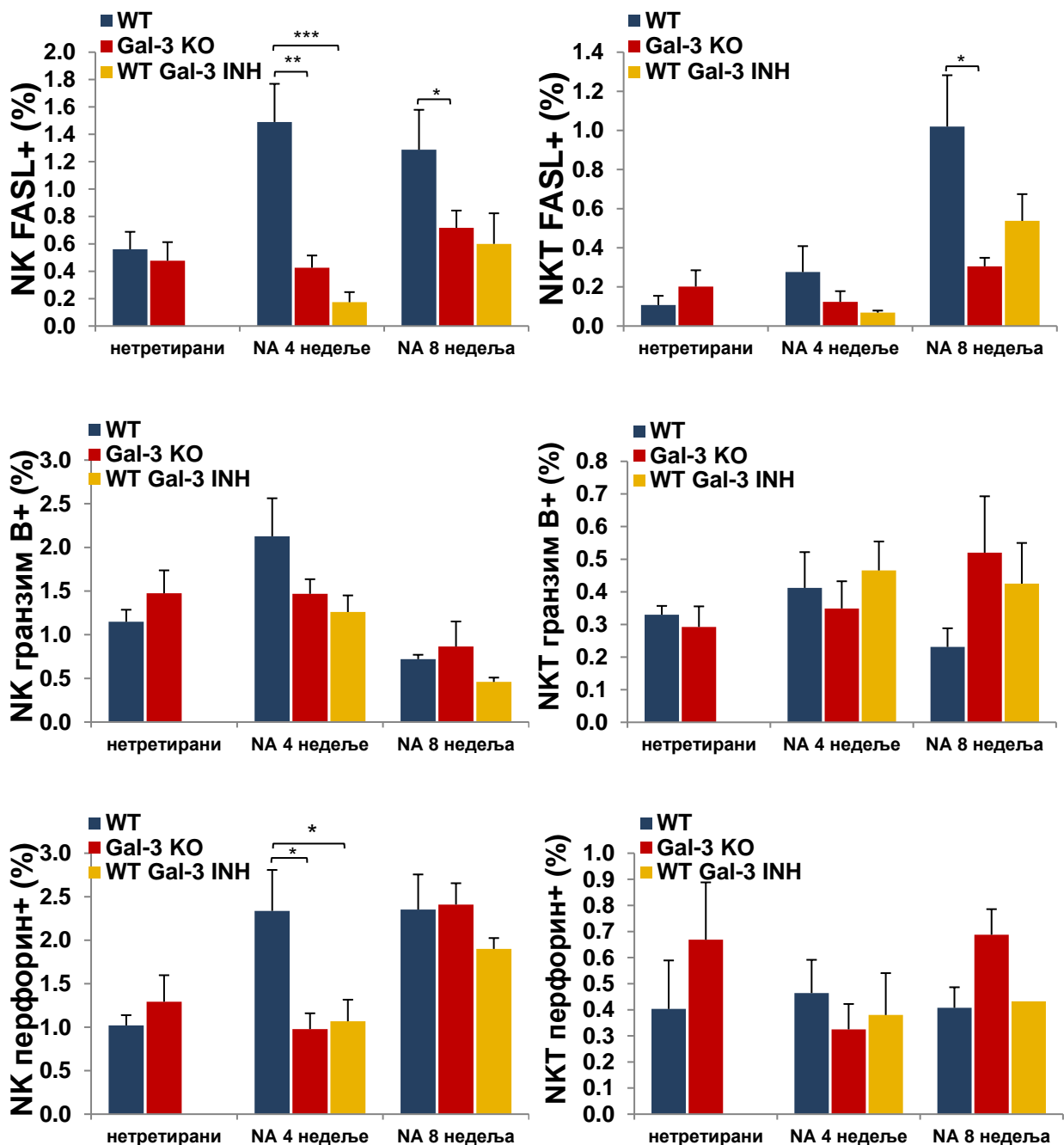
Даља анализа фенотипа НК и НКТ ћелија у јетрама WT, Gal-3 дефицијентних и мишева третираних инхибитором галектина-3, четврте и 8. недеље после инфекције бактеријом је указала да одсуство галектина-3 више утиче на фенотип НК него фенотип НКТ ћелија. Иако је присуство НКТ ћелија неопходно за развој РВС након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* није уочено да галектин-3, иако утиче на тежину саме болести, мења заступљеност као ни фенотип ових ћелија у јетри. Примена инхибитора галектина-3 као и делеција гена за Gal-3 у јетри значајно смањује проценат НК ћелија које експримирају маркер активације KLRG1 и четврте и 8. недеље после инфекције бактеријом (Графикон 33). Процент НК ћелија које експримирају маркер активације CD69 је статистички значајно мањи само у јетри Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева и то само четврте недеље после инфекције. Иако је проценат НКТ ћелија које експримирају маркере активације KLRG1 и CD69 већи у јетри WT мишева у поређењу са групама Gal-3 дефицијентних и мишева третираних инхибитором галектина-3 те разлике нису статистички значајне осим за проценат CD69+ НКТ ћелија и то само 8. недеље после инфекције бактеријом (Графикон 33).

Одсуство галектина-3 такође смањује проценат НК ћелија које експримирају маркере цитотоксичности FASL и перфорин. Процент НК ћелија које експримирају FASL и перфорин је статистички значајно мањи у јетри како мишева третираних инхибитором галектина-3 тако и мишева са делецијом гена за Gal-3 у поређењу са WT мишевима четврте недеље после инфекције бактеријом (Графикон 34). Значајно мањи ($p < 0.05$) проценат FASL+ НК ћелија се 8. недеље после инфекције бактеријом одржава само у групи Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева.



Графикон 33. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат активираних НК ћелија у јетри. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четврте и 8. недеље после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелијај по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

Галектин 3 углавном не утиче на цитолитичке карактеристике НКТ ћелија у јетри мишева са РВС индукованим инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.

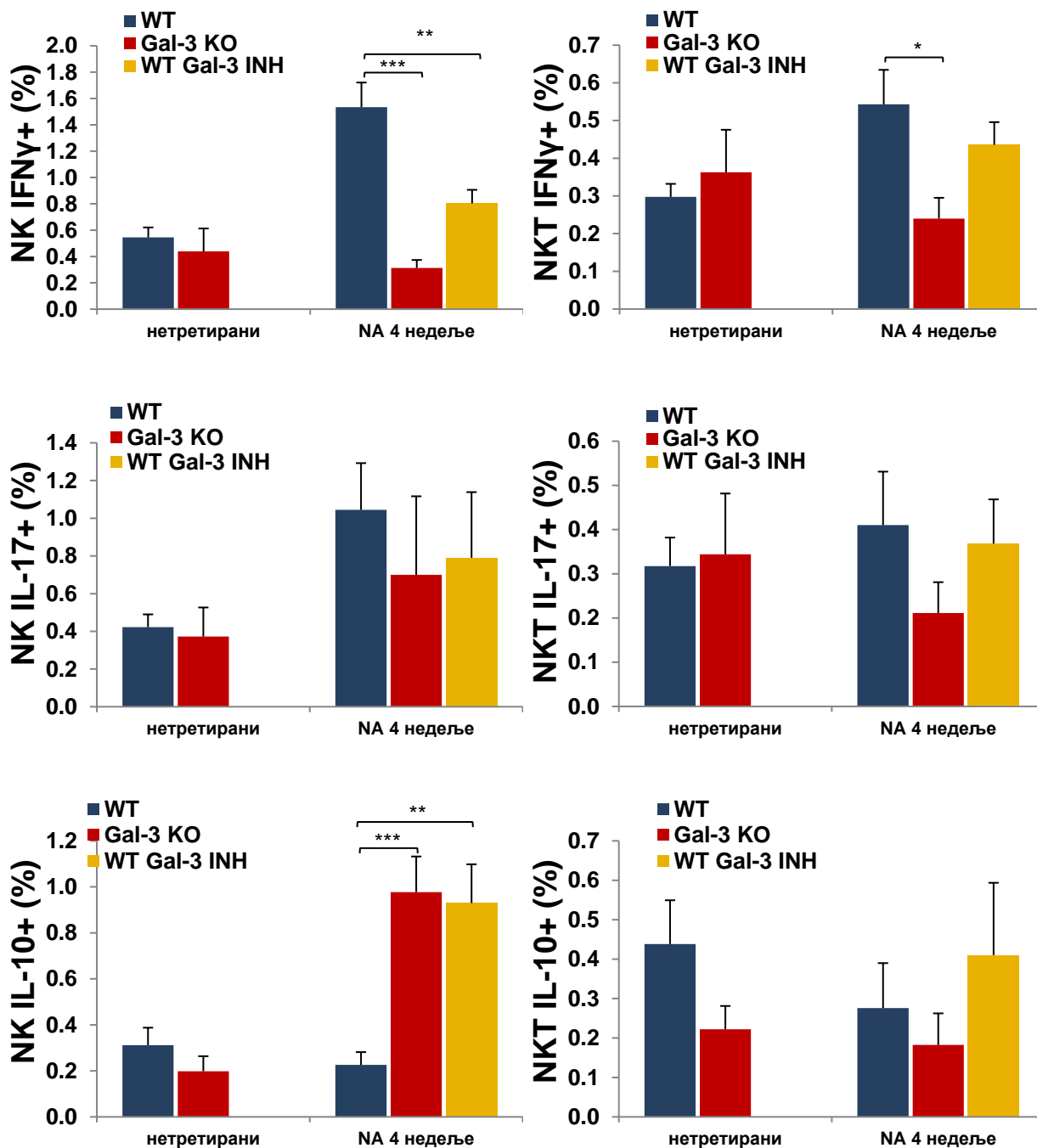


Графикон 34. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат цитолитичких НК ћелија у јетри. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четврте и 8. недеље после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелијај по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

4.12.5. Примена Gal-3 INH и делеција гена за галектин 3 значајно смањују проценат IFN- γ + а повећавају проценат IL-10+ NK ћелија у јетри мишева са PBC-ом индукованим инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Обзиром да NK и NKT ћелије продукцијом различитих цитокина модулишу имунски одговор и утичу на активацију аутореактивних Т лимфоцита и да су главне промене у фенотипу ових ћелија забележене четврте недеље после инфекције, даље је испитан утицај галектина-3 на заступљеност инфламацијских IFN- γ + и IL-17+ и антиинфламацијских IL-10+ NK и NKT ћелија у јетрама мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, четврте недеље после инфекције.

Као што се види на Графикону 26 проценат IFN- γ + NK ћелија је статистички значајно мањи како у групи мишева третираних инхибитором галектина-3 ($p < 0.005$) тако и мишева са делецијом гена за Gal-3 ($p < 0.001$) у поређењу са нетретираним WT мишевима инфицираним бактеријом. Обрнуто, статистички значајно већи проценат антиинфламацијских IL-10+ NK ћелија је забележен у јетри мишева третираних инхибитором галектина-3 и мишева са делецијом гена за Gal-3 у поређењу са процентом ових ћелија у јетри нетретираних WT мишева инфицираних бактеријом. Слично досадашњим резултатима, међу испитиваним групама мишева није забележена значајна разлика у проценту инфламацијских и антиинфламацијских NKT ћелија. Детектован је само већи проценат IFN- γ + NKT ћелија у групи инфицираних WT мишева у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 35).



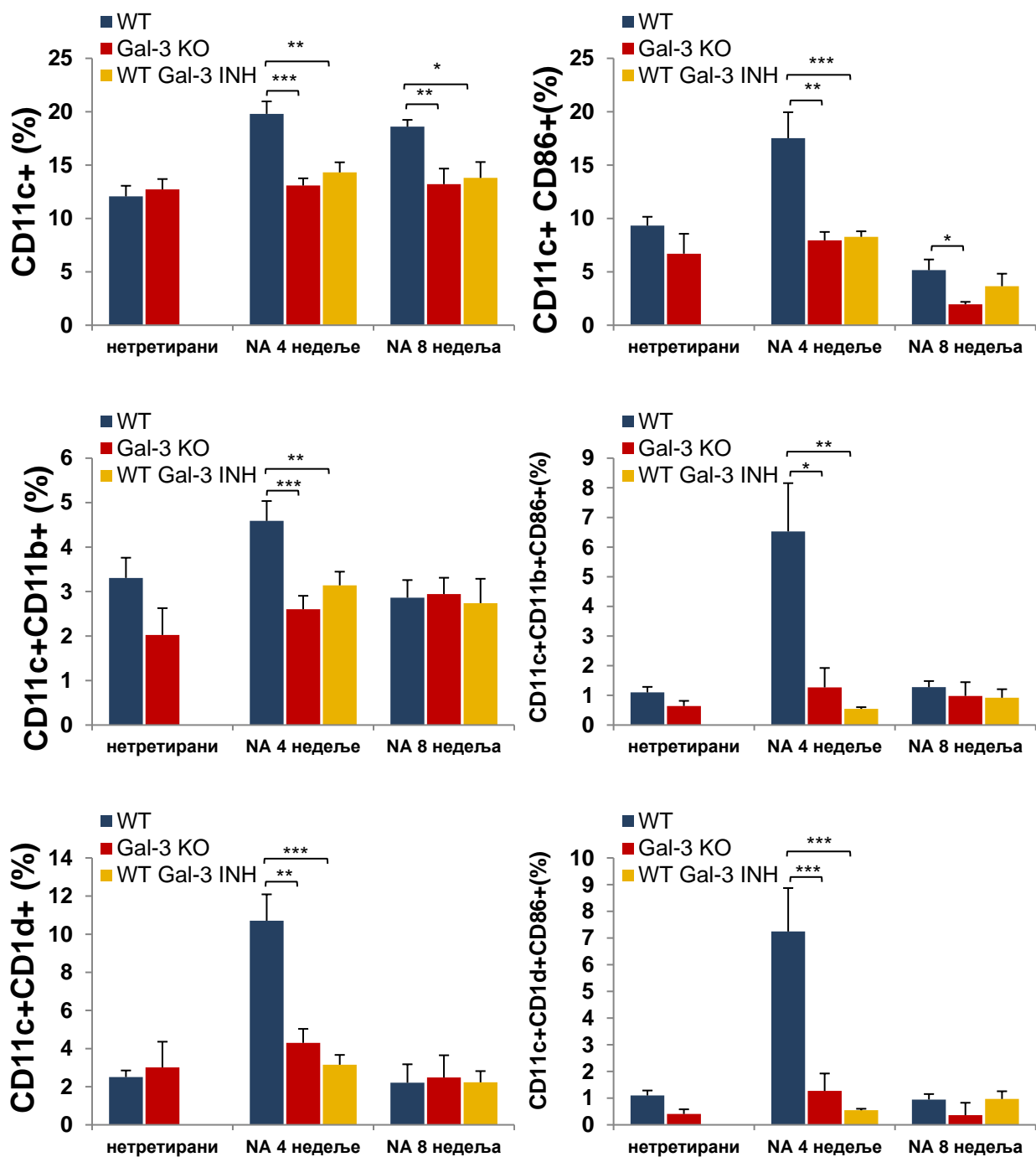
Графикон 35. Третирање мишева инфицираних бактеријом инхибитором галектина-3 значајно смањује проценат инфламацијских и повећава проценат регулаторних НК ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четврте и 8. недеље после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности +SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

4.12.6. Одуство галектина 3 и примена Gal-3 INH значајно смањују проценат активираних дендритских ћелија које презентују антигене Т лимфоцитима и NKT ћелијама у јетри мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Ћелије које презентују антигене имају централну улогу у препознавању молекулских образаца патогена и приказивању бактеријских антигена Т лимфоцитима и NKT ћелијама. Од адекватне активације антиген презентујућих ћелија зависи и стимулација NKT ћелија које су неопходне за започињање аутоимунског процеса у моделу РВС изазваном инфекцијом бактеријом док је стимулација Т лимфоцита кључни за одржавање аутоимунског процеса. Даљом анализом је испитан утицај галектина 3 на заступљеност и функционалне карактеристике дендритских ћелија. Анализирани су популације CD11c⁺ дендритских ћелија, као и популације CD11c⁺CD11b⁺ које се означавају као инфламацијске дендритске ћелије које на инфламацијске стимулусе долазе у циљна ткива из периферне крви, а такође и популација CD11c⁺CD1d⁺ дендритских ћелија које приказују антигене у склопу CD1d молекула и важне су за активацију NKT ћелија.

