



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**



**Илија Д. Јефтић**

**УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ  
СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ  
У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: проф. др Нада Пејновић**

**Крагујевац, 2015. године**

*Мојој породици  
за огромну подршку,  
љубав и разумевање*

*За несебично пружену помоћ и подршку у изради докторске дисертације неизмерну захвалност дугујем ментору проф. др Нади Пејновић, проф. др Миодрагу Л. Лукићу и проф. др Небојши Арсенијевићу. Хвала вам што сте ми помогли да закорачим у свет науке и саветима усмеравате да у њему истрајем.*

*Искрено се захваљујем Катедри за Патолошку физиологију на разумевању и подршци.*

*Захваљујем др Немањи Јовичићу и колегама из Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на помоћи пруженој у изради овог рада.*

## САДРЖАЈ

1. УВОД .....	6
1.1. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ .....	6
1.1.1. Дефиниција NAFLD .....	6
1.1.2. Спектар и ток болести NAFLD .....	7
1.1.2.1. Неалкохолна масна јетр .....	8
1.1.2.2. Неалкохолни стеатохепатитис .....	8
1.1.2.3. Фиброза јетре .....	10
1.1.3. Дијагноза NAFLD.....	11
1.1.4. Епидемиологија NAFLD.....	13
1.2. УЛОГА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА У НАСТАНКУ NAFLD .....	13
1.2.1. Улога гојазности у настанку NAFLD.....	14
1.2.2. Улога дислипидемије, транспорта и метаболизма липида у NAFLD.....	15
1.2.3. Улога Diabetes mellitus-а тип 2 у настанку NAFLD .....	17
1.3. МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ .....	18
1.3.1. Улога инсулинске резистенције у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре .....	19
1.3.2. Улога активације TLR4 рецептора у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре.....	20
1.3.3. Улога оксидативног стреса у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре.....	23
1.3.4. Улога активације NLRP3 инфламазома у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре.....	24
1.4. УЛОГА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ПАТОГЕНЕЗИ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗИ ЈЕТРЕ .....	27
1.4.1. Улога макрофага у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре .....	28
1.4.2. Улога дендритичних ћелија у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре .....	29
1.4.3. Улога осталих ћелија имунског система у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре .....	30

1.4.4. Значај цитокина у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре .....	32
1.5. ФАМИЛИЈА ГАЛЕКТИНА.....	35
1.6. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3.....	36
1.7. СТРУКТУРНЕ ОСОБИНЕ ГАЛЕКТИНА-3.....	37
1.8. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РЕГУЛАЦИЈИ ИМУНСКОГ ОДГОВОРА.....	39
1.9. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 DIABETES MELLITUS-у.....	41
1.10. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ.....	43
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ .....	45
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	47
3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	47
3.1.1 Методологија добијања LGALS3 <sup>-/-</sup> мишева.....	47
3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ ПРИМЕНОМ ДИЈЕТЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ .....	50
3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА РАЗВОЈА БОЛЕСТИ .....	51
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА ЈЕТРЕ И СЕРУМУ.....	52
3.5. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА, ЈЕТРЕ, КОСТНЕ СРЖИ И ПЕРИФЕРНЕ КРВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ.....	53
3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива .....	54
3.5.2. Изолација моноклеарних ћелија из јетре .....	54
3.5.3. Изолација ћелија из костне сржи .....	55
3.5.4. Изолација ћелија из периферне крви .....	56
3.6. ФЕНОТИПСКА И ФУНКЦИОНАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИЗОЛОВАНИХ ЋЕЛИЈА .....	56
3.6.1. Бојење мембранских маркера .....	57
3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина .....	58
3.7. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЈЕТРЕ .....	60

3.7.1. Бојење хематоксилином и еозином .....	60
3.7.2. Бојење липида <i>Oil-red O</i> методом .....	61
3.7.3. Бојење колагена <i>Sirius red</i> методом .....	62
3.7.4. Бојење колагена трихромном методом по <i>Masson</i> -у .....	62
3.7.5. Квантификација и скорирање .....	63
3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА .....	65
3.9. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ТКИВУ ЈЕТРЕ МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ .....	67
3.9.1. Изолација RNA из ткива јетре миша .....	67
3.9.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA .....	68
3.9.3. Квантификација експресије гена.....	68
3.10. КУЛТУРА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА .....	71
3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА .....	72
4. РЕЗУЛТАТИ .....	73
4.1. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 УБРЗАВА НАСТАНАК ГОЈАЗНОСТИ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	73
4.2. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 УБРЗАВА НАСТАНАК ТИП 2 DIABETES MELLITUS-A У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	75
4.3. ПОВЕЋАНЕ СЕРУМСКЕ ВРЕДНОСТИ ЛИПИДА У LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	77
4.4. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА ДЕНДРИТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МАКРОФАГА У ВИСЦЕРАЛНОМ МАСНОМ ТКИВУ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	78
4.5. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА Т ЛИМФОЦИТИМА У ВИСЦЕРАЛНОМ МАСНОМ ТКИВУ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	79
4.6. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ГАЛЕКТИНА 3 У ЈЕТРИ ИНДУКОВАНА ЈЕ ДУГОТРАЈНОМ ДИЈЕТОМ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ .....	80

---

4.7. ИСХРАНА СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ДОВЕЛА ЈЕ ДО ИЗРАЖЕНИЈЕ СТЕАТОЗЕ У LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА .....	81
4.8. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА УДРУЖЕНИХ СА НАСТАНКОМ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЈЕТРИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	83
4.9. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА TLR 4 У ЈЕТРИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	84
4.10. LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ИМАЛИ СУ МАЊЕ ХЕПАТОЦЕЛУЛАРНО ОШТЕЋЕЊЕ И МАЊУ ЛОБУЛАРНУ ИНФИЛТРАЦИЈУ У ЈЕТРИ .....	86
4.11. LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ИМАЛИ СУ МАЊЕ ИЗРАЖЕНУ ФИБРОЗУ .....	88
4.12. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ЗРЕЛИХ МИЈЕЛОИДНИХ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА У ЈЕТРИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	91
4.13. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МАКРОФАГА У ЈЕТРИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	94
4.14. МАЊА ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА И IL-1 $\beta$ У ЈЕТРИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	97
4.15. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ЗРЕЛИХ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА И ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МОНОЦИТА У КОСТНОЈ СРЖИ И ПЕРИФЕРНОЈ КРВИ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	98
4.16. СМАЊЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈА ПРОИНФЛАМАТОРНИХ И ПРОФИБРОГЕНИХ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ И ТКИВУ ЈЕТРЕ LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	100
4.17. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА IL-33 У ХЕПАТОЦИТИМА LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	102
4.18. IL-33 СТИМУЛИШЕ ПРОДУКЦИЈУ IL-13 У WT МАКРОФАГИМА <i>IN VITRO</i> .....	103

---

4.19. LGALS3 <sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ НАКОН АПЛИКАЦИЈЕ IL-33 IN VIVO ИМАЛИ СУ МАЊЕ ИЗРАЖЕНУ ФИБРОЗУ ЈЕТРЕ .....	105
5. ДИСКУСИЈА .....	107
5.1. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ГОЈАЗНОСТИ, ИНФЛАМАЦИЈЕ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	110
5.2 УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ СТЕАТОЗЕ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	112
5.3. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ХЕПАТОЦЕЛУЛАРНОГ ОШТЕЋЕЊА У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	114
5.4. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ИНФЛАМАЦИЈЕ ЈЕТРИ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА.....	116
5.5. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА ПРОДУКЦИЈУ ЦИТОКИНА У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	121
5.6. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ IL-33/IL-13 ПОСРЕДОВАНЕ ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА .....	122
6. ЗАКЉУЧАК .....	125
СКРАЋЕНИЦЕ .....	128
7. ЛИТРЕРАТУРА .....	133
8. ПРИЛОГ .....	168
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА .....	168
8.2. KEY WORD DOKUMENTATION .....	172
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА .....	176
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА .....	177
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS .....	181
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ .....	184



## 1. УВОД

### 1.1. НЕАЛКОХОЛНА МАСНА БОЛЕСТ ЈЕТРЕ

#### 1.1.1. Дефиниција NAFLD

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. *Nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) обухвата различит спектар болести, од једноставне стеатозе која представља акумулацију масти у јетри (енгл. *Nonalcoholic fatty liver*, NAFL), преко неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. *Nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), па до цирозе и могућег настанка хепатоцелуларног карцинома (1, 2). Према препорукама, дефиниција NAFLD подразумева депоновање масти у паренхиму јетре које се јавља у одсуству конзумирања алкохола, примене стеатогених лекова и урођених поремећаја у метаболизму липида (2).

NAFLD представља најчешћу хроничну болест јетре у развијеним земљама (3). Њена основна карактеристика је масна инфилтрација јетре дефинисана хистолошки као присуство стеатозе у више од 5% хепатоцита (4), која може бити праћена развојем стеатохепатитиса, који карактерише оштећење ткива и настанак запаљенске реакције јетре, што у крајњем исходу води настанку фиброзе.

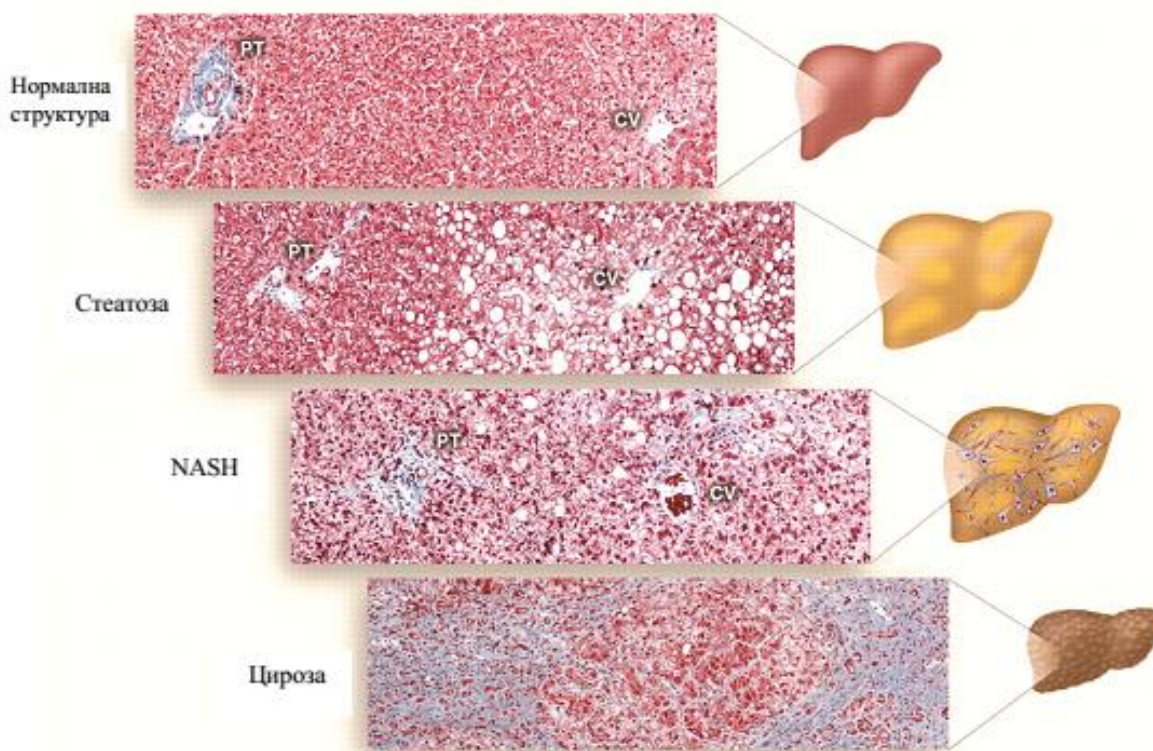
Израз неалкохолни стеатохепатитис први пут је употребљен од стране *Ludwig-a* и сарадника 1980. године, са циљем да се опише стање код пацијената средње животне доби које је било праћено повећаном серумском активношћу ензима који указују на оштећење јетре и хистолошким налазом биопсије јетре који је одговарао алкохолном стеатохепатитису, у осуству позитивне анамнезе конзумирања алкохола (5).

Иако тачан узрок настанка NAFLD-а није познат, показано је да се често јавља код особа са одређеним медицинским стањима као што су гојазност, инсулинска резистенција и шећерна болест тип 2 (енгл. *Diabetes mellitus type 2*, DMТ2).

Последњих година неалкохолни стеатохепатитис је постао подручје великог интересовања и бројних базичних и клиничких истраживања, али упркос значајном напретку у разумевању, патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена.

### 1.1.2. Спектар и ток болести NAFLD

Спектар NAFLD обухвата различите облике болести: једноставну стеатозу која је присутна код највећег броја оболелих, затим неалкохолни стеатохепатитис, који карактерише оштећење хепатоцита и присуство лобуларне инфилтрације. Присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза NAFLD, али значајно корелира са настанком компликација. Наиме показано је да депоновање екстрацелуларног матрикса, тачније процес фиброгенезе може довести до настанка цирозе и инсуфицијенције јетре, а могућ је настанак и хепатоцелуларног карцинома (2) (схема 1).



**Схема 1. Неалкохолна масна болест јетре - спектар болести.**  
(Кориговано према: *Cohen JC. et al. Science 2011; 332:1519-1523.*)

### 1.1.2.1. Неалкохолна масна јетра

Основна карактеристика NAFL је присуство стеатозе, односно микро- или макровезикула масти у хепатоцитима, без настанка запаљенске реакције и фиброзе (4, 6). Повећано депоновање масти у јетри може бити последица постојања неравнотеже између допремања и транспорта слободних масних киселина (енгл. *Free fatty acids*, FFAs) и синтезе масних киселина (енгл. *Fatty acids*, FAs) и триглицерида у јетри. Повећано допремање FFAs може бити последица повећаног уноса путем хране или повећаоог ослобађањем од стране масног ткива. Гојазност и инсулинска резистенција су уско повезани са NAFLD, тако да је данас опште прихваћено да NAFLD представља манифестацију метаболичког синдрома у јетри (7). Прекомеран унос нутритијената праћен је ослобађањем FFAs у портну циркулацију и појачаним допремањем у јетру (8). Инсулинска резистенција одговорна је за периферну липолизу и додатно повећан транспорт FFAs у јетру (9). Иако депоновање масти у јетри представља бенигни поремећај, масно измењени хепатоцити постају осетљиви на настанак оштећења и последични развој запаљенске реакције и инфилтрације паренхима јетре (10).

### 1.1.2.2. Неалкохолни стеатохепатитис

Неалкохолни стеатохепатитис, за разлику од једноставне стеатозе, карактерише присуство некроинфламаторне компоненте, са или без придружене фиброзе (6). Поред стеатозе, кључне хистолошке компоненте потребне за дијагнозу NASH-а су присуство хепатоцелуларног оштећења које се манифестује присуством балонираних хепатоцита (енгл. *hepatocyte ballooning*) као и присуство лобуларне инфилтрације (6). Присуство масне инфилтрације у највећем проценту није праћено настанком оштећења и стеатохепатитиса. Новији радови показују, да за разлику од бенигне непрогресивне масне инфилтрације, стеатозу у сколопу NASH-а карактерише депоновање засићених FAs, холестерола и церамида који остварују липотоксични ефекат (11-13). Показано је да хепатотоксични ефекат поменутих липида резултира оштећењем митохондрија и лизозома као и директним или индиректним активирањем JNK киназа (енгл. *C-Jun N-terminal kinase*) (14). Опште је прихваћено да су засићене дуголанчане FAs, као што су

палмитинска и стеаринска киселина, токсичније у односу на незасићене масне киселине (15).

Механизам којим засићене масне киселине доводе до настанка оштећења подразумева настанак реактивних облика кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS) (11). ROS могу настати у митохондријама као последица оксидативне фосфорилације (16), затим могу бити последица активације оксидативних ензима у склопу стреса ендоплазматског ретикулума (17), а могу бити продуковани од стране инфламаторних ћелија у којима је активиран NADPH (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) оксидазни систем (18, 19). Најновија истраживања су показала да засићене масне киселине могу довести до оштећења хепатоцита путем активације NLRP3 (енгл. *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3*) инфламазома и следствене продукције активног интерлеукина-1 $\beta$  (енгл. *Interleukin-1 $\beta$* , IL-1 $\beta$ ) (20). Такође је показано да хепатоцити изложени дејству палмитинске киселине у садејству липополисахарида продукују IL-1 $\beta$  (21). Активација Toll-like рецептора (енгл. *Toll-like receptors*, TLRs) посредством FFAs доводи до активације NF $\kappa$ B (енгл. *Nuclear factor- $\kappa$ B*) укљученог у регулацију експресије гена за проинфламаторне цитокине и може за последицу имати хепатотоксични ефекат (22). Одговор на оштећење и смрт хепатоцита ја настанак запаљенске реакције. Механизам активације имунског система подразумева продукцију проинфламаторних цитокина и хемокина (11), као и ослобађање молекула из оштећених ћелија (енгл. *Danger-associated molecular pattern molecules*, DAMPs) односно алармина (23). Иако се разликују од молекулских образаца експримираних на патогенима (енгл. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), DAMPs такође могу бити препознати од стране TLRs (24). Продукција DAMPs од стране оштећених хепатоцита као и активирање проинфламаторних сигналних путева и последична продукција цитокина и хемокина, имају снажан ефекат на активацију Купферових ћелија и регрутовање циркулаторних моноцита у јетру (25). Активирани Купферове ћелије промовишу регрутовање проинфламаторних моноцита продукцијом TNF- $\alpha$  (енгл. *Tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (25). Поред продукције цитокина, активирани макрофаге продукују и хемокине као нпр. CCL2 (енгл. *Chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2), који игра веома важну улогу у патогенези стеатохепатитиса и привлачењу моноцита у ткиво јетре (26, 27). Поред

макрофага, актуелна запажања у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре истичу улогу дендритичних ћелија (енгл. *Dendritic cells*, DCs) (28) и резидентних лимфоидних ћелија природне имуности (енгл. *Innate lymphoid cells*, ILCs) (29). Иако њихова улога у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре још увек није прецизно дефинисана, верује се да своје главне ефекторске функције остварују продукцијом цитокина, контролом миграције и поларизације макрофага као и улогом у активацији стелатних ћелија (енгл. *Hepatic stellate cells*, HSCs) и прогресији стеатохепатитиса у праву фиброзе јетре.

### 1.1.2.3. Фиброза јетре

Иако присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза NASH, показано је да настанак фиброзе значајно корелира са настанком компликација. Кључне ћелије у процесу депоновању екстрацелуларног матрикса (енгл. *extracellular matrix*, ECM) и процесу фиброгенезе су активирани HSCs које на својој мембрани експримирају  $\alpha$ -SMA (енгл. *alpha-smooth muscle actin*) (2, 30). HSCs које се називају и Ито ћелије, налазе се између хепатоцита и синусоидалних ендотелних ћелија и складиште витамин А (30). У одговору на оштећење хепатоцита или стимулацију попримају активациони фенотип, експримирају  $\alpha$ -SMA и постају миофибробласти (31). Миофибробласти имају већи пролиферативни капацитет и већу способност миграције у односу на неактивирани HSCs које депонују липиде, па се још називају липоцити. Поред експресије  $\alpha$ -SMA, миофибробласти појачано производе колаген тип I и III којим учествују у формирању ECM (30, 31). Поред активираних HSCs, у процесу фиброгенезе и продукцији колагена учествују и портални фибробласти, ћелије пореклом из костне сржи (мезенхимне матичне ћелије, фиброцити и хематопоеетске ћелије) као и паренхимске ћелије које подлежу епително-мезенхимној транслацији (енгл. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) (30, 32). Процес активације HSC одвија се у две фазе, прва фаза односи се на процес диференцијације у правцу миофибробласта док се у другој фази повећава експресија рецептора за факторе раста и профиброгене цитокине (31). Цитокини који су битни у регулацији инфламаторног одговора на оштећење, као на пример IL-1 $\beta$ , интерлеукин-6 (енгл. *interleukin-6*, IL-6), TNF- $\alpha$  и трансформишућ фактор раста- $\beta$  (енгл. *transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ), могу довести до активације стелатних ћелија (33, 34). Продукција интерлеукина-13 (енгл. *interleukin-13*, IL-13) је веома битна у развоју

фиброзе јетре када је у питању NASH (35). Механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе најчешће подразумева стимулацију продукције TGF- $\beta$ , кључног цитокина у процесу депоновања екстрацелуларног матрикса (36, 37). Недавно је показана улога интерлеукина-33 (енгл. *interleukin-33*, IL-33) у процесу фиброзе јетре, посредоване преко ефеката IL-13 продукованог од стране ILCs тип 2 (33).

### 1.1.3. Дијагноза NAFLD

Већина пацијената са NAFLD нема никакве симптоме, па се присуство масно измењене јетре открива случајно приликом ултразвучног прегледа јетре. Тренутно важеће препоруке у случају налаза стеатозе, а нормалних вредности ензима и одсутности симптома који могу указати на оштећење паренхима јетре, подразумева дијагностику потенцијалних метаболичких абнормалности које могу бити у основи поремећаја као што су: конзумирање алкохола, примена стеатогених лекова, хиперлипидемија, хипергликемија и слично (2). Патохистолошка анализа ткива добијеног биопсијом јетре представља „златни стандард“ у дијагностици NAFLD. То је једина метода којом је могуће дефинитивно потврдити дијагнозу, и са великом сигурношћу искључити друге узроке болести јетре. Поред потврде дијагнозе, друга важна функција биопсије јетре је разликовање обичне стеатозе од стеатохепатитиса, два облика болести са битно различитим током и прогнозом. Патохистолошка анализа додатно омогућава евалуацију и квантификацију некроинфламаторне компоненте и фиброзе (39, 40).

Основна хистолошка карактеристика NAFLD садржана је у самом називу болести и карактерише је накупљање масти унутар хепатоцита, односно стеатоза. Минимални критеријум за дијагнозу NAFLD представља масна инфилтрација јетре дефинисана хистолошки као присуство стеатозе у више од 5% хепатоцита (39, 40). Стеатоза јетре може се манифестовати као присуство микро- или макровезикула масти у хепатоцитима. Микровезикуларна стеатоза карактерише се присуством малих јасно дефинисаних капљица масти унутар хепатоцита, док се макровезикуларна односи на хепатоците код којих постоји једна велика интрацитоплазматска кап масти која једно помера ка периферији. Могуће је и постојање мешовитог типа стеатозе, где постоје микро- и

макроезидуларно измењени хепатоцити (39). Дијагноза NASH-а подразумева, да је поред стеатозе присутно оштећење хепатоцита и лобуларна инфилтрација. Хепатоцелуларно оштећење манифестује се као присуство балонираних хепатоцита (6). Балонирање хепатоцита је једна од најважнијих патохистолошких карактеристика стеатохепатитиса, а повезано је са прогресијом болести (41). Балонирани хепатоцити су увећани са обилнијом бледо пребојеном цитоплазмом, великим хиперхроматским једром и уочљивим нуклеолусом. *Mallory-eva* телашца представљају еозинofilне интрацитоплазматске инклузије, које се састоје од аберантно измењених филамената, а присутне су у близини једра балонираних хепатоцита (42). За разлику од балонираних хепатоцита који могу да се виде и код алкохолом изазваног стеатохепатитиса, присуство језгра гликогена унутар, обично перипорталних хепатоцита, указује на неалкохолни стеатохепатитис (43, 44). Лобуларни инфилтрат састоји се од моноклеарних ћелија и обично је благог степена, док је присуство израженијег инфилтрата у корелацији са тежим обликом и прогресијом болести (45). Фиброза јетре позитивно корелира са настанком компликација иако њено присуство није неопходно да би се поставила дијагноза. Процес фиброгенезе обично одпочиње депоновањем колагена дуж синусоида и око хепатоцита, док са напредовањем болести долази до депоновања у портним просторима и формирања мостова између порталних простора што код неких болесника води настанку цирозе (46). Током прогресије болести у правцу фиброзе, стеатоза може постепено нестати, што може бити повезано са капацитетом хепатоцита да метаболишу липиде (47).

Када је NAFLD у питању, тренутно постоје два патохистолошка система бодовања која су у широј употреби. Први је предложен од стране *Brunt*-а и сарадника (48), а други који је данас у широј употреби је систем који је развијен 2005. године са циљем да се покрије читав хистолошки спектар који се виђа у склопу NAFLD и омогући прецизна употреба биопсије у студијама на темељу броја бодова добијених семиквантитативним оцењивањем појединих хистолошких карактеристика (49). Тај коначни број назван је NAS (енгл. *NAFLD activity score*), а састоји се од појединачног скорирања стеатозе, лобуларне инфламације и балонирања хепатоцита. Скорирање фиброзе слично је у оба предложена патохистолошка система скорирања.

#### 1.1.4. Епидемиологија NAFLD

Неалкохолна масна болест јетре која се сматра манифестацијом метаболичког синдрома представља најчешћу хроничну болест јетре у развијеним земљама. Учесталост у општој популацији је јако висока и у развијеним земљама износи између 20 и 30%, зависно од методологије која је коришћена у испитиваним популацијама (50-52). Учесталост NAFLD се значајно повећава последњих година паралелно са порастом броја гојазних и оболелих од DMT2 (53). Код гојазних преваленца NAFLD се креће између 30 и 100%, код пацијената који имају DMT2 између 10 и 75%, док се код оних са хиперлипидемијом креће у распону од 20 до 92% (54). Учесталост NASH-а у општој популацији процењује се на око 3-5% (55). Учесталост NASH-а код гојазних износи 35% (56), док се овај проценат значајно повећава код екстремно гојазних и оболелих од DMT2 (57).

## 1.2. УЛОГА МЕТАБОЛИЧКОГ СИНДРОМА У НАСТАНКУ NAFLD

Скуп метаболичких абнормалности које представљају и повећавају ризик за развој DMT2 са придруженим коморбидитетима и компликацијама назива се метаболички синдром. Основна обележја метаболичког синдрома или синдрома инсулинске резистенције како се другачије назива су: централни (абдоминални) тип гојазности, хипертриглицеридемија, снижен HDL (енгл. *High density lipoprotein*) холестерол, повишен крвни притисак и поремећена регулација гликемије (58).