Примена инхибитора галектина-3 као и делеција гена за галектин-3 утичу на статистички значајно смањење процента CD11c⁺ ($p < 0.005$; $p < 0.001$), CD11c⁺CD11b⁺ ($p < 0.005$; $p < 0.001$) и CD11c⁺CD1d⁺ ($p < 0.005$; $p < 0.001$) дендритских ћелија четири недеље након инфекције бактеријом (Графикон 27). Осам недеља после инфекције бактеријом одржава се статистички значајно ($p < 0.005$; $p < 0.05$) смањен проценат CD11c⁺ ћелија у обе групе мишева са дефицијенцијом галектина 3 (Графикон 36).

Процент активираних CD11c⁺CD86⁺ ћелија је статистички значајно мањи у јетри галектин 3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева и 4 ($p < 0.005$) и 8 ($p < 0.05$) недеља после инфекције, а проценат ових ћелија у јетри мишева третираних инхибитором галектина-3 је статистички значајно мањи у поређењу са групом WT мишева ($p < 0.005$) четири недеље после инфекције (Графикон 36).

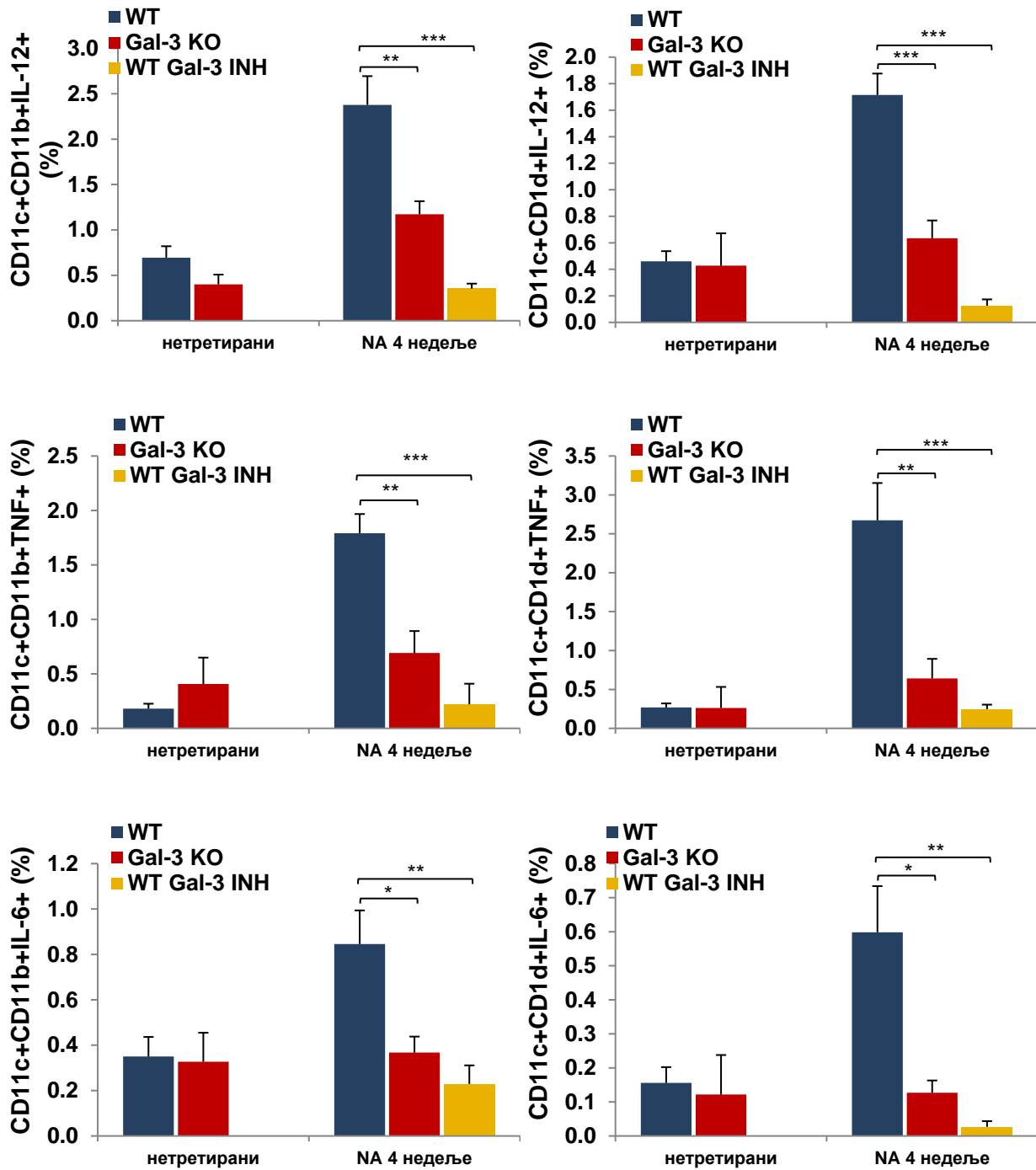


Графикон 36. Третирање инхибитором галектина мишева инфицираних бактеријом значајно смањује проценат CD11c+, CD11c+CD11b+ и CD11cCD1d+ дендритских ћелија као и проценат ових ћелија које експримирају маркер активације CD86. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре четири и 8 недеља дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

Процент активираних CD11c+CD11b+CD86+ ($p < 0.05$, $p < 0.005$) и CD11c+CD1d+CD86+ ($p < 0.001$) ћелија је статистички значајно мањи у јетри мишева третираних инхибитором галектина-3 као и јетри галектин-3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева четири недеље после инфекције бактеријом (Графикон 36).

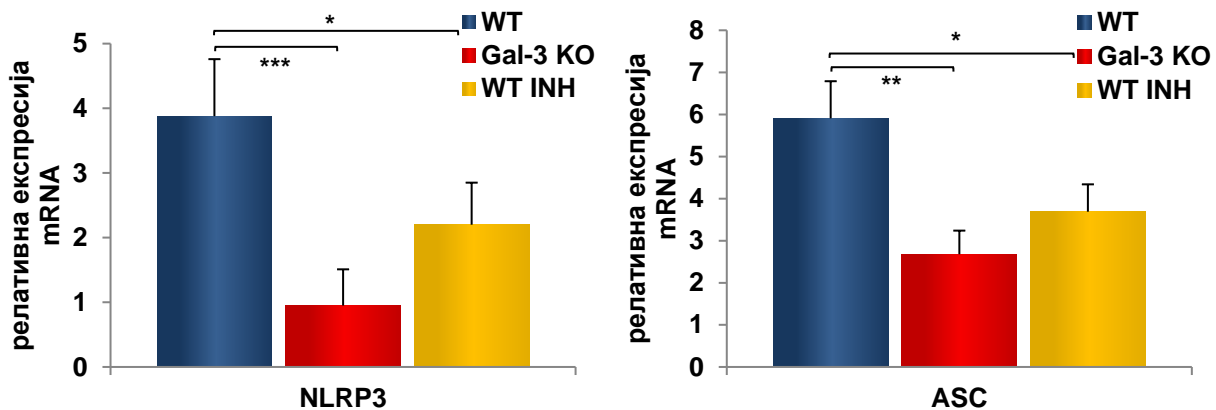
4.12.7. Одуство галектина 3 значајно смањује проценат проинфламацијских дендритских ћелија у јетри мишева са PBC-ом индукованом инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Смањење процента дендритских ћелија у јетри мишева третираних инхибитором галектина 3 као и галектин 3 дефицијентних мишева у поређењу са WT мишевима праћено је и смањењем процента инфламацијских CD11c+, CD11c+CD11b+ и CD11c+CD1d+ ћелија. Четири недеље после инфекције бактеријом проценат наведених популација дендритских ћелија које експримирају проинфламацијске цитокине IL-12, TNF- α и IL-6 је статистички значајно мањи у јетри мишева третираних инхибитором галектина 3 и галектин 3 дефицијентних мишева у поређењу са групом WT мишева (Графикон 37).



Графикон 37. Третирање инхибитором галектина мишева инфицираних бактеријом значајно смањује процент инфламацијских $CD11c^+$, $CD11c+CD11b^+$ и $CD11c+CD1d^+$ дендритских ћелија. Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 4 и 8 недеља дана после инфекције бактеријом и анализирани проточном цитометријом. Приказане су средње вредности + SE процента испитиваних ћелија по групи са укупно 8 мишева по свакој групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим t тестом $*p < 0.05$ $**p < 0.005$

Значајнија активација инфлазама уочена у мијелоидном ћелијама WT мишева, три дана после инфекције бактеријом, потврђена је и анализом експресије гена за NLRP3 у ткиву јетре инфицираних мишева и то 15 недеља након прве дозе бактерија. Статистички значајно већа ($p < 0.001$) експресија гена за NLRP3 (и до четири пута већа) је уочена у ткиву јетре WT мишева у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 38). Такође статистички је значајно већа ($p < 0.05$) експресија гена за NLRP3 у ткиву јетре WT мишева у поређењу са групом мишева третираних прве четири, недеље након прве дозе бактерија, инхибитором галектина 3. Слични резултати су добијени и анализом експресије друге компоненте инфлазама ASC. Скоро 3 три пута већа експресија гена за ASC је уочена у ткиву јетре WT мишева у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева. Такође статистички значајно мања ($p < 0.05$) експресија ASC је уочена у ткиву јетре мишева третираних инхибитором галектина 3 у поређењу са групом WT мишева (Графикон 38).



Графикон 38. Инфекција бактеријом значајно експресију NLRP3 и ASC у ткиву јетре. РНК је изолована из ткива јетре 15 недеља после прве дозе бактерија и *real time* PCR методом је одређен ниво релативне експресије mRNA за NLRP3 и ASC у односу на β -актин. Приказане су средње вредности + SD нивоа mRNA, 4 миша по групи. Статистичка значајност разлике је одређена Student-овим *t* тестом * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$

5. ДИСКУСИЈА

До данас објављена истраживања јасно су указала на потпуно супротне улоге Gal-3 у патогенези различитих хроничних инфламацијских болести. Тако је показано да делеција гена за Gal-3 ублажава неколико аутоимунских болести у чијој патогенези главну улогу играју Т лимфоцити: дијабетес, експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (273) и инфламацијским болестима, као што су акутно оштећење јетре Т лимфоцитима и НКТ ћелијама (276) и акутни колитис. Такође постоје докази да у моделу дијабетеса индукованог дијетом са високим садржајем масти (274) и стеатози јетре (284) Gal-3 остварује потпуно супротни ефекат, делује протективно.

Различити, а често и супротни, ефекти Gal-3 могу да буду резултат регулације доминантног имунопатогенетског механизма у различитим моделима болести, па тако Gal-3 модулише развој хроничних болести које у основи имају имунске механизме на најмање два нивоа: први подразумева модулацију функције ћелија имунског система, а други контролу различитих процеса у ћелијама одређеног ткива које је захваћено болешћу, а које не припадају имунском систему.

Утицај галектина-3 на патогенезу примарног билијарног холангитиса до сада није испитиван, а резултати ове студије јасно показују да Gal-3 може да има потпуно супротне ефекте на ток болести у два различита модела па изгледа сасвим документовано да утицај галектина-3 на развој и ток болести зависи од доминантног механизма индукције болести.

У моделу примарног билијарног холангитиса индукованог имунизацијом C57BL/6 мишева ксенобиотиком у адјувансу Gal-3 има протективни ефекат, ублажавајући болест вероватно тако што штити холангиоците од апоптозе чиме смањује доступност аутоантигена и тако ограничава аутоимунски процес. Супротно, у моделу ове болести изазване бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* одсуство галектина-3 готово да чини мишеве резистентним на развој РВС највероватније због неадекватне активације дендритских ћелија бактеријом у одсуству галектина-3, услед чега изостаје и активација свих осталих ћелија (НКТ и НК ћелија, Т лимфоцита) које учествују у развоју оштећења билијарних канала.

5.1. Холангиоцити оболелих од примарног билијарног холангитиса експримирају Gal-3

Раније објављене студије указују да је у здравим хуманим јетрама експресија Gal-3 у хепатоцитима и холангиоцитима немерљива (259). Међутим, експресија Gal-3 је у различитим патолошким стањима постаје евидентна па је тако показана је експресија галектина-3 у 93% узорака холангиокарцинома, при чему је експресија интензивнија у боље диферентованим туморима (259, 264). Интрахепатични холангиокарцином се често јавља у подручјима дуготрајне инфламације и фиброзе билијарних канала па је могуће да је и холангитис удружен са повећаном експресијом Gal-3. Резултати наше студије су по први пут указали на значајну експресију галектина-3 у холангиоцитима оболелих од примарног билијарног холангитиса (Слика 1). Међутим експресија галектина-3 је забележена и у холангиоцитима оболелих од вирусних хепатитиса, а није детектована у билијарним епителним ћелијама оболелих од хроничног склерозирајућег холангитиса (Слика 1) (285). Резултати наше студије су сагласни са новијим податком о повећаној експресији галектина-3 у ткиву јетре оболелих од РВС (265), мада у овој студији није испитана експресија галектина-3 у холангиоцитима. Могуће је да је повећање експресије Gal-3 у холангиоцитима компензаторни механизам који штити ове ћелије од апоптозе изазване различитим стимулусима у РВС али и другим инфламацијским стањима, као што су вирусни хепатитиси (286). У прилог овој хипотези иде налаз одсуства експресије Gal-3 у холангиоцитима у каснијим стадијумима РВС које карактерише изражена фиброза и прогресивно оштећење билијарних канала. Међутим, галектин-3 експримирају и ћелије имунског система и овај молекул различито утиче на њихову функцију зависно од врсте ћелија и патолошког стања односно стадијума болести. Ефекат галектина 3 на ћелије урођене имуности је углавном проинфламацијски јер овај молекул: појачава хемотаксу и екстравазацију неутрофила и ослобађање проинфламацијског цитокина IL-8 (287), модулише дегранулацију и преживљавање неутрофила, њихову интеракцију са ламинином и фибронектином и тако појачава адхезију леукоцита за ендотел (230), подстиче хемотаксу моноцита (288) и интеракцију ових ћелија са екстрацелуларним матриксом (289), повећава фагоцитну способност макрофага (246) и појачава респираторни прасак у неутрофилима и макрофагима (290-292).

У складу са овим подацима као и скоријим налазом повећане експресије галектина-3 у макрофагима јетре оболелих од РВС (265) могуће је да овај лектин делујући на ћелије урођене имуности игра и проинфламацијску улогу у патогенези РВС. Како би детаљније испитали која је улога галектина-3 у патогенези РВС испитан је ток експерименталних модела болести код Gal-3 дефицијентних мишева.

5.2. Gal-3 дефицијентни мишеви развијају тежу форму примарног билијарног холангитиса индукованог ксенобиотиком

Експериментални налази ове студије указују да делеција гена за Gal-3 убрзава и погоршава примарни билијарни холангитис индукован имунизацијом ксенобиотиком. C57BL/6 мишеви са делецијом гена за Gal-3 развијају знатно јачу болест у поређењу са мишевима који имају функционални ген за Gal-3. Код мишева којима недостаје ген за Gal-3 запажени су значајно израженији мононуклеарни инфилтрати у јетри у којима доминирају CD8⁺ Т лимфоцити, већа оштећења билијарних канала, јача фиброза јетре, веће концентрације анти-PDC-E2 IgA у серуму и већи AST/ALT индекс у серуму.

Значајније оштећење билијарних канала код људи оболелих од примарног билијарног холангитиса директно корелира са заступљеношћу CD8⁺ Т лимфоцита у инфилтратима у ткиву јетре (293). Веће присуство CD8⁺ Т лимфоцита у инфилтратима билијарног тракта је забележена и код IL-2R α ^{-/-} мишева који спонтано развијају РВС, као и код мишева имунизованих ксенобиотиком- 20А-BSA (74) (294). Цитотоксички лимфоцити специфични за PDC-E2 играју главну улогу патогенези РВС и очигледно директно оштећују ткиво односно директно лизирају холангиоците (295). У том смислу значајан је и налаз да пасивни трансфер CD8⁺ Т лимфоцита, изолованих из dnTGF β RII мишева, индукује развој аутоимунског холангитиса (са израженом инфламацијом око билијарних канала, њиховом деструкцијом и формирањем гранулома у портном простору) код Rag-1^{-/-} мишева, док трансфер CD4⁺ Т лимфоцита уопште није праћен развојем РВС-like промена у јетри (296). Дефицијенција хемокинског рецептора CXCR3 појачава аутоимунски холангитис који развијају dnTGF β RII мишеви и то појачавањем функције патогених CD8⁺ Т лимфоцита (297). Поменути резултати су у складу са резултатима овде приказане студије која јасно

документује да је већи број CD8⁺ Т лимфоцита у ткиву јетре Gal-3 дефицијентних мишева повезан са тежим обликом PBC, већим оштећење јетре и повећаним индексом AST/ALT (264, 298).

Иако је документовано да су CD8⁺ Т лимфоцити главни егзекутори у оштећењу холангиоцита студије спроведене како на узорцима хуманог порекла тако и у експерименталним моделима PBC указују да централну улогу у патогенези ове болести играју Th1 лимфоцити за чију је диференцијацију неопходно присуство IL-12. Тако су две независне студије генома показале да су одређене варијанте гена за IL-12A и IL-12RB2 удружене са појавом PBC (299, 300). Такође уколико се dnTGFbRII мишевима који спонтано развијају болест (која веома личи на PBC) уклони ген који кодира p40 субјединицу цитокина IL-12 они развијају значајно мању инфламацију билијарних канала са смањењем концентрација проинфламацијских цитокина у јетри (301). Спонтани развој болести код мишева који континуирано појачано експримирају IFN- γ указује на кључну улогу овог цитокина у раним фазама развоја PBC (302). Показано је да стална експресија подстиче експресију MHC II у хепатоцитима и холангиоцитима што доприноси иницијалном оштећењу ових ћелија (302). У складу са наведеним налазима је и резултат овде приказане студије који указује да је теже форма холангитиса код Gal-3 дефицијентних мишева удружена са повећањем броја и CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ (графикон 9).

5.3. Тежи облик болести, индуковане ксенобиотиком, код Gal-3 KO мишева је удружен се већом фреквенцом апоптозе холангиоцита

Измерене концентрације анти-PDC-E2 антитела у серуму мишева имунизованих ксенобиотиком сагласне су са резултатима претходно објављених студија (298). Тако је у серуму мишева имунизованих ксенобиотиком уочен је пораст концентрација свих мерених класа антитела специфичних за PDC-E2 (IgG, IgM и IgA), при чему нема статистички значајне разлике у концентрацијама IgM и IgG између WT и Gal-3 дефицијентних мишева док је концентрација IgA специфичног за PDC-E2 статистички значајно већи у серуму Gal-3 дефицијентних мишева. Анти-PDC-E2 антитела класе А се детектују у жучи, сливи, урину и серуму оболелих (303). Као кључни налаз за доказивање болести наводи се

присуство IgG специфичних за PDC-E2 (304). Концентрације анти-PDC-E2 IgA у серуму Gal-3 дефицијентних мишева, имунизованих ксенобиотиком, корелирају са већим оштећењем билијарних епителних ћелија. Овај налаз је значајан јер је раније показано да анти PDC-E2 антитела класе А трансцитозом пролазе кроз холангиоците и да том приликом активирају каспазе и индукују апоптозу билијарних епителних ћелија (68). Активност каспаза директно корелира са концентрацијом анти-PDC-E2 антитела класе А у серуму оболелих од PBC (68). У складу са овим резултатима је и налаз овде приказане студије који јасно документује да су повећане концентрације анти-PDC-E2 антитела класе А у серуму Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком удружен са значајно већом апоптозом холангиоцита.

Узимајући у обзир претходно наведену корелацију између концентрације анти-PDC-E2 антитела класе А у серуму и апоптозе холангиоцита испитане су евентуалне разлике у проценту апоптотичних холангиоцита између WT и Gal-3 дефицијентних мишева. Већа концентрација анти-PDC-E2 антитела класе А у серуму Gal-3 дефицијентних мишева је у корелацији са појачаном апоптозом холангиоцита код ових мишева (Графикон 12, Слика 8). Gal-3 је експримиран у епителним ћелијама слузнице желуца, колона и простате али и у ћелијама имунског система као што су моноцити и макрофаги (305, 306). Експресија галектина-3 се повећава у епителним ћелијама и ћелијама имунског система у различитим инфламацијским стањима. У овој студији је показано да је Gal-3 експримиран у холангиоцитима оболелих од примарног билијарног холангитиса (Слика 1). Поред тога показано је да у холангиоцитима здравих мишева скоро да нема Gal-3 (Слика 7), а експресија овог молекула расте у холангиоцитима мишева имунизованих ксенобиотиком, што указује на постојање везе између експресије Gal-3 и инфламације у ткиву јетре мишева. Делација гена за Gal-3 чини ћелије хуманог колоректалног карцинома и холангиокарцинома осетљивијим на апоптозу (148, 307, 308) док прекомерна експресија галектина-3 штити од апоптотске смрти (309). Судаћи по претходно наведеним налазима експресија Gal-3 у јетри животиња имунизованих ксенобиотиком може да има протективну улогу, штитећи холангиоците од апоптозе.

Могуће објашњење је и да је експресија Gal-3 у холангиоцитима у примарном билијарном холангитису компензаторни механизам којим се билијарне епителне ћелије штите од апоптозе коју у овој болести индукују различити стимулуси. У прилог овој хипотези иде и

налаз слабе или потпуног одсуства експресије Gal-3 у холангиоцитима у каснијим фазама примарног билијарног холангитиса људи које карактерише прогресивно оштећење билијарних канала и изражена фиброза (Слика 1).

У складу са овде приказаним резултатима могуће је да појачана апоптоза холангиоцита, регистрована код имунизованих Gal-3 дефицијентних мишева, олакшава ослобађање аутоантигена и индукује јачу активацију дендритских ћелија са значајнијим инфлуксом инфламацијских лимфоцита што за последицу има веће оштећење билијарних канала и израженију форму болести и фиброзу јетре. Према томе, израженија апоптоза холангиоцита може да буде последица одсуства галектина-3. Значајно већи проценат апоптотичних билијарних епителних ћелија након излагања проапоптотским стимулусима *in vitro* детектован је међу холангиоцитима потеклим из јетре здравих Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са истим ћелијама изолованим из здраве јетре WT што потврђује антиапоптотску улогу галектина-3 у овим ћелијама.

Апоптоза холангиоцита је веома значајан догађај у патогенези РВС (310, 311) јер током овог процеса антиген PDC-E2 остаје интактан са очуваним епитопима, а његова експресија на апикалној (луминалној) површини билијарних каналића је потврђена имунохистохемијски бојењем специфичним анти-PDC-E2 моноклонским антителима (312-314). Интактни PDC-E2 се детектује и у апоптотским телашцима потеклим од умирућих холангиоцита што га чини доступним анти-митохондријским антителима (61). Дакле може да се претпостави да појачана апоптоза холангиоцита Gal-3 дефицијентних мишева узрокује појачано ослобађање аутоантигена и последичну стимулацију имунског одговора што на концу појачава болест.

Појачана апоптоза холангиоцита регистрована код Gal-3 дефицијентних мишева може да допринесе тежини болести и на други начин и то појачаном стимулацијом ћелија урођене имуности. Макрофаги добијени из линије моноцита оболелих од примарног билијарног холангитиса инкубирани са апоптотским телашцима која потичу од холангиоцита, а у присуству АМА продукују значајну количину инфламацијских цитокина (310). Описано је да Gal-3 може да игра улогу класичног „*eat me*“ сигнала на апоптотским телашцима и да на тај начин стимулише фагоцитозу апоптотичних ћелија и ћелијског дебрија (315). Галектин-3 стимулише макрофаге на уклањање апоптотичних неутрофила чиме утиче на резолуцију инфламације (316). Узимајући у обзир ове налазе могуће је закључити да је код Gal-3

дефицијентних мишева поремећено уклањање апоптотичних холангиоцита који експримирају интактни аутоантиген PDC-E2 услед чега постоји већа доступност аутоантигена који стимулише специфичне лимфоците што доприноси појачању инфламације и оштећењу билијарних каналића.

У нашој студији је показано да дендритске ћелије присутне у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева, имунизованих ксенобиотиком, имају израженији инфламацијски фенотип (Графикон 11, Слика 6), што није у складу са претходно наведеним подацима да апоптотска тела пореклом холангиоцита у присуству специфичних аутоантитела стимулишу макрофаге да продукују проинфламацијске цитокине (310) који би онда вероватно подстицали развој инфламацијског фенотипа и дендритских ћелија. Међутим галектин-3 на дендритским ћелијама такође модулише функцију самих дендритских ћелија. Gal-3 дефицијентне дендритске ћелије продукују мање антиинфламацијског цитокина IL-10 и подстичу продукцију IFN- γ у алогеним Т лимфоцитима (317). Новија студија показује да *in vitro* стимулација дендритских ћелија изолованих из Gal-3 дефицијентних мишева липополисахаридом повећава продукцију проинфламацијских цитокина IL-1, IL-12, IL-6 али и антиинфламацијског IL-10 (318). У складу са наведеним налазима могуће је да дендритске ћелије Gal-3 дефицијентних мишева у одговору на стимулацију TLR агонистима, присутним у адјувансу који се додаје приликом имунизације ксенобиотиком, развијају снажнији инфламацијски фенотип и тако доприносе активацији специфичних лимфоцита и појачању инфламације и оштећења билијарних канала.

5.4. Gal-3 дефицијентни мишеви имунизовани ксенобиотиком развијају израженију фиброзу јетре

Дисбалан између апоптотске смрти холангиоцита и пролиферације преосталих ћелија одређује ток болести, јер појачано уништавање ћелија води у прогресију болести са значајним губитком билијарних канала и фиброзом јетре. У одмаклим стадијумима PBC холангиоцити губе способност да пролиферишу и доминира апоптотска смрт ових ћелија. Апоптоза подстиче фиброгенезу активацијом стелатних ћелија јетре (енг. *Hepatic Stellate Cells*, HSCs) (314, 319). У јетрама Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком уочава се израженија фиброза. Gal-3 активира различите профибротске

факторе укључујући фактор раста фибробласта и TGF- β и стимулише продукцију колагена у различитим болестим (222). Али овде приказани, а очигледно супротни резултати могу да се објасне значајно израженијом апоптозом холангиоцита у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева што снажније активира HSCs и за последицу има израженију фиброзу која јасно . корелира са већим концентрацијама профибротских цитокина IL-13 и IL-17 у серуму (320) (321).

Налаз већег укупног број IFN- γ ⁺ CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева, имунизованих ксенобиотиком, је у сагласности са претходним студијама које су показале да имунизација IFN- γ дефицијентних мишева, са2OA-BSA у адјувансу, не узрокује инфламацију у јетри (322). Такође, већи број IFN- γ ⁺ CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева је у повезан са израженијим инфламацијским фенотипом дендритских ћелија у јетри ових мишева.

Показана израженија инфламација, фиброза и оштећење билијарних канала у јетри Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих ксенобиотиком указује на протективну улогу галектина-3 у аутоимунском холангитису индукованом ксенобиотиком.

Међутим детаљније проучавање имунопатогенезе у РВС захтева и разматрање више фактора, узимањем у обзир да више етиолошких фактора може утицати на развој болести као и на вишезначност имунског одговора у различитим фазама болести (323-325).

5.5. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са знатно блажом формом примарног билијарног холангитиса индукованог бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Novosphingobium aromaticivorans је убиквитарна α -протеобактерија која садржи конзервирани епитоп PDC E2 и може да се детектује на слузницама у дигестивном тракту људи (49, 326, 327). *Novosphingobium aromaticivorans* метаболише ксенобиотике (328, 329) и тако интерферира са ентерохепатичним кружењем жучних киселина и метаболизмом хормона. Наведене карактеристике бактерије и метаболичке интеракције које остварује доприносе прекиду ауто толеранције у ткиву јетре.

Инфекција осетљивих сојева мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* (5×10^7 cfu) у две дозе (нулте и друге недеље) индукује продукцију антитела специфичних за PDC E2 и активацију аутореактивних Т лимфоцита који учествују у развоју хроничне инфламације у јетри која веома подсећа на промене које се виђају у јетри оболелих од PBC. Иако се сврстава у Грам негативне бактерије ћелијски зид *Novosphingobium aromaticivorans* не садржи липополисахарид. У ћелијском зиду ових бактерија су присутни гликофинголипиди (као што је глукуронилцерамид) који активирају NKT ћелије које препознају овакве антигене у склопу CD1d молекула (113). Овако активирани NKT ћелије продукују цитокине и хемокине које омогућавају активацију и диференцијацију помагачких Т лимфоцита (283, 330). NKT ћелије као и ћелије које експримирају CD1d молекулу су прве ћелије урођене имуности које детектују присуство бактерије *Novosphingobium aromaticivorans* и подстичу антимикробни имунски одговор. NKT ћелије су присутне у великом броју у јетри где се крећу по синусоидалним ендотелним ћелијама и обављају функцију надзора овог васкуларног простора (331, 332). Присуство ових ћелија као и експресија CD1d у јетри се значајно повећавају код оболелих од PBC (333-335).

Како аутоимунски холангитис који се код мишева развија након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, за разлику од болести индуковане ксенобиотиком, има више сличности са природним настанком, током и развојем болести код људи користили смо и овај модел за испитивање улоге Gal-3 у патогенези PBC. Експериментални налази овде приказаног истраживања указују да Gal-3 у овом моделу болести има супротне ефекте у поређењу са описаним ефектима у моделу PBC који се изазива ксенобиотиком. Мишеви са делецијом гена за Gal-3, а којима је болест изазвана бактеријом, готово да не развијају инфилтрате у јетри, имају значајно мање вредности AST/ALT индекса и мање вредности анти- PDC-E2 IgA у серуму, и мањи број активираних дендритских, инфламацијских NK и NKT и Th17 и Tc17 ћелија у јетри у поређењу са C57BL/6 мишевима који имају функционални ген за Gal-3. Једном речју галектин-3 дефицијентни миви, у одговору на инфекцију бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*, развијају много блажу болест него мишеви који поседују овај ген. Овај налаз указује на потпуно другачију улогу галектина-3 у два различита модела болести.

Кључни елементи за дијагностику PBC, као што су снажна инфилтрација малих жучних путева и формирање гранулома, су детектовани у јетрама инфицираних C57BL/6 WT

мишева а приказани овом студијом, описани у и моделу болести изазваном на исти начин у NOD 1101 соју миша. За разлику од налаза поменуте студије на NOD 1101, у овде приказаним истраживањима регистрован је и развој фиброзе у јетри инфицираних C57BL/6 WT мишева, а ова разлика је вероватно последица сојних разлика. Фиброза је реакција ткива на екстравазацију жучних соли услед деструкције билијарних каналића, а сматра се да је за развој фиброзе неопходно присуство Th2 цитокина. Продукција Th2 цитокина је значајно супримирана код NOD мишева (336) док C57BL/6 WT мишеви, иако слабије него BALB/c мишеви, ипак продукују Th2 цитокине (337). Овде приказани резултати такође указују на развој и Th2 имунског одговора код инфицираних C57BL/6 WT мишева, па тако дендритске ћелије ових мишева у одговору на *in vitro* стимулацију бактеријом продукују IL-4 (Графикон 24), што може да објасни појаву фиброзе. Остале лезије које развијају инфицирани NOD 1101 мишеви, а које више одговарају аутоимунском хепатитису (венулитис, инфилтрати у паренхиму и експанзија плазмочита) (338) се такође уочавају у јетрама инфицираних C57BL/6 WT мишева (Слике 13 и 14). Међутим, у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева скоро да се и не уочавају хистолошки параметри оштећења, осим благе инфилтрације билијарних каналића без оштећења епитела, и то не код свих мишева из групе (Графикон 5, Слика 3). У јетрама C57BL/6 WT мишева третираних инхибитором галектина-3, у прве четири недеље након инфекције, такође се не уочавају перипортни и перибилијарни инфилтрати ни након четири ни након 24 недеље од прве дозе бактерија (Графикон 28, Слика 13 и 14). Уместо тога у јетрама ових мишева се, четири недеље након примене инхибитора, уочавају дифузни инфилтрати у паренхиму и тракаста поља некрозе хепатоцита (Слика 13), а након 24 недеље остају само мања поља инфилтрације у паренхиму (Слика 14). У складу са наведеним налазима су и нешто веће вредности ензима јетре (AST и ALT) у серумима инфицираних мишева третираних инхибитором галектина-3 у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 29).