NAFLD је уско повезан са метаболичким синдромом, тако да је данас опште прихваћено да NAFLD представља манифестацију метаболичког синдрома у јетри. Тачна преваленција NAFLD и NASH-а у популацији оних који испуњавају услове за метаболички синдром није позната, али на високу преваленцу индиректно указују студије у којима је показана инциденца NAFLD од 85-98% код екстремно гојазних, односно 62-69% код оболелих од DMT2 (59-61). Више студија је такође потврдило високу учесталост метаболичког синдрома код болесника са NAFLD, и она се зависно од



методологије коришћене у студијама кретала између 53 и 78% (62, 63). Велики број студија је показао да су од појединих обележја метаболичког синдрома, гојазност и шећерна болест тип 2 најбољи предиктори тежине патохистолошких облика болести. Присутност ових обележја била је у корелацији са тежином стеатохепатитиса и прогресијом фиброзе у правцу цирозе (64-66). Насупрот томе, остала обележја метаболичког синдрома најчешће у студијама нису индивидуално корелирана са степеном болести. Код пацијената са метаболичким синдромом очекивана је не само велика учесталост NAFLD, већ и тежа форма болести у тренутку дијагнозе, као и бржа прогресија болести током праћења (67).

### 1.2.1. Улога гојазности у настанку NAFLD

Гојазност је хронично обољење праћено бројним компликацијама, укључујући и NAFLD. Основна карактеристика гојазности је депоновање масних наслага у организму. Ризик за настанак компликација уско је повезан са дистрибуцијом масних наслага у организму (68, 69). Иако висцерално адипозно ткиво (енгл. *visceral adipose tissue*, VAT) чини свега 10% укупних масних наслага у организму, управо увећање овог ткива представља главни узрок настанка NAFLD, манифестације синдрома инсулинске резистенције у јетри (70, 71). Прекомерни унос нутритијената праћен је прогресивним повећањем величине самих адипоцита. Оног тренутка када се попуне капацитети адипоцита, отвара се пут за улазак FFAs у портну циркулацију и појачано допремање у јетру (72).

Инсулинска резистенција, односно поремећај у сигналном путу дејства инсулина, сматра се кључним механизмом за настанак периферне липолизе и појачаног допремања FFAs у јетру, као и за појачану синтезу FAs и триглицерида у јетри, што води настанку масне болести јетре (73). FFAs смањују везивање инсулина за хепатоците, а самим тим и његову разградњу, што резултира хиперинсулинемијом. Хиперинсулинемија је удружена са смањеном способношћу инсулина да супримира процес глуконеогенезе, док га FFAs додатно појачавају (74).

Поред улоге VAT-а као енергетског депоа за складиштење липида, познато је да адипоцити секретују бројне протеине који имају важне биолошке функције. Познато је да је висцерално масно ткиво ендокрини орган који активно секретује хормоне (лептин, адипонектин, резистин и др.), цитокине (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) као и протеине акутне фазе (75). Адипоцитокени, протеини пореклом из висцералног масног ткива имају веома битну улогу у патогенези NAFLD. Једна студија је показала да је лептин повезан са настанком инсулинске резистенције па самим тим и са стеатозом, иако није био у корелацији са инфламацијом и фиброзом (76). Друге су студије пак показале да лептин игра веома битну улогу у активацији стелатних ћелија и процесу фиброгенезе, како код људи тако и на анималним моделима (77-79). Сnižена концентрација адипонектина уз смањену експресију његових рецептора на хепатоцитима, која се виђа у NAFLD, значи смањење његових повољних ефеката на  $\beta$ -оксидацију масних киселина, резултат је повећано депоновање триглицерида у хепатоцитима уз погоршање хепатичне инсулинске резистенције (80). Бројна истраживања су показала везу између хроничне инфламације ниског степена у висцералном масном ткиву и обољења јетре. Познато је да проинфламаторни цитокини смањују осетљивост на дејство инсулина, тако да гојазност може бити праћена аберантним таложењем липида у другим ткивима као што је то јетра (81). Инфламација у висцералном масном ткиву праћена је инфилтацијом макрофагама које такође продукују проинфламаторне цитокине (82, 83). Иако су многе од ових активности углавном ограничене на аутокрини и паракрини ефекат, адипоцитокени продуковани од стране адипоцита и инфламаторних ћелија значајно доприносе системској инфламацији (70). Поред тога адипоцитокени су укључени у процес миграције и активације макрофага ћелија које су кључне у процесу активације стелатних ћелија, ћелија одговорних за депоновање екстрацелуларног матрикса (84).

### **1.2.2. Улога дислипидемије, транспорта и метаболизма липида у NAFLD**

Поремећаји у метаболизму и транспорту липида, који за последицу имају настанак хиперлипидемије уско су повезани са гојазношћу, инсулинском резистенцијом, па самим тим и са настанком NAFLD (85).

Инсулинска резистенција одговорна је за настанак периферне липолизе и појачано допремање и синтезу масних киселина и триглицерида у јетри (72). Терапија хиперлипидемије доводи до хистолошког побољшања масне инфилтрације јетре као и да смањује могућност настанка компликација како код људи тако и на анималним моделима (86, 87). Метаболизам и транспорт FFAs као и де-ново синтеза FAs и триглицерида у јетри регулисани су веома сложеним механизмима и контролишу је бројни гени. Поред повећаног допремања FFAs у јетру, веома важну улогу у настанку масне инфилтрације јетре играју транспорт и синтеза триглицерида у самој јетри. Транспорт слободних масних киселина из плазме посредован је транспортним протеинима. Показано је да транслоказа CD36 која је експримирана на хепатоцитима и моноклеарним фагоцитима игра веома важну улогу у транспорту и депоновању FAs у јетру (88). Додатно је показано да повећана експресија CD36 доводи до повећаног депоновања масних киселина у јетру, како код људи тако и у анималним моделима (89-91). Интересантно је да делеција гена за CD36 није резултирала мањим депоновањем масних киселина у јетру, што говори да ова транслоказа није неопходна за транспорт FFAs у нормалним условима (92). Транспорт липида као и експресија транспортних протеина налазе се под контролом бројних гена, показано је да транскрипциони фактори PPAR- $\gamma$  (енгл. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) и LXR (енгл. *Liver X receptor*) повећавају експресију CD36 и транспорт FFAs у јетру (93, 94).

Поред транспорта и повећаног депоновања, веома важну улогу у настанку масне инфилтрације у јетри, имају транскрипциони фактори укључени у процес синтезе FAs и триглицерида. ACC (енгл. *Acetyl-CoA carboxylase*) и FAS (енгл. *Fatty acyl synthase*) одговорни су за де-ново синтезу FA у јетри. ACC1 се налази у цитоплазми и продукује малонил коензим А (енгл. *Malonyl-CoA*, M-CoA) који представља супстрат за FAS, док ACC2 која се налази у митохондријама продукује M-CoA који инхибира CPT1 (енгл. *Carnitine palmitoyl-transferse 1*) (95-97). За синтезу триглицерида из FAs одговорна је активност диацилглицерол ацилтрансферазе (енгл. *Diacylglycerol acyltransferase*, DGAT) која се такође налази у две изоформе. DGAT1 као супстрат користи егзогене FAs за разлику од DGAT2 која користи новосинтетисане FAs (98).

Поред поменутих гена и транскрипционих фактора укључених у метаболизам липида, веома важну улогу у настанку стеатозе имају и гени који се налазе под контролом инсулина и гликемије. SREBP1c (енгл. *Sterol regulatory element-binding protein 1c*) који се појачано експримира у одговору на инсулин, важан је за метаболизам глукозе и синтезу триглицерида (99) док CHREBP (енгл. *Carbohydrate response element binding protein*) у одговору на глукозу повећава експресију гена укључених у процес гликолизе, де-ново липогенезе и синтезе триглицерида (100, 101).

### 1.2.3. Улога Diabetes mellitus-а тип 2 у настанку NAFLD

Шећерна болест тип 2 представља стање хроничне хипергликемије које настаје као последица инсулинске резистенције. У одговору на инсулинску резистенцију настаје компензаторно увећање масе панкреасних острваца и пораст функције  $\beta$ -ћелија. Онога тренутка када  $\beta$ -ћелије више не могу да компензују инсулинску резистенцију настаје прогресивна инсуфицијенција  $\beta$ -ћелија која се манифестује недостатком инсулина и хипергликемијом (102). Преваленца масне болести јетре је много чешћа код оболелих од DMТ2 него у општој популацији, независно од гликорегулације (103). С друге стране, оболели од NAFLD имају већу вероватноћу да развију DMТ2, независно од конвенционалних фактора ризика као што су гојазност, инсулинска резистенција и метаболички синдром (104). Претпоставка је да NAFLD промовише инсулинску резистенцију која лежи у основи ова два метаболичка поремећаја (105).

Неколико студија је показало да DMТ2 код људи корелира са некроинфламаторном компонентом у развоју стеатохепатитиса и прогресијом фиброзе (106). Такође је показано да DMТ2 представља фактор ризика у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у мишијем моделу гојазности индуковане храном са високим садржајем масти (107).

### **1.3. МЕХАНИЗАМ НАСТАНКА СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ**

Патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена, најшире је прихваћена теорија „два удараца“ (108). „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида која је последица инсулинске резистенције (108, 109). Инсулинска резистенција одговорна је за периферну липолизу и појачан транспорт FFAs у јетру, као и за појачану синтезу FAs и триглицерида у јетри, што коначно води настанку стеатозе (108-110). Масна јетра затим постаје осетљива на „друге удараце“ који могу довести до оштећења хепатоцита, инфламације и фиброзе.

Механизам настанка оштећења подразумева активацију различитих молекуларних механизма. Један од потенцијалних механизма који објашњава настанак оштећења хепатоцита представља активација TLRs експримираних како на хепатоцитима, ћелијама урођеног имунског система тако и на HSCs. Показано је да активација TLRs посредством FFAs или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, доводи до активације NF $\kappa$ B посредованих проинфламаторних сигналних путева и настанак хепатоцелуларног оштећења (111, 112). Оксидативни стрес, као последица  $\beta$ -оксидације масних киселина и стварање хепатотоксичних ROS, један је од претпостављених механизма прогресије стеатозе у правцу настанка стеатохепатитиса (113, 114). Наиме, оксидативни стрес и пероксидација липида могу довести до оштећења митохондрија као и мембране хепатоцита што представља потенцијални механизам у настанку стеатохепатитиса (115). Најновија истраживања су показала да засићене масне киселине, као један од метаболичких продуката и ендотоксин путем активације инфлазома и последичног ослобађања активне каспазе-1, индукују продукцију активног интерлеукина-1 $\beta$  и настанак инфламације (22). Без обзира на механизам настанка оштећења, активација проинфламаторних сигналних путева, води настанку запаљенске реакције и инфилтрације.

Даља прогресија у правцу цирозе може захтевати и „трећи ударац“ који посебно промовише фиброгенезу, индукцијом диференцијације HSCs у правцу настанка миофибробласта, кључних ћелија у процесу стварања колагена и депоновања екстрацелуларног матрикса. HSCs могу бити директно активирани ендотоксином посредством стимулације TLR4 рецептора, који је експримиран на овим ћелијама, и последичном активацијом NF $\kappa$ B сигналног пута (111). Цитокини који су битни у регулацији инфламаторног одговора на оштећење, такође могу довести до активације HSC (33-35).

### **1.3.1. Улога инсулинске резистенције у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре**

Инсулинска резистенција је патолошко стање које карактерише одсуство физиолошког одговора периферних ткива на дејство инсулина, што води настанку метаболичког синдрома. Инсулинска резистенција представља заједнички фактор који повезује гојазност, дислипидемију и DMТ2 са настанком масне болести јетре и прогресијом у правцу настанка стеатохепатитиса и фиброзе јетре (117).

Гојазност и инсулинска резистенција повезани су са настанком стеатозе у склопу NAFLD (7, 118). Поред тога, инсулинска резистенција је повезана са прогресијом болести из преддијабетеса у клинички манифестни DMТ2. У одговору на резистенцију ткива на дејство инсулина настаје компензаторно увећање масе панкреасних острваца и пораст секреторног капацитета  $\beta$ -ћелија (102). Као последица инсулинске резистенције појачава се периферна липолиза која индукује стварање и повећава транспорт FFAs у јетру. Поред тога, у одговору на настанак инсулинске резистенције  $\beta$ -ћелије појачано стварају инсулин што води настанку хиперинсулинемије која је одговорна и за појачану синтезу FAs и триглицерида у јетри, што додатно доприноси настанку стеатозе (9). У моменту када функционална експанзија  $\beta$ -ћелија више не може да компензује степен инсулинске резистенције, настаје прогресивна инсуфицијенција  $\beta$ -ћелија која се манифестује дефицијенцијом инсулина (102).

Новије студије истичу да је гојазношћу индукована инфламација основни узрок настанка инсулинске резистенције (119, 120). На механизам настанка инфламације указала су истраживања која су документовала да је активација NF-κB повећана у гојазности и да корелира са степеном инсулинске резистенције (121, 122). Повећана активација NF-κB праћена је повећаном експресијом гена за проинфламаторне цитокине у масном ткиву (123). Ови цитокини, као што су TNF-α, IL-6 и IL-1β, промовишу инсулинску резистенцију у масном ткиву и јетри, имају важну улогу у патогенези настанка стеатохепатитиса. (124).

Додатно, најновија истраживања су показала да се у мишијем моделу индуковане гојазности, експресија макрофагних маркера и проинфламаторних цитокина расте у висцералном масном ткиву у периоду од 6. до 16. недеље, док се у јетри повећана експресија детектује у периоду од 16. до 26. недеље на исхрани са високим садржајем масти (125).

### 1.3.2. Улога активације TLR4 рецептора у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре

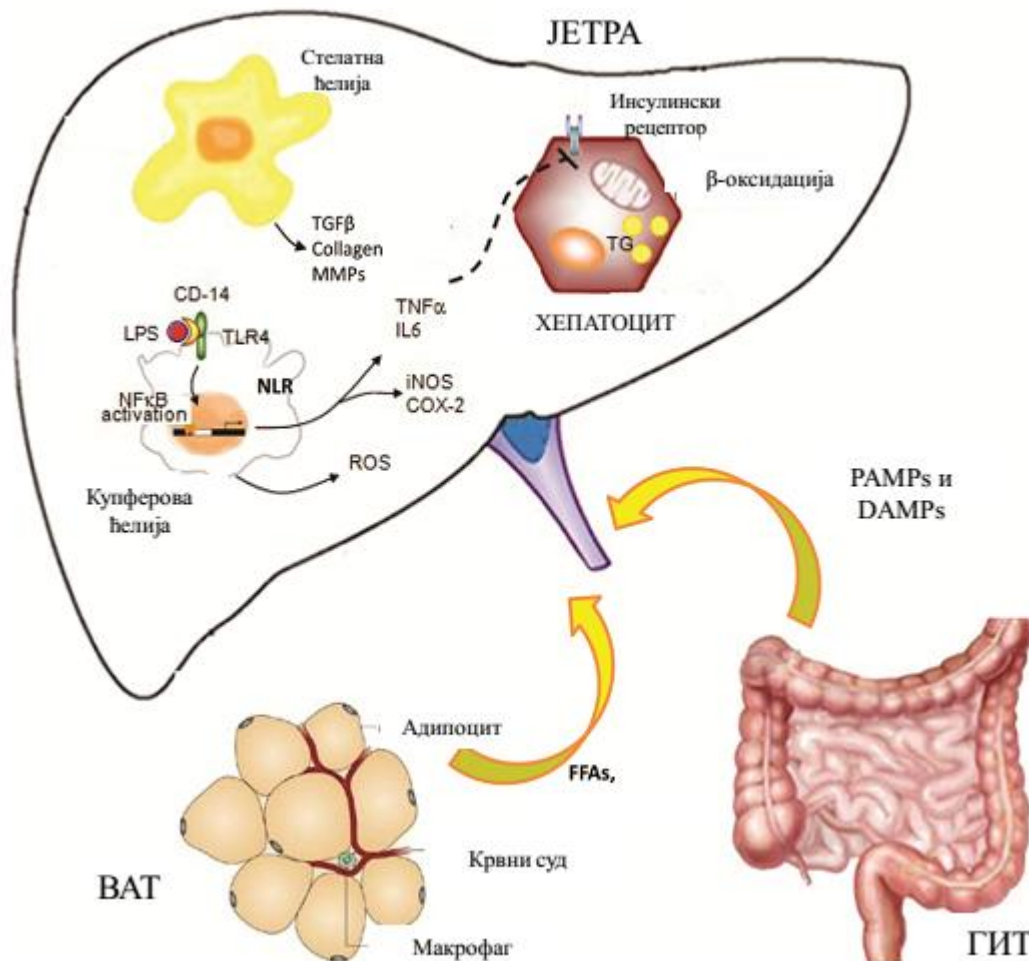
Стеатохепатитис, за разлику од једноставне стеатозе, карактерише присуство оштећења хепатоцита и лобуларне инфилтрације. Директна изложеност ткива јетре масним киселинама, али и адипоцитокинима, представља основ за покретање имунског одговора (126). Молекуларни механизми путем којих FFAs индукују инфламаторни одговор у јетри су веома комплексни. FAs могу директно или преко својих метаболита као што је церамид да активирају TLR4 (енгл. *toll-like receptor 4*) и индукују активацију проинфламаторних сигналних путева, превасходно у макрофагама (127).

Такође је показано да стеаринска и палмитинска киселина, чији су системски нивои повећани у дијетом индукованом NAFLD, могу да активирају TLR4 (128). Новија истраживања све чешће говоре о интеракцији исхране, нормалне микрофлоре у гастроинтестиналном тракту и активационом статусу ћелија имунског система у контексту настанка инфламације индуковане гојазношћу (129, 130).

Поред тога показано је да мишеви одгајани у конвенционалним условима имају већи садржај масти у поређењу са мишевима одгајаним у “*germ-free*” условима (130). Додатно је показано да трансплатација бактеријске микрофлоре мишева на конвенционалној исхрани резултира наглим порастом телесне тежине мишева који су до тада одгајани у “*germ-free*” условима (131). NAFLD је повезана са повећаном пропустљивошћу епитела гастроинтестиналног тракта. Тако у NAFLD расте серумски ниво липополисахарида грам негативних бактерија (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS), бактеријске DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*) и пептидогликана (133). Поменути производи микрофлоре могу директно да доведу до активације TLR4 рецептора и продукције проинфламаторних цитокина и хемокина (112).

Системске вредности LPS расту у готово свим анималним моделима дијетом индукованог NAFLD, укључујући исхрану са високим садржајем масти (енгл. *high-fat diet*, HFD), дијету са високим садржајем фруктозе (енгл. *fructose-rich diet*), метионин/холин дефицијентну дијету (енгл. *methionine/choline-deficient diet*, MCD ) и холин дефицијентну дијету (енгл. *choline-deficient amino acid-defined*, CDAA) (132). Додатно је показано да мишеви дефицијентни за TLR4 имају ниже системске вредности LPS, као и блажи облик NAFLD-а (133). (схема 2)



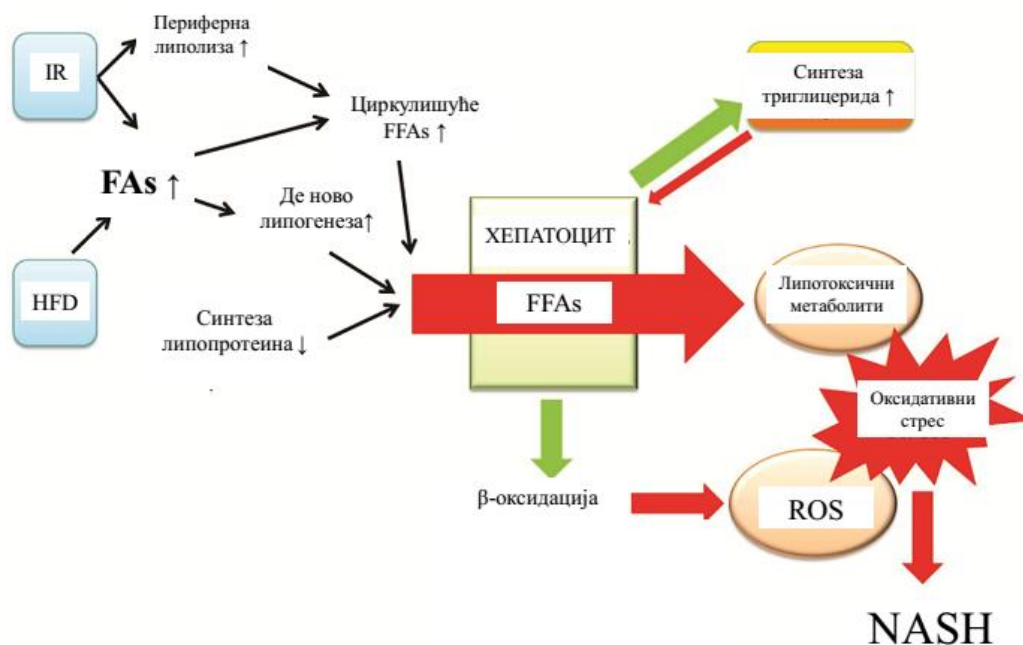


**Схема 2. Улога активације TLR4 у развоју стеатохепатитиса.** Директна изложеност ткива јетре FFAs пореклом из висцералног масног ткива и LPS-у пореклом из гастроинтестиналног тракта, индукује активацију проинфламаторних сигналних путева преко активације TLR4. (Кориговано према: *Meli R. et al, Front Immunol 2014; 5:177. doi: 10.3389/fimmu.2014.00177.*)

Хронична апликација LPS резултира настанком стеатозе, инсулинске резистенције и увећањем тежине јетре, чак и код животиња које су на стандардној исхрани (134). Јетра представља циљни орган када је LPS у питању, с обзиром да осамдесет процената интравенски апликованог LPS доспева у јетру за врло кратко време (132). Интеракција LPS-TLR4 игра важну улогу у настанку стеатохепатитиса, с обзиром да LPS пореклом из гастроинтестиналног тракта системом вене порте доспева директно у јетру. Када је фиброза јетре у питању, показано је да поред хепатоцита и макрофага, HSCs такође експримирају TLR4 рецептор и могу бити директно активирани LPS-ом (116).

### 1.3.3. Улога оксидативног стреса у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре

Оксидативни стрес и стварање слободних радикала један су од претпостављених механизма прогресије стеатозе у правцу настанка стеатохепатитиса. Оксидативни стрес и продукција ROS од стране митохондрија, ендоплазматског ретикулума и пероксизома игра веома важну улогу у настанку хепатоцелуларног оштећења и NASH-а (135). С обзиром да су ниске вредности ROS неопходне за виталне ћелијске процесе, постојање равнотеже између продукције ROS и антиоксидативне заштите је веома важно (136). Оксидативни стрес у хепатоцитима као последица  $\beta$ -оксидације и липотоксичног дејства FFAs у митохондријама један су од претпостављених механизма настанка оштећења и прогресије у правцу развоја стеатохепатитиса (схема 3).



**Схема 3. Значај оксидативног стреса у патогенези настанка стеатохепатитиса.**

(Кориговано према: Peverill W et al. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:8591-8638)

Показано је да смањен степен оксидативне заштите постоји код болесника који развију NASH (137). Дуготрајни оксидативни стрес доводи до настанка ROS који доводе до оштећења дуголанчаних полинезасићених масних киселина (енгл. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), њихове липидне пероксидације и настанка алдехида 4-HNE (енгл. 4-

*hydroxy-2-nonenal*) и MDA (енгл. *malondialdehyde*) (138). 4-HNE и MDA имају дужи полуживот у поређењу са ROS што омогућава ширење оксидативним стресом индукованог оштећења. Поред митохондрија, стрес ендоплазматског ретикулума као и продукција ROS од стране пероксизома могу бити повезани са липидном пероксидацијом FFAs (139, 140). Оштећење митохондријалне DNA настаје као последица стварања ROS и додатно фаворизује настанак и прогресију оксидативног оштећења што у крајњем исходу води настанку оштећења митохондрија али и осталих органела и индукује процес апоптозе (141).

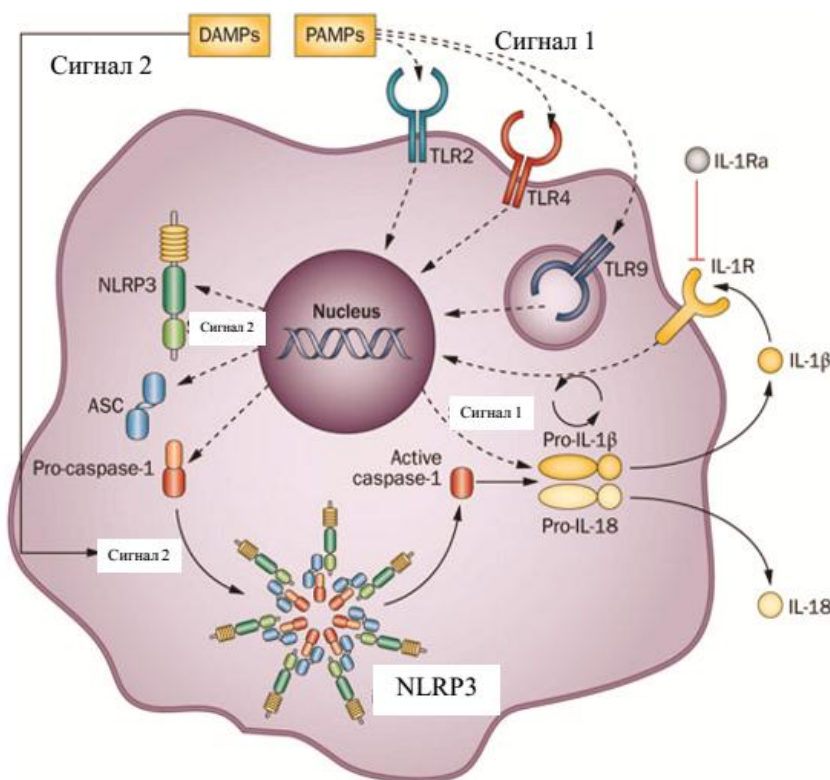
Цитотоксични ROS као и продукти липидне пероксидације настали у хепатоцитима дифундују у екстраћелијски простор где могу утицати како на Купферове ћелије, тако и директно на HSCs, ћелије које играју важну улогу у развоју стеатохепатитиса и прогресији у правцу фиброзе. Купферове ћелије које у себи таложе FFAs као и холестерол, посебно су осетљиве на дејство ROS који у њима активира NF-κB сигнални пут и индукује синтезу проинфламаторних цитокина (142). Додатно је показано да индукција NADPH (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) оксидазног система у макрофагима и последица продукција реактивних облика кисеоника могу резултирати оштећењем (143).