5.6. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са значајно мањом фреквенцијом Th17 и Tc17 лимфоцита у јетрама C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Иако се РВС описује као болест у чијој патогенези доминантну улогу играју Th1 лимфоцити постоје подаци који указују и на значајну улогу Th17 лимфоцита у иницијацији и прогресији болести. Описана је значајна акумулација Th17 лимфоцита у јетри оболелих од РВС, као и већа експресија хемокина CCL20 који вероватно учествује у привлачењу ових ћелија у јетру (339). У другој студији је описано значајно присуство IL23+ и IL-17+ мононуклеарних ћелија у портним просторима јетре у одмаклим стадијумима РВС као и позитивна корелација између концентрације of IL-23 и IL-17 у серуму оболелих од РВС са концентрацијом γ глутамил трансферазе у серуму (340). Документован је и значајан пораст броја IL-17+ лимфоцита у инфилтратима јетре оболелих од РВС у поређењу са процентом ових ћелија у инфилтратима присутним у другим болестима јетре као и у јетрама здравих особа (75). Налаз IL-17+ лимфоцита у јетри карактеристика је каснијих фаза развоја РВС, што указује на значај конверзије Th1 у Th17 имунски одговор за прогресију болести (341). Такође је у јетрама IL-2R α дефицијентних мишева, који спонтано развијају болест сличну РВС људи, описано присуство агрегата IL-17 позитивних лимфоцита у портним просторима, као и већа фреквенца оваквих ћелија у јетри у односу на периферију (75). У истој студији је показано да CD4+ Т лимфоцити из јетре здравих C57BL/6J мишева секретују веће количине IL-17 у поређењу са CD4+ Т лимфоцитима из слезине истих мишева што указује на склоност лимфоцита да у микроокружењу јетре продукују IL-17. Поред тога кокултура CD4+ Т лимфоцита изолованих из слезине C57BL/6J мишева и непаренхимских ћелија јетре је повећала 10 пута продукцију IL-17 у Т лимфоцитима у поређењу са ћелијама које су гајене без додатка ћелија издвојених из јетре. Овај налаз указује да микроокружење јетре барем код C57BL/6J мишева подстиче развој Th17 имунског одговора у аутоимунским и инфламацијским болестима јетре.

У складу са наведеним подацима су и резултати овде приказане студије који јасно документују да је број Th17 и Tc17 лимфоцита у јетрама C57BL/6 мишева инфицираних

бактеријом већа од броја Th1 и Tc1 лимфоцита у јетрама истих мишева (Графикон 18). У јетрама Gal-3 дефицијентних мишева као и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, а у складу са хистолошким и серумским параметрима болести, значајано је мањи и проценат Th17, Tc1 и Tc17 ћелија (Графикон 31). Штавише, у јетрама инфицираних Gal-3 дефицијентних и WT мишева третираних инхибитором галектина-3 није уочено повећање проценат Tc1 и Tc17 у односу на проценте у јетрама нетретираних мишева уз незнатно повећање процента Th1 и Th17 лимфоцита (Графикон 31). Узимајући у обзир ове резултате и резултат претходно наведене студије (75) може да се закључи да у развоју аутоимунског процеса изазваног инфекцијом C57BL/6 мишева бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* кључну улогу играју CD4+ и CD8+ лимфоцити који продукују IL-17.

5.7. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, је удружена са значајно слабијом активацијом дендритских ћелија код C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Галектин-3, везивањем за рецепторе на ћелијама, остварује бројне улоге у физиолошким и патолошким процесима. Ендогени рецептори за галектин-3 су веома различите форме гликофинголипида које могу да имају различите угљено хидратне компоненте (342).

Галектини остварују директну интеракцију и са гликанима присутним на површини бактеријских ћелија. Поред тога бактеријска инфекција модулише експресију галектина на ћелијама домаћина који онда регулише функције леукоцита и модулише инфламацијски одговор. Доказано је да Грам позитивне бактерије (*Streptococcus pneumoniae*) као и Грам негативне бактерије (*Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*) на површини исказују угљенохидратне компоненте које се везују за галектине (343-346). Галектин-3 се двојачко везује за липополисахариде: С терминус CRD домена се везује за остаци лактозе LPS-а *Klebsiellae pneumoniae*, а N терминусом који не садржи угљене хидрате се везује за липид А LPS-а *Salmonellae entericae subspecies enterica* (343). Интрацелуларни галектин-3 остварује интеракције са гликолипидима и фосфатидилинозитол манозидима, *Mycobacterium*

tuberculosis који се акумулирају на мембрани фагозома који садрже микобактерије у току инфекције овим бактеријама (347). Такође галектин-3 везује бочне ланце О антигена бактерије *Helicobacter pylori*, која изазива гастритис. Адхезија ове бактерије за епител желуца утиче на повећање експресије галектина-3 у епителним ћелијама (348) што указује да галектин-3 утиче на одговор домаћина на инфекцију и то тако што промовише регрутовање фагоцита на место инфекције и подстиче инфламацијски одговор. Галектин-3 подстиче и екстравазацију и регрутовање неутрофила у току инфекције бактеријом *Streptococcus pneumoniae* и тако ублажава пнеумонију изазвану овом бактеријом (349). У мишјем моделу инфекције плућа *Streptococcus pneumoniae* је такође показано да галектин-3 делује хемоатрактантно на неутрофиле што може да помогне уклањању бактерија али и већем оштећењу плућа (350). Показано је да галектин-3 штити од развоја ендотоксичног шока изазваног LPS-ом који потиче из *Salmonellae*, али парадоксално повећава преживљавање самих бактерија (351). Сумирано ови подаци указују да галектин-3 може да се веже за глукоконјугате бактерија и тиме, или олакшава, или инхибира улазак патогена у ћелије домаћина. Такође везивање галектина-3 за глукоконјугате бактерија може и да подстиче али и да инхибира урођени и стечени имунски одговор домаћина.

Нема података о могућој интеракцији галектина-3 и молекула присутних у склопу ћелијског зида или површинских молекула бактерије *Novosphingobium aromaticivorans*. Међутим на основу претходно наведених података о интеракцији галектина-3 и глукоконјугата различитих бактерија, као и на основу података да галектин-3 остварује интеракцију са гликосфинголипидима на хуманим ћелијама, а имајући у виду да је главна компонента ћелијског зида *Novosphingobium aromaticivorans*-а управо гликосфинголипид веома је вероватно да и ова бактерија остварује директне контакте са хуманим ћелијама посредством галектина-3.

Познато је да у патогенези РВС који развијају мишеви након инфекције бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* кључну улогу играју НКТ ћелије које цитокинима које продукују стимулишу настанак инфламацијских аутореактивних лимфоцита (50). Међутим како НКТ ћелије углавном препознају гликосфинголипиде приказане у склопу молекула CD1d исказаног на дендритским ћелијама анализирани су карактеристике и НКТ и дендритских ћелија у инфицираним мишевима у присуству и одсуству галектина-3.

Иако је уочено смањење процента NKT ћелија у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева четири недеље након бактеријске инфекције (Графикон 32) између испитиваних група нису уочене значајне разлике у фенотипу ових ћелија, осим већег процента CD69⁺ и FASL⁺ NKT ћелија у јетри WT мишева (Графикони 33 и 34).

Анализа фенотипа дендритских ћелија у јетри и слезини три дана после инфекције бактеријом показала је значајно мањи проценат активираних и IL-12⁺ дендритских ћелија у слезини Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са WT мишевима (Графикон 20) док је у јетри Gal-3 дефицијентних мишева присутан значајно мањи проценат IL-1⁺ дендритских ћелија (Графикон 21). Поред тога у фази развијене болести у јетрама Gal-3 дефицијентних мишева као и WT мишева третираних инхибитором галектина-3, детектован је значајно мањи проценат активираних CD86⁺ и инфламацијских (IL-6⁺ TNF- α ⁺ и IL-12⁺) мијелоидних CD11c⁺CD11b⁺ као и CD11c⁺CD1d⁺ дендритских ћелија које приказују липидне антигене NKT ћелијама (Графикони 36 и 37).

Наведени резултати су супротни резултатима добијеним у моделу болести индуковане ксенобиотиком али су сагласни резултатима претходно наведене студије која указује да Gal-3 дефицијентне дендритске ћелије продукују мање антиинфламацијског цитокина IL-10 и тако подстичу продукцију IFN- γ у алогеним Т лимфоцитима (317), као и налазом да блокада експресије Gal-3 коришћењем siRNA мења проинфламацијски фенотип и учинак дендритских ћелија добијених из моноцита (352). Блокада експресије Gal-3 у дендритским ћелија повећава продукцију IL-12 p35 и IL-10, а смањује IL-23 p19, IL-6, IL-1 β што за последицу има неадекватан развој Th17 лимфоцита (352). Налаз ове студије је у сагласности са овде приказаним налазом значајног смањења процента IL-1⁺ дендритских ћелија у јетри Gal-3 дефицијентних мишева, без разлике у проценту IL-12⁺ дендритских ћелија што може да објасни и смањење броја Th17 и Tc17 лимфоцита у јетри у одсуству галектина-3. Атенуација инфламацијског фенотипа дендритских ћелија у одсуству галектина-3 је у сагласности са резултатима других студија у којима је проучавана улога овог молекула у патогенези различитих инфламацијских болести јетре (279, 284) и акутног колитиса (277). Такође овде приказани резултати показују да *in vitro* бактеријска стимулација дендритских ћелија изолованих из здравих WT мишева значајно повећава проценат активираних CD86⁺ и инфламацијских IL-12⁺ дендритских ћелија (Графикони 25 и 26), а да истоветна

стимулација дендритских ћелија изолованих из Gal-3 дефицијентних мишева скоро да и не мења фенотип ових ћелија.

Претходно наведени резултати указују да Gal-3 дефицијентни мишеви скоро да и не развијају РВС након инфекције бактеријом највероватније због немогућности дендритских ћелија да се адекватно активирају бактеријом у одсуству галектина-3 услед чега изостаје адекватна активација и НКТ ћелија и аутореактивних Т лимфоцита па се и не развија хронична билијарна инфламација. Овај закључак је у складу са резултатима претходних студија у којима је показано да Gal-3 повећава капацитет дендритских ћелија да подстакну ефекторску улогу НКТ ћелија и оштећење јетре у моделу хепатитиса изазваном α -галактозил церамидом (278).

Показано је да присуство галектина-3 на НК ћелијама не утиче на активацију и фенотип ових ћелија након *in vitro* стимулације бактеријама али и да је стимулација ових ћелија бактеријом врло слаба (Графикони 23 и 24). Такође међу испитиваним групама, три дана након инфекције, не постоје разлике у проценту инфламацијских и цитотоксичких НК ћелија. Међутим од четврте недеље по инфекцији у јетрама WT мишева присутни су значајно већи проценти активираних, инфламацијских и цитотоксичких НК ћелија (Графикони 34, 35, 36). Овај резултат је супротан до сада публикованим резултатима о утицају галектина-3 на функцију НК ћелија у којима је показано да галектин-3 супримира антитуморску цитотоксичку активност ових ћелија (353, 354). Међутим, наши резултати такође указују да НК ћелије вероватно нису укључене у рани имунски одговор на *Novosphingobium aromaticivorans* и могуће је да је инфламацијски фенотип ових ћелија у фази испољене болести последица активације НК ћелије инфламацијским дендритским ћелијама код WT мишева. Могуће је да инфламацијске дендритске ћелије WT мишева, активирание бактеријом, продукцијом цитокина активирају НК ћелије које онда продукују IFN- γ који повратно делује на дендритске ћелије чиме се успоставља позитивна повратна спрега којом се знатно појачава инфламацијски одговор (355), а да код Gal-3 дефицијентних мишева ова интеракција изостаје јер нема адекватне активације дендритских ћелија што је разлог појаве регулаторног фенотипа НК ћелија у јетри Gal-3 дефицијентних и мишева третираних инхибитором галектина-3 (Графикон 35). Познато је да се НК ћелије активирају у току развоја РВС и доприносе мултистепену патогенези болести, деплеција ових ћелија

знатно смањује продукцију аутоантитела као и продукцију инфламцијских цитокина Т лимфоцита (356).

5.8. Дефицијенција Gal-3, као и примена инхибитора Gal-3 код WT мишева, значајно смањују активацију инфламазома код C57BL/6 мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*

Познато је да активација инфламазома у макрофагима јетре игра значајну улогу у патогенези различитих болести овог органа, доприноси оштећењу јетре, инфламацији и фибрози (357, 358). NLRP3 се везује за адапторски протеин ASC и формира се инфламазом који цепа прокаспазу 1 до активне форме каспазе 1 која учествују у ослобађању активне форме проинфламацијског цитокина IL-1 β (359). Трансгени мишеви који конститутивно експримирају активну форму NLRP3 испољавају узражену пироптозу хепатоцита, инфламацију и фиброзу (358) док деплеција NLRP3 штити мишеве од развоја оштећења јетре. Резултати недавно публиковане студије указују да је галектин-3 неопходан за адекватну активацију инфламазома (360). У складу са овим налазом су и резултати овде приказане студије који јасно документују значајно већи проценат дендритских CD11c⁺ и мијелоидних CD11b⁺ ћелија које експримирају компоненту инфламазома NLRP3 у популацији моноклеарних ћелија изолованих из јетре и слезине WT мишева три дана након бактеријске инфекције у поређењу са групом Gal-3 дефицијентних мишева (Графикон 22). Значајно је напоменути да је већи проценат ћелије које експримирају NLRP3 детектован међу моноклеарним ћелијама јетре у поређењу са ћелијама изолованим из слезине. Такође стимулација дендритских ћелија изолованих из Gal-3 дефицијентних мишева бактеријом и липополисахаридом *in vitro* не утиче на експресију NLRP3 у овим ћелијама, док истоветна стимулација дендритских ћелија WT мишева повећава проценат ћелија које експримирају NLRP3⁺ (Графикон 27). У складу са наведеним резултатима су и налази недавно публиковане студије у којој је показано да dnTGF- β RII који спонтано развијају болест, која личи на РВС људи, развијају значајно мању инфламацију и фиброзу јетре уколико им се уклони и ген који кодира Gal-3 што се објашњава неадекватном

стимулацијом инфламазома који има важну улогу у патогенези овог модела РВС и доприноси активацији Th17 лимфоцита (361).

Активација инфламазома је важна у патогенези метаболичких и инфламацијских болести јетре које покрећу понављајући слаби стимулуси (алкохолна болест јетре, неалкохолни стеатохепатитис или хронични вирусни хепатитис). Инфламација које се развија у овим болестима зависи од инфламазома који интегрише мултипле слабе сигнале, активира се и покреће инфламацију. Са друге стране у болестима које покрећу јаки стимулуси имунског система као што су аутоимунски хепатитис, или хепатитис индукован парацетамолом активација инфламазома не игра никакву улогу. Овакве стимулусе детектују рецептори на ћелијама урођене имуности који покрећу другачије сигналне путеве који опет за резултат имају инфламацију (362).

Како је *Novosphingobium aromaticivorans* бактерија са атипичним ћелијским зидом који садржи гликофинголипиде као и еукариотске ћелије и која, иако се детектује на слузници дигестивног тракта, углавном не изазива инфламацију нити оштећење ткива (49, 326, 327) сасвим је могуће да се код мишева инфламацијски одговор на ову бактерију и активација дендритских ћелија покреће стимулацијом инфламазома (интеграцијом слабих сигнала) што омогућава даљу активацију ћелија имунског система и развој холангитиса. Изразито слабија болест код Gal-3 дефицијентних мишева говори у прилог ове претпоставке с обзиром да галектин-3 подстиче активацију инфламазома. Са друге стране у моделу РВС индукованом имунизацијом ксенобиотиком у адјувансу који садржи стимулаторе TLR искључује се утицај активације инфламазома на стимулацију урођеног имунског одговора. Утицај галектина-3 на продукцију инфламацијских цитокина у дендритским ћелијама након снажне стимулације TLR агонистима нема толики значај као што има у активацији инфламазома. Дендритске ћелије и WT и Gal-3 дефицијентних мишева се адекватно активирају након имунизације, односно вероватно се покреће врло сличан инцијални имунски одговор, па експресија галектина-3 у овом моделу има већи утицај на ток болести. У одсуству галектина-3 холангиоцити су подложнији апоптози коју покреће имунски одговор, тиме се ослобађа више аутоантигена који повратно делује на додатну активацију аутореактивних лимфоцита што повратно појачава имунски одговор и појачава оштећење јетре.