Када се HSC изложене дејству ROS настаје стрес ендоплазматског ретикулума који за последицу има настанак аутофагије и промену активационог статуса (144). Најбитнија карактеристика ROS-ом активираних HSC је губитак цитоплазматски депонованих липида и повећана способност миграције и продукције екстрацелуларног матрикса (145).

#### **1.3.4. Улога активације NLRP3 инфлазома у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре**

Ћелије урођеног имунског одговора поседују рецепторе који имају способност да детектују настанак оштећења као и продор микроорганизама, а могу бити експримирани у различитим ћелијским одељцима. Ови рецептори, означавају се као NLRs (енгл. *nucleotide binding and oligomerization domain, NOD-like receptors*, NLRs) (146).

Главну улогу у надзору цитоплазматског простора имају структуре које се називају инфламазоми, молекулски комплекси који контролишу активацију протеолитичког ензима каспазе-1. Каспаза-1 даље контролише активацију про-инфламаторних цитокина IL-1 $\beta$  и IL-18, што може довести до брзе ћелијске смрти, процеса означеног као пироптоза (146). У NLRs фамилију молекула који формирају инфламазоми спадају NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 и NLRP12 (147). NLRP3 инфламазом представља најбоље проучени мултипотеински комплекс, крипирин, који може бити активиран различитим молекулима који се ослобађају из оштећених ћелија (DAMPs), као и молекулским обрасцима микроорганизама (PAMPs) (146-148) (схема 4).



**Схема 4. Механизам активације NLRP3 инфламазома.** За активацију NLRP3 инфламазома и продукцију проинфламаторних цитокина, неопходна су два сигнала. Сигнал 1 активира TLRs, док се сигнал 2 остварује посредством DAMPs и/или PAMPs (Кориговано према: *Wree A et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013; 10:627-636*)

NLRP3 има трокомпонентну структуру и састоји се из централног нуклеотид везујућег домена задуженог за олигомеризацију, Nod (или NACHT), понављајућег карбокси-терминалног домена богатог леуцином (енгл. *leucine-rich repeat*, LRR) и

ефекторског аминок-терминалног домена који садржи пирин (енгл. *pyrin-containing domain 3*, PYD). NLR инфламазоми, укључујући NLRP3, садрже адапторски протеин ASC (енгл. *apoptotic speck protein*), у чијем саставу се налазе PYD и CARD (енгл. *caspase recruitment and activation domain*) (149). ASC служи као платформа за међупротеинске интеракције током активације и олигомеризације инфламазома, са последичном активацијом каспазе-1 и продукције IL-1 $\beta$  (150) (схема 4). Недавно је показано да активација NLRP3 инфламазома игра веома важну улогу у настанку гојазности и инсулинске резистенције, пошто делеција NLRP3 инфламазома, као и фармаколошка инхибиција каспазе-1, имају протективно дејство у настанку инсулинске резистенције (151). Такође, познато је да активација каспазе-1 и продукција IL-1 $\beta$  игра веома важну улогу у патогенези алкохолног и неалкохолног стеатохепатитиса као и у развоју фиброзе јетре (152, 153). Значај активације каспазе-1 и IL-1 $\beta$  сигналног пута је потврђен у бројним студијама које су користиле анималне моделе дијетом индукованог NAFLD, а показале су на различите начине да блокирање продукције IL-1 $\beta$  смањује хепатоцелуларно оштећење (154, 155). Показано да активација NLRP3 инфламазома у мијелоидним ћелијама може бити одговорна за настанак оштећења, инфламације и последично фиброзе јетре (156). Такође је показано да мишеви са циљаном делецијом NLRP3 инфламазома храњени CDAA дијетом имају мање увећање јетре, мање оштећење паренхима јетре као и мањи степен фиброзе јетре (157). Иста група аутора показала је да код болесника који развију NASH расте експресија NLRP3 и IL-1 $\beta$ , као и да постоји позитивна корелација са степеном фиброзе (157).

## 1.4. УЛОГА ИНФЛАМАЦИЈЕ У ПАТОГЕНЕЗИ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗИ ЈЕТРЕ

Стеатохепатитис, за разлику од једноставне стеатозе, карактерише присуство некроинфламаторне компоненте. Поред тога, лобуларна инфилтрација је неопходна да би се поставила дијагноза NASH-а. Неколико механизма објашњава активацију проинфламаторних сигналних путева у јетри и настанак лобуларне инфилтрације.

Веома важну улогу у патогенези настанка стеатохепатитиса на пољу стеатозе игра активација урођеног имунског одговора. Имунски систем може бити активиран како посредством PAMPs, тако и продукцијом DAMPs од стране оштећених ћелија (158).

Механизам активације имунског одговора најчешће подразумева активацију TLRs и/или NLRP3 инфламазома (158-160). Поред тога у отпочињању имунског одговора, јако важну улогу има и инсулинска резистенција, оксидативни стрес, липидна пероксидација, продукција проинфламаторних адипоцитокина, стрес ендоплазматског ретикулума као и следствена активација проинфламаторних сигналних путева у самој јетри (135, 161, 162).

Јетра се састоји од неколико типова ћелија, хепатоцити чине 60 до 80%, док остатак отпада на резидентне макрофаге (Купферове ћелије), дендритичне ћелије (енгл. *Dendritic cells*, DCs), ћелије природне убице (енгл. *Natural killer*, NK), NKT (енгл. *Natural killer T*, NKT) ћелије, Т лимфоците, синусоидалне ендотелне ћелије и стелатне ћелије јетре (енгл. *Hepatic stellate cells*, HSCs).

Иако све ћелијске популације, како паренхимске, тако и непаренхимске, играју улогу у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре, опште је прихваћено да је инфламација посредована активацијом урођених имунских механизма, пре свега макрофага и DCs.

#### 1.4.1. Улога макрофага у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре

Као што је поменуто претходно, активација урођеног имунског одговора игра јако битну улогу у патогенези NASH-а (159). Значајан допринос разумевању настанка и прогресије NASH-а на пољу стеатозе, дала су истраживања која су указала на важну улогу ћелија урођене имуности. Тако је иницијално указано на кључни значај инфилтрације, локализације и функционалне хетерогености макрофага у процесу настанка инфламације током развоја стеатохепатитиса на пољу стеатозе (163). Током развоја масне болести, јетру инфилтрише велики број макрофага који поред резидентних макрофага, Купферових ћелија, играју кључну улогу у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре (164). У хомеостатским условима, Купферове ћелије уклањају патогене и токсине из циркулације и одржавају толеранцију у ткиву јетре секрецијом интерлеукина-10 (енгл. *interleukin-10*, IL-10) (165). У току NASH-а у Купферовим ћелијама су активирани про-инфламаторни сигнални путеви, иако се њихов број током развоја гојазности не мења (25). Наиме, у анималном моделу дијетом индукованог стеатохепатитиса показано је да су Купферове ћелије прве ћелије које се активирају у одговору на оштећење хепатоцита. Продукуцијом проинфламаторних цитокина и хемокина привлаче моноците из циркулације који инфилтришу ткиво јетре и пролиферишу (25). Продуковани цитокини покрећу инфламаторни процес у самим хепатоцитима одговоран за настанак инсулинске резистенције и хепатоцелуларног оштећења (164).

Поред продукције цитокина, активиране макрофаге продукују и хемокине. Од продукованих хемокина, MCP-1 (енгл. *Monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), познатији као CCL2, игра веома важну улогу у привлачењу моноцита у ткиво јетре где даље диферентују у ткивне макрофаге. Инфилтришући макрофаги настављају да продукују хемокине чиме се даље одржава инфламаторни процес. Један од најважнијих хемокина у миграцији макрофага у ткиво јетре, CCL2 се везује за хемокински рецептор CCR2 (енгл. *C-C chemokine receptor type 2*, CCR2) на макрофагима (165). Показано је да делација односно фармаколошка инхибиција гена за CCL2 или CCR2 смањује инфилтрацију

макрофага у ткиво јетре, редукује параметре инфламације и смањује хронично хепатоцелуларно оштећење (166).

Макрофаги су веома хетерогена популација ћелија и у зависности од ткивне микросредине могу да испоље различите фенотипске и функционалне карактеристике. Класично активирани или М1 макрофаги, потакнути дејством интерферона- $\gamma$  (енгл. *Interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) и липополисахарида експримирају про-инфламаторни фенотип (167). Макрофаги препознају PAMPs испољене на микроорганизмима помоћу рецептора за ове молекулске обрасце, као што је то TLR4 (168). Активација и поларизација макрофага у правцу про-инфламаторног М1 фенотипа настаје као последица стимулације макрофага посредством PAMPs, DAMPs или посредство проинфламаторних цитокина. Продукција проинфламаторних цитокина игра веома важну улогу у настанку стеатохепатитиса и прогресији болести како код људи тако и код експерименталних животиња (169, 170). Неколико проинфламаторних цитокина, а пре свих IL-1 $\beta$  продукован од стране макрофага, је укључено у процес настанка стеатохепатитиса и фиброзе јетре (171).

Даља прогресија у правцу цирозе може захтевати померање имунског одговора и поларизацију макрофага у правцу М2 фенотипа (172). Новија истраживања показују да IL-33 стимулише алтернативну активирацију макрофага и настанак фиброзе (173). Такође је показано да продукција IL-13 игра веома важну улогу у развоју фиброзе јетре (35). IL-13 посредована фиброгенеза најчешће подразумева стимулацију продукције TGF- $\beta$ , иако је показано да стимулацију HSC може да оствари директно (36).

#### **1.4.2. Улога дендритичних ћелија у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре**

Улога DCs, професионалних антиген презентујућих ћелија, у патогенези хроничних болести јетре и NAFLD није довољно разјашњена. Показано је да у токсичном оштећењу јетре DCs попримају проинфламаторни фенотип као и да се зреле DCs појављују рано у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре (174). Студија која је испитивала улогу DCs у патогенези стеатохепатитиса индукованог применом MCD дијете, показала је да се зреле DCs појављују рано након индукције болести и да имају проинфламаторни фенотип.



Пораст DCs био је праћен активацијом CD4<sup>+</sup> лимфоцита, док је број Т регулаторних лимфоцита редукован (175). Такође је показано да храна са високим садржајем масти индукује пораст DCs у јетри и висцералном масном ткиву, где ове ћелије имају важну улогу у активацији и регрутовању проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија (176). Са друге стране, показано је да се број DCs повећава у фази резолуције фиброзе, где ове ћелије лимитирају процес фиброгенезе (177).

Упркос значајном напретку у разумевању улоге DCs патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена, с обзиром на њихову различиту улогу у различитим фазама развоја стеатохепатитиса и фиброзе јетре.

### **1.4.3. Улога осталих ћелија имунског система у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре**

Актуелна запажања у патогенези стеатохепатитиса поред макрофага и DCs истичу улогу бројних ћелија имунског система које у међусобној комуникацији креирају инфламаторни миље у ткиву јетре. Иако њихова улога у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре још увек није прецизно дефинисана, верује се да своје главне ефекторске функције остварују у процесима контроле миграције и поларизације макрофага и активације HSCs.

Показано да након хепатоцелуларног оштећења, DCs могу да посредују у активацији NK, NKT ћелија, конвенционалних и регулаторних Т лимфоцита као и хепатичних стелатних ћелија, и на тај начин започну снажан инфламаторни одговор (174).

Иако се број и цитотоксични потенцијал **NK ћелија** повећава у гојазности улога ових ћелија у патогенези стеатохепатитиса није до краја разјашњена (178). Испитивања на анималним моделима су показала да број NK ћелије повећава са прогресијом стеатохепатитиса (179), али да ове ћелије спречавају настанак фиброзе продукцијом IFN $\gamma$  (180). Иако је показано да се број **NKT ћелија** у јетри смањује са развојем и прогресијом NAFLD, тачан механизам којим депоновање липида доводи до смањене

заступљености ових ћелија није до краја разјашњен (181). NKT ћелије специфично препознају гликолипидне антигене, а након активације могу да продукују проинфламаторне, као и антиинфламаторне цитокине (182). Додатно, NKT ћелије могу бити одговорне за оштећење хепатоцита. Као механизам NKT ћелијама посредованог оштећења јетре сматра се индукција апоптозе хепатоцита посредством Fas ligand:Fas интеракције као и посредством продукције проинфламаторних цитокина (183).

Улога **T лимфоцита** у гојазношћу индукованој инфламацији у ткиву јетре је преваходно посредована продукцијом цитокина. Кључну улогу у томе имају CD4<sup>+</sup> помагачки T лимфоцити (енгл. *T helper*, Th) у основи подељени на Th1 субпопулацију која продукује про-инфламаторне цитокине, пре свега IFN- $\gamma$ , и Th2 субпопулацију одговорну за продукцију IL-4 и IL-13 (184). Иако се сматра да је NASH класична тип 1 поларизована болест све је више података који указују на значај равнотеже између типа 1 и типа 2 имунског одговора (185).

Новији радови указују на значај активације Th17 субпопулације T лимфоцита и продукције IL-17 у патогенези стеатохепатитиса и прогресији у правцу фиброзе јетре (186, 187). Регулаторни CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T лимфоцити (енгл. *Forkhead box P3*, FoxP3) секретују анти-инфламаторне цитокине који инхибирају миграцију макрофага и утичу на њихову поларизацију у смеру M2 фенотипа (188). Такође, показано је да током прогресије у правцу стеатохепатитиса CD8<sup>+</sup> цитотоксички T лимфоцити инфилтришу јетру, продукују про-инфламаторне цитокине и тако промовишу миграцију и активацију макрофага (189).

#### 1.4.4. Значај цитокина у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре

У патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре важну улогу имају TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  и IL-13.

**TNF $\alpha$**  је први пут откривен као цитокин важан у индукцији хеморагијске некрозе тумора па је назван „фактор некрозе тумора“ (енгл. *tumor necrosis factor*, TNF $\alpha$ ) (190). TNF $\alpha$  продукују макрофаги, дендритичне ћелије, лимфоцити, мастоцити, ендотелне ћелије и фибробласти, независно од типа ћелија које га продукују има про-инфламаторно дејство (191). TNF $\alpha$ , као плеотропни цитокин, има значајну улогу у многим биолошким процесима: индукује снажан ћелијски имунски одговор, утиче на пролиферацију лимфоцита и стимулише продукцију медијатора запаљења.

У јетри, TNF $\alpha$  игра важну улогу у патогенези неалкохолне болести јетре (192). Повећани нивои TNF $\alpha$  у серуму, као и повећана експресија у ткиву јетре пацијената који развију NASH значајно корелира са хистолошким скором (193). Поред директног хепатотоксичног ефекта, TNF $\alpha$  доприноси настанку оштећења и индиректно, повећавајући експресију адхезивних молекула на ендотелним ћелијама чиме помаже миграцију и активацију макрофага (176, 194).

**IL-1 $\beta$**  који је члан интерлеукин-1 фамилије цитокина спада у проинфламаторне цитокине и најчешће је испитиван цитокин у патогенези настанка стеатозе и стеатохепатитиса (195). Купферове ћелије и макрофаге су главни продуктори IL-1 $\beta$ . У експерименталним моделима је показано да IL-1 $\beta$  промовише развој стеатозе (196). Механизам којим IL-1 $\beta$  доводи до појачаног депоновања липида у хепатоцитима подразумева значајну улогу овог цитокина у настанак инсулинске резистенције и последично повећано допремање FFAs у јетру (197).

Поред тога појачана продукција IL-1 $\beta$  може бити последица активације макрофага посредством PAMPs и DAMPs. Механизам којим долази до активације и продукције проинфламаторног IL-1 $\beta$  подразумева активацију TLRs на макрофагама посредством ендотоксина или засићеним масним киселинама (112, 127).

Такође, познато је да активација NLRP3 инфлазома, каспазе-1 и продукција IL-1 $\beta$  игра веома важну улогу у патогенези неалкохолног стеатохепатитиса као и у развоју фиброзе јетре (152, 157). Серумске вредности IL-1 $\beta$  су значајно веће код NAFLD оболелих, и вредности позитивно корелирају са степеном фиброзе јетре (198).

**TGF- $\beta$**  спада у плеотропне цитокине и има важну улогу у процесима пролиферације, диференцијације, ангиогенезе као и у процесима репарације у одговору на оштећење ћелије (199). Свој ефекат TGF- $\beta$  остварује везујући се за тип 2 рецептор који затим доводи до фосфорилације тип 1 рецептора. Тип 1 рецептор киназа затим активира Smad-зависни, или Smad-независни сигнални пут преко ангажовања Так1 или PI3 протеин киназа (200). Резултат Smad-зависног сигналног пута је фосфорилација Smad2 и Smad3 који преко Smad4 регулишу транскрипцију гена важних за остваривање биолошких функција TGF- $\beta$  (201).

У јетри, TGF- $\beta$  игра веома важну улогу у процесу фиброгенезе првенствено активирањем HSCs (199, 202). Добро је познато да TGF- $\beta$  сигнализација преко HSCs игра веома важну улогу у процесу прогресије NAFLD у правцу фиброзе јетре (202). Иако је показано да експресија TGF- $\beta$  расте код NASH болесника који развију фиброзу (203), улога TGF- $\beta$  сигналног пута у хепатоцитима и метаболичким абнормалностима није до краја разјашњена.

Додатно је показано да је TGF- $\beta$ -Smad3 сигнални пут повезан са настанком гојазности, инсулинске резистенције и стеатозе кроз регулацију експресије PPAR- $\gamma$  (204). Такође је показано да TGF- $\beta$  игра веома важну улогу у регулацији метаболизма липида у самим хепатоцитима, процесу настанка оштећења и смрти ћелије, самим тим и у прогресији NAFLD у правцу настанка NASH и фиброзе јетре (199).

**IL-13** је представник Th2 цитокина и сматра се поред IL-4 (енгл. *interleukin-4*) кључним цитокином за индукцију тип 2 имунског одговора (205). Своје дејство IL-13 остварује посредством рецептора који се састоји од више субјединица: алфа ланац IL-4 рецептора (IL-4R $\alpha$ ) и најмање једног од два позната IL-13 специфична везујућа места

(IL-13R $\alpha$ 1 и IL-13R $\alpha$ 2). У оба случаја IL-13 остварује свој ефекат активирајући ЈАК тирозин киназе и активира STAT6 транскрипциони фактор који одлази у једро где регулише транскрипцију гена важних за биолошке ефекте IL-13 (205).

IL-13 игра веома важну улогу у настанку имунског одговора против паразита, као и у алергијским реакцијама (206). IL-13 такође игра веома важну улогу у процесу фиброзе и депоновања екстрацелуларног матрикса. Наиме показано је да IL-13 остварује свој профиброгени ефекат у јетри дејством на HSCs, повећавајући експресију  $\alpha$ -SMA, колагена и TGF- $\beta$  (207).

Улога IL-13 у хроничним обољењима и фибрози јетре најобимније је описана у анималним моделима инфекције са *Schistosoma mansoni*. Неколико студија је показало да је IL-13 кључни профиброгени цитокин у инфекцији са *Schistosoma mansoni*, као и да блокирање ефекта IL-13 у овом моделу спречава настанак фиброзе (208).

Када је у питању NASH и прогресија у правцу фиброзе показано је да IL-13 такође игра важну улогу. Додатно је показано да у болесника који развију NASH постоји повећана експресија IL-13R $\alpha$ 2 у поређењу са болесницима који развију просту стеатозу (35). Иако IL-13 може директно да доведе до активације стелатних ћелија (36), механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе најчешће подразумева стимулацију продукције TGF- $\beta$ , цитокина који такође игра важну улогу у процесу фиброгенезе у јетри (37).

## 1.5. ФАМИЛИЈА ГАЛЕКТИНА

Лектини припадају фамилији еволуционо конзервираних протеина који имају способност да се везују угљене хидрате (209). Лектини су класификовани у четири групе: лектини С типа, лектини Р типа, пентраксини и галектини (209). Када су у питању галектини, за све чланове ове фамилије заједничко је присуство најмање једног домена за препознавање угњених хидрата (енгл. *Carbohydrate recognition domain*, CRD ). CRD домен дужине је око 135 аминокиселина и има висок афинитет везивања  $\beta$ -галактозида (210). Галектини припадају фамилији протеина која данас броји 15 познатих чланова (211). На основу структуре, као и броја и организације CRD региона, сви галектини су класификовани у три подгрупе (212):

- „*proto*”- тип галектина који садржи по један CRD регион. Могу да функционишу као мономери (галектин -5, -7 и -10) или као димери (галектин -1, -2, -11, -13, -14, -15)
- „*tandem-repeat*”- тип галектина који поседују два различита CRD региона повезана пептидним ланцем различите дужине (галектин -4, -6, -8, -9, -12)
- „*chimera*”- тип галектина садржи један CRD регион спојен са не-лектинским аминокиселинским ланцем дужине од око 120 аминокиселина са кратким понављајућим секвенцама богатим пролином и глицином. Јединствени члан ове групе је галектин-3 који у присуству мултивалентних угљених хидрата формира пентамере (схема 5).

## ГАЛЕКТИНИ

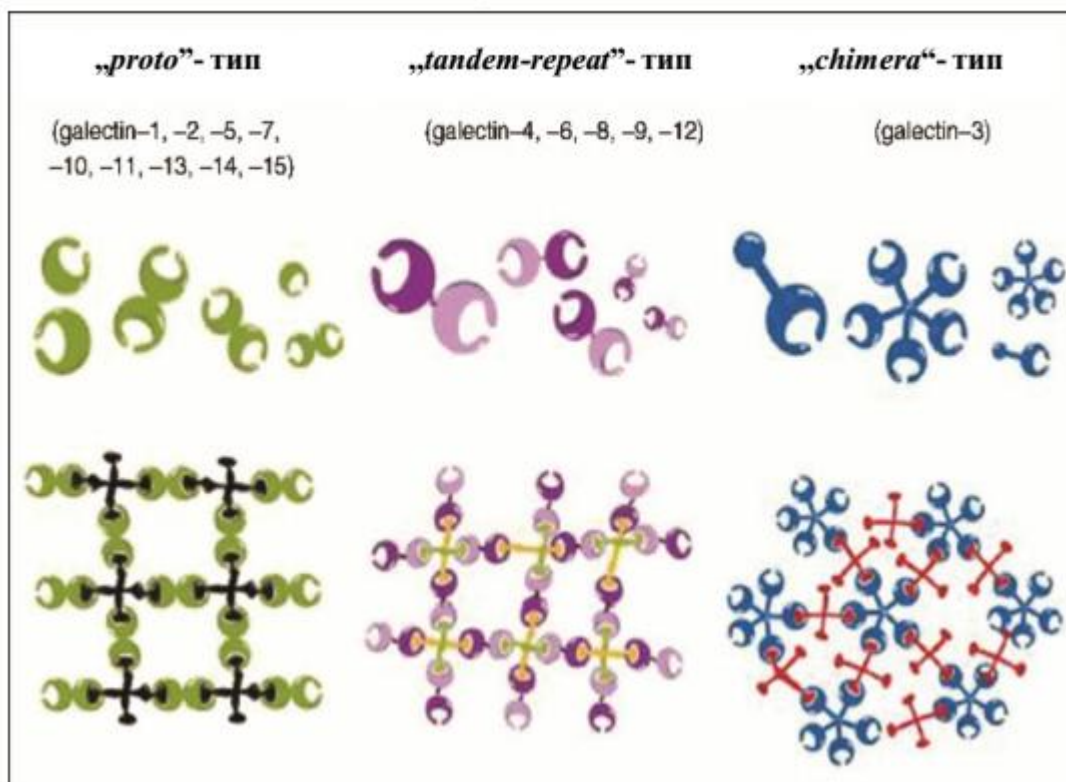


Схема 5. Класификација галектина на основу броја и организације CRD региона.  
( Модификовано према *Pereira AR et al. Rev Por Cardiology 2015; 34:201-208*)

### 1.6. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3

Галектини су широко распрострањени у природи. Присутни су у ћелијама најнижих облика живота, али и у ћелијама сисара, што упућује на потенцијално важну улогу ових молекула у основним ћелијским процесима везаним за преживљавање организма (209-211). Галектини су широко распрострањени како у различитим ткивима тако и у различитим типовима ћелија. Галектини су превасходно локализовани у цитоплазматском простору. Међутим, већ дуго је познато да могу бити секретовани или транспортовани у једру или друге ћелијске компартмане (213, 214). Тако се галектини могу наћи у цитоплазми, органелама, једру, на површини ћелије или као слободни молекули у различитим телесним течностима (215).

Поред афинитета да се вежу за галактозу, неки од галектина имају способност прилагођавања CRD региона за везивање различитих олигосахарида који улазе у састав гликопротеина на ћелијској мембрани или у екстрацелуларном матриксу (216-218). Везивањем за гликокоњугате присутне на површини ћелије и њиховим унакрсним повезивањем, могу да започну каскаду различитих сигналних путева у ћелији (216). Са друге стране, функције интрацелуларно локализованих галектина нису посредоване везивањем за угљене хидрате, већ за различите интрацелуларне протеинске лиганде. На овај начин галектини се укључују у бројне интраћелијске сигналне путеве (219).