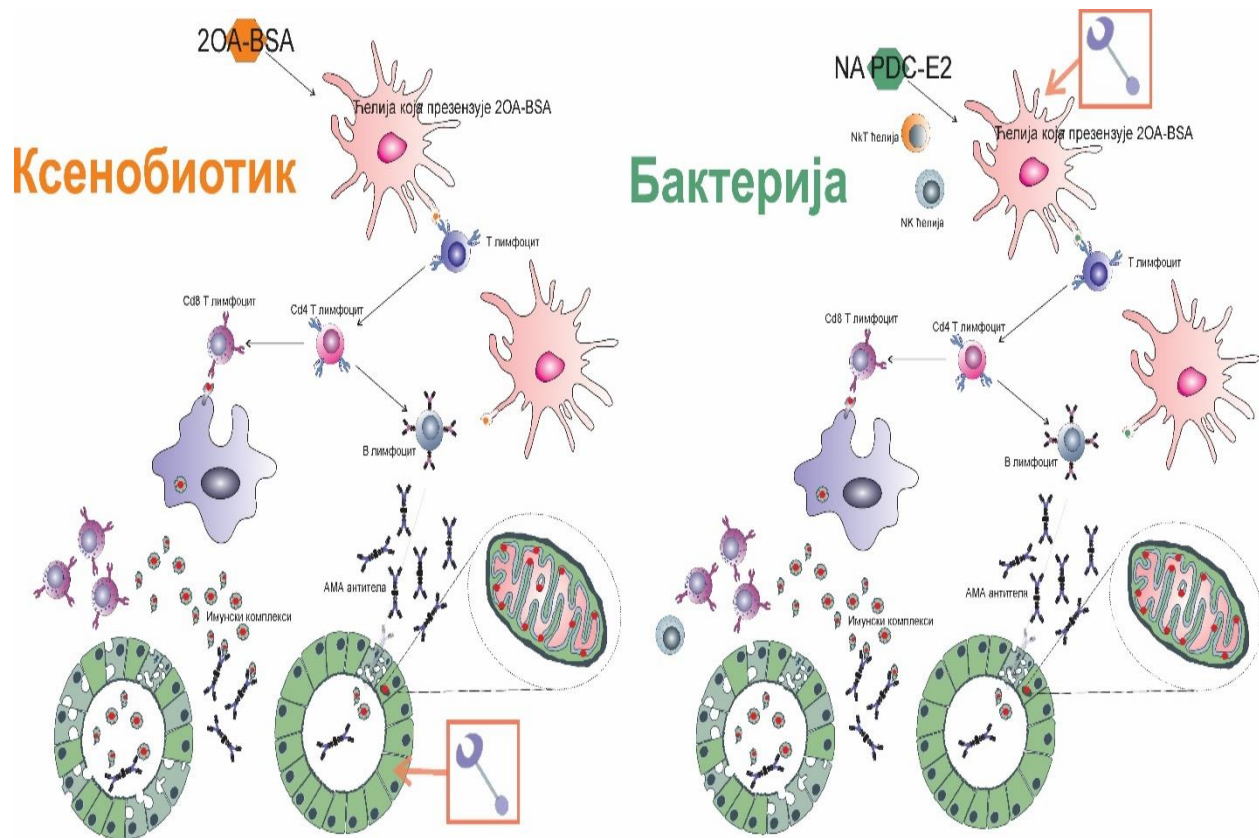


Схема 6. Приказује кључну улогу галектина-3 у два различито индукована модела примарног билијарног холангитиса

6. ЗАКЉУЧЦИ

Дефицијенција галектина-3 погоршава РВС ако је болест изазвана имунизацијом **ксенобиотиком** у адјувансу. На овај начин изазвану болест карактеришу:

- израженија апоптоза холангиоцита што повећава количину доступног аутоантигена
- већи инфлукс инфламацијских Т лимфоцита и дендритских ћелија, без промена у релативном односу појединих популација имунских ћелија као и инфламацијских лимфоцита и дендритских ћелија.

Ако се болест изазива инфекцијом *Novosphingobium aromaticivorans*-ом недостатак галектина-3 као и примена инхибитора галектина-3 значајно редукују оштећења билијарних канала. Етиопатогенеза овако индуковане болести има много више сличности са РВС-ом код људи у поређењу са РВС који се индукује применом ксенобиотика у великој количини адјуванаса. Редуковано оштећење билијарних канала у одсуству галектина-3 у овом моделу болести је праћено значајно слабијом активацијом дендритских ћелија, вероватно због доминантне улоге инфлазама у стимулацији имунског одговора бактеријом што за последицу има слабију активацију НК ћелија као и слабији развој инфламацијских Т лимфоцита који одржавају аутоимунски процес.

Евентуална будућа примена инхибитора галектина-3 у терапији РВС морала би се заснивати на прецизној целуларној и молекулској процени основних патогенетских механизма инфламације у сваком појединачном случају. Уколико би се прецизно утврдило да се болест превасходно одвија слично моделу бактеријске инфекције могло би се очекивати да примена инхибитора ублажи болест. Али у случају да оболели имају инфекцију која изазива системски инфламацијски одговор, евентуална примена инхибитора би могла да погорша стање због удруженог ефекта јаче активације ћелија урођене имуности цитокинима који се продукују у току системског инфламацијског одговора и могућег већег ослобађања аутоантигена из холангиоцита.

Закључци су проистекли из следећих експерименталних резултата:

1. Одсуство галектина-3 појачава оштећење билијарних канала у моделу РВС изазваном имунизацијом ксенобиотиком, судећи према вредностима хистолошког скорa и серумских параметара.
2. Одсуство галектина-3 у РВС индукованом имунизацијом ксенобиотиком појачава системски Th17 имунски одговор и фиброзу јетре.
3. Одсуство галектина-3 у РВС индукованом имунизацијом ксенобиотиком је удружено, са већим бројем CD8+T лимфоцита као и инфламацијских CD4+ и CD8+T лимфоцита који садрже IFN- γ у мононуклеарним инфилтратима јетре.
4. Тежи облик РВС индукованог имунизацијом ксенобиотиком који се развија код Gal-3 дефицијентних мишева је удружен са масивнијом апоптозом холангиоцита будући да су ове ћелије Gal-3 дефицијентних мишева осетљивије на апоптотске стимулусе *in vitro*.
5. Одсуство галектина-3 у моделу РВС индукованом имунизацијом ксенобиотиком је повезано са повећањем броја активираних (CD86+ и МНС II+) и инфламацијских (TNF- α) дендритских ћелија.
6. Одсуство галектина-3 значајно смањује оштећење билијарних канала у моделу РВС изазваном инфекцијом бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans*.
7. Одсуство галектина-3 у моделу РВС индукованом бактеријском инфекцијом је праћено смањењем заступљености Th17 и Tc17 лимфоцита у јетри.
8. Мање оштећење билијарних канала код Gal-3 КО мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* повезано је са смањењем процента НК ћелија, мањим процентом активираних, цитолитичких и проинфламацијских НК ћелија, као и повећањем антиинфламацијских НК ћелија у јетри у ефекторској фази болести.
9. Мање оштећење билијарних канала у јетри Gal-3 КО мишева инфицираних бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* је повезано са смањеном експресијом компоненте инфлазама у мијелоидним ћелијама што резултује неадекватним развојем инфламацијских дендритских ћелија.
10. Превентивна примена Gal-3 инхибитора значајно смањује оштећење билијарних канала у РВС изазваном бактеријском инфекцијом.

11. Превентивна примена Gal-3 инхибитора значајно смањује заступљеност Th17 и Tc17 лимфоцита, инфламацијских NK, NKT и дендритских ћелија и цитолитичких NK, NKT ћелија у PBC изазваном бактеријском инфекцијом.
12. Превентивна примена Gal-3 инхибитора значајно смањује експресију NLRP3 компоненте инфламосома у ткиву јетре.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Addison T, Gull W. On a certain affection of the skin, vitiligoidea—(a) plana; (b) tuberosa, with remarks. *Guy's Hosp. Rep.* 1851; 7:265- 3.
2. Beuers I, Gershwin ME, Gish RG, Invernizzi P, Jones DE, Lindor K, Ma X, Mackay IR, Parés A, Tanaka A, Vierling JM, Poupon R. Changing Nomenclature for PBC: From 'Cirrhosis' to 'Cholangitis'. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39(5):e57-9.
3. Hanot V. Étude sur une forme de cirrhose hypertrophique du foie [cirrhose hypertrophique avec ictère chronique]. Paris: JB Baillière. 1876.
4. Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003;7(4):879-900.
5. Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2011; 377(9777):1600-9.
6. Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol.* 2013; 8:303-30.
7. Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1965; 1:827–31.
8. Fussey SP, Guest JR, James OF, Bassendine MF, Yeaman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85:8654–58.
9. Moteki S, Leung PS, Dickson ER, Van Thiel DH, Galperin C, Buch T, Alarcon-Segovia D, Kershenovich D, Kawano K, Coppel RL, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology.* 1996; 23(3):436-44.
10. Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF. Asymptomatic primary biliary cirrhosis; clinical features, prognosis and symptom progression in a large population based cohort. *Gut.* 2004; 53(6):865-70.
11. Goldblatt J, Taylor PJ, Lipman T, Prince MI, Baragiotta A, Bassendine MF, James OF, Jones DE. The true impact of fatigue in primary biliary cirrhosis: a population study . 2002, *Gastroenterology.* 2002;122(5):1235-41..
12. Al-Harthy N, Kumagi T, Coltescu C, Hirschfield GM. The specificity of fatigue in primary biliary cirrhosis: evaluation of a large clinic practice. *Hepatology.* 2010;52(2):562-70.
13. Newton JL, Hudson M, Tachtatzis P, Sutcliffe K, Pairman J, Burt JA, Jones DE. Population prevalence and symptom associations of autonomic dysfunction in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007;45(6):1496-505.

14. Hollingsworth KG, Newton JL, Taylor R, McDonald C, Palmer JM, Blamire AM, Jones DE. Pilot study of peripheral muscle function in primary biliary cirrhosis: potential implications for fatigue pathogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(9):1041-8.
15. Newton JL, Gibson GJ, Tomlinson M, Wilton K, Jones D. Fatigue in primary biliary cirrhosis is associated with excessive daytime somnolence. *Hepatology*. 2006;44(1):91-8.
16. Cerri G, Cocchi CA, Montagna M, Zuin M, Podda M, Cavallari P, Selmi C. Patients with primary biliary cirrhosis do not show post-exercise depression of cortical excitability. *Clin Neurophysiol*. 2010;121(8):1321-8.
17. Hollingsworth KG, Jones DE, Aribisala BS, Thelwall PE, Taylor R, Newton JL, Blamire AM. Globus pallidus magnetization transfer ratio, T(1) and T(2) in primary biliary cirrhosis: relationship with disease stage and age. *J Magn Reson Imaging*. 2009; 29(4):780-4.
18. Jones DE, Bhala N, Burt J, Goldblatt J, Prince M, Newton JL. Four year follow up of fatigue in a geographically defined primary biliary cirrhosis patient cohort. *Gut*. 2006; 55(4):536-41.
19. Jones DE, Al-Rifai A, Frith J, Patanwala I, Newton JL. The independent effects of fatigue and UDCA therapy on mortality in primary biliary cirrhosis: results of a 9 year follow-up. *J Hepatol*. 2010; 53(5):911-7.
20. Patel A, Seetharam A. Primary Biliary Cholangitis: Disease Pathogenesis and Implications for Established and Novel Therapeutics. *J Clin Exp Hepatol*. 2016; 6(4):311-318.
21. Kremer AE, Namer B, Bolier R, Fischer MJ, Oude Elferink RP, Beuers U. Pathogenesis and Management of Pruritus in PBC and PSC. *Dig Dis*. 2015; 33 Suppl 2:164-75.
22. Leslie WD, Bernstein CN, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in hepatic disorders. *Gastroenterology*. 2003; 125(3):941-66.
23. Zeron PB, Retamozo S, Bové A, Kostov BA, Sisó A, Ramos-Casals M. Diagnosis of Liver Involvement in Primary Sjögren Syndrome. *J Clin Transl Hepatol*. 2013; 1(2):94-102.
24. Bowlus CL, Gershwin ME. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev*. 2014; 13(4-5):441-4.
25. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1978; 379(2):103-12.
26. Scheuer P. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med*. 1967;60(12):1257-60.
27. Nakanuma Y, Harada K. Florid duct lesion in primary biliary cirrhosis shows highly proliferative activities. *J Hepatol*. 1993; 19:216-221.
28. Sipponen P, Salaspuro MP, Makkonen H. Histological characteristics of chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis with special reference to orcein positive hepatocellular accumulations. *Ann Clin Res*. 1976; 8(3):200-5.

29. James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom? *Hepatology* 1999; 30:390-394.
30. Metcalf JV, Bhopal RS, Gray J, Howel D, James OF. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis in the city of Newcastle upon Tyne, England. *Int J Epidemiol* 1997; 26:830-836.
31. Kim WR, Lindor KD, Locke GR, Therneau TM, Homburger HA, Batts KP, Yawn BP, Petz JL, Melton LJ, Dickson ER. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology* 2000; 119:1631-1636.
32. Koulentaki M, Mantaka A, Sifaki-Pistolla D, Thalassinos E, Tzanakis N, Kouroumalis E. Geoepidemiology and space-time analysis of Primary biliary cirrhosis in Crete, Greece. *Liver Int* 2014; 34: e200-e207.
33. Ala A, Stanca CM, Bu-Ghanim M, Ahmado I, Branch AD, Schiano TD, Odin JA, Bach N. Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near Superfund toxic waste sites. *Hepatology* 2006; 43:525-531.
34. Abu-Mouch S, Selmi C, Benson GD, Kenny TP, Invernizzi P, Zuin M, Podda M, Rossaro L, Gershwin ME. Geographic clusters of primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol* 2003; 10:127-131.
35. Prince MI, Chetwynd A, Diggle P, Jarner M, Metcalf JV, James OF. The geographical distribution of primary biliary cirrhosis in a well-defined cohort. *Hepatology* 2001; 34: 1083-1088.
36. Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex. *Autoimmun Rev.* 2008;7(8):626-30.
37. Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, Heneghan MA, Neuberger JM, Donaldson PT, Day DB, Ducker SJ, Muriithi AW, Wheeler EF, Hammond CJ, Dawwas MF, Jones DE, Peltonen L, Alexander GJ, Sandford RN, Anderson CA. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2011; 43:329-332.
38. McNally RJ, Ducker S, James OF. Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis. *Hepatology* 2009; 50:1169-1174.
39. Miller FW1, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, De Roos AJ. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4):259-71.
40. Selmi C, Leung PS, Sherr DH, Diaz M, Nyland JF, Monestier M, Rose NR, Gershwin ME. Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: a National Institute of Environmental Health Sciences expert panel workshop. *J Autoimmun.* 2012;39(4):272-84.
41. Jones DE, Watt FE, Metcalf JV, Bassendine MF, James OF. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically based population study. *J Hepatol* 1999; 30:402-407.

42. Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, Lindor KD, Kaplan MM, Vierling JM. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview based study of 1032 patients. *Hepatology* 2005; 42:1194-1202.
43. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, Gordon SC, Wright HI, Zweiban B, Podda M, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004; 127:485-492.
44. Liu JZ, Almarri MA, Gaffney DJ, Mells GF, Jostins L, Cordell HJ, Ducker SJ, Day DB, Heneghan MA, Neuberger JM, Donaldson PT, Bathgate AJ, Burroughs A, Davies MH, Jones DE, Alexander GJ, Barrett JC, Sandford RN, Anderson CA. Dense fine-mapping study identifies new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2012; 44: 1137-1141.
45. Bogdanos DP, Pares A, Baum H, Caballeria L, Rigopoulou EI, Ma Y, Burroughs AK, Rodes J, Vergani D. Disease-specific cross-reactivity between mimicking peptides of heat shock protein of *Mycobacterium gordonae* and dominant epitope of E2 subunit of pyruvate dehydrogenase is common in Spanish but not British patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2004;22(4):353-62.
46. Bogdanos DP, Baum H, Okamoto M, Montalto P, Sharma UC, Rigopoulou EI, Vlachogiannakos J, Ma Y, Burroughs AK, Vergani D. Primary biliary cirrhosis is characterized by IgG3 antibodies cross-reactive with the major mitochondrial autoepitope and its *Lactobacillus* mimic. *Hepatology.* 2005; 42(2):458-65.
47. Kaplan MM. *Novosphingobium aromaticivorans*: a potential initiator of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2147-2149.
48. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Gershwin ME. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology.* 2003;38(5):1250-7.
49. Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, Leung PS, Balkwill DL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2005; 24(3):209-19.
50. Mattner J, Savage PB, Leung P, Oertelt SS, Wang V, Trivedi O, Scanlon ST, Pendem K, Teyton L, Hart J, Ridgway WM, Wicker LS, Gershwin ME, Bendelac A. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(5):304-15.
51. Rieger R, Leung PS, Jeddelloh MR, Kurth MJ, Nantz MH, Lam KS, Barsky D, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 27(1):7-16.
52. Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Yoshida K, Yang GX, Hibi T, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology.* 2008; 48(2):531-40.

53. Wakabayashi K, Yoshida K, Leung PS, Moritoki Y, Yang GX, Tsuneyama K, Lian ZX, Hibi T, Ansari AA, Wicker LS, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Induction of autoimmune cholangitis in non-obese diabetic (NOD).1101 mice following a chemical xenobiotic immunization. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155(3):577-86.
54. Ambrosini YM, Yang GX, Zhang W, Tsuda M, Shu S, Tsuneyama K, Leung PS, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. The multi-hit hypothesis of primary biliary cirrhosis: polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166(1):110-20.
55. Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, Leung PS, Illarionov P, Gershwin ME, Chuang YH. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53(3):915-25.
56. Gershwin ME, Ansari AA, Mackay IR, Nakanuma Y, Nishio A, Rowley MJ, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunol Rev.* 2000;174:210-25.
57. Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, Coppel RL, Kaplan MM, Gershwin ME. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest.* 2002; 109(9):1231-40.
58. Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol.* 2009; 31(3):323-31.
59. Wu CT, Davis PA, Luketic VA, Gershwin ME. A review of the physiological and immunological functions of biliary epithelial cells: targets for primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis and drug-induced ductopenias. *Clin Dev Immunol.* 2004; 11(3-4):205-13.
60. Kimura Y, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nishioka M, Giraud AS, Neuberger J, Benson G, Kaul R, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2002; 36(5):1227-35.
61. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis *World J Gastroenterol.* 2008;14(21):3328-37.
62. Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF, Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest.* 2001; 108(2):223-32.
63. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Mackay IR, Gores GJ, Ansari AA, Van de Water J, Gershwin ME. Apoptoses and the biliary specificity of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 49(3):871-9.
64. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, Ansari AA, Coppel RL, Worman HJ, Gores GJ, Gershwin ME. Biliary apoptoses and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 52(3):987-98.

65. Van de Water JI, Gerson LB, Ferrell LD, Lake JR, Coppel RL, Batts KP, Wiesner RH, Gershwin ME. Immunohistochemical evidence of disease recurrence after liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1996; 24(5):1079-84.
66. Van de Water J, Turchany J, Leung PS, Lake J, Munoz S, Surh CD, Coppel R, Ansari A, Nakanuma Y, Gershwin ME. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2653-64.
67. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, De Lellis R, Coppel R, Ansari A, Gershwin ME. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology*. 1995; 21(4):1031-7.
68. Matsumura S, Van De Water J, Leung P, Odin JA, Yamamoto K, Gores GJ, Mostov K, Ansari AA, Coppel RL, Shiratori Y, Gershwin ME. Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2004;39(5):1415-22.
69. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, Luketic V, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med*. 2002; 195(1):113-23.
70. Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K, Kita H, Niino H, Arinobu Y, Ono N, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2008; 31(2):110-5.
71. Van de Water J, Ansari A, Prindiville T, Coppel RL, Ricalton N, Kotzin BL, Liu S, Roche TE, Krams SM, Munoz S, Gershwin ME. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med*. 1995; 181(2):723-33.
72. Wang J, Yang G, Dubrovsky AM, Choi J, Leung PS. Xenobiotics and loss of tolerance in primary biliary cholangitis. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(1):338-48.
73. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, Curbishley SM, Withers DR, Reynolds GM, Shetty S, Harki J, Shaw JC, Eksteen B, Hubscher SG, Walker LS, Adams DH. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol*. 2010; 184(6):2886-98.
74. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, Chuang YH, Nakamura T, Saito S, Shimoda S, Tanaka A, Bowlus CL, Takano Y, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43(4):729-37.

75. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2009; 32(1):43-51.
76. Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon gamma accelerates NF-kappaB activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol.* 2006; 59(2):184-90.
77. Shimoda S, Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 51(2):567-75.
78. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, Shu SA, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Kronenberg M, Flavell RA, Gao B, Gershwin ME. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008; 47(2):571-80.
79. Inamura K, Tsuji H, Nakamoto Y, Suzuki M, Kaneko S. Transgenic mice aberrantly expressing pyruvate dehydrogenase complex E2 component on biliary epithelial cells do not show primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2006; 145(1):93-100.
80. Butler P, Hamilton-Miller J, Baum H, Burroughs AK. Detection of M2 antibodies in patients with recurrent urinary tract infection using an ELISA and purified PBC specific antigens. Evidence for a molecular mimicry mechanism in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis? *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 35(3):473-85.
81. Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology.* 1995 Dec;109(6):1969-76.
82. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290(2):G377-85.
83. Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157(2):261-70.
84. Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity in the pathogenesis of biliary diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010; 9(2):83-90.
85. Sasatomi K, Noguchi K, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. Abnormal accumulation of endotoxin in biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 1998; 29(3):409-16.
86. Harada K, Nakanuma Y. Cholangiopathy with respect to biliary innate immunity. *Int J Hepatol.* 2012; 2012:793569.

87. Ide T, Sata M, Nakano H, Suzuki H, Tanikawa K. Increased serum IgM class anti-lipid A antibody and therapeutic effect of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1997; 44(18):1569-73.
88. Ballot E, Bandin O, Chazouilleres O, Johanet C, Poupon R. Immune response to lipopolysaccharide in primary biliary cirrhosis and autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2004; 22(2):153-8.
89. Mason A, Xu L, Shen Z, Fodera B, Joplin R, Neuberger J, O'Donnell B. Patients with primary biliary cirrhosis make anti-viral and anti-mitochondrial antibodies to mouse mammary tumor virus. *Gastroenterology*. 2004; 127(6):1863-4.
90. Mason AL, Xu L, Guo L, Munoz S, Jaspán JB, Bryer-Ash M, Cao Y, Sander DM, Shoenfeld Y, Ahmed A, Van de Water J, Gershwin ME, Garry RF. Detection of retroviral antibodies in primary biliary cirrhosis and other idiopathic biliary disorders. *Lancet*. 1998; 351(9116):1620-4.
91. Xu L, Shen Z, Guo L, Fodera B, Keogh A, Joplin R, O'Donnell B, Aitken J, Carman W, Neuberger J, Mason A. Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14):8454-9.
92. Mason AL, Zhang G. Linking human beta retrovirus infection with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010; 34(6-7):359-66.
93. Mason AL. The evidence supports a viral aetiology for primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2011; 54(6):1312-4.
94. Montano-Loza AJ, Wasilenko S, Bintner J, Mason AL. Cyclosporine A inhibits in vitro replication of betaretrovirus associated with primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 2010; 30(6):871-7.
95. Selmi C. The evidence does not support a viral etiology for primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2011; 54(6):1315-6.
96. Jones DE. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2003; 39(4):639-48.
97. Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, Coppel RL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2005; 42(4):802-8.
98. Kikuchi K, Lian ZX, Yang GX, Ansari AA, Ikehara S, Kaplan M, Miyakawa H, Coppel RL, Gershwin ME. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2005; 128(2):304-12.
99. Moritoki Y, Lian ZX, Wulff H, Yang GX, Chuang YH, Lan RY, Ueno Y, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted by the TLR9 ligand CpG and suppressed by potassium channel blockers. *Hepatology*. 2007; 45(2):314-22.

100. Selmi C, Lleo A, Pasini S, Zuin M, Gershwin ME. Innate immunity and primary biliary cirrhosis. *Curr Mol Med*. 2009; 9(1):45-51.
101. Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Nakada S, Nakanuma Y. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology*. 2008; 48(1):186-95.
102. Krams SM, Dorshkind K, Gershwin ME. Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Exp Med*. 1989; 170(6):1919-30.
103. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. Irie J, Wu Y, Wicker LS, Rainbow D, Nalesnik MA, Hirsch R, Peterson LB, Leung PS, Cheng C, Mackay IR, Gershwin ME, Ridgway WM. *J Exp Med*. 2006; 203(5):1209-19.
104. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, Chuang YH, Padgett KA, He XS, Ridgway WM, Ansari AA, Coppel RL, Li MO, Flavell RA, Kronenberg M, Mackay IR, Gershwin ME. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol*. 2006; 177(3):1655-60.
105. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, Yang GX, Ridgway W, Ueno Y, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 44(5):1240-9.
106. Hsu W, Zhang W, Tsuneyama K, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Coppel RL, Lian ZX, Mackay I, Gershwin ME. Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology*. 2009; 49(1):133-40.
107. Zhang W, Sharma R, Ju ST, He XS, Tao Y, Tsuneyama K, Tian Z, Lian ZX, Fu SM, Gershwin ME. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimicrobial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology*. 2009; 49(2):545-52.
108. Amano K, Leung PS, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, Suen YF, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Lam KS, Zeniya M, Matsuura E, Coppel RL, Gershwin ME. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol*. 2005; 174(9):5874-83.
109. Naiyanetr P, Butler JD, Meng L, Pfeiff J, Kenny TP, Guggenheim KG, Reiger R, Lam K, Kurth MJ, Ansari AA, Coppel RL, López-Hoyos M, Gershwin ME, Leung PS. Electrophile-modified lipoic derivatives of PDC-E2 elicits anti-mitochondrial antibody reactivity. *J Autoimmun*. 2011; 37(3):209-16.
110. Leung PS, Park O, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Induction of primary biliary cirrhosis in guinea pigs following chemical xenobiotic immunization. *J Immunol*. 2007; 179(4):2651-7.

111. Leung PS, Quan C, Park O, Van de Water J, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Coppel RL, Lam KS, Gershwin ME. Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies. *J Immunol*. 2003; 170(10):5326-32.
112. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005; 353(12):1261-73.
113. Kawahara K, Moll H, Knirel YA, Seydel U, Zähringer U. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur J Biochem*. 2000; 267(6):1837-46.
114. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:297-336.
115. Van Kaer L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(1):31-42. .
116. Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol*. 2002; 3(12):1163-8.
117. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation *J Exp Med*. 2004; 199(12):1607–1618.
118. de Waard A, Hickman S, Kornfeld S. Isolation and properties of β -galactoside binding lectins of calf heart and lung. *J Biol Chem*. 1976; 251(23):7581-7.
119. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994; 76(4):597-8.
120. Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD, Stowell SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol Biol*. 2015; 1207:1-35.
121. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR, Rabinovich GA. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*. 2011; 50(37):7842-57.
122. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol*. 2004; 21(7):1177-87.
123. Bonzi J, Bornet O, Betzi S, Kasper BT, Mahal LK, Mancini SJ, Schiff C, Sebban-Kreuzer C, Guerlesquin F, Elantak L. Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. *Nat Commun*. 2015; 6:6194.

124. Liu SD, Whiting CC, Tomassian T, Pang M, Bissel SJ, Baum LG, Mossine VV, Poirier F, Huflejt ME, Miceli MC. Endogenous galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. *Blood*. 2008; 112(1):120-30.
125. Thiemann S, Baum LG. The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins. *J Clin Immunol*. 2011; 31(1):2-9.
126. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1253:181-92.
127. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2009; 185(3):381-5.
128. Baum LG, Garner OB, Schaefer K, Lee B. Microbe-host interactions are positively and negatively regulated by galectin-glycan interactions *Front Immunol*. 2014; 5:284.
129. Hsu DK, Yang RY, Liu FT. Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol*. 2006; 417:256-273.
130. Lichtenstein RG, Rabinovich GA. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death Differ*. 2013; 20(8):976-86.
131. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 1999; 9(10):979-84.
132. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994; 269(33):20807-10.
133. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004; 19(7-9):433-40.
134. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-Ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *Glycoconj J*. 2004; 19(7-9):433-40.
135. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure*. 1995; 3(12):1379-93.
136. Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P, Acharya KR. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry*. 1998; 37(40):13930-40.
137. Varela PF, Solís D, Díaz-Mauriño T, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. A crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *J Mol Biol*. 1999; 294(2):537-49.
138. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(13):1679-700.

139. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e17.
140. Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai K, Wada Y, Futai M. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 361(2):195-201.
141. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation*. 1998; 63(3):159-68.
142. Wilson TJ, Firth MN, Powell JT, Harrison FL. The sequence of the mouse 14 kDa β -galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem J*. 1989; 261(3):847-52.
143. Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol*. 2002; 71(5):741-52.
144. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(5):338-52.
145. Yang RY, Yu L, Graham JL, Hsu DK, Lloyd KC, Havel PJ, Liu FT. Ablation of a galectin preferentially expressed in adipocytes increases lipolysis, reduces adiposity, and improves insulin sensitivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(46):18696-701.
146. Yang RY, Havel PJ, Liu FT. Galectin-12: a protein associated with lipid droplets that regulates lipid metabolism and energy balance. *Adipocyte*. 2012; 1(2):96-100.
147. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002; 277(18):15819-27.
148. Shi Y, He B, Kuchenbecker KM, You L, Xu Z, Mikami I, Yagui-Beltran A, Clement G, Lin YC, Okamoto J, Bravo DT, Jablons DM. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 2007; 121(6):1175-81.
149. Boyle KB, Randow F. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16(3):339-48.
150. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol*. 2007; 66:143-158.
151. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(1):29-41.
152. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572(2-3):232-54.

153. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem.* 2008; 283(15):10109-23.
154. Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9(5):578-84.
155. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572(2-3):263-73.
156. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):313-20.
157. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9):583-91.
158. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem.* 1998; 273:13047-13052.
159. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem.* 1994; 269:4424-4430.
160. Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 281:27-35.
161. Fang R, Mantle M, Ceri H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J.* 1993; 293:867-872.
162. Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Nakamura T. Characterization of the *Xenopus* galectin family. Three structurally different types as in mammals and regulated expression during embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:12285-12293.
163. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. 2004, Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J.* 2004; 19:441-9.
164. Cooper DN1, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol.* 1991; 115:1437-1448.
165. Watt DJ, Jones GE, Goldring K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J.* 2004; 19:615-619.
166. Georgiadis V, Stewart HJ, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, Deltour L, Goldring K, Poirier F, Lawrence-Watt DJ. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn.* 2007; 236:1014-1024.
167. Fowles D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn.* 1995; 203:241-251.

168. GR, Vasta. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:424-438.
169. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572:274-284.
170. van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology.* 2010; 20:2-12.
171. TA, Ho MK and Springer. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1982; 128:1221-1228.
172. JL, Roff CF. and Wang. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1983; 258:10657-10663.
173. N., Liu FT. and Orida. Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem.* 1984; 259:10649-10652.
174. Cerra RF, Gitt MA and Barondes SH. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *J Biol Chem.* 1985; 260:10474-10477.
175. Sparrow CP, Leffler H. and Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem.* 1987; 262:7383-7390.
176. Raz A, Meromsky L, Zvibel I et al. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer.* 1987; 39:353-360.
177. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM et al. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem.* 1990; 265:7097-7099.
178. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, et al. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacteria and tissue collagenase. *J Biol Chem.* 1993; 268:26704-26711.
179. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* 1999; 59:6239-6245.
180. Barboni EA, Bawumia K, Henrick RC, et al. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology.* 2000; 10:1201.
181. GA, Liu FT. and Rabinovich. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:29-41.
182. Ochieng J, Furtak V. and Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J.* 2004; 19:527-535.
183. A, Almkvist J. and Karlsson. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J.* 2004; 19: 575-581.

184. Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1379:97-106.
185. Menon RP and Hughes RC.. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgy complex. *Eur J Biochem*. 1999; 264:569-576.
186. Yang RY, Hsu DK and Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:6737-6742.
187. Akahani S1, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res*. 1997; 57(23):5272-6.
188. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Letters*. 2004; 9:305-328.
189. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473:172-185.
190. Domic J, Dabelic S and Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760:616-635.
191. Thijssen VL, Poirier F, Baum LG, et al. Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood*. 2007; 110(8):2819-2827.
192. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1673(1-2):75-93.
193. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001; 83(7):667-76.
194. Moutsatsos LK, Wade M, Schindler M. et al. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 6452-6456.
195. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ et al. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2000; 255:278-290.
196. Lotz MM, Andrews CW, Korzelius Jr CA et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:3466-3470.
197. Honjo Y, Inohara H, Akahani S et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:4635-4640.
198. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F et al. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett*. 2004; 212:233-239.
199. RC, Sato S and Hughes. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem*. 1994; 269:4424-4430.

200. W., Nickel. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem.* 2003; 270:2109-2119.
201. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338:1031–1036.
202. W., Nickel. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 2005; 6(8):607-14.
203. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Exp Cell Res* 1998; 245:294–302.
204. Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies, *J Pathol.* 1999; 187:481–9.
205. Pesheva P, Kuklinski S, Schmitz B, Probstmeier R. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *J Neurosci Res* 1998; 54: 639–54 (1998).
206. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156:899–909
207. Van den Brule FA, Bellahcene A, Jackers F, Liu F-T, Sobel ME, Castronovo V. Antisense galectin-3 alters thymidine incorporation in human MDA-MB435 breast cancer cells. *Int J Oncology* 1997; 11:261–4.
208. Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:661–8.
209. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69:555–64.
210. Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001; 18:787–92.
211. Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 and polarized growth within collagen gels of wild-type and ricin-resistant MDCK renal epithelial cells. *Glycobiology.* 1999; 9:489–95.
212. Krugluger W, Frigeri LG, Lucas T, Schmer M, Forster O, Liu F-T, Boltz-Nitulescu G. Galectin-3 inhibits granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. *Immunobiology.* 1997; 197(1):97-109.
213. Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, Xu XC. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate.* 2002; 50:64–70.

214. Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G, Tell G. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: A role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302:545–53.
215. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A. et al. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65(16):7292-7300.
216. Lin HM, Pestell RG, Raz A. et al. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells *Oncogene.* 2002; 21:8001–8010.
217. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S. et al. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 2004; 64(18):6363-6367.
218. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):507-15.
219. Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y et al. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2002; 277:6852-6857.
220. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246(3):788-91.
221. Kim HRC, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 1999; 59:4148–54 (1999).
222. Li LC, Li J, Gao J. Review Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014; 351(2):336-43.
223. RC, Sato S. and Hughes. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem.* 1992; 267:6983-6990.
224. FT, Frigeri LG. and Liu. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J Immunol.* 1992; 148: 861-869.
225. Sato S, Burdett I. and Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res.* 1993; 207(1):8-18.
226. Schwaderer AL, Vijayakumar S, Al-Awqati Q. et al. Galectin-3 expression is induced in renal beta-intercalated cells during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(1):F148-158.
227. Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH. et al. Apical secretion of a cytosolic protein by MDCK cells: evidence for polarized release of an endogenous lectin by a non-classical secretory pathway. *J Biol Chem.* 1993; 268:11750-11757.
228. Iurisci I, Tinari N, Natoli C. et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1389-1393.

229. Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA. et al. Galectin 3 and Its Binding Protein in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2003; 48(10):2788–2795.
230. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol*. 1996;156(10):3939-44.
231. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol*. 2002; 168(4):1813-22.
232. Mataresse P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu F-T, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 2000; 85: 545–554.
233. Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289:845–850.
234. Swarte VV, Mebius RE, Joziase DH, Van den Eijnden DH, Kraal G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1998; 28:2864–2871.
235. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG. et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol*. 2002; 32(5):1434-1444.
236. DK, Liu FT. and Hsu. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect*. 2007; 20(7):455-460.
237. Pfoertner S, Jeron A, Probst-Kepper M, Guzman CA, Hansen W, Westendorf AM, Toepfer T, Schrader AJ, Franzke A, Buer J, Geffers R. Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome Biol* 2006; 7: R54.
238. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad.* 2010; 1183:158–82.
239. Cortegano I, del Pozo V, Cárđaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 downregulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol*. 1998; 161(1):385-9.
240. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:273-93.
241. Oliveira FL, Brand C, Paula AA, Arcanjo KD, Hsu DK, Liu FT, Takiya CM, Borojevic R, Chammas R, El-Cheikh MC. Lack of galectin-3 disturbs mesenteric lymph node homeostasis and B cell niches in the course of *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS One*. 2011; 6;6(5):e19216
242. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2004; 172(1):493-502.

243. Oliveira FL, Frazão P, Chammas R, Hsu DK, Liu FT, Borojevic R, Takiya CM, El-Cheikh MC. Kinetics of mobilization and differentiation of lymphohematopoietic cells during experimental murine schistosomiasis in galectin-3 $-/-$ mice. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2):300-10.
244. Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):893-902.
245. Clark AG, Weston ML, Foster MH. Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. *Glycobiology.* 2013; 23(7):893-903.
246. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 2003;112(3):389-97.
247. Chen HY, Sharma BB, Yu L, Zuberi R, Weng IC, Kawakami Y, Kawakami T, Hsu DK, Liu FT. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. *J Immunol.* 2006; 177(8):4991-7.
248. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD, Rabinovich GA. Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *J Clin Immunol.* 2011; 31(1):10-21
249. van den Berg TK, Honing H, Franke N. et al. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J. Immunol.* 2004;173:1902–1907.
250. John CM, Jarvis GA, Swanson KV. et al. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cell Microbiol.* 2002; 4:649-662.
251. S., Pelletier I. and Sato. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem.* 2002; 277:17663–17670.
252. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O. et al. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2007; 170:546–556.
253. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E. et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009; 82(2):1167-1173.
254. Forsman H, Islander U, Andréasson E. et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(2):445-454.
255. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A. et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced. *Clin Immunol.* 2009; 130(1):83-88.
256. Breuill L, Vanhoutte F, Fontaine J. et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun.* 2007; 75(11):5148-5157.

257. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY. et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 2009; 174:922–931.
258. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, Doria A. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240(8):1019-28.
259. Shimonishi T, Miyazaki K, Kono N, Sabit H, Tuneyama K, Harada K, Hirabayashi J, Kasai K, Nakanuma Y. Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol.* 2001;32(3):302-10.
260. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2008; 38:1098-1111.
261. Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripa B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 2009; 100:2077-2084.
262. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:5060-5065.
263. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, Delucchi F, Serino M, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: A major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol.* 2011. 54(5):975-83.
264. Junking M, Wongkham C, Sripa B, Sawanyawisuth K, Araki N, Wongkham S. Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer.* 2008; 44(4):619-26.
265. Tian J, Yang G, Chen HY, Hsu DK, Tomilov A, Olson KA, Dehnad A, Fish SR, Cortopassi G, Zhao B, Liu FT, Gershwin ME, Török NJ, Jiang JX. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J.* 2016; 30(12):4202-4213.
266. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. *Molecular Biology of the Cell.* Fifth edition. Science Taylor & Francis Group, 2007.
267. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. *Molecular Biology of the Cell.* Fifth edition. s.l. : Science Taylor & Francis Group, 2007.
268. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *CM., Smith.* 14(15):32, s.l. : The Scientist, T. 2000.
269. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature.* 2002; 420: 510.
270. Gritzmacher CA, Mehl VS. and Liu F-T. Genomic cloning of the gene for an IgE binding lectin reveals unusual utilization of 59 untranslated regions. *Biochemistry.* 1992; 31:9533–9538.
271. Hsu DK, Yang RY, Pan Z. et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *Am J Pathol.* 2000; 156:1073.

272. Kanji Wakabayashi, Zhe-Xiong Lian, Patrick S.C. Leung, Yuki Moritoki, Koichi Tsuneyama, Mark J. Kurth, S. Lam, Katsunori Yoshida, Guo-Xiang Yang, Toshifumi Hibi, Aftab A. Ansari, William M. Ridgway, Ross L. Coppel, Ian R. Mackay, and M. Eric Gershwin. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen PDC-E2 By a xenobiotic with ensuing biliary ductal disease. *Hepatology*. 2008; 48(2): 531–540.
273. Jiang HR1, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; 42(7):1804-14.
274. Pejnovic, N. N. et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes*. 2013; 62:1932-1944.
275. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012; 52(1-2):100-10.
276. Volarevic, V. et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*. 2012; 55:1954-1964.
277. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages. *J Crohns Colitis*. 2016; 10(5):593-606.
278. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol*. 2015; 45(2):531-43.
279. Van de Water J, Gershwin ME, Leung P, Ansari A, Coppel RL. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J. Exp. Med*. 1988; 167: 1791–1799.
280. Van de Water, J., Ansari, A.A., Surh, C.D., Coppel, R., Roche, T., Bonkovsky, H., Kaplan, M., and Gershwin, M.E. Evidence for the targeting by 2-oxo-dehydrogenase enzymes in the T cell response of primary biliary cirrhosis. *J. Immunol*. 1991; 146: 89–94.
281. Jones, D.E., Palmer, J.M., James, O.F., Yeaman, S.J., Bassendine, M.F., and Diamond, A.G. T-cell responses to the components of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1995; 21: 995–1002.
282. Kawahara, K., Kuraishi, H., and Zähringer, U. Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp and their distribution among members of the alpha-4 subclass of Proteobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 1999; 23: 408–413.

283. Kinjo Y, Wu ., Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong CH, Kronenberg M. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005; 434: 520–525.
284. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mol Med*. 2015; 21:453-65. .
285. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep*. 2016; 6:23348.
286. Gupta E, Chakravarti A. Viral infections of the biliary tract. *Saudi J Gastroenterol*. 2008; 14(3):158-60.
287. Colnot C, Ripoche MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology*. 1998; 94(3):290-6.
288. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*. 2000; 165(4):2156-64.
289. Fernández GC1, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology*. 2005; 15(5):519-27. .
290. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol*. 1995; 154(7):3479-87.
291. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*. 1995; 147(4):1016-28.
292. Greenwald AG, Jin R, Waddell TK. Galectin-3-mediated xenoactivation of human monocytes. *Transplantation*. 2009; 87(1):44-51.
293. Jung T, Schauer C, heusser C et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth*. 1993; 159(1-2):197-207.
294. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, Yang GX, Ridgway W, Ueno Y, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Nov; 44(5):1240-9.
295. Hsu W, Zhang W, Tsuneyama K, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Coppel RL, Lian ZX, Mackay I, Gershwin ME. Differential mechanisms in the pathogenesis of autoimmune

cholangitis versus inflammatory bowel disease in interleukin-2Ralpha(-/-) mice. *Hepatology*. 2009; 49(1):133-40. .

296. Yang GX, Lian ZX, Chuang YH, Moritoki Y, Lan RY, Wakabayashi K, Ansari AA, Flavell RA, Ridgway WM, Coppel RL, Tsuneyama K, Mackay IR, Gershwin ME. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology*. 2008; 47(6):1974-82.

297. Ma HD¹, Ma WT¹, Liu QZ¹, Zhao ZB¹, Liu MZ¹, Tsuneyama K², Gao JM³, Ridgway WM⁴, Ansari AA⁵, Gershwin ME⁶, Fei YY⁷, Lian ZX⁸. Chemokine receptor CXCR3 deficiency exacerbates murine autoimmune cholangitis by promoting pathogenic CD8+ T cell activation. *J Autoimmun*. 2017; 78:19-28.

298. Wakabayashi K¹, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Yoshida K, Yang GX, Hibi T, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology*. 2008; 48(2):531-40.

299. Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, Gu X, Walker EJ, Jing K, Juran BD, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Coltescu C, Atkinson EJ, Heathcote EJ, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med*. 2009; 360:2544–2555.

300. Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Lu Y, Bianchi I, Podda M, Xu C, Xie G, Macciardi F, Selmi C, Lupoli S, Shigeta R, Ransom M, Lleo A, Lee AT, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Bernuzzi F, Zuin M, Rosina F, Borghesio E, Floreani A, Lazzari R, N. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet*. 2010; 42(8):658-60.

301. Yoshida K, Yang GX, Zhang W, Tsuda M, Tsuneyama K, Moritoki Y, Ansari AA, Okazaki K, Lian ZX, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. Deletion of interleukin-12p40 suppresses autoimmune cholangitis in dominant negative transforming growth factor beta receptor type II mice. *Hepatology*. 2009; 50(5):1494-500.

302. Bae HR, Leung PS, Tsuneyama K, Valencia JC, Hodge DL, Kim S, Back T, Karwan M, Merchant AS, Baba N, Feng D, Park O, Gao B, Yang GX, Gershwin ME, Young HA. Chronic expression of interferon-gamma leads to murine autoimmune cholangitis with a female predominance. *Hepatology*. 2016; 64(4):1189-201.

303. Reynoso-Paz S¹, Leung PS, Van De Water J, Tanaka A, Munoz S, Bass N, Lindor K, Donald PJ, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. Evidence for a locally driven mucosal response and the presence of mitochondrial antigens in saliva in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2000; 31(1):24-9.

304. Rigopoulou EI, Davies ET, Bogdanos DP, Liaskos C, Mytilinaiou M, Koukoulis GK, Dalekos GN, Vergani D. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 2007; 27(9):1226-31.

305. Lotan R, Ito H, Yasui W, Yokozaki H, Lotan D, Tahara E. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer*. 1994; 56(4):474-80.
306. Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol*. 1996; 148(5):1661-70.
307. Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripa B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci*. 2009; 100(11):2077-84. .
308. Cheng YL, Huang WC, Chen CL, Tsai CC, Wang CY, Chiu WH, Chen YL, Lin YS, Chang CF, Lin CF. Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 412(2):334-40.
309. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS, Raz A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(10):4395-406.
310. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, Ansari AA, Coppel RL, Worman HJ, Gores GJ, Gershwin ME. Biliary apoptoses and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2010; 52(3):987-98
311. Rong G1, Zhong R, Lleo A, Leung PS, Bowlus CL, Yang GX, Yang CY, Coppel RL, Ansari AA, Cuebas DA, Worman HJ, Invernizzi P, Gores GJ, Norman G, He XS, Gershwin ME. Epithelial cell specificity and apoptose recognition by serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2011; 54(1):196-203.
312. Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, Cha S, Nakanuma Y, Kaplan M, De Lellis R, Coppel R, Ansari A, Gershwin ME. Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology*. 1995; 21(4):1031-7.
313. Van de Water J, Turchany J, Leung PS, Lake J, Munoz S, Surh CD, Coppel R, Ansari A, Nakanuma Y. Molecular mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex-E2. *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2653-64.
314. Lleo A, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: apoptoses and epitopes. *J Gastroenterol*. 2011; 46 Suppl 1:29-38.
315. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J Cell Physiol*. 2012; 227(2):401-7.
316. Bylund, Anna Karlsson Karin Christenson Mustafa Matlak Åse Björstad Kelly L Brown Esbjörn Telemo Emma Salomonsson Hakon Leffler Johan. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology*. 2009; 19 (1): 16-20.