Експресија галектина се мења током ембриогенезе и ћелијске диференцијације, а мења се и у различитим физиолошким и патолошким условима (220). Функционално су укључени у различите биолошке процесе, као што су ембриогенеза, адхезија, пролиферација и диференцијација ћелија, апоптоза, бактеријска колонизација, метаболизам органских материја и модулација имунског одговора (221-223). Многобројни су докази да галектини играју јако битну улогу у различитим патолошким стањима укључујући аутоимунске болести, хроничне инфламаторне болести, раст и метастазирање тумора, метаболичке абнормалности укључујући тип 2 шећерне болести и компликације као што су масна болест јетре и процес фиброзе различитих ткива и органа (224-229).

## 1.7. СТРУКТУРНЕ ОСОБИНЕ ГАЛЕКТИНА-3

Галектин 3 (29-35-kD) је најпре идентификован као површински антиген присутан на мембрани перитонеалних макрофага мишева стимулираних тиогликолатом, а био је означен као Mac-2 (230). Касније су откривени структурно слични лектински молекули: CBP-35 (енгл. *Carbohydrate-binding protein*, CBP величине 35-kDa) мишјих фибробласта, εBP (енгл. *ε-binding protein from rat basophilic leukemia cells*, εBP), RL-29 (енгл. *29-kDa lectin in rat lung tissue*, RL-29), HL-29 (енгл. *29-kDa lectin in human lung tissue*, HL-29), L-34 (лектин од 34-kDa) и LBP (енгл. *Non-integrin laminin binding protein*, LBP) у макрофагима (230-235). Анализом гена, као и аминокиселинских секвенци утврђено је



постојање високе холологије међу овим молекулима (236). Узимајући у обзир висок степен хомологије овог молекула између различитих врста, номенклатуром из 1994. године је означен као галектин-3 (237).

Анализом структуре галектина-3 уочено је да овај молекул има јединствену структуру која га разликује од осталих чланова фамилије галектина (238). Галектин-3 се састоји од једног полипептидног ланца који чине два структурно и функционално различита домена: N-терминални домен и C-терминални домен који служи за препознавање угљених хидрата (239, 240). У присуству мултивалентних лиганата, молекули галектина-3 се, захваљујући својим N терминалним доменима, удружују у пентамере и на тај начин унакрсно повезују површинске гликокоњугате формирајући решеткасту структуру. Поред структурних, два описана домена галектина-3 су одговорна за испољавање различитих функција овог молекула (230, 241, 242).

Иако нема способност за везивање угљених хидрата N терминални крај галектина-3 је есенцијалан за његове пуне биолошке функције (243). N терминални крај галектина-3, величине 110-130 аминокиселина, преко аминокиселине тирозин на позицији 102 и суседних аминокиселина партиципира у везивању угљенохидратних лиганата (244). Такође је одговоран за формирање пентамера чиме доприноси унакрсном повезивању лиганата (215, 245, 246). У N-терминалном домену налази се циљно место деловања протеаза (колагеназа и металопротеиназа) које разграђују и инактивирају галектин-3. Исецање ланца рекомбинантног хуманог галектина-3 на позицији аланин62-тирозин63 повећава афинитет за везивање угљених хидрата, али смањује способност олигомеризације галектина-3 чиме мења његове функције зависне од формирања пентамера (247). N-терминални домен има веома важну улогу и у секрецији галектина-3 (248), јер делеција првих 11 аминокиселина овог домена блокира секрецију галектина-3 (249). Уз то, N-терминални домен је важан и за улогу галектина-3 у регулацији апоптозе. Наиме, показано је да мутација серина на позицији 6 ремети антиапоптотичну активност галектина-3 (250).

C-теминални домен галектина-3 се састоји из 130 аминокиселина које формирају глобуларну структуру. Она се састоји из две анти-паралелне  $\beta$ -плоче са по 5-6  $\beta$ -ланаца који формирају удубљење за везивање угљених хидрата (244). У склопу овог домена се налази конзервирана NWGR секвенца која игра јако битну улогу у антиапоптотском ефекту галектина-3, јер је структурно хомолога са ВН1 доменом фамилије анти-апоптотских Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) протеин (251).

## 1.8. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РЕГУЛАЦИЈИ ИМУНСКОГ ОДГОВОРА

Галектин-3 је експримиран на многим ћелијама имунског система и има важну улогу у регулацији инфламације. Конститутивно је експримиран на моноцитима, макрофагима, дендритичним ћелијама, мастоцитима, еозинофилима, док га лимфоцити експримирају тек након активације (252).

Познато је да галектин-3 партиципира у више фаза инфламаторног одговора као што су хемотакса, активација и адхезија, опсонизација и фагоцитоза (253-255). За разлику од макрофага који интензивно експримирају и секретују галектин-3, мишји неутрофили не експримирају галектин-3 (256). Ипак, секретовани галектин-3 путем унакрсног повезивања мембранских гликопротеина, може да стимулише различите сигнале у ћелијама урођене имуности као што су оксидативни прасак у неутрофилима и дегранулација мастоцита (255-257).

Галектин-3 је импликован у процесе апоптозе ћелија урођене имуности. Тако су макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева склонији апоптози у поређењу са макрофагима галектин-3 позитивних животиња (258). Фагоцитоза апоптотичних неутрофила од стране макрофага у галектин-3 дефицијентних мишева је знатно мање ефикасна у поређењу са контролним животињама, што за последицу има нагомилавање апоптотичних неутрофила и следствено оштећење ткива (259).

Галектин-3 утиче на атхезију моноцита и макрофага и помаже њихову миграцију кроз ендотел (216, 260). Галектин-3 функционише и као рецептор који препознаје молекулске обрасце, гликокоњугате на површини микроорганизама и на тај начин активира фагоците и појачава њихову микробицидну и фагоцитну способност (260). Уз то, галектин-3 повећава продукцију IL-1 и реактивних кисеоничних радикала у макрофагама (261).

Постоје опречни ставови о улози галектина-3 у активацији макрофага. Показано је да *in vitro* алтернативна активација галектин-3 дефицијентних макрофага под утицајем IL-4 и IL-13 редукована, док је класична активација под утицајем липополисахарида неизмењена (262). Додатно, у истој студији је показано да примена рекомбинантног галектина-3 стимулише док примена галектин-3 инхибитора блокира алтернативну активацију макрофага (262). У прилог томе иду међусобно опречни резултати студија које су испитивале да ли галектин-3 у макрофагима делује про или анти-инфламаторно. Наиме, у једној студији је показано да макрофаги лалектин-3 дефицијентних животиња под утицајем липополисахарида продукују већу количину проинфламаторних цитокина, што упућује на антиинфламаторне ефекте галектина-3 у макрофагима (263). Супротно томе, галектин-3 у макрофагима учествује у активацији JAK/STAT сигналних путева што је довело до масовне продукције про-инфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (264).

Намеће се закључак да је улога галектина-3 у активацији макрофага веома сложена и да веома важну улогу у том процесу игра микросредина инфламираног органа, као и локална и системска продукција цитокина.

Галектин-3 има важну улогу у миграцији и активацији дендритичних ћелија (265, 266). Дендритичне ћелије изоловане из периферних лимфних органа галектин-3 дефицијентних мишева се много спорије крећу у односу на галектин-3 позитивне ћелије. Поред тога, у току инфекције дендритичне ћелије повећавају експресију галектина-3 што побољшава њихову атхезију и миграторну способност (267). Експресија галектина-3 у дендритичним ћелијама игра важну улогу у поларизацији имунског одговора (268-270).

Галектин-3 експримиран је на активираним Т и В лимфоцитима и игра веома важну улогу у пролиферацији и апоптози Т лимфоцита (270, 271). Показано је да тек након активације Т лимфоцити почињу да експримирају галектин-3 (272). Ако се експресија галектина-3 у лимфоцитима инхибира, они постају мање осетљиви на митогене стимулусе и смањује се њихова пролиферација (272). Експресија интрацелуларног галектина-3 инхибира, а експресија екстрацелуларног галектина-3 подстиче апоптозу активираних Т лимфоцита. Проапоптотски ефекат екстрацелуларни галектин-3 остварује везујући се за гликокоњугате на мембрани Т лимфоцита (273). Додатно, чини се да делеција гена за галектин-3 подстиче настанак регулаторних ћелија, јер је проценат регулаторних Т лимфоцита у слезини и централном нервном систему имунизованих галектин-3 дефицијентних мишева био већи у односу на галектин-3 позитивне мишеве (267).

Такође је, у експерименталном моделу малигног меланома, показано да галектин-3 утиче на цитотоксични потенцијал НК ћелија (274). НК ћелије изоловане из слезине галектин-3 дефицијентних мишева показале су значајно већи цитотоксични потенцијал у односу НК ћелијама изоловане из галектин-3 позитивних мишева (274).

## **1.9. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У ГОЈАЗНОСТИ И ТИП 2 DIABETES MELLITUS-у**

Галектин-3 је члан фамилије  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и паренхимским ћелијама различитих ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације испољава своју мултифункционалност у процесима регулације инфламације која може уско бити повезана са метаболичким абнормалностима (метаинфламација) (275, 227, 228).

Гојазност је поремећај телесне композиције који се најпрецизније дефинише апсолутним увећањем количине, пре свега висцералног адипозног ткива у организму у условима прекомерног уноса нутријената. Најчешће, експанзију масног ткива прати

увећање телесне масе. Досадашњим истраживањима показано је да је галектин-3 експримиран на адипоцитима и да игра јако битну улогу у процесима пролиферације и диференцијације ових ћелија. (276, 277). Међутим, улога галектина-3 у настанку гојазности и тип 2 diabetes mellitus-а није до краја објашњена. Наиме, показано је да су серумске вредности галектина-3 повећане у гојазних и да негативно корелирају са вредностима гликозираног хемоглобина (278) С друге стране, *Okhura* и сарадници показали су да су ниске серумске вредности галектина-3 повезане са инсулинском резистенцијом код оболелих од тип 2 Diabetes mellitus-а (279).

Новији резултати показују да делеција гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-а индукованих применом дијете са високим садржајем масти. Главне манифестације убрзаног настанка болести у *LGALS3<sup>-/-</sup>* мишева на дијети са високим садржајем масти, огледају се у значајно већој телесној маси и количини висцералног адипозног ткива, појави хипергликемије, порасту НОМА-IR индекса, израженом инсулитису и прогресивној инфилтрацији про-инфламаторних макрофага у панкреасна острвца (227, 280). У складу са овим резултатима су подаци из најновије студије која је документовала да аблација гена за галектин-3 индукује увећање адипозног ткива што је праћено развојем системске инфламације и инсулинске резистенције (227, 281).

Један од могућих механизма протективног ефекта галектина-3 везан је за његову функцију рецептора чистача за крајње продукте метаболизма глукозе (енгл. *Advanced glycation endproducts*, AGE) и липида (енгл. *Advanced lipoxidation endproducts*, ALE). Галектин-3 учествује у деградацији и уклањању AGE и ALE из циркулације у условима повећаног флуksа ових метаболита, који настаје као последица енергетског дисбаланса организма (227, 282). Претпоставка је да је у одсуству галектина-3 појачано депоновање ових молекула, као и експресија PRR (енгл. *Pattern recognition receptor*) за AGE (RAGE) који активира ћелије имунског система и подстиче продукцију про-инфламаторних медијатора.

Додатно,  $\beta$ -ћелије панкреасних острваца, изложене цитотоксичном дејству IL-1 $\beta$  *in vitro*, повишено експримирају галектин-3 који има протективну улогу у процесу њиховог оштећења (227, 283). Досадашњим истраживањима делеција гена за галектин-3 доведена је у везу са убрзаном прогресијом дијабетесних компликација као што су експериментални гломерулонефритис и атеросклероза, указујући на могући протективни ефекат галектин-3 у метаболичким дисфункцијама и инфламацији ниског степена која је у основи патогенезе гојазности и DMT2 (284-285).

## 1.10. УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ

Галектин-3 има важну улогу у патогенези инфламаторних болести јетре (264, 286-288). Претходна истраживања су показала да у јетри и серуму пацијената оболелих од стеатохепатитиса, цирозе и хепатоцелуларног карцинома долази до промене у експресији галектина-3 (229, 288-290).

Међутим, опречни резултати су објављени када је у питању улога галектина-3 у развоју стеатохепатитиса у експерименталним моделима. *Nomoto* и сарадници су показали да галектин-3 дефицијентни мишеви мушког пола спонтано развијају стетозу са 6 месеци старости (291). Додатно, иста група аутора је показала коришћењем CDAА дијете да мишеви са циљаном делецијом галектина-3 развијају већу стеатозу и хепатоцелуларно оштећење у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (292). С друге стране, *Jacobini* и сарадници су показали да су галектин-3 дефицијентни мишеви били резистентни на развој стеатохепатитиса и фиброзе јетре када су храњени атерогеном дијетом (293).

У здравој јетри, галектин-3 је експримиран на Купферовим ћелијама, ендотелним ћелијама и активираним стелатним ћелијама док га зрели здрави хепатоцити не експримирају (275). Галектин-3 првобитно је описан као молекул неопходан за активацију макрофага (230). Макрофаги имају веома важну улогу у настанку

хепатоцелуларног оштећења, развоју стеатохепатитиса и фибрози јетре (163-166). и могу се на основу фенотипских и функционалних карактеристика класификовати као М1 и М2-макрофаги (167). М1 макрофаги продукују проинфламаторне цитокине, који својим хепатотоксичним ефектом доводе до оштећења ткива јетре, док су М2 макрофаги који продукују антиинфламаторне цитокине одговорни за процес репарације и фиброгенезе у ткиву јетре (167, 168). Поред улоге у активацији макрофага (294), галектин-3 је неопходан за активацију стелатних ћелија и настанак миофибробласта, кључних ћелија у процесу депоновања екстрацелуларног матрикса и настанак фиброзе у ткиву јетре (295). Делација гена за галектин-3 блокира TGF- $\beta$  посредовану активацију миофибробласта и експресију проколагена, чиме спречава настанак фиброзе у јетри мишева третираних са угљентетрахлоридом. Додатно, делација галектина-3 блокира активацију миофибробласта и експресију проколагена *in vitro* и *in vivo* и значајно редукује фиброзу у јетри (295). Такође је показано да са развојем цирозе код људи долази до пораста експресије галектина-3 у хепатоцитима у близини регенеративних чворића (288). Поједине студије су сугерисале да се експресија галектина-3 може користити као прогностички фактор за хепатоцелуларни карцином (296). Већа експресија у једру ћелија хепатоцелуларног карцинома корелира са лошијом прогнозом (297). Супресија експресије нуклеарног галектина-3 подстиче апоптозу и сензитивност на хемиотерапију малигнућ ћелија холангиокарцинома (296).

Са обзиром да је галектин-3 експримиран на Купферовим ћелијама, измењеним хепатоцитима и на свим ћелијама имунског система које имају важну улогу у настанку и прогресији стеатохепатитиса и фиброзе јетре, одлучили смо да у нашем истраживању испитамо улогу галектина-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности индуковане дуготрајном применом хране са високим садржајем масти.

## **2. ЦИЉ СТУДИЈЕ**

Главни циљ ове студије је да се испита улога галектина-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у мишијем моделу гојазности индуковане дуготрајном применом дијете са високим садржајем масти.

У складу са овим циљем испитивани су:

1. Улога гојазности у настанку стеатохепатитиса и фиброзе јетре у присуству или одсуству галектина-3
2. Улога инфламације у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у присуству или одсуству галектина-3
3. Механизам настанка инфламације и фиброзе јетре у присуству или одсуству галектина-3

Експериментални задаци студије:

- Испитати утицај галектина-3 на развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног масног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести
- Испитати утицај галектина-3 на развој инсулинске резистенције одређивањем параметара гликорегулације
- Испитати утицај галектина-3 на развој инфламације у висцералном масном ткиву
- Испитати утицај галектина-3 на развој инфламације у гастроинтестиналном тракту
- Испитати утицај галектина-3 на развој стеатозе и метаболизам липида у јетри
- Испитати утицај галектина-3 на настанак хепатоцелуларног оштећења
- Испитати утицај галектина-3 на настанак оксидативног стреса
- Испитати утицај галектина-3 на развој инфламације у ткиву јетре
- Испитати утицај галектина-3 на развој фиброзе јетре



- Испитати фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које учествују у инфламацији и фибрози у ткиву јетре
- Испитати фенотипске и функционалне карактеристике ћелија костне сржи и периферне крви
- Испитати вредност проинфламаторних и профиброгених цитокина у серуму и ткиву јетре
- Утврдити везу између галектина-3 и активације NLRP3 и следствене продукције IL-1 $\beta$ , као могућег механизма настанка инфламације и хепатоцелуларног оштећења
- Утврдити везу између галектина-3 и активације IL-33/ST2 осовине и следствене продукције IL-13, као могућег механизма настанка фиброзе у ткиву јетре *in vivo*, као и у перитонеалним макрофагама *in vitro*

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживање је спроведено на 8 недеља старим мужјацима, чистог соја C57Bl/6 (енгл. *wild type*, WT) и мишевима којима је циљано уклоњен ген за галектин-3 (LGALS3<sup>-/-</sup>) C57Bl/6 соја. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви су добијени захваљујући љубазношћу проф. др Hsu-a (*Daniel K Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, CA, USA*).

Мишеви су одгајани у стандардним условима у виваријуму Цента за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. За време трајања експеримента, експерименталне животиње су имале слободан приступ храни и води (лат. *ad libitum*). У појединачним експериментима коришћени су мишеви приближне телесне тежине.

Спроведено истраживање одобрено је од стране Етичке комисије за експерименталне животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број 01-2759/4 од 19.03.2014. године.

##### 3.1.1 Методологија добијања LGALS3<sup>-/-</sup> мишева

У циљу добијања *knock-out* мишева, који имају један или више нефункционалних гена, користи се метода хомологе рекомбинације. Генетска рекомбинација којом се замењују генетске секвенце између два слична или идентична молекула дезоксирибонуклеинске киселине назива се хомолога рекомбинација (298). Овим поступком могуће је функционални ген заменити некодирајућим геном, чиме се у потпуности елиминише функција постојећег гена. Поступак стварања *knock-out* мишева, укључујући и мишеве којима је циљано уклоњен ген за галектин-3, заснива се на методи хомологе рекомбинације.

Селекција ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација полазна је тачка у добијању *knock-out* мишева. Фрагмент DNA са мутираним или искљученим геном се

најпре уграђује у вектор који садржи додатне гене за контролу рекомбинације: ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) и ген за тимидин киназу (*TK* ген) (298, 299). Вектор је тако конструисан да се при хомологој рекомбинацији *Neo* ген увек инкорпорира у хромозомалну DNA док се *TK* ген губи. Овако добијени вектор се убацује у културу ћелија чији медијум садржи неомицин као и ганцикловир или FIAU (енгл. *1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil*) који се под утицајем тимидин киназе метаболише у летални продукт. Ћелије у којима је дошло до случајне интеграције вектора у геном резистентне су на неомицин, али су осетљиве на присуство ганцикловира или FIAU. Супротно, ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација резистентне су како на неомицин тако и на ганцикловир или FIAU, јер се у њима *TK* ген не инкорпорира у геном. Ова селекција омогућава одабир само преживелих ћелија које носе хомологе рекомбинације (298, 299).

Мишији ген за галектин-3 састоји се од 6 егзона. Егзони 2 и 3 кодирају аминокотерминални крај галектин-3 молекула, док егзони 4 и 6 кодирају карбокси терминални крај, који садржи домен за препознавање угљених хидрата (300). У лабораторији др *Hsu*-а (*University of California*) са циљем добијања *LGALS3<sup>-/-</sup>* мишева направљен је прекид гена за галектин-3 на нивоу ембрионалних матичних ћелија (301). Вектор је конструисан тако да садржи фрагмент клониране DNA за галектин-3. Поступак за добијање *LGALS3<sup>-/-</sup>* мишева подразумева прекид генске секвенце која кодира домен за препознавање угљених хидрата. Тачније, кратак сегмент кога чине интрон-4-егзон 5 је замењен геном за резистенцију на неомицин. Сегмент од егзона-4 до егзона-5 мишијег гена за галектин-3 је уграђену *Poly(A)* вектор (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) на горњем крају у близини промотера за тимидин киназу-*Neo* касете. Други сегмент од егзона-5 до егзона-6 је уграђен низводно од *Neo* касете, док је сегмент на споју интрона-4 и егзона-5 прекинут *Neo* геном (301).

У мишије матичне ћелије (B3) је уграђен циљни вектор, а хомолога рекомбинација у трансфектованим ћелијама резистентним на аминокотозидни антибиотик, генетицин (G418) је детектована помоћу две технике: PCR (енгл. *Polimerase Chain Reaction*) и *Southern blot* техником. Провером 894 клонова ембрионалних матичних ћелија

идентификована су само 2 клона, 4A2 и 9A4, у којима се десила хомолога рекомбинација. Један од добијених клонова ембрионалних матичних ћелија у коме се десила хомолога рекомбинација је најпре пропагиран, а затим су добијене ћелије убризгане у 3,5 дана старе бластоцисте C57Bl/6 мишева, које су потом имплантиране у лажно гравидне женке соја CD1 (сурогат мајке).

На овакав начин добијени химерични мужјаци, укрштани су са C57Bl/6 женкама и добијени су хетерозиготи LGALS3<sup>+/-</sup> мишеви. Имбредним укрштањем ових мишева, након 9 генерација добијени су хомозиготни, *knock-out* мишеви, генетски дефицијентни у експресији галектин-3 молекула (LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви) (301).

Као што је било за очекивати, анализом различитих ткива (јетра, мозак, плућа, лимфни чворови, слезина, тимус...) показано је да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви не експримирају галектин-3. Хистолошком анализом различитих ткива и органа, изолованих из добијених LGALS3<sup>-/-</sup> мишева нису уочене било какве видљиве промене. Није постојала разлика у телесној тежини као и тежини различитих органа, као ни у броју ћелија у периферној крви и биохемијском профилу између LGALS3<sup>+/+</sup> и LGALS3<sup>-/-</sup> мишева. Укупан број лимфоцита као и однос CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ћелија у тимусу, слезини и лимфним чворовима није се разликовао између два генотипа мишева (301).

### 3.2. ИНДУКЦИЈА ГОЈАЗНОСТИ ПРИМЕНОМ ДИЈЕТЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ

Гојазност и тип 2 *Diabetes mellitus-a* индуковани су применом дијете са високим садржајем масти (енгл. *High-fat diet*, HFD, 60% kcal из масти, *Mucedola, Milano, Italy*) у трајању од 12 и 24 недеље, почев од 8 недеље старости. Контролна група животиња је стављена на стандардну исхрану (енгл. *Standard-fat diet*, SFD, 10% kcal из масти, *Mucedola, Milano, Italy*). За време трајања експеримента, животиње су имале слободан приступ храни и води.

Након 12 недеља специјалног режима исхране, животиње су жртвоване у атмосфери zasiћеној диетилетром (*BETAHEM, Београд, Србија*). Након жртвовања изоловани су јетра, висцерално масно ткиво и ћелије костне сржи за даљу анализу. Пункцијом абдоминалне аорте, скупљена је крв хепаринизираним шприцем. Након центрифугирања (20 минута на 3000 rpm) издвојена је плазма која је замрзнута на  $-20^{\circ}\text{C}$  за даљу анализу. Из талога су изоловани леукоцити периферне крви који су коришћени за даљу анализу. Свим експерименталним животињама је након тога изоловано дебело црево које смо користили за даљу анализу.

Након 24 недеље специјалног режима исхране, животиње су жртвоване и изоловани су јетра и висцерално масно ткиво из перигонадалних депоа за даљу анализу. Пункцијом абдоминалне аорте, сакупљена је крв. Након коагулације, 30 минута на собној температури, серум је издвојен центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнут на  $-20^{\circ}\text{C}$  за даљу анализу.

Са циљем да се испита улога IL-33/ST2 сигналног пута у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре, након 10 недеља специјалног режима исхране део мишевима је примио рекомбинантни IL-33 (*eBioscience, San Diego, CA, USA*) интраперитонеално у пет доза (0,5µg/мишу) сваког другог дана. Након 12 недеља специјалног режима исхране и апликације IL-33, животиње су жртвоване и изоловани су јетра и висцерално масно ткиво за даљу анализу.

### 3.3. ПРАЋЕЊЕ МЕТАБОЛИЧКИХ ПАРАМЕТАРА РАЗВОЈА БОЛЕСТИ

Сваке четврте недеље, од почетка експеримента, мерено је увећање телесне тежине мерењем сваког појединачног миша као и мерење вредности глукозе у пуној крви. Крв за анализу добијена је пункцијом репне вене након 4h гладовања. Кап крви је наношена на тест траку за мерење гликемије (*Accu-Chek Performa Test Strips, Roche, Germany*), а потом је вредност гликемије очитавана на глукомеру (*Accu-Chek Performa, Roche, Germany*) за сваког миша појединачно.

Концентрација секретованог инсулина наше одређивана је након 4h гладовања уз помоћ ELISA теста (*Alpco, Salem, NH, USA*) према упутству произвођача. На основу измерених вредности гликемије наше и инсулинемије у време жртвовања животиња израчунате су вредности НОМА-IR (енгл. *Homeostasis model assessment of insulin resistance*) индекса за сваког миша појединачно на основу следеће формуле:

$$\text{НОМА-IR} = (\text{концентрација инсулина наше (mU/ml)} \times \text{гликемија наше (mmol/l)})/22,5$$

Серумске концентрације липида (триглицерида и укупног холестерола као и серумска активност трансаминаза (АСТ и АЛТ) мерени су за сваког миша појединачно, употребом *Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan)*.

### 3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У ХОМОГЕНАТУ ТКИВА ЈЕТРЕ И СЕРУМУ

Део левог режња изоловане јетре (100 mg) механички је хомогенизован у 0,5 ml PBS-а (енгл. *Phosphate Buffered Saline*) (Ph=7,2). Супернатант је издвојен центрифугирањем (10 минута на 4000 rpm) и замрзнут на -20°C за даљу анализу.

Нивои цитокина, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-33, IL-10 и TGF- $\beta$  у супернатанту хомогенизованог ткива јетре и серуму мерени су коришћењем комерцијалних ELISA китова специфичних за мишије цитокине (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*).

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у, тако да почетна концентрација буде 1000 pg/ml за IL-6, IL-17 и IL-33; 2000 pg/ml за IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 и TGF- $\beta$  и 4000 pg/ml за IL-13. Од припремљених штокова стандарда направљена су серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу ((енгл. *Reagent Diluent*, PBS са 1%-тним BSA (енгл. *Bovine Serum Albumin*, BSA)) у циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве, према којој ће бити израчунате концентрације мерених цитокина.

У бунарчиће микротитар плоча (енгл. *Microtiter plate*) са 96 бунара са равним дном (*Sarsted, Germany*) сипано је по 100  $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*). 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*). Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (енгл. *Block Buffer*, PBS са 1%-тним BSA) финалног волумена 300  $\mu$ l и плоче су остављене један сат на собној температури, након чега су опране пуфером за испирање.

Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плоч, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања микротитар плоча, у све бунарчиће је додато 100  $\mu$ l радне концентрације антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*). Плоче су обложене адхезивном фолијом и поново

остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране и у бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури без директног излагања сунчевој светлости прекинута је након 20 минута, испирањем микротитар плоча. Затим је у бунарчиће сипано 100  $\mu$ l раствореног супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у размери 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50  $\mu$ l стоп раствора (енгл. *Stop solution: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*) и прочитана је оптичка густина на 450nm, на *Microplate reader*-у (*Zenyth 3100 Mylti-Mode-Detektor, Anthos, Austria*).

Све вредности су умањене за вредности абсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). Стандардна крива направљена на основу измерених вредности стандарда коришћена је за израчунавање вредности за сваки појединачни узорак. Мерење свих узорака урађено је у трипликату.

### **3.5. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈЕ ЋЕЛИЈА ВИСЦЕРАЛНОГ АДИПОЗНОГ ТКИВА, ЈЕТРЕ, КОСТНЕ СРЖИ И ПЕРИФЕРНЕ КРВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНЕ ЦИТОМЕТРИЈЕ**

Све мишеве којима су изоловане моноклеарне ћелије из висцералног адипозног ткива и јетре жртвовани су у атмосфери засићеној диетилетром након 24 недење специјалног режима исхран. Мишеви који су коришћени за изолацију ћелија периферне крви и костне сржи жртвовани су у атмосфери засићеној диетилетром након 12 недења специјалног режима исхран. Моноклеарне ћелије су изоловане из висцералног адипозног ткива и јетре, ћелије костне сржи и периферне крви потом су анализирани методом проточне цитометрије. Анализирана је процентуална заступљеност, апсолутни број, фенотипске и функционалне карактеристике различитих популација ћелија.



### 3.5.1. Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива

Тотално висцерално адипозно ткиво је изоловано из перитонеалне шупљине екцизијом из пери-епидидималних и пери-реналних депоа. Изоловано ткиво је уз 3 ml PBS-а уситњено маказицама а потом додатно опрано у истом волумену. Након испирања, ткиво је пребачено у епрувету од 50 ml и додато је 4 ml раствора за дигестију: 1 mg/ml колагеназе тип 2 (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у RPMI-1640 медијуму са 2% BSA (*Sigma Aldrich*). Ткиво је дигестирано у трајању од 1h на 37°C у воденом купатилу уз константно мешање у шејкеру на 100 rpm, а затим пропуштено кроз ћелијско сито величине 40  $\mu\text{m}$  (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Добијена ћелијска суспензија је центрифугирана (5 минута 1800 rpm), након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Lysis buffer*) и инкубиране 3 минута на 37°C. Пуфер за лизирање је потом неутрализован са 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*). Ћелије су потом центрифугиране (10 минута 1400 rpm) и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након другог прања, ћелије су ресуспендоване у 500  $\mu\text{l}$  RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

### 3.5.2. Изолација моноклеарних ћелија из јетре

За изолацију моноклеара из јетре коришћена је метода механичке разградње јетре. Након изолације јетре, уклонили смо жучну кесу и урадили перфузију ткива јетре кроз *v.portae* апликавањем 7 ml PBS-а. Јетру смо затим уситнили маказицама и нежно је здробили кроз челичну мрежу 200  $\mu\text{m}$ , користећи „полугу“ шприца. Потом смо добијену суспензију пропустили кроз ћелијско сито величине 70  $\mu\text{m}$  (*Cell strainer, BD Pharmigen, USA*) и добијени садржај ресуспендовали у 15 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а и два пута центрифугирали на 507 rpm 1 минут на собној температури, без наглог кочења центрифуге (енгл. *with off break settings*). Супернатант који је садржао непаренхимске интрахепатичне ћелије, пребацили смо у нову епрувету и центрифугирали на 1433 rpm 8 минута, на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енгл. *with high*

*break settings*). Добијени талог ресуспендовали смо у 10 ml 37.5% перколу (*Percoll, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у HBSS (енгл. *Hank's Balanced Salt Solution, HBSS*) медијуму који је садржао 100 U јединица по ml, и онда центрифугирали на 1907 rpm 30 минута на собној температури без наглог заустављања центрифуге. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Lysis buffer*) и инкубиране 5 минута на +4°C. Након инкубације пуфер за лизирање је неутрализован са 5 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а (енгл. *Fetal bovine serum*). Ћелије су потом центрифугиране (10 минута 1400 rpm) са активираним опцијом наглог кочења и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након другог прања, ћелије су ресуспендоване у 1ml RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

### 3.5.3. Изолација ћелија из костне сржи

Ћелије костне сржи изоловане су из два фемура по мишу. Након одстрањивања фемура, очишћен је вишак мишића и урађена је перфузија коштаног канала коришћењем шприца (RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а) и игле (26g). Добијена суспензија ћелија је провучена кроз шприц и иглу (19g) два пута са циљем да се ћелије костне сржи што више раздвоје. Ћелије су потом центрифугиране (5 минута 1500 rpm) са активираним опцијом наглог кочења и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера за лизирање еритроцита и инкубиране 5 минута на собној температури. Након инкубације пуфер за лизирање је неутрализован са 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а. Ћелије су потом центрифугиране (5 минута 1200 rpm) са активираним опцијом наглог кочења и два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. Након другог прања, ћелије су ресуспендоване у 2 ml RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

### 3.5.4. Изолација ћелија из периферне крви

Након пунктирања абдоминалне аорте изоловали смо 300  $\mu$ l крви коришћењем шприца који је претходно обложен хепарином. Крв је потом центрифугирана (10 минута на 3000 rpm) са активираним опцијом наглог кочења. Након тога покупили смо плазму и горњу трећину талога која садржи леукоците периферне крви (енгл. *buffy coat*) и пренели у нову епрувету од 15 ml. Ћелије су потом центрифугиране (10 минута 4000 rpm) са активираним опцијом наглог кочења. Плазма је издвојена и замрзнута на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера за лизирање еритроцита и инкубиране 4 минута на собној температури уз стално мешање. Након инкубације пуфер за лизирање је неутрализован са 2 ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а и садржај је центрифугиран 8 минута на 1500 rpm. Након тога ћелије су два пута опране у 4 ml RPMI медијума са 10% FBS-а. После другог прања ћелије су пропуштене кроз ћелијско сито величине 70  $\mu\text{m}$  (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Ћелије су потом центрифугиране (5 минута 1500 rpm) са активираним опцијом наглог кочења ресуспендоване у 1 ml RPMI медијума са 10% FBS-а и избројане.

### 3.6. ФЕНОТИПСКА И ФУНКЦИОНАЛНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИЗОЛОВАНИХ ЋЕЛИЈА

У циљу дефинисања фенотипских и функционалних карактеристика различитих субпопулација моноклеарних ћелија изолованих из висцералног адипозног ткива и јетре, ћелија изолованих из костне сржи и периферне крви, коришћена су анти-мишија моноклонска антитела специфична за различите површинске и интрацелуларне молекуле. За сваку анализу коришћено је  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu$ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer, BD Biosciences*). Ћелијама је додата одговарајућа количина обележених моноклонских антитела или одговарајућих изотипских контрола (Табела 1).

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
<i>PE Anti mouse F4/80</i>	CI:A3-1	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse CD11b</i>	M1/70	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse CD11c</i>	N418	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse CD3</i>	145-2C11	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse CXCR3</i>	CXCR3-173	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse NK1.1</i>	PK136	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse CCR7</i>	4B12	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse CD8</i>	eBioH35-17.2	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD4</i>	RM4-5	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse F4/80</i>	BM8	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse IL-1<math>\beta</math></i>	166931	<i>R&amp;D Systems, Minneapolis, MN, USA</i>
<i>PE Anti mouse IL-13</i>	eBio13A	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD206</i>	15-II	<i>Biolegend, San Diego, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse MHC II</i>	14-4-4S	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse B220</i>	RA3-6B2	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD11c</i>	N418	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD8a</i>	53-6.7	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse CD80</i>	16-10A1	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse CD86</i>	GL1	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse Ly6C</i>	RB6-8C5	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse Ly6G</i>	1A8	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse ST2</i>	245707	<i>R&amp;D Systems, Minneapolis, MN, USA</i>
<i>APC Anti mouse CD45</i>	30-F11	<i>Invitrogen, Carlsbad, CA, USA</i>
<i>PE Anti mouse Isotype control</i>	eBR2a	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>Per CP Anti mouse Isotype control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>
<i>APC Anti mouse Isotype control</i>	A95-1	<i>eBiosciences, San Diego, CA, USA</i>
<i>FITC Anti mouse Isotype control</i>	R35-95	<i>BD Biosciences, San Jose, CA, USA</i>

Табела 1. Моноклонска антителиа и изотипске контроле коришћене у проточној цитометрији

### 3.6.1. Бојење мембранских маркера

Моноклонска антителиа која су коришћена за површинско бојење била су у таквим концентрацијама да њихово финално разблажење у суспензији буде 1:200. У 50  $\mu$ l претходно растворених антителиа додато је  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50  $\mu$ l пуфера за бојење. Након краткотрајног вортексовања узорци су инкубирани 20 минута на температури од +4°C у одсуству светлости. По истеку инкубације, додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење и центрифугирањем 5 минута на 1400 rpm, ћелије су опране. Након прања, супернатант је одливен, а ћелије су ресуспендоване у 350  $\mu$ l пуфера за бојење. Након завршеног бојења мембранских маркера ћелије су анализиране на

проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). За све цитометријске анализе коришћен је регион (енгл. *Gate*) моноклеарних ћелија у *FSC/SSC* (енгл. *Forward scattered light/Side-scattered light*) плоту. Током сваке цитометријске анализе, регистровано је најмање 30000 догађаја. Подаци су анализирани помоћ *FlowJo* (*Tree star*) софтвера.

### 3.6.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина

Бојење интрацелуларних молекула и цитокина изведено је по протоколу *BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>* методе. За стимулацију ћелија коришћени су форбол миристат ацетат (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, *PMA*; *Sigma Aldrich*) и јономицин (енгл. *ionomycin*, *Sigma Aldrich*) (302). Поменути стимулатори покрећу активност протеин киназе *C* (енгл. *Protein Kinase C*, *PKC*) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује повећану експресију интрацелуларних молекула и цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима. Оптимално трајање стимулације за већину цитокина износи од 4 до 6 часова, обзиром да дужа инкубација може бити удружена са испољавањем цитотоксичних ефеката поменутих стимулатора.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStop<sup>TM</sup>* *BD* (садржи моненсин) и *GolgyPlug<sup>TM</sup>* (садржи брефелдин А). Поменути инхибиторима блокира се интрацелуларни транспорт и повећава акумулација већине цитокина у ендоплазматском ретикулуку и Голџи комплексу, што повећава могућност детекције ћелија које продукују одређене цитокине. Ћелије су инкубирани 6 часова, обзиром да моненсин и брефелдин испољавају дозно и временски зависан цитотоксичан ефекат, па се излагање ћелија овим агенсима мора ограничити. Инкубације дуже од 12 часова су цитотоксичне.

Након истека времена предвиђеног за активацију, ћелије ( $5 \times 10^5$ ) су центрифугиране 5 минута на 1400 *rpm* и ресуспендоване у пуферу за бојење. Потом је уследило бојење мембранских маркера према претходно описаној процедури. Ћелије су инкубирани са моноклонским антителима специфичним за површинске маркере 20 минута на температури од +4°C у одсуству светлости. После истека инкубације. Ћелије су опране у

2 ml хладног пуфера за бојење 5 минута на 1400 rpm. Ћелије су потом фиксиране и пермеабелизоване коришћењем 250  $\mu$ l раствора за фиксацију и пермеабелизацију (енгл. *Fixation/Permeabilisation solution*, *BD Biosciences*) у трајању 20 минута на +4°C. Претходно и пошто је додат раствор за фиксацију и пермеабелизацију сви узорци су добро вортексовани. Након истека инкубације, ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију (енгл. *Perm/Wash<sup>TM</sup>*, *BD Biosciences*) 5 минута на 1400 rpm. Посто је супернатант одливан, на ћелије су додата антитета за интрацелуларно бојење цитокина растворена у 10%-ном пуферу за пермеабелизацију и инкубирана 30 минута на +4°C. Примарно коњуговано анти мишије антители за IL-13 примењено је да тако да финално разблажење буде 1:100. Примарна коњугована анти-мишија антитета за NLRP3 и IL-1 $\beta$  примењена су у финалној концентрацији 1:200. Након истека инкубације ћелије су опране у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију 5 минута на 1400 rpm. Након испирања у 2 ml 10%-ног пуфера за пермеабелизацију 5 минута на 1400 rpm, ћелије су ресуспендоване у 350  $\mu$ l пуфера за бојење. Непосредно након завршеног бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences*).

### 3.7. ХИСТОПАТОЛОШКА АНАЛИЗА ТКИВА ЈЕТРЕ

За хистопатолошку анализу су коришћени формалином фиксирани и парафином укалупљени (енгл. *Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded*, FFPE) исечци ткива јетре. Од парафинских калупа направљени су пресеци дебљине 5  $\mu\text{m}$  који су бојени хематоксилином и еозином за процену стеатозе и инфилтрације у јетри. За визуелизацију колагена у ткиву јетре коришћена су два бојења: *Sirius red* бојење, које колаген боји црвено и трихромно бојење по *Masson*-у, које колаген боји плаво. За детекцију липида коришћени су криостатски исечци ткива јетре и *Oil-Red O* бојење које липиде боји црвено.

#### 3.7.1. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци који су претходно загрејани у термостату на  $+56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 45 минута су потопљени у ксилолу са циљем да се уклони парафин. Затим је урађен поступак рехидратације ткива испирањем у падајућим концентрацијама алкохола: 2 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 најпре дестилованом а потом и текућом водом 5 минута. Затим су препарати бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich*) 2 минута. Након истека времена урађен је поступак дехидратације и просветљивања препарата. За процес дехидратације сада 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 бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

### 3.7.2. Бојење липида *Oil-red O* методом

Бојење липида на криостатским исечцима ткива јетре миша урађено је *Oil-Red O* методом. Исечци дебљине 5  $\mu\text{m}$  исечени на криотому остављени су да се осуше 30 до 60 минута на собној температури, а потом су фиксирани у 10% формалину 10 минута. Потом су препарати поново осушени на собној температури и затим пажљиво опрани прво у дестилованој а потом и текућој води. Након тога су препарати опрани у 60% изопропронолу (*Isoprpanol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) и бојени 15 минута у свеже припремљеном 0,5% *Oil-red O* раствору (енгл. *Oil-red O working solution, Sigma Aldrich*). Након бојења препарати су опрани у 60% изопропронолу и обојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich*) 30 секунди, а затим су испрани текућом водом 3 минута. Препарати су покривени глицеролом и покровним стаклима, остављени да се осуше а потом анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

### 3.7.3. Бојење колагена *Sirius red* методом

Парафински исечци ткива јетре на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, испирањем у падајућим концентрацијама алкохола, као што је претходно описано, коришћени су за бојење колагена. Препарати су најпре бојени свеже припремљеним раствором *Weigert*-овог хематоксилина (*Weigert's hematoxylin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 8 минута, а затим интензивно опрани најпре 10 минута у текућој а потом и у дестилованој води. Радни раствор *Weigert*-овог хематоксилина добијен је мешањем једнаке количине раствора А и раствора Б (енгл. *Weigert's Iron hematoxylin Set (Solution A & B), Sigma Aldrich*). Након прања у текућој води препарати су бојени *Picro-Sirius red* раствором не краће од 1 сата. Радни раствор *Picro-Sirius red* за бојење добијен је мешањем 0,5 g *Sirius red* боје (енгл. *Direct Red 80, Sigma Aldrich*) и 500 ml засићеног раствора пикричне киселине (енгл. *Picric acid Solution, Sigma Aldrich*). Након бојења препарати су два пута по 5 минута опрани у 0,005% воденом раствору глацијалне сирћетне киселине (*Centrohem, Србија*). Након прања урађен је поступак дехидратације, у три измене апсолутног алкохола и просветљивања препарата, 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem,*



Србија) и прекривени су покровним стаклима. Крајњи резултат бојења су црвено пребојена колагена влакна и жуто пребојена позадина док се једра боје смеђе до браон. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

#### 3.7.4. Бојење колагена трихромном методом по *Masson*-у

Парафински исечци ткива јетре на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, као што је претходно описано, коришћени су за бојење колагена овом методом. Препарати су најпре фиксирани 15 минута у претходно загрејаном на 56°C *Буеновом* раствору (енгл. *Bouins solution, Sigma Aldrich*). Након фиксације препарати су опрани у текућој води и бојени свеже припремљеним раствором *Weigert*-овог хематоксилина као што је претходно описано. Препарати су затим интензивно опрани најпре 10 минута у текућој, а потом и у дестилованој води. Препарати су затим бојени 10 минута киселим фуксином (енгл. *Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, Sigma Aldrich*) и опрани у дестилованој води. Потом су препарати диферентовани у раствору који је добијен мешањем једнаких количина 5%-раствора фосфо-молибденске (енгл. *Phosphomolybdic acid, Sigma Aldrich*) и фосфо-тунгстичне киселине (енгл. *Phosphotungstic acid, Sigma Aldrich*) 5 до 10 минута. Затим се препарати, директно без претходног прања, боје 5 минута раствором плавог анилина (енгл. *Aniline blue Solution, Sigma Aldrich*). Након прања у дестилованој води препарати се диферентују у 1%-ом раствору сирћетне киселине од 2 до 5 минута. Након прања, урађен је поступак дехидратације, у две измене по 5 минута, прво 96%-им а затим и апсолутним алкохолом, након чега је уследило просветљивања препарата 5 минута у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и прекривени су покровним стаклима. Крајњи резултат бојења су плаво пребојена колагена влакна, црвено пребојена цитоплазма, док се једра боје црно. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани и усликани на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).

### 3.7.5. Квантификација и скорирање

Када је NAFLD у питању, тренутно постоје два патохистолошка система бодовања која су у широј употреби. Ми смо се одлучили за коришћење система скорирања и квантификације који је предложен 2005. године од стране *Kleiner*-а и сарадника. Скорирање је урађено за сваку појединачну хистолошку карактеристику и то: стеатозу, балонирање хепатоцита, лобуларну инфилтрацију и фиброзу. Степен стеатозе се процењује семиквантитативно, паренхим ацинуса се дели на трећине, па се процењује проценат паренхима који је захваћен процесом; 0: до 5% (нормално); 1: 5-33% (блага стеатоза); 2: 34-66% (умерена стеатоза) или 3: >66% (изражена стеатоза). Балонирање хепатоцита повезано је са прогресијом болести и једна је од најважнијих патохистолошких карактеристика стеатохепатитиса. Скорирање балонираних хепатоцита је урађено на следећи начин: 0: нема балонираних хепатоцита; 1: присутно неколико балонираних хепатоцита; 2: присуство балонираних хепатоцита изражено. Лобуларни инфилтрат састоји се од мононуклеарних ћелија и обично је благог степена, док је присуство израженијег инфилтрата у корелацији са тежим обликом и прогресијом болести. Скорирање лобуларног инфилтрата је урађено на следећи начин: 0: нема инфилтрације; 1: мање од 2 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута; 2 до 4 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута; 3: више од 4 фокуса инфилтрације у видном пољу, увећање 20 пута. Иако присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза стеатохепатитиса, њено присуство указује на могућност настанка компликација и тежу форму болести. Скорирање фиброзе је урађено на следећи начин: 0: нема присутне фиброзе; 1: присутна перисинусоидална фиброза; 2: присутна перипортална фиброза; 3: присутна фиброза између перипорталних простора („*bridging*“ фиброза); 4: присутна цироза. Предложени систем скорирања налази се у табели 2. Додатно је квантификација урађена коришћењем комерцијалног програма *ImageJ* којим је израчунат проценат паренхима који је захваћен стеатозом и фиброзом.

NAFLD СКОР СИСТЕМ	
<b>СТЕАТОЗА</b>	0: <5% паренхима 1: 5-33% паренхима 2: 34-66% паренхима 3: >66% паренхима
<b>БАЛОНИРАЊЕ ХЕРАТОЦИТА</b>	0: није присутно 1: присутно неколико 2: изражено
<b>ЛОБУЛАРНА ИНФИЛТРАЦИЈА</b>	0: није присутно 1: <2 фокуса (увеличање x20) 2: 2-4 фокуса (увеличање x20) 3: >4 фокуса (увеличање x20)
<b>ФИБРОЗА</b>	0: нема фиброзе 1: присутна перисинусоидална фиброза 2: присутна перипортална фиброза 3: постоји „bridging“ фиброза 4: цироза

**Табела 2. Скор систем коришћен за квантификацију NAFLD.**  
(Кориговано према: *Kleiner DE. et al. Hepatology 2005; 41:1313-21.*)

### 3.8. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака јетре урађено је коришћењем *Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK)* за бојење CD68 и  $\alpha$ -SMA и *Rabbit Specific HRP/AEC Detection IHC Kit (Abcam)* за бојење Gal-3 и IL-33, према препорученом протоколу.

Парафински исечци ткива јетре дебљине 5  $\mu$ m на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива, као што је претходно описано, коришћени су за имунохистохемијско бојење. Након завршеног поступка депарафинизације ткивни исечци 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-a* са циљем да се инактивише 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-a* који је после 10 минута инкубације испран једном у PBS-у. На ткивне исечке су потом додато 150  $\mu$ l примарног антитела (у разблажењу 1:200): мишијег анти-мишијег CD68 (*Abcam*), мишијег анти-мишијег  $\alpha$ -SMA (*Abcam*), зечијег анти-мишијег Gal-3 (*Abcam*) и зечијег анти-мишијег IL-33 (*Santa Cruz Biotechnology, USA*). Сва примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA. Након инкубације са примарним антителима 1h у влажној комори на собној температури, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у са 0,005% Tween-a (*Tween-20, Sigma Aldrich*). Затим је на ткивне исечке на којима смо бојили CD68 и  $\alpha$ -SMA, инкубирани 30 минута на собној температури у присуству биотинизираниог козјег анти-мишијег антитела (енгл. *Biotinylated goat anti mouse IgG*). Након инкубације, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у са 0,005% Tween-a. Затим је на ткивне исечке апликована *Streptavidin Peroxidase-a* која је инкубирана 10 минута на собној температуре. Након испирања 3 пута по 5 минута у PBS-у, апликовано је 2-3 капи DAB реагенса претходно добијеног додавањем 20  $\mu$ l DAB Chromagen-a у 1ml DAB Substrate-a. После истека 6 минута, време које је било потребно да се боја развије, препарати су испрани три пута у дестилованој води. На препарате на којима су бојени Gal-3 и IL-33 је након инкубације примарног

антитела и испирања додато 2-3 капи секундарног HRP- конјугованог анти-зечијег антитела (*Rabbit Specific HRP conjugate*) које је инкубирано 30 минута на собној температури. Након инкубације, препарати су опрани 3 пута по 5 минута у PBS-у са 0,005% Tween-а и на препарате је додато субстрат (*AEC Single Solution*). После истека 10 минута, време које је било потребно да се боја развије, препарати су испрани три пута у дестилованој води.

Након испирања, ткивни исечци су бојени хематоксилином 2 минута, а затим интензивно опрани текућом водом. Обојени исечци су покривени са једном капи глицерола (CD68 и  $\alpha$ -SMA) или воденим медијумом за покривање (Gal-3 и IL-33) и покровном луспицом. Након сушења у трајању од 48h, интензитет и дистрибуција бојења су анализирани и усликани помоћу светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*). Број позитивних ћелија израчунали смо након бројања 10 различитих поља, користећи програм *ImageJ*.

### 3.9. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА У ТКИВУ ЈЕТРЕ МЕТОДОМ КВАНТИТАТИВНЕ ЛАНЧАНЕ РЕАКЦИЈЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ

#### 3.9.1. Изолација RNA из ткива јетре миша

Изолација укупне рибонуклеопротеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid, RNA*) из ткива јетре миша урађена је употребом тризол реагенса, који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата, а којим се разграђује биолошки материјал и денатуришу протеини.

Део изолованог ткива јетре миша (100 mg) је најпре исецкан маказицама, а потом потпуно механички хомогенизован у 1 ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA*) помоћу ручног хомогенизатора. Хомогенат је потом пребачен у нове епрувете величине 1,5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) инкубирани 5 минута на собној температури, а потом центрифугиран 10 минута на 12000 rpm на +4°C. У следећем кораку на супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane, BCP, Sigma Aldrich*), узорци су потом добро вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 20 минута на 12000rpm на +4°C. Након центрифугирања јасно се раздвајају три слоја, горњи провидни слој, у којем се налази RNA, доњи у којем се налазе протеини и прстен DNA који се налази између њих. Горњи провидни слој је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 µl расхлађеног изоприл алкохола чиме је урађена преципитација RNA. Узорци су благо промешани, инкубирани 15 минута на собној температури и потом центрифугирани 8 минута на 12000 rpm 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 (енгл. *Nuclease free wather, Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност RNA одређена је спектрофотометријски мерењем абсорбанце на 260/280 nm коришћењем апарата *Eppendorf® Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany)*.

### 3.9.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA

Реверзна транскрипција представља процес у коме се једноланчана RNA преписује у комплементарну DNA (енгл. *Complementary DNA*, cDNA). Процес реверзне транскрипције урађен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), према упутству произвођача. Препис је урађен по следећој процедури: 10  $\mu$ l узорка који садржи 2  $\mu$ g укупне RNA изоловане из јетре инкубиран је са 10  $\mu$ l мастер микса.

Мастер микс је направљен на леду и садржао је: 2  $\mu$ l пуфера (*RT Buffer*), 0,8  $\mu$ l dNTP Mix-a, 2  $\mu$ l хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1  $\mu$ l реверзне транскриптазе (*Multi Scribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase*) и 3,2  $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе (*Nuclease-free H<sub>2</sub>O*). У епрувете које су садржале RNA 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.

### 3.9.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија 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 20  $\mu$ l реакционе смеше по комори, садржао је: 2  $\mu$ l узорка cDNA, 10  $\mu$ l мастер микса (*Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems*), 2  $\mu$ l смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и „reverse“) и 6  $\mu$ l воде која не садржи нуклеазе. Финалне концентрације прајмера претходно су оптимизоване за сваки ген. 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 на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Затим су са циљем одређивања специфичности и идентитета PCR продукта подешени услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Есеј је рађен у дупликату за сваки узорак. Прајмери за коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у табели (Табела 3).

	<b>Sense (5' to 3')</b>	<b>Antiense (5' to 3')</b>
Procol.α1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
α-SMA	ACTGGGACGACATGGAAAAG	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
CD11c	ATGGAGCCTCAAGACAGGAC	GGATCTGGGATGCTGAAATC
F4/80	TGCATCTAGCAATGGACAGC	GCCTTCTGGATCCATTTGAA
CCL2	CAGGTCCCTGTCATGCTTCT	GTCAGCACAGACCTCTCTCT
NLRP3	AGCCTTCCAGGATCCTCTTC	CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC
Caspase 1	AGATGGCACATTTCCAGGAC	GATCCTCCAGCAGCAACTTC
IL-1β	TCTTTGAAGTTGACGGACCC	TGAGTGATACTGCCTGCCTG
IL-6	TCCATCCAGTTGCCTTCTTG	TTCCACGATTTCCCAGAGAAC
TNF-α	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
TLR4	CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG	ACACTACCACAATAACCTTCCGGCTC
CD14	AGGGTACAGCTGCAAGGACT	CTTCAGCCCAGTGAAAGACA
Nox2	CGGTGTGCAGTGCTATCATC	GCTCTCCTTTCTCAGGGGTT
P22phox	CCTGCSGCGATAGAGTAGGC	TCATGGGGCAGATCGAGT
P47phox	ATGACCTCAATGGCTTACC	CTATCTGGAGCCCCTTGACA
P67phox	CTATCAGCTGGTCCCACGA	GCAGTGGCCTACTTCCAGAG
IL-33	TCCTTGCTTGGCAGTATCCA	TGCTCAATGTGTCAACAGACG
ST2	GCAATTCTGACACTTCCCATG	ACGATTTACTGCCCTCCGTA
IL-13	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
TGF-β	ATACAGGGCTTTCGATTCAGC	GTCCAGGCTCCAAATATAGG
ChREBP	CTGGGGACCTAAACAGGAGC	GAAGCCACCCTATAGCTCCC
LXR-α	ATCGCCTTGCTGAAGACCTCTG	GATGGGGTTGATGAACTCCACC
LXR-β	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT	TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT
CREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGGAAGTCACTGT
PPAR-γ	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA	GAGGGTGTTAGAAGGTTCTTCATGA



Abca-1	CGCAGTGACCAGAAAACAATGTG	TATCAATGAGGCAAGGGTGTGG
Cd36	TCCAGCCAATGCCTTTGC	TGGAGATTACTTTTTTCAGTGCAGAA
FAS	AGAGATCCCGAGACGCTTCT	GCCTGGTAGGCATTCTGTAGT
CPT1	AACCCAGTGCCTTAACGATG	GAACTGGTGGCCAATGAGAT
DAGT1	ACCGCGAGTTCTACAGAGATTGGT	ACAGCTGCATTGCCATAGTTCCT
DAGT2	AGCTGGTGAAGACACACAACC	TGATGATAGCATTGCCACTCC
$\beta$ -actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT

**Табела 3. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.**

Компаративном  $C_T$  (енгл. *Cycle threshold*,  $C_T$ ) методом ( $\Delta\Delta C_T$ ) одређује се релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле. Ниво експресије анализираних гена нормализован је у односу на ниво експресије гена за  $\beta$ -актин као референтног гена детектованог у идентичном узорку. Као калибратор изабран је један узорак из контролне групе који је био најприближнији средњој вредности свих узорака контролне групе. Коначан резултат израчуан је у релативним јединицама као N-пута (енгл. *Fold change*) у односу на калибратор према следећој једначини.

$$N_{\text{узорка}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T_{\text{узорка}} - \Delta C_T_{\text{калибратора}}$$

$$\Delta C_T_{\text{узорка}} = C_T_{\text{узорка}} - C_T_{\beta\text{-актина}}$$

$$\Delta C_T_{\text{калибратора}} = C_T_{\text{калибратора}} - C_T_{\beta\text{-актина}}$$

### 3.10. КУЛТУРА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА

За испитивање експресије ST2 молекула и IL-33 зависне продукције IL-13 коришћене су адхерентне перитонеалне ћелије. Перитонеалне ћелије добијене су из перитонеалног испирка са 10 ml хладног PBS-а који је садржао 3% FBS-а. Изоловане ћелије су пребачене у епрувете од 15 ml, центрифугиране 10 минута на 1500 rpm на собној температури и затим ресуспендоване у DMEM-у (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich*, DMEM) са 10% FBS-а. Ћелије су потом постављене у стаклене Петри шоље (енгл. *Petri dish*) 2h на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. По истеку инкубације, неадхерентне ћелије су одстрањене пажљивим испирањем са топлим PBS-ом. Адхерентне ћелије су одвојене стругањем уз помоћ силиконске гуме, опране и ресуспендоване у комплетном медијуму (DMEM са 10% FBS-а, 2mM L-глутамин, 100IU/ml пеницилин G и 100 µg/ml стрептомицин). Након бројања, ћелије су постављене у културу у плоче са 24 бунара (5 x 10<sup>5</sup> ћелија по бунару) на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. Ћелије су потом стимулисане са различитим концентрацијама IL-33 (20, 50 и 100 ng/ml) у трајању 48h. Након инкубације на ћелијама је одређивана експресија ST2 молекула и IL-33 зависне продукције IL-13 методом проточне цитометрије, а у супернатантима је одређивана концентрација IL-13 ELISA методом.

### 3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података испитана је правилност расподеле добијених вредности. Ако је број вредности био мањи од 50 за проверу смо користили *Shapiro-Wilk* тест, а за узорак већи од 50 користили смо *Kolmogorov-Smirnov* тест. Уколико су вредности имале правилну расподелу користили смо параметарски *Students*-ов t тест, док смо у случају неправилне расподеле користили непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. Резултати експеримената су изражени као средња вредност +/- стандардна грешка (енгл. *Standard error*, SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група користили смо два нивоа статистичке значајности  $p < 0.05$  и  $p < 0.01$ . Добијени резултати су приказани табеларно и графички.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

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

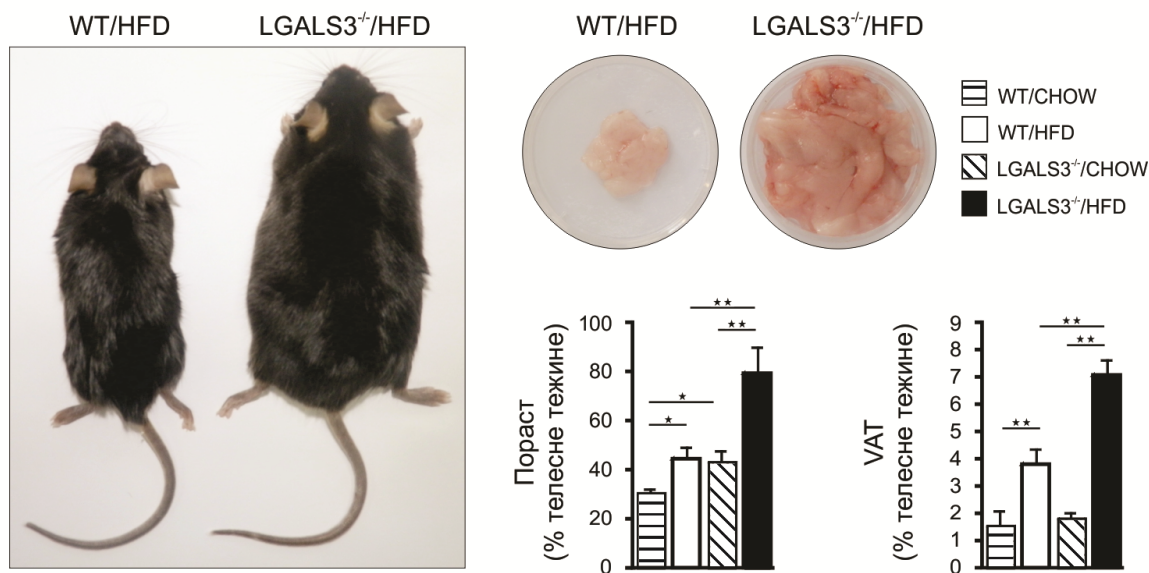
Са циљем да се испита утицај галектина-3 на развој гојазности и тип 2 *diabetes mellitus*-а, мишеви дефицијентни за галектин-3 као и контролни мишеви дивљег соја C57Bl/6 храњени су храном са високим садржајем масти (60%) или стандардном лабораторијском храном (10%) у трајању од 24 недеље. Све време трајања експеримента, животиње су имале слободан приступ храни и води. Сваке четврте недеље, од почетка експеримента, мерено је увећање телесне тежине мерењем сваког појединачног миша. Након 24 недеље, храна са високим садржајем масти у односу на стандардну храну довела је до повећања телесне масе у оба гентипа, изражена као укупна телесна тежина на крају експеримента и пораст телесне масе у грамима у односу на почетну телесну тежину. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани богатој мастима су имали значајно увећање телесне тежине у односу на WT мишеве на истој исхрани. Интересантно је да су LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на стандардној исхрани имали значајно већу телесну масу као и пораст телесне тежине у односу на WT мишеве на стандардној храни (Табела 4).

	WT CHOW	WT HFD	LGALS3 <sup>-/-</sup> CHOW	LGALS3 <sup>-/-</sup> HFD
Телесна тежина (гр)	28.01±0.5	31.1±1.12 <sup>#</sup>	29.6±0.86 <sup>¶</sup>	39.5±1.51 <sup>*¥</sup>
Пораст тежине (гр)	6.13±0.33	9.54±1.02 <sup>#</sup>	7.91±0.97 <sup>¶</sup>	17.7±1.83 <sup>*¶</sup>
Укупни VAT (гр)	0.45±0.02	1.21±0.22 <sup>*</sup>	0.56±0.08	2.81±0.33 <sup>*¥</sup>

**Табела 4. Повећана телесна тежина LGALS3<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на дуготрајној исхрани са високим садржајем масти.** Телесна тежина експерименталних животиња мерена је сваке 4 недеље током трајања експеримента. Количина укупног висцералног адипозног ткива измерена је након жртвовања животиња по истеку 24 недеље специјалног режима исхране. Измерене вредности телесне тежине и укупног висцералног масног ткива су приказане као појединачне вредности за сваког миша. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, <sup>#</sup>p<0.05, <sup>\*</sup>p<0.01, vs. CHOW; <sup>¶</sup>p<0.05, <sup>¥</sup>p<0.01 vs. WT.

Добијени резултати показују да у одсуству галектина 3 настаје убрзан развој гојазности како на храни са високим садржајем масти тако и на стандардној исхрани. Ово додатно потврђује и податак да су LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на стандардној исхрани имали значајно већу телесну масу као и пораст телесне тежине у односу на WT мишеве након 24 недеље од почетка експеримента (Табела 4).

Гојазност је хронично обољење које карактерише депоновање масних наслага у организму пре свега висцералног масног ткива, чије увећање има веома битну улогу у настанку компликација. У мишева је висцерално масно ткиво локализовано у перигонадалним и периреналним депоима. Након 24 недеље специјалног режима исхране, животиње су жртвоване и измерена је укупна маса изолованог масног ткива из перитонеалне шупљине. Уочено је да је храна са високим садржајем масти довела до пораста количине висцералног масног ткива у оба генотипа у односу на стандардну исхрану (Табела 4). Такође је показано да је количина висцералног масног ткива у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на дијети са високим садржајем масти значајно већа у односу на WT мишеве на истој исхрани, приказано у грамима (Табела 4) као и процентуално у односу на телесну тежину (Слика 1).



**Слика 1. Повећана телесна тежина и количина висцералног адипозног ткива LGALS3<sup>-/-</sup> мишева након 24 недеље на исхрани са високим садржајем масти.** Репрезентативне слике мишева и укупног висцералног масног ткива изолованог након 24 недеље исхране са високим садржајем масти. Пораст телесне тежине као и проценат висцералног масног ткива у односу на телесну тежину након 24 недеље специјалног режима исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Све време трајања експеримента, просечна количина хране унета недељно није се статистички значајно разликовала између два генотипа мишева на истој исхрани.

## 4.2. АБЛАЦИЈА ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 УБРЗАВА НАСТАНАК ТИП 2 DIABETES MELLITUS-A У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Шећерна болест тип 2 представља стање хроничне хипергликемије коју карактеришу следећи патофизиолошки поремећаји: резистенција на инсулин у периферним ткивима, поремећај секреције инсулина у панкреасним острвцима као и повећана глуконеогенеза у јетри. Током трајања експеримента праћени су параметри гликорегулације и то гликемија наше мерена након четворосатног гладовања као и серумска концентрација инсулина наше мерена након 24 недеље специјалног режима исхране.

Гојазни LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви су имали значајно веће вредности гликемије наше у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти након 24 недеље. Важну улогу галектина-3 у очувања хомеостазе процеса гликорегулације додатно је потврдила чињеница да су LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на стандардној исхрани имали значајно веће вредности гликемије наше у односу на WT мишеве на истој исхрани (Табела 5).

	WT CHOW	WT HFD	LGALS3 <sup>-/-</sup> CHOW	LGALS3 <sup>-/-</sup> HFD
Гликемија наше (mmol/L)	7.16±0.27	7.34±0.21	8.79±0.31 <sup>¥</sup>	10.67±0.36 <sup>*¥</sup>
Инсулин наше (ng/mL)	0.36±0.16	0.36±0.12	0.39±0.06	1.87±0.19 <sup>#¶</sup>
HOMA-IR	1.04±0.08	1.52±0.39	4.39±0.89 <sup>¶</sup>	8.65±1.87 <sup>#¶</sup>

**Табела 5. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти развијају инсулинску резистенцију и поремећај у гликорегулацији.** Гликемија наше мерена је сваке 4. недеље током трајања експеримента. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају веће вредности гликемије и инсулинемије наше у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране након 24 недеље. На основу вредности гликемије и инсулинемије израчунат је HOMA-IR коефицијент инсулинске резистенције. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају веће вредности HOMA-IR у поређењу са осталим експерименталним групама. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, <sup>#</sup>p<0.05, <sup>\*</sup>p<0.01, vs. CHOW; <sup>¶</sup>p<0.05, <sup>¥</sup>p<0.01 vs. WT.

Интересантно је запажање да је измерена вредност гликемије наше била статистички значајно већа у гојазних LGALS3<sup>-/-</sup> у односу на WT мишеве већ у 4. недељи након индукције болести (8.86 ± 0.36 vs. 7.20 ± 0.28 mmol/L, p=0.006).

Инсулинска резистенција игра веома важну улогу у настанку DMT2 и хроничних компликација. У одговору на инсулинску резистенцију настаје компензаторно увећање масе панкреасних острваца и пораст функције β-ћелија до тренутка када β-ћелије више не могу да компензују инсулинску резистенцију када настаје прогресивна инсуфицијенција β-ћелије која се манифестује недостатком инсулина.

Вредности HOMA-IR индекса су показале изражен степен инсулинске резистенције у LGALS3<sup>-/-</sup> у поређењу са WT мишевима на исхрани богатој мастима. С обзиром на већ поменуто улогу галектина-3 у процесу гликорегулације, уочено је да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви

на стандардној исхрани имају значајно веће вредности НОМА-IR индекса у поређењу са WT мишевима на стандардној дијети након 24 недеље (Табела 5).

### 4.3. ПОВЕЋАНЕ СЕРУМСКЕ ВРЕДНОСТИ ЛИПИДА У LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Инсулинска резистенција сматра се кључним механизмом за настанак периферне липолизе и појачаног допремања слободних масних киселина у јетру као и за појачану синтезу масних киселина и триглицерида у самој јетри.

Након 24 недеље специјалног режима исхране анализиран је липидни статус експерименталних животиња одређивањем концентрације укупног холестерола и триглицерида у серуму. Добијени подаци су показали да оба генотипа мишева на дијети са високим садржајем липида имају значајно веће системске вредности укупног холестерола у односу на мишове на стандардној исхрани. Додатно LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви који су били на дијети са високим садржајем масти имали су значајно веће вредности укупног холестерола као и триглицерида у односу на WT мишове након 24 недеље (Табела 6).

	WT CHOW	WT HFD	LGALS3 <sup>-/-</sup> CHOW	LGALS3 <sup>-/-</sup> HFD
Холестерол (mmol/L)	3.18±0.17	4.76±0.13*	3.40±0.16	5.96±0.22* <sup>‡</sup>
Триглицериди (mmol/L)	1.34±0.07	1.35±0.09	1.48±0.11	1.74±0.07 <sup>¶</sup>

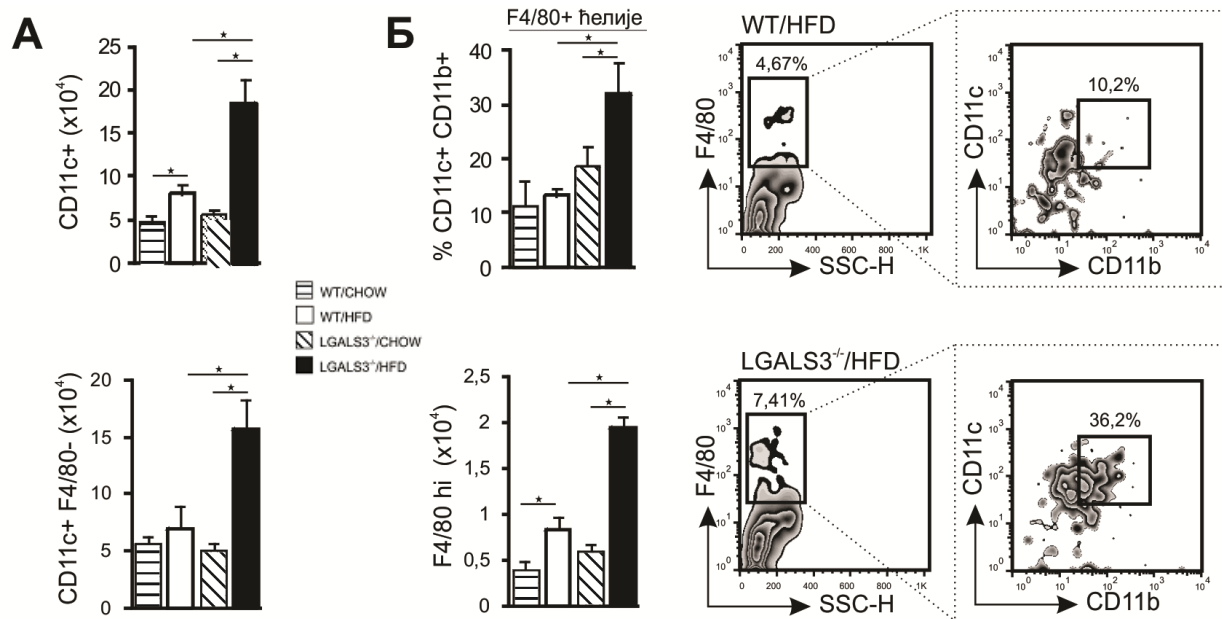
**Табела 6. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти развијају хиперлипидемију.** Липидни профил урађен је након 24 недеље специјалног режима исхране. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају веће вредности укупног холестерола и триглицерида у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, <sup>#</sup>p<0.05, \* p<0.01, vs. CHOW; <sup>¶</sup> p<0.05, <sup>‡</sup> p<0.01 vs. WT.



#### **4.4. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА ДЕНДРИТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МАКРОФАГА У ВИСЦЕРАЛНОМ МАСНОМ ТКИВУ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Након 24 недеље специјалног режима исхране из експерименталних животиња изолована је стромална васкуларна фракција ћелија из висцералног масног ткива. Присуство и природа инфламације испитивани су методом проточне цитометрије.

LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви који су били на дијети са високим садржајем масти имали су већу количину висцералног масног ткива као и повећану инфилтрацију дендритичних ћелијама и проинфламаторним макрофагама. Мишеви са циљаном делецијом галектина-3 имали су већу заступљеност укупних CD11c<sup>+</sup> као и CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија у односу на WT мишеве након 24 недеље исхране са високим садржајем масти (Слика 2А). Процентуална заступљеност проинфламаторних макрофага, дефинисаних као троструко позитивне F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ћелије, била је значајно већа у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са WT мишевима на исхрани богатој мастима. Додатно, проинфламаторне F4/80<sup>hi</sup> макрофаге, биле су заступљеније у висцералном масном ткиву гојазних LGALS3<sup>-/-</sup> у поређењу са WT мишевима (Слика 2Б).



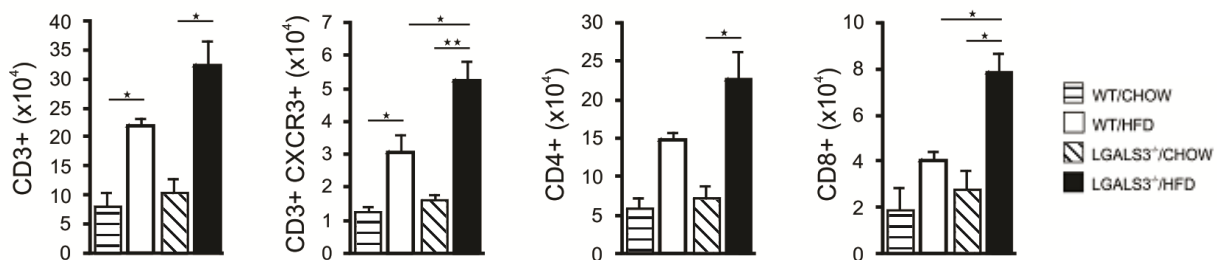
**Слика 2. Повећана заступљеност дендритских ћелија и проинфламаторних макрофага у висцералном масном ткиву LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је апсолутни број и процентуална заступљеност ћелија у мононуклеарном инфилтрату са репрезентативним плотовима. (А) Дендритичне ћелије (Б) Проинфламаторне макрофаге: троструко позитивне F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> и F4/80<sup>hi</sup> ћелије. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05

#### 4.5. ПОВЕЋАНА ИНФИЛТРАЦИЈА Т ЛИМФОЦИТИМА У ВИСЦЕРАЛНОМ МАСНОМ ТКИВУ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

С обзиром да ћелије стеченом имунског одговора играју јако битну улогу у настанку инфламације и инсулинске резистенције у склопу гојазности и DMT2 испитивали смо заступљеност ових ћелија у висцералном масном ткиву.

Исхрана са повећаним садржајем масти након 24 недеље довела је до пораста количине масног ткива што је било праћено и већом заступљеношћу укупних CD3<sup>+</sup> лимфоцита као и CD4<sup>+</sup> лимфоцита у односу на експерименталне животиње које су биле на стандардној исхрани (Слика 3). Заступљеност CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> лимфоците, била је већа у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти.

Гојазни LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су већу заступљеност CD8<sup>+</sup> лимфоцита у односу на животитиће које су храњене стандардном храном као и у поређењу са гојазним WT мишевима (Слика 3) . Додатно, показали смо да је однос CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> лимфоцита био статистички значајно већи у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти ( $0.39 \pm 0.05$  vs.  $0.26 \pm 0.017$ ,  $p=0.014$ ).



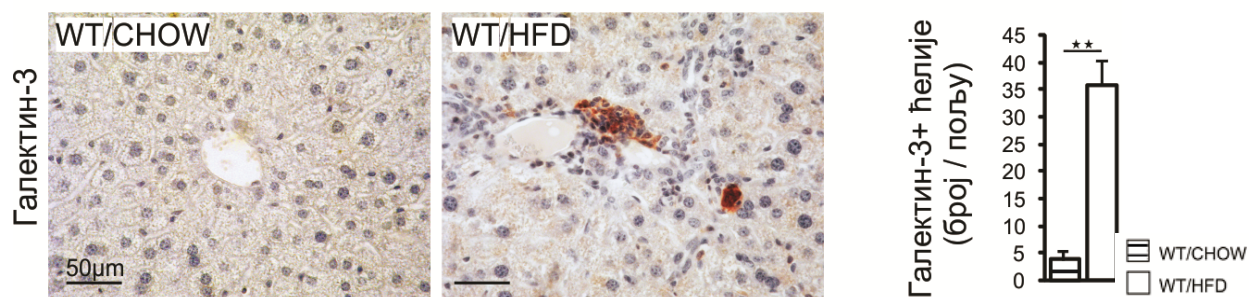
**Слика 3. Повећана заступљеност лимфоцита у висцералном масном ткиву LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.** Мононуклеарне ћелије изоловане из стромалне васкуларне фракције висцералног масног ткива анализирани су методом проточне цитометрије. Проказана је апсолутни број укупних CD3+, CD3+CXCR3+, CD4+ и CD8+ лимфоцита у мононуклеарном инфилтрату. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

#### 4.6. ПОВЕЋАНА ЕКСПРЕСИЈА ГАЛЕКТИНА 3 У ЈЕТРИ ИНДУКОВАНА ЈЕ ДУГОТРАЈНОМ ДИЈЕТОМ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ

Узимајући у обзир значајну улогу галектина-3 као рецептора чистача за AGE и ALE у метаболичким абнормалностима, као и његове значајне улоге у регулацији имунског одговора и процеса фиброзе, испитана је експресија овог молекула у јетри WT животиња у зависности од исхране.

Методом имунохистохемијског бојења галектина-3 у јетри показана је повећана експресија у мишева на дијети са високим садржајем масти у поређењу са мишевима на стандардној исхрани. Хепатоцити нису били позитивни на галектин-3. Ћелије позитивне

на галектин-3 по морфологији одговарају макрофагама и локализоване су у грануломима перипорталних простора (Слика 4).



**Слика 4. Повећана експресија галектина-3 у јетри WT животиња на исхрани са високим садржајем масти.** Методом имунохистохемијског бојења галектина-3 у јетри показана је повећана експресија овог молекула у мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са животињама на стандардној исхрани, као и репрезентативне слике (увеличање x100). Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*\* p<0.01.

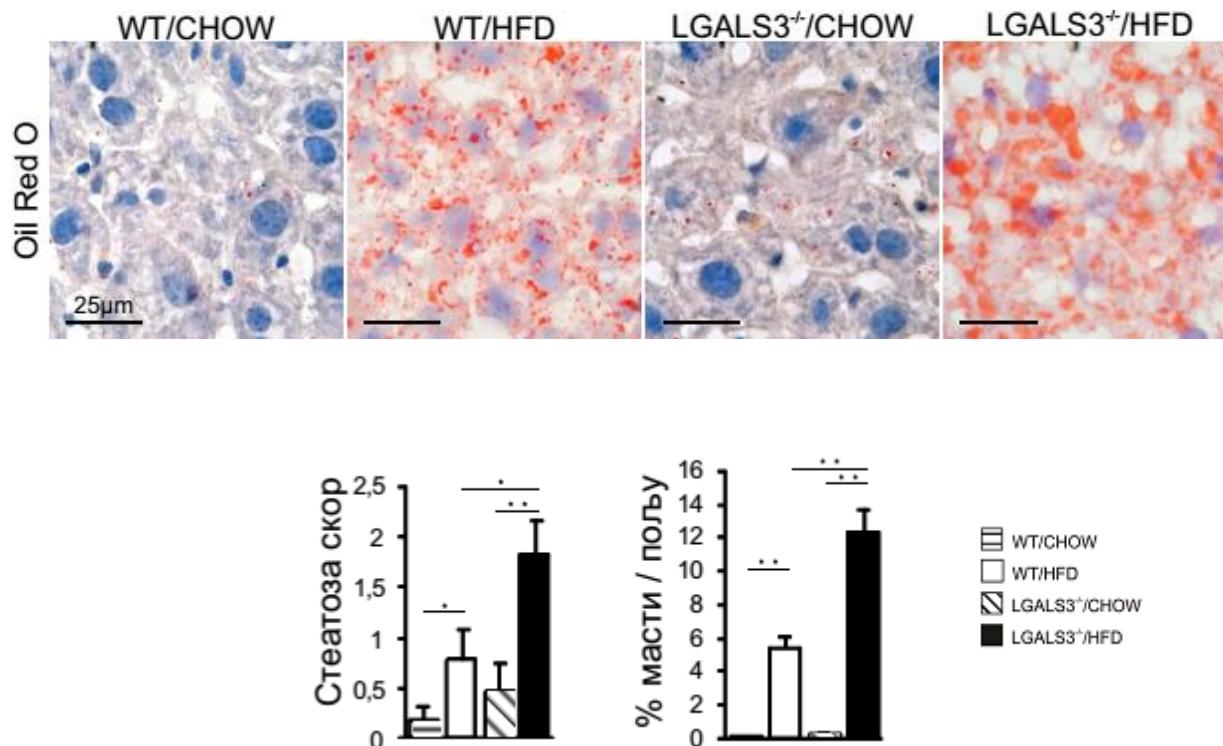
#### 4.7. ИСХРАНА СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ДОВЕЛА ЈЕ ДО ИЗРАЖЕНИЈЕ СТЕАТОЗЕ У LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА

Основна хистолошка карактеристика неалкохолне масне болести јетре садржана је у самом називу болести и карактерише је накупљање масти унутар хепатоцита, односно стеатоза. Минимални критеријум за дијагнозу масне болести јетре представља масна инфилтрација јетре дефинисана хистолошки као присуство стеатозе у више од 5% хепатоцита. Стеатоза јетре може се манифестовати као присуство микро- или макровезикула масти у хепатоцитима.

За детекцију липида коришћени су криостатски исечци ткива јетре и *Oil-Red O* бојење које липиде боји црвено.

Исхрана са високим садржајем масти довела је до масне инфилтрације јетре у оба генотипа у поређењу са експерименталним животињама на стандардној исхрани (Слика 5). Галектин-3 дефицијентни мишеви имали су статистички значајно израженију стеатозу у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти. Додатно, у

LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти доминантно је била присутна макровезикуларна стеатоза док је код WT мишева преовладава микровезикуларна стеатоза (Слика 5).



**Слика 5. Израженија стеатоза јетре LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.** Методом селективног хистохемијског бојења липида показали смо да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају већи степен стеатозе у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Репрезентативне слике *Oil Red O* бојења (увеличање x100) и квантификација стеатозе. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

С обзиром да масна инфилтрација јетре може бити последица различитих поремећаја у метаболизму липида у јетри, испитали смо експресију гена важних у метаболичким процесима.

Израженија стеатоза у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти праћена је значајно већом експресијом транслоказе CD36, транскрипционог фактора PPAR-γ као и ензима задуженог за де ново синтезу масних киселина FAS, у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране (Табела 7).

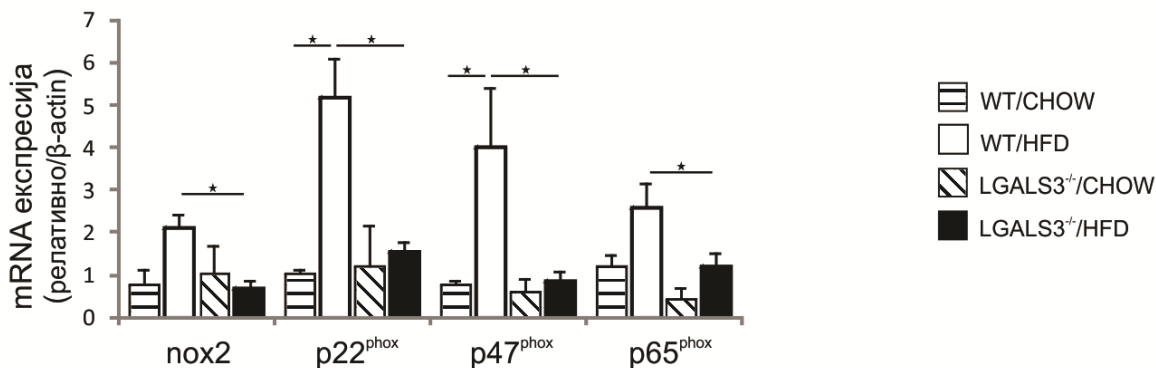
	WT CHOW	WT HFD	LGALS3 <sup>-/-</sup> CHOW	LGALS3 <sup>-/-</sup> HFD
<b>ChREBP</b>	1.08±0.02	1.3±0.23	1.27±0.19	1.39±0.19
<b>LXR-α</b>	1.02±0.48	4.93±0.95*	1.31±0.66	1.65±0.62 <sup>#</sup>
<b>LXR-β</b>	0.93±0.40	1.79±0.3*	1.08±0.27	1.42±0.18
<b>SREBP-1c</b>	1.02±0.23	1.76±0.15*	0.89±0.08	1.78±0.23
<b>CD36</b>	0.70±0.43	1.20±0.72	0.98±0.56	4.70±0.49* <sup>#</sup>
<b>PPAR-γ</b>	1.03±0.61	2.52±0.53*	1.60±0.50	5.57±0.25* <sup>#</sup>
<b>FAS</b>	0.66±0.13	0.83±0.23	0.42±0.09	2.21±0.31* <sup>#</sup>
<b>DAGT1</b>	0.38±0.12	1.64±0.61*	0.33±0.07	1.05±0.23*
<b>DAGT2</b>	0.52±0.22	3.15±0.61*	0.51±0.11	2.50±0.26*
<b>CPT1</b>	0.51±0.23	2.66±0.87*	0.77±0.27	2.67±0.91*

**Табела 7. Експресија гена важних у метаболизму липида.** Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо улогу гена важних у процесу метаболизма липида у јетри. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су већу експресију CD36, PPAR-γ и FAS у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране.. Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, vs. CHOW; <sup>#</sup>p<0.05, vs. WT.

#### 4.8. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА УДРУЖЕНИХ СА НАСТАНКОМ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ЈЕТРИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Оксидативни стрес и стварање слободних радикала један су од претпостављених механизма прогресије стеатозе у правцу настанка стеатохонепатитиса и фиброзе јетре. Са обзиром да активирани макрофаге продукују реактивне облике кисеоника посредством активације NADPH оксидазне каскаде испитали смо експресију компоненти овог ензимског система у јетри.

Исхрана са високим садржајем масти резултирала је повећаном експресијом компоненти NADPH оксидазног система Nox2, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and p65<sup>phox</sup> у јетри у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве који су били на истом режиму исхране тј. дијети са високим садржајем масти (Слика 6).



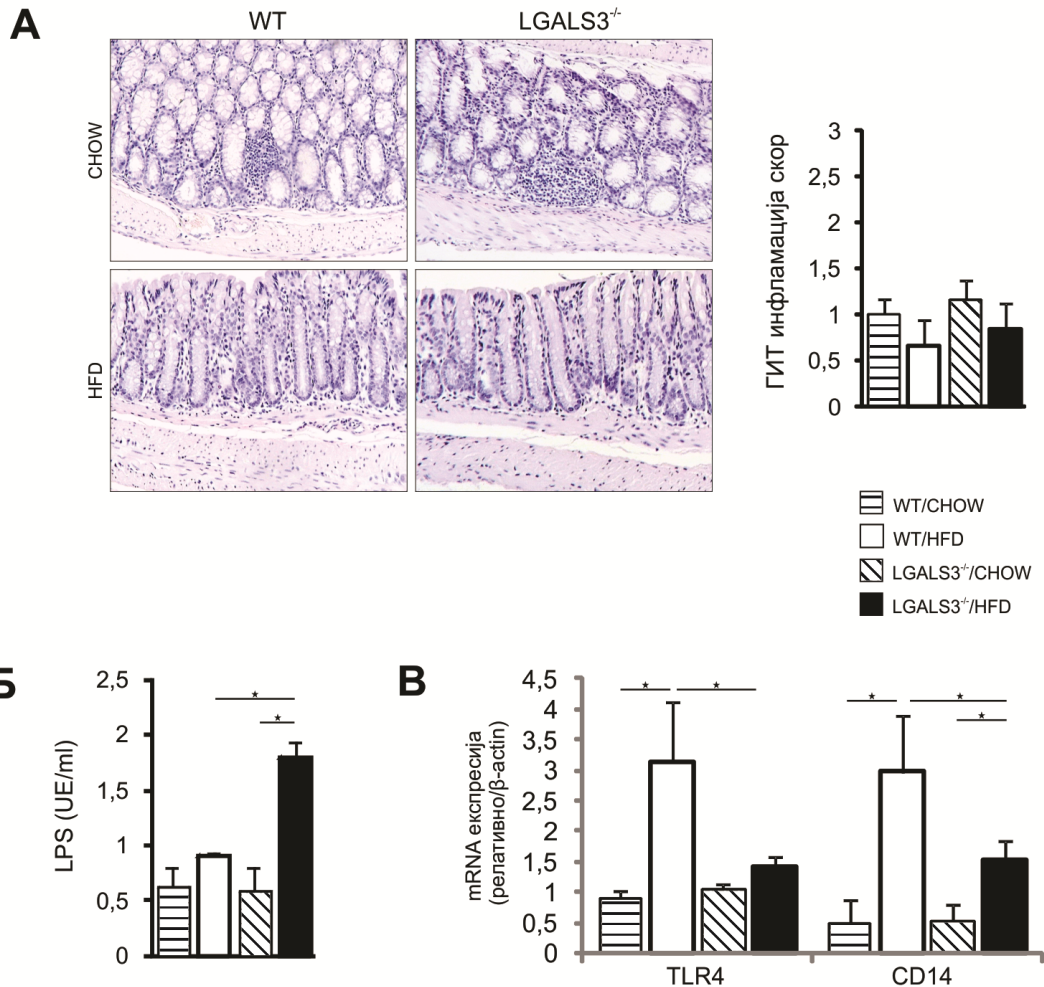
**Слика 6. Смањена експресија компоненти NADPH оксидазног система у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти.** Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо улогу гена важних у процесу настанка оксидативног стреса у јетри. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију pox2, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> и p65<sup>phox</sup> у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*p<0.05.

#### 4.9. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА TLR 4 У ЈЕТРИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Познато је да дијета са високим садржајем масти може да резултира измењеном флором гастроинтестиналног тракта и повећаном пропустљивошћу цревног епитела. Из тог разлога испитали смо присуство инфламације у дебелом цреву као и системске вредности LPS-а. Додатно смо испитали експресију TLR4 и CD14 рецептора у јетри с обзиром да активација TLR4 посредством LPS-а пореклом из гастроинтестиналног тракта игра веома важну улогу у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре.

Иако је хистолошки показано да није било разлике у инфилтрацији у дебелом цреву (Слика 7А), исхрана са високим садржајем масти довела је до повећања серумских вредности LPS-а само у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са животињама на стандардној исхрани, као и у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 7Б). Упркос повећаним системским вредностима LPS-а, LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са

високим садржајем масти имали су мању експресију TLR4 и CD14 у јетри у поређењу са WT животињама на истој исхрани (Слика 7B).



**Слика 7.** Смањена експресија TLR4 и CD14 у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти. (A) Репрезентативне слике дебелог црева и квантификација инфилтрације (H&E бојење, увеличање x40), (Б) серумских вредности LPS-а и (В) експресија TLR4 и CD14 у јетри након 24 недеље специјалног режима исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05.

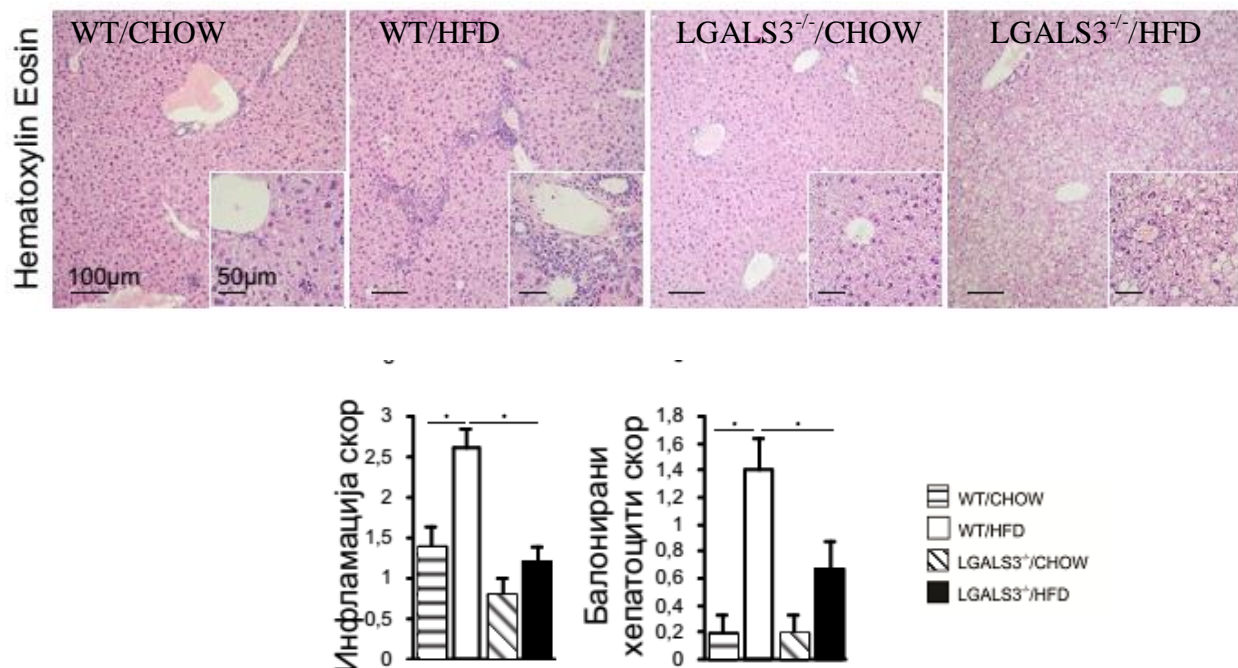


#### **4.10. LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ИМАЛИ СУ МАЊЕ ХЕПАТОЦЕЛУЛАРНО ОШТЕЋЕЊЕ И МАЊУ ЛОБУЛАРНУ ИНФИЛТРАЦИЈУ У ЈЕТРИ**

Стеатохепатитис, за разлику од једноставне стеатозе, карактерише и присуство некроинфламаторне компоненте. Поред стеатозе, кључне хистолошке компоненте неопходне за дијагнозу стеатохепатитиса су и хепатоцелуларно оштећење праћено лобуларном инфилтрацијом. Оштећење хепатоцита манифестује се присуством балонираних хепатоцита и порастом серумске активности јетриних ензима. Лобуларни инфилтрат састоји се од моноклеарних ћелија и обично је благог степена, док је присуство израженијег инфилтрата у корелацији са тежим обликом и прогресијом болести.

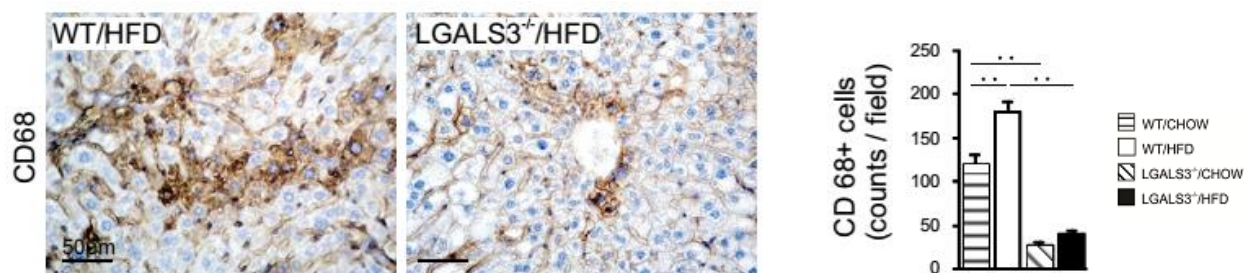
Иако су имали израженију стеатозу LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мање хепатоцелуларно оштећење уз мање присуство балонираних хепатоцита. Додатно, исхрана са високим садржајем масти довела је до повећане серумске активности јетриних ензима у WT животиња у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране (АСТ: 101.8 ± 4.14 vs. 64.5 ± 7.51 IU/L, p=0.014; АЛТ: 52.6 ± 6.14 vs. 27.25 ± 3.01 IU/L, p=0.043).

Додатно је показано да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мањи скор инфилтрације у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. За разлику од LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани богатој мастима код којих је махом била присутна дифузна инфилтрација код WT животиња је доминантно било присуство лобуларних инфилтрата у портним просторима (Слика 8).



**Слика 8.** Смањена лобуларна инфилтрација и оштећење хепатоцита у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти. Методом хистохемијског Н&Е бојења показали смо да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мањи степен инфилтрације и мање хепатоцелуларно оштећење у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Репрезентативне слике Н&Е бојење, (увеличање x40) и квантификација лобуларне инфламације и оштећења хепатоцита (Балонирање хепатоцита). Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05.

У сагласности са претходно показаним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију мононуклеарних ћелија у јетри WT животиња на исхрани са високим садржајем масти имунохистохемијски је потврђена повећана заступљеност CD68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране (Слика 9).



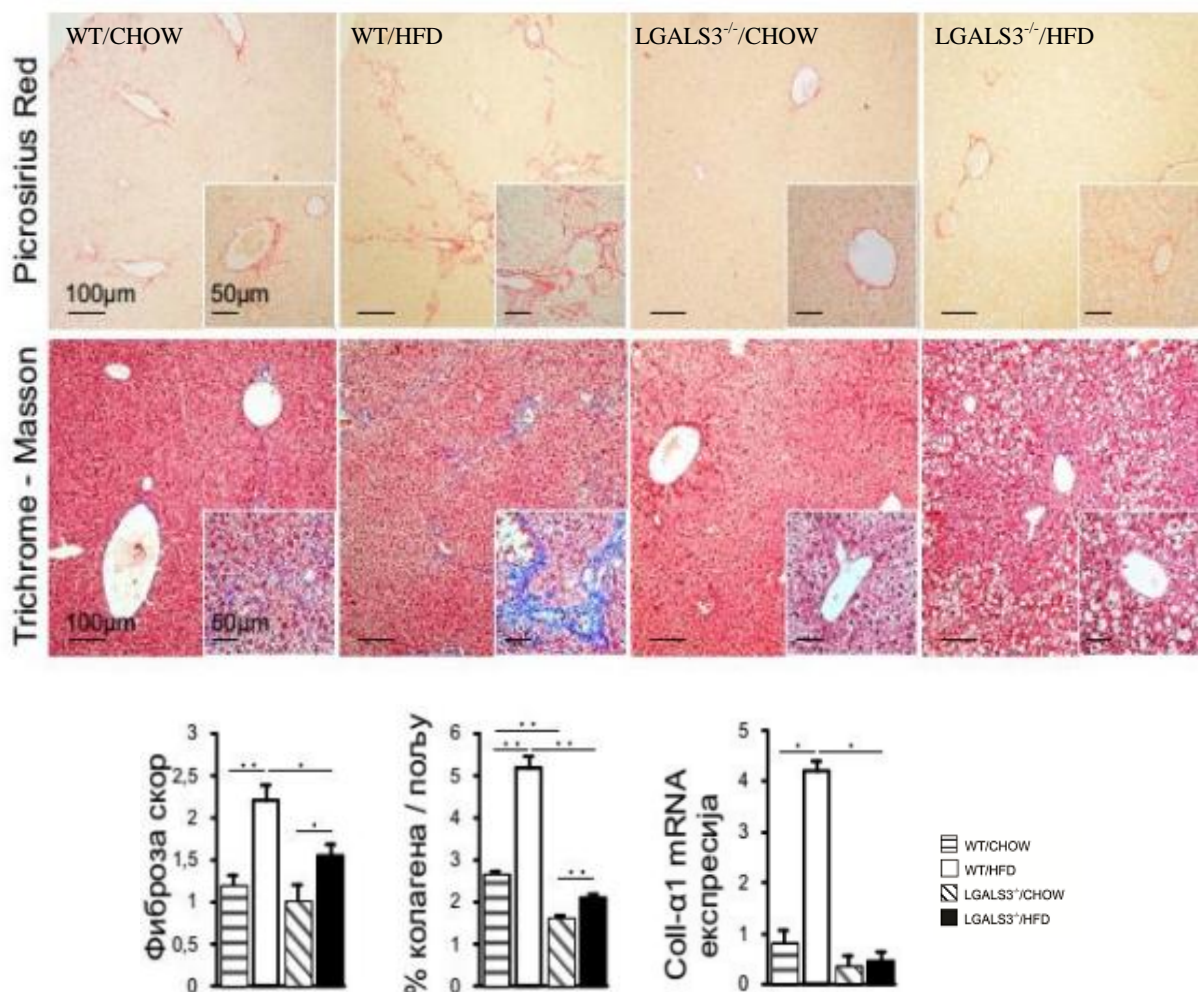
**Слика 9. Смањена инфилтрација проинфламаторних CD68<sup>+</sup> макрофага у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти..** Методом имунохистохемијског бојења CD68 у јетри показана је смањена експресија овог молекула у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране као и репрезентативне слике (увеличање x100). Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*\* p<0.01.

#### 4.11. LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ ИМАЛИ СУ МАЊЕ ИЗРАЖЕНУ ФИБРОЗУ

Иако присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза стеатохепатитиса, показано је да фиброза значајно корелира са настанком компликација болести. Процес фиброгенезе обично отпочиње депоновањем колагена дуж синусоида и око хепатоцита, док са напредовањем болести долази до депоновања у портним просторима и формирања мостова између порталних простора што води настанку цирозе. Кључне ћелије у процесу стварања колагена и депоновању екстрацелуларног матрикса су миофибробласти, ћелије које најчешће настају активацијом резидентних стелатних ћелија.

Исхрана са високим садржајем масти довела је до израженије фиброзе јетре у оба генотипа у поређењу са експерименталним животињама на стандардној исхрани. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су статистички значајно мање изражену фиброзу у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 10). Додатно, у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти доминантно је била присутно депоновање екстрацелуларног матрикса у перисинусоидалним просторима и око хепатоцита (Слика 10), за разлику од WT мишева где је процес фиброгенезе био израженији са депоновањем екстрацелуларног матрикса у портним просторима, као и

између портних простора са формираним мостовима, тзв. фиброза премошћавања (енгл. *bridging fibrosis*) (Слика 10).

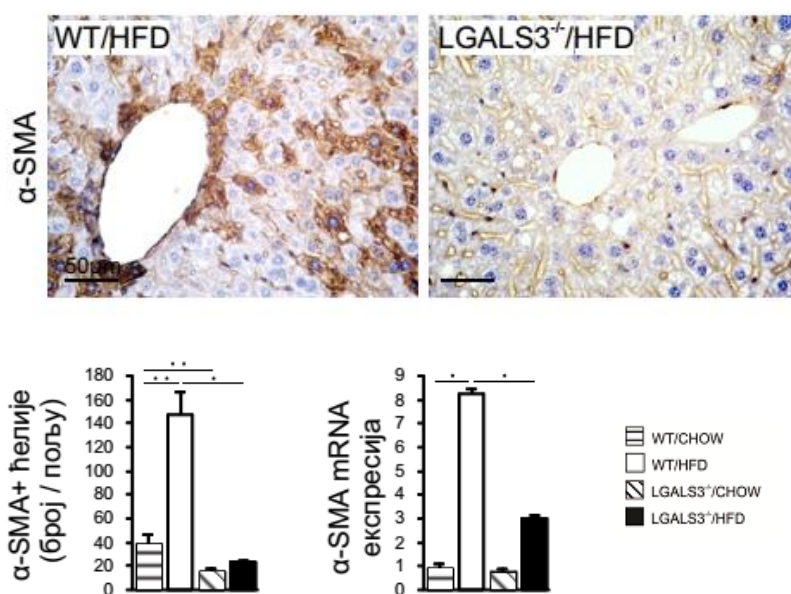


**Слика 10. Мањи степен фиброзе јетре у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.** Методом селективног хистохемијског бојења колагена (*Picrosirius red* и *Trichrome - Masson*) показали смо да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мањи степен фиброзе у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Репрезентативне слике *Picrosirius red* и *Trichrome - Masson* бојења (увеличање x40; x100) и квантификација фиброзе. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

Експресија гена за синтезу проколагена порасла је само код WT мишева на исхрани богатој мастима у односу на стандардну исхрану, као и у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве који су били на истом режиму исхране тј. дијети са високим садржајем масти (Слика 10).

Познато је да су кључне ћелије у депоновању екстрацелуларног матрикса активирани миофибробласти који експримирају  $\alpha$ -SMA (енгл. *alpha-smooth muscle actin*), сходно томе мунохистохемијски и методом ланчане полимеризације у реалном времену смо испитивали експресију овог маркера у ткиву јетре.

Имунохистохемијски је потврђена повећана заступљеност  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> ћелија у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани. Додатно је показана статистички значајно већа експресија гена за  $\alpha$ -SMA у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 11).



**Слика 11.** Смањена заступљеност  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> миофибробласта у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти. Методом имунохистохемијског бојења  $\alpha$ -SMA у јетри показана је смањена експресија овог молекула у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране као и репрезентативне слике (увеличање x100). Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*\* p<0.01.

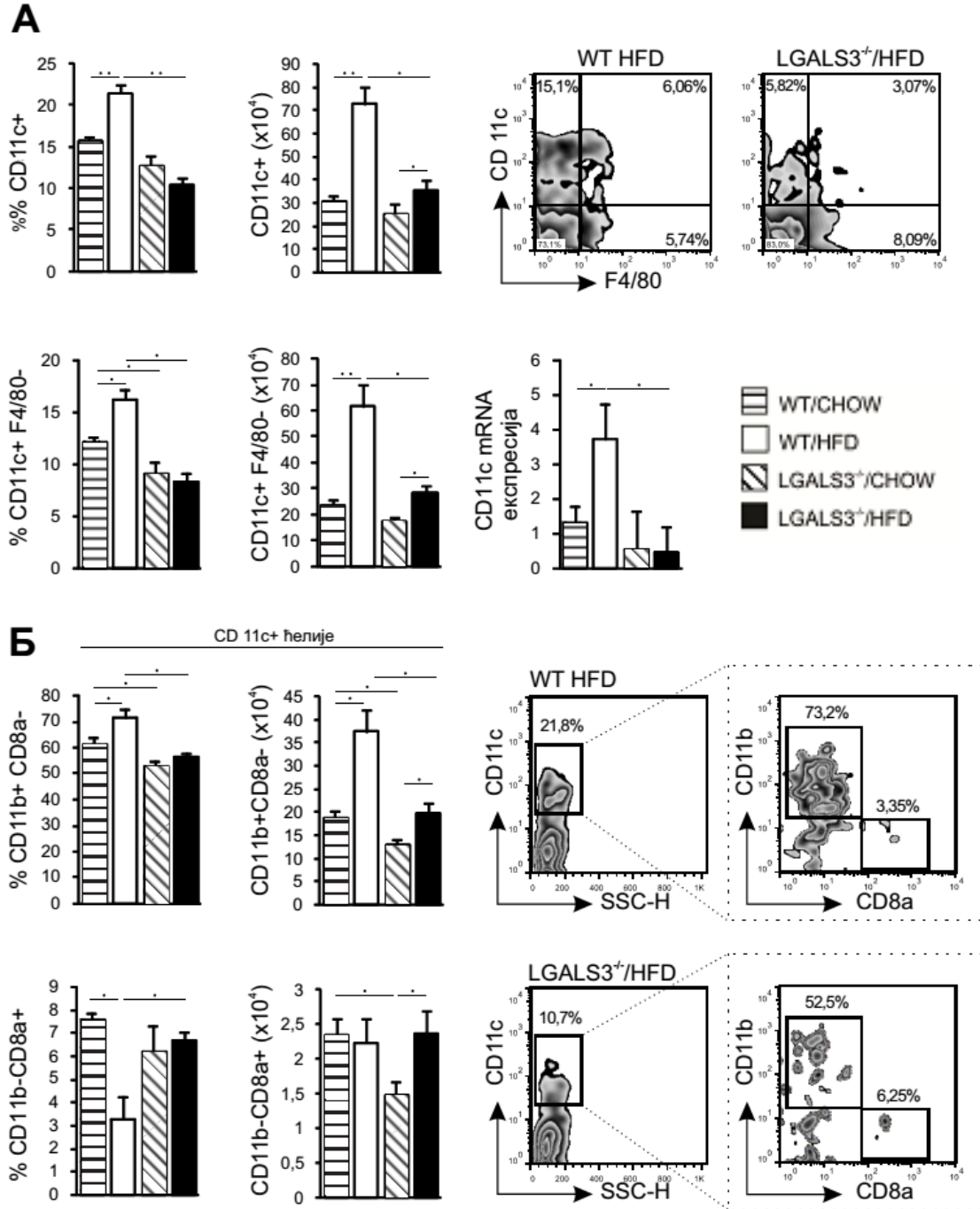
#### **4.12. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ЗРЕЛИХ МИЈЕЛОИДНИХ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА У ЈЕТРИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Присуство инфилтрације у ткиву јетре представља кључну хистолошку компоненту неопходну за дијагнозу и игра јако важну улогу у патогенези неалкохолног стеатохепатитиса. Након 24 недеље специјалног режима исхране из ткива јетре експерименталних животиња изолована је непаренхимска фракција ћелија. Присуство и природа инфламације испитивани су методом проточне цитометрије

Улога дендритичних ћелија у развоју стеатохепатитиса није до краја разјашњена. Са акцентом на њихову потенцијалну улогу како у развоју стеатохепатитиса тако и у процесу фиброгенезе, испитивали смо фенотипске и функционалне карактеристике ових ћелија у ткиву јетре.

Исхрана са повећаним садржајем масти након 24 недеље довела је до пораста броја укупних CD11c<sup>+</sup> као и CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> дендритичних ћелија у односу на мишеве истог генотипа на стандардној исхрани, као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 12А). Додатно је показана статистички значајно већа експресија гена за CD11c у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти методом ланчане полимеризације у реалном времену (Слика 12А).

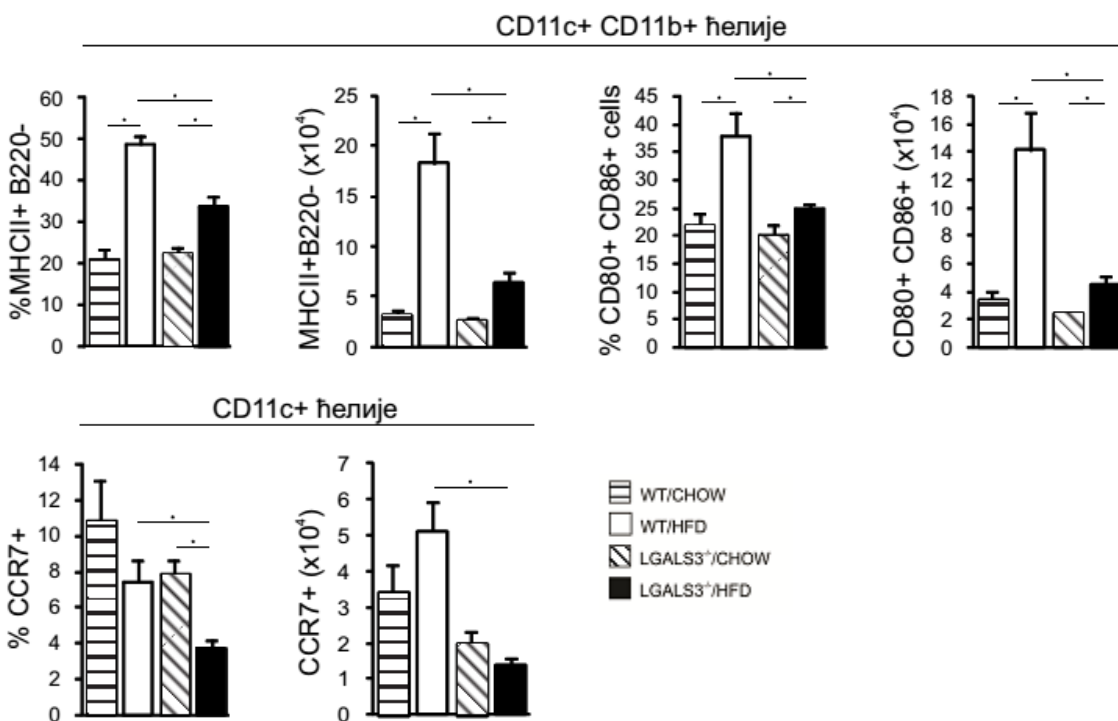
Већа заступљеност дендритских ћелија у WT мишева на исхрани богатој мастима последица је веће процентуалне заступљености мијелоидних CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8a<sup>-</sup> док су лимфоидне CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8a<sup>+</sup> дендритичне ћелије биле ниже у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 12Б).



Слика 12. Смањена заступљеност дендритских ћелија у јетри  $LGALS3^{-/-}$  мишева на исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је апсолутни број и процентуална заступљеност ћелија у мононуклеарном инфилтрату са репрезентативним плетовима. (А) Дендритичне ћелије и експресија CD11c (Б) Представљени резултати два експеримента,  $n=5-7$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

Присутне мијелоидне ћелије у WT животиња на исхрани богатој мастима показивале су зрели матурациони статус. Наиме, процентуална заступљеност мијелоидних ћелија које експримирају МНС молекулу II класе и маркере активације CD80 и CD86, порасла је у WT животиња на исхрани са високим садржајем масти као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 13).

Исхрана са високим садржајем масти довела је до пада процентуалне заступљености дендритских ћелија које експримирају CCR7 молекулу у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева, а њихова процентуална заступљеност је била нижа у односу на WT мишеве који су такође храњени храном са високим садржајем масти (Слика 13).



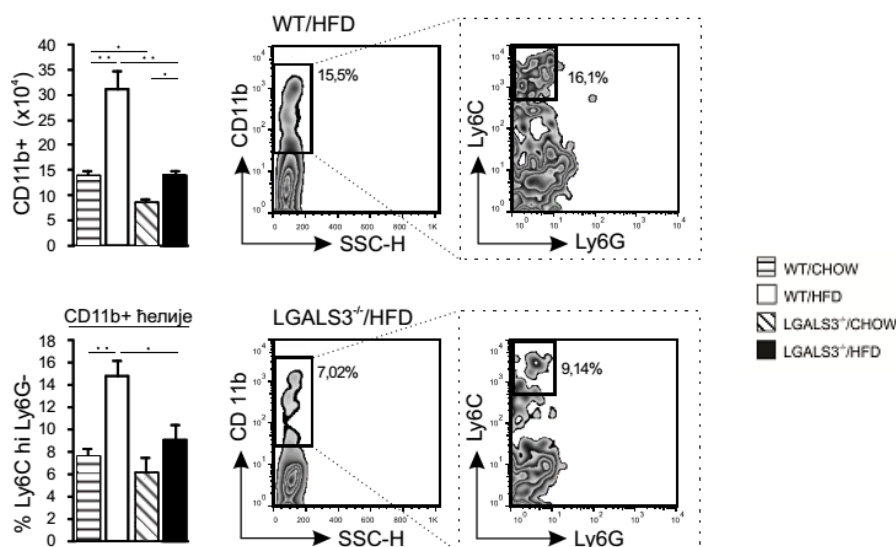
**Слика 13. Смањена заступљеност зрелих мијелоидних дендритских ћелија у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти.** Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива јетре анализирале су методом проточне цитометрије. Приказана је процентуална заступљеност као и апсолутни број мијелоидних дендритских ћелија које експримирају МНС II класе, CD80, CD86 и CCR7 у мононуклеарном инфилтрату. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.



### 4.13. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МАКРОФАГА У ЈЕТРИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

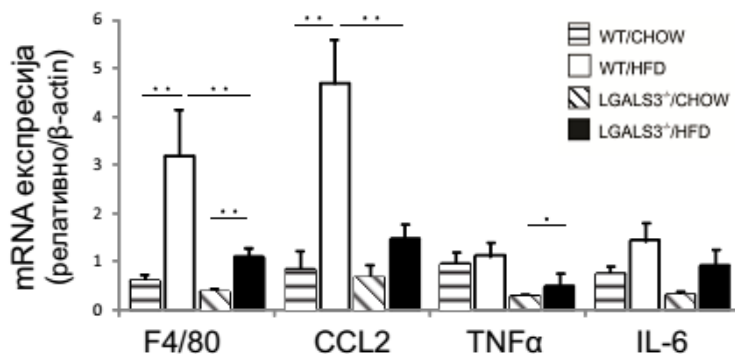
Мијелоидне ћелије су хетерогена популација ћелија и играју јако битну улогу у патогенези стеатохепатитиса на пољу масно измењене јетре. У циљу испитивања улоге мијелоидних ћелија у развоју стеатохепатитиса, методом проточне цитометрије анализиран је фенотип и функционални статус мијелоидних ћелија присутних у ткиву јетре.

Повећан број мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти био је праћен повећаном процентуалном заступљеношћу проинфламаторних моноцита/макрофага које смо окарактерисали као CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>, у пређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 14).



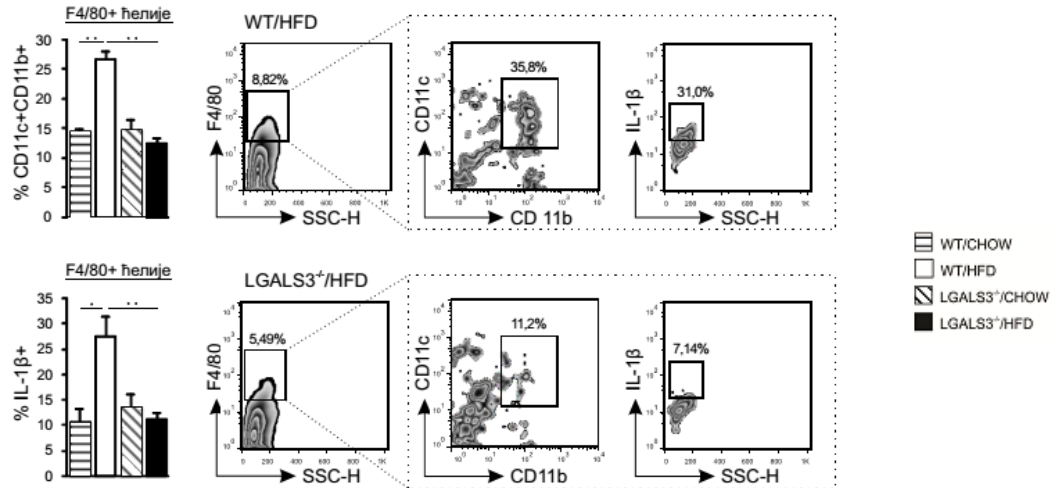
**Слика 14.** Смањена заступљеност мијелоидних ћелија и проинфламаторних моноцита у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказан је апсолутни број и процентуална заступљеност укупних мијелоидних ћелија и проинфламаторних моноцита (CD11b+Ly6c+Ly6G-) у мононуклеарном инфилтрату са репрезентативним плотовима. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Повећано присуство проинфламаторних моноцита праћено је повећаном експресијом гена за CCL2 у ткиву јетре WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 15).



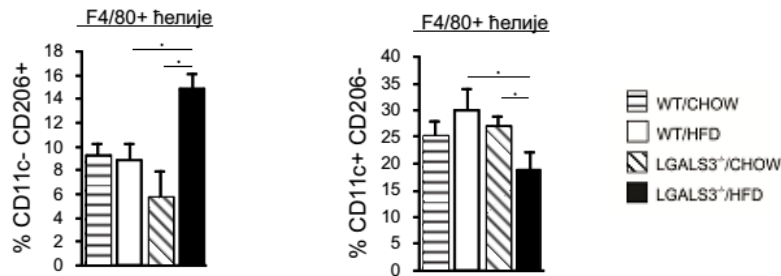
**Слика 15. Смањена експресија макрофага и хемокина CCL2 у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти.** Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију макрофагних маркера, CCL2 хемокина и проинфламаторних цитокина у јетри. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију F4/80 и CCL2 у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Додатно, уочено је да дијета са високим садржајем масти значајно утиче на инфилтрацију троструко позитивних проинфламаторних F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> и селектованих F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1β у WT животиња на исхрани са високим садржајем масти као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 16).



**Слика 16.** Смањена заступљеност проинфламаторних макрофага у јетри  $LGALS3^{-/-}$  мишева на исхрани са високим садржајем масти. Приказана је процентуална заступљеност проинфламаторних трострукопозитивних макрофага и макрофага који продукују IL-1 $\beta$  у мононуклеарном инфилтрату са репрезентативним плотовима. Представљени резултати два експеримента,  $n=5-7$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

Процентуална заступљеност M1 макрофага, дефинисаних као  $F4/80^{+}CD11c^{+}CD206^{-}$  ћелије, била је значајно већа у WT мишева на исхрани са високим садржајем у поређењу са  $LGALS3^{-/-}$  мишевима на истој дијети. Насупрот томе, процентуална заступљеност алтернативно активираних M2 макрофага, фенотипа дефинисаног као  $F4/80^{+}CD11c^{-}CD206^{+}$ , била је значајно редукована у јетри WT мишева у поређењу са  $LGALS3^{-/-}$  мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 17).

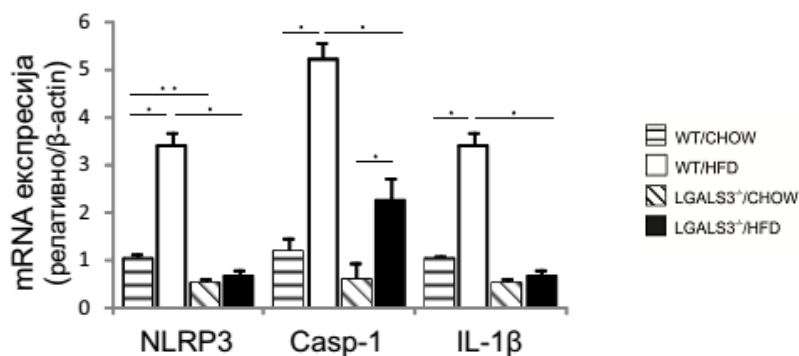


**Слика 17.** Смањена заступљеност проинфламаторних M1 макрофага и повећана заступљеност антиинфламаторних M2 макрофага у јетри  $LGALS3^{-/-}$  мишева на исхрани са високим садржајем масти. Приказана је процентуална заступљеност M1 ( $F4/80^{+}CD11c^{+}CD206^{-}$ ) макрофага и M2 макрофага ( $F4/80^{+}CD11c^{-}CD206^{+}$ ) у мононуклеарном инфилтрату. Представљени резултати два експеримента,  $n=5-7$  животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

#### 4.14. МАЊА ЕКСПРЕСИЈА NLRP3 ИНФЛАМАЗОМА И IL-1 $\beta$ У ЈЕТРИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

У складу са претходно добијеним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију проинфламаторним макрофагама у ткиву јетре WT мишева на исхрани богатој мастима испитали смо продукују IL-1 $\beta$  у макрофагама и експресију компоненти NLRP3 инфламазома у ткиву јетре.

Као што је већ поменуто проценат селектованих F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1 $\beta$  је био значајно већи у групи WT мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> на истој врсти дијете (Слика 16). Додатно, показали смо да је продукција IL-1 $\beta$  била праћена повећаном експресијом IL-1 $\beta$  као и компоненти NLRP3 инфламазома у ткиву јетре WT мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са мишевима истог генотипа на стандардној исхрани као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани богатој мастима. Експресија NLRP3 инфламазома, каспазе-1 као и IL-1 $\beta$  мерена методом ланчане полимеризације у реалном времену била је такође већа у ткиву јетре WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (С



**Слика 18.** Смањена експресија компоненти NLRP3 инфламазома у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти. Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо улогу гена важних у процесу активације NLRP3 инфламазома у јетри. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију NLRP3, каспазе-1 и IL-1 $\beta$  у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* p<0.05.

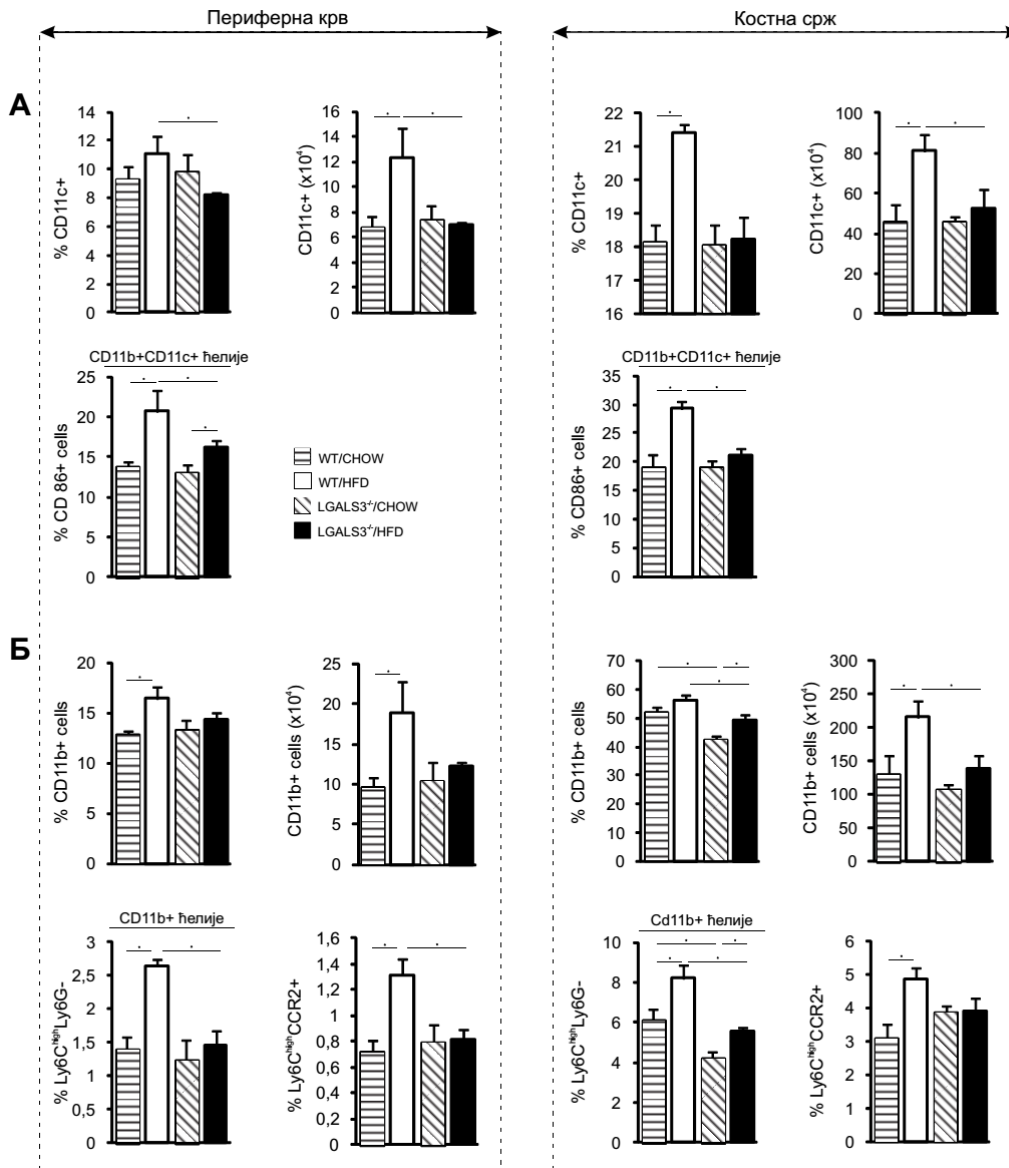
Интересантно је запажање да је експресија NLRP3 инфламазома била већа у ткиву јетре WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима оба на стандардној исхрани (Слика 18).

#### **4.15. МАЊА ЗАСТУПЉЕНОСТ ЗРЕЛИХ ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА И ПРОИНФЛАМАТОРНИХ МОНОЦИТА У КОСТНОЈ СРЖИ И ПЕРИФЕРНОЈ КРВИ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Познато је да инфилтришуће ћелије у јетри играју веома важну улогу у патогенези стеатохепатитиса, а у складу са претходно добијеним резултатом веће експресије CCL2 у јетри WT мишева на исхрани са високим садржајем масти, испитивали смо процентуалну заступљеност и број зрелих дендритичних ћелија и проинфламаторних моноцита.

Храна са високим садржајем масти довела је до пораста процентуалне заступљености и укупног броја CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија у костној сржи и периферној крви WT животиња. Када се упореде животиње на исхрани са високим садржајем масти, LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су статистички мању заступљеност CD11c<sup>+</sup> дендритичних ћелија у костној сржи и периферној крви