317. Mobergslien A, Sioud M. Galectin-1 and -3 gene silencing in immature and mature dendritic cells enhances T cell activation and interferon- γ production. *J Leukoc. Biol.* 2012; 91:461–467.
318. Fermino ML1, Dylon LS2, Cecílio NT3, Santos SN4, Toscano MA2, Dias-Baruffi M1, Roque-Barreira MC3, Rabinovich GA5, Bernardes ES6. Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. *Mol Immunol.* 2016; 76:22-34.
319. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. The consequences of apoptosis in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008; 31(3):257-62.
320. Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, Zheng ZM, Xu Y, Qin LY, Chen SJ. Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagn Pathol.* 2013; 28:8:40.
321. Tang J, Huang H, Ji X, Zhu X, Li Y, She M, Yan S, Fung M, Li Z. Involvement of IL-13 and tissue transglutaminase in liver granuloma and fibrosis after schistosoma japonicum infection. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:753483.
322. Kawata K, Tsuda M, Yang GX, Zhang W, Tanaka H, Tsuneyama K, Leung P, He XS, Knechtle S, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Identification of potential cytokine pathways for therapeutic intervention in murine primary biliary cirrhosis. *PLoS One.* 2013; 8(9):e74225.
323. Zhang J, Zhang W, Leung PS, Bowlus CL, Dhaliwal S, Coppel RL, Ansari AA, Yang GX, Wang J, Kenny TP, He XS, Mackay IR, Gershwin ME. Ongoing activation of autoantigen-specific B cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2014; 60(5):1708-16.
324. Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, Li Y, Xu X, Jin L, Yang T, Li Z, Sun Y, Zhang JY, Lv S, Chen L, Li B, Gershwin ME, Wang FS. CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2015; 61(2):627-38.
325. Beuers U, Gershwin ME. Unmet challenges in immune-mediated hepatobiliary diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2015; 48(2-3):127-31.
326. Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Gershwin ME. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology.* 2003; 38(5):1250-7.
327. Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Côté L, Prévost AP. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(11):3954-9.
328. Shuttleworth KL, Sung J, Kim E, Cerniglia CE. Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* strains. *Mol Cells.* 2000; 10(2):199-205.
329. Pinyakong O, Habe H, Omori T. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Gen Appl Microbiol.* 2003; 49(1):1-19.

330. Mattner J1, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005; 434(7032):525-9.
331. Ohteki T1, MacDonald HR. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med*. 1994; 180(2):699-704.
332. Geissmann F1, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, Littman DR. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol*. 2005; 3(4):e113.
333. Kita H1, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M, Gershwin ME. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology*. 2002; 123(4):1031-43.
334. Harada K1, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Accumulating CD57 + CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 2003; 23(2):94-100.
335. Tsuneyama K1, Yasoshima M, Harada K, Hiramatsu K, Gershwin ME, Nakanuma Y. Increased CD1d expression on small bile duct epithelium and epithelioid granuloma in livers in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1998; 28(3):620-3.
336. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997; 7(6):727-38.
337. Zhang BB1, Yan C1, Fang F1, Du Y1, Ma R1, Li XY1, Yu Q1, Meng D2, Tang RX1, Zheng KY1. Increased hepatic Th2 and Treg subsets are associated with biliary fibrosis in different strains of mice caused by *Clonorchis sinensis*. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0171005.
338. Mieli-Vergani G1, Vergani D. De novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *J Hepatol*. 2004; 40(1):3-7.
339. Shi T, Zhang T, Zhang L, Yang Y, Zhang H, Zhang F. The Distribution and the Fibrotic Role of Elevated Inflammatory Th17 Cells in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(44):e1888.
340. Qian C, Jiang T, Zhang W, Ren C, Wang Q, Qin Q, Chen J, Deng A, Zhong R. Increased IL-23 and IL-17 expression by peripheral blood cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Cytokine*. 2013; 64(1):172-80.
341. Yang CY1, Ma X, Tsuneyama K, Huang S, Takahashi T, Chalasani NP, Bowlus CL, Yang GX, Leung PS, Ansari AA, Wu L, Coppel RL, Gershwin ME. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 Biliary Microenvironment in Primary Biliary Cirrhosis: Implications for Therapy. *Hepatology*. 2014; 59(5):1944-53.

342. Collins PM1, Bum-Erdene K1, Yu X1, Blanchard H2. Galectin-3 interactions with glycosphingolipids. *J Mol Biol.* 2014; 426(7):1439-51.
343. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J. Immunol.* 1996; 156:1572.
344. Vinogradov E, Perry MB. Structural analysis of the core region of the lipopolysaccharides from eight serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr Res.* 2001; 335(4):291-6.
345. Mandrell RE, Apicella MA, Lindstedt R, Leffler H. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol.* 1994; 236:231–254.
346. Gupta SK, Masinick S, Garrett M, Hazlett L. D. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. *Infect. Immun.* 1997; 65:2747–2753.
347. Barboni E, Coad S, Fiori A. The binding of mycolic acids to galectin-3: a novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids? *FEBS Lett.* 2005; 579:6749–6755.
348. Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS, High NJ. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cell. Microbiol.* 2006; 8:44–54.
349. Farnworth SL, et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am. J. Pathol.* 2008; 172:395–405.
350. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* 2008; 180:2466–2473.
351. Li Y, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J. Immunol.* 2008; 181:2781–2789.
352. Chen SS1, Sun LW2, Brickner H2, Sun PQ3. Downregulating galectin-3 inhibits proinflammatory cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells via RNA interference. *Cell Immunol.* 2015; 294(1):44-53.
353. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, Tian Z. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *J Biol Chem.* 2014; 289(48):33311-9.
354. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis.* 2011; 28(5):451-62.
355. Ferlazzo G1, Morandi B, D'Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A, Moretta L. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003; 33(2):306-13.

356. Shimoda S1, Tsuneyama K, Kikuchi K, Harada K, Nakanuma Y, Nakamura M, Ishibashi H, Hisamoto S, Niuro H, Leung PS, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168(3):279-84.
357. Wree A1, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*. 2014; 59(3):898-910.
358. Wree A1, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*. 2014; 92(10):1069-82.
359. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:707-35.
360. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. *J Crohns Colitis*. 2016;10(5):593-606.
361. Tian J1, 2, Yang G3, Chen HY4,5, Hsu DK4, Tomilov A6, Olson KA7, Dehnad A1, Fish SR1, Cortopassi G6, Zhao B2, Liu FT4,5, Gershwin ME3, Török NJ1,8, Jiang JX9. Galectin-3 regulates inflammasome activation in cholestatic liver injury. *FASEB J*. 2016; 30(12):4202-4213.
362. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12(7):387-400.

8. ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Александар Н. Арсенијевић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Марија Миловановић

Наслов рада:

НР

Значај експресије галектина-3 у патогенези примарног билијарног холангитиса код мишева

Језик публикације:

ЈП

Српски

Језик извода

Српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања: Србија
ЗП

Уже географско подручје: Србија
УГП

Година: 2017
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

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

Физичи опис рада: Дисертација има 179 странице, садржи 8 поглавља,
ФО 38 графикона, 14 слика, 6 схема, 362 референце

Научна област: Медицина

Научна дисциплина: Имунологија
ДИ

Предметна одредница/ кључне речи РВС, Gal-3, NA, C57BL/6 мишеви, апоптоза,
ПО ВЕСs

УДК

Чува се:
ЧУ У библиотеци факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000

Важна напомена:
МН

Извод:**ИД**

Утицај галектина-3 на патогенезу примарног билијарног холангитиса до сада није испитиван, а резултати ове студије јасно показују да Gal-3 може да има потпуно супротне ефекте на ток болести у два разлишита модела па изгледа сасвим документовано да утицај галектина-3 на развој и ток болести зависи од доминантног механизма индукције болести.

У моделу примарног билијарног холангитиса индукованог имунизацијом C57BL/6 мишева ксенобиотиком у адјувансу Gal-3 има протективни ефекат, убалажавајући болест вероватно тако што штити холангиоците од апоптозе чиме смањује доступност аутоантигена и тако ограничава аутоимунски процес. Супротно, у моделу ове болести изазване бактеријом *Novosphingobium aromaticivorans* одсуство галектина-3 готово да чини мишеве резистентним на развој РВС највероватније због неадекватне активације дендритских ћелија бактеријом у одсуству галектина-3, услед чега изостаје и активација свих осталих ћелија (NKT и NK ћелија, Т лимфоцита) које учествују у развоју оштећења билијарних канала.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 05.04.2017

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник комисије

Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија, члан комисије

Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан комисије

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type: Monographic publication

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Aleksandar N. Arsenijević

AU

Menthor/co-mentor

MN Prof. dr Marija Milovanović

Title:

TI

The significance of the expression of galectin-3 in the pathogenesis of primary biliary cholangitis in mice

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Serbia

LP

Publication year: 2017

PY

Publisher: Author reprint

PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovića 69

PP

Physical description

PD

Thesis has 179 pages, has 8 chapters, 38 charts, 14 pictures, 6 schemes, 362 references

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Immunology
SD

Subject/key words:
SKW PBC, Gal-3, NA, C57BL/6 mice, apoptosis, BECs

UDC

Holding data: Library of faculty of Medical Sciences, 34000 Kragujevac

Note:
N

Abstract:
AB

The impact of galectin-3 in the pathogenesis of primary biliary cholangitis has not been studied, and the results of this study clearly show that Gal-3 can have completely opposite effects on the course of the disease in two different induction models looks quite documented that the effect of galectin-3 in the development and course of the disease depends on the prevalent mechanism for the induction of the disease.

In the model of primary of biliary cholangitis induced by immunizing C57BL/6 mice with xenobiotics in adjuvant, Gal-3 has a protective effect, mitigating disease probably by protecting from apoptosis holangiocyte thus reducing the availability of autoantigens, thus limiting the autoimmune process. Contrary, in the model of this disease caused by bacteria *Novosphingobium aromaticivorans* absence of galectin-3 almost makes the mice resistant to the development of PBC most likely due to inadequate activation of dendritic cells by the bacteria in the absence of galectin-3, and subsequent reduced activation of other cells (NKT and NK cells, T lymphocytes) that participate in the development of biliary duct damage.

Accepted by the Scientific Board on: 05.04.2017
ASB

Defended on:
DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

Prof. dr Miodrag Lukić, Professor Emeritus of the University of Kragujevac for the scientific field of Microbiology and Immunology, President of the Commission

Prof. dr Danilo Vojvodić, Associate Professor of Medicine, University of Defense Military Medical Academy in Belgrade for the scientific field of Clinical Immunology, committee member

Prof. dr Vladislav Volarević, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific field of Microbiology and Immunology, committee member

8.3 Лични подаци

Рођен 30.11.1986. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршио у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу уписао 2005/2006. и успешно завршио 2012. године са просечном оценом 9,65. Школске 2012/13. уписао Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положио је усмени докторски испит са оценом 10 (десет). Две године обављао посао сарадника у настави на предметима: Микробиологија и имунологија, Основи онкологије и Клиничка имунологија. Изабран је у звање асистента за ужу научну област Основи онкологије 2015. године.

Активно се бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета Медицинских наука у Крагујевцу. У мају 2013. године учествовао је у мултидисциплинарној школи „5th Course on Cytoskeleton: Cytoskeleton in Cell Organization“ на Институту Кири у Паризу.

Учесник је:

- Републичког пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја:
 1. ОН 175069 „Молекулске детерминанте урођене имуности у аутоимунским болестима и канцерогенези“
- Макро пројеката Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:
 1. МП 01-14 „Галектин 3, IL-33R и инфекције у имунопатогенези инфламаторних болести“
 2. МП 02-14 „Испитивање цитотоксичног дејства биоактивних супстанци и имуномодулација тумора“

8.3.1 Подаци о објављеним радовима:

1. **Arsenijevic A**, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep.* 2016;6 :23348. doi: 10.1038/srep23348. **M21=8 бодова**
2. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, **Arsenijevic A**, Stojanovic B, Tanaskovic I, Krmpotic A, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2017 Feb 27;8 :192. **M21=8 бодова**
3. Lazić D, **Arsenijević A**, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(ii) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016 Mar 21;45(11):4633-46. doi: 10.1039/c5dt04132e. **M21=8 бодова**
4. V Zdravkovic ND, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, **Arsenijevic AN**, Zdravkovic ND, Mitrovic SLj, Arsenijevic NN. Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma. *Int J Med Sci.* 2014;11(9):936-47, **M22=5 бодова**
5. Gazdic M, Volarevic V, **Arsenijevic A**, Erceg S, Moreno-Manzano V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Stem Cells and Labeling for Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 26;18(1). pii: E6. doi: 10.3390/ijms18010006. **M22=5 бодова**
6. Milos V. Nikolic, Marina Z. Mijajlovic, Verica V. Jevtic, Zoran R. Ratkovic, Slađana B. Novakovic, Goran A. Bogdanovic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Srećko R. Trifunovic, Gordana P. Radic. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure.* 2016; 1116:264-271. **M23=3 бода**
7. Marina Ž. Mijajlović, Miloš V. Nikolić, Verica V. Jevtić, Zoran R. Ratković, Jelena Milovanović, **Aleksandar Arsenijević**, Bojana Stojanović, Slađana B. Novaković, Goran A. Bogdanović, Srećko R. Trifunović, Gordana P. Radić. Cytotoxicity of platinum(IV) and palladium(II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid. Crystal structure of [Pd(1,2-dpheddp)] complex. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.* 2016; 35(1):79 – 86. **M23=3 бода**

8. Marija Z. Milovanovic, **A.N. Arsenijevic**, J.Z. Milovanovic, B. Stojanovic, N.N. Arsenijevic, M.L. Lukic. IL-33/ST2 axis mediates resistance to EAE by promoting regulatory B and tolerogenic dendritic cells. 15th International congress of immunology, Milan, Italy, August 2013. Abstract book, pp 152, **M34 = 0,5 бодова**
9. **Aleksandar Arsenijevic**, Jelena Milovanovic, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Eric M. Gershwin, Patrick Leung, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Xenobiotic induced model of primary biliary cirrhosis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (3): 145-150. **M52 = 1,5 бодова**
10. Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Branka Popovic, Stipan Jonjic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic. Latent Murine Cytomegalovirus Infection Contributes to EAE Pathogenesis. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 183-190. **M52 = 1,5 бодова**
11. Žana Besser Silconi, Sasa Benazic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Platinum complexes and their anti-tumour activity against chronic lymphocytic leukaemia cells. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 181- 186. **M52 = 1,5 бодова**
12. Bojana Stojanovic, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Marija Milovanovic, Miodrag L. Lukic. Regulatory role of peritoneal B cells in EAE. Ser J Exp Clin Res. DOI: 10.1515/SJECR-2015-0048, **M52 = 1,5 бодова**
13. Sasa Benazic, Zana Besser Silconi, Jelena Milovanovic, **Aleksandar Arsenijevic**, Bojana Stojanovic, Marija Milovanovic, Tatjana Kanjevac. Zinc and gold complexes in the treatment of breast cancer. Ser J Exp Clin Res DOI: 10.1515/SJECR-2015-0044 **M52 = 1,5 бодова.**
14. Jurisevic M, Radosavljevic G, **Arsenijevic A**, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. Ser J Exp Clin Res. DOI:10.1515/SJECR-2016-0042. **M52=1,5 бодова**

8.4 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Александар Арсенијевић
Датум и место рођења: 30.11.1986. Крагујевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Основи онкологије
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА
Број страница:
Број слика: 58
Број библиографских података: 362
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Марија Миловановић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 05.11.2015
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-374/24; 05.04.2017.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Миодраг Лукић, проф. емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Миодраг Лукић, проф. емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
Комисија за оцену докторске дисертације: Проф. др Миодраг Лукић, проф. емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија

Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Комисија за одбрану докторске дисертације:

Проф. др Миодраг Лукић, проф. емеритус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Проф. др Данило Војводић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Клиничка имунологија

Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Датум одбране дисертације:

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

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

**ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ
БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА**

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, 2017 године,

Александар Арсенијевић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александар Арсенијевић,

дозвољавам

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

**ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГАЛЕКТИНА-3 У ПАТОГЕНЕЗИ ПРИМАРНОГ
БИЛИЈАРНОГ ХОЛАНГИТИСА КОД МИШЕВА**

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

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, 2017 године,

Александар Арсенијевић
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/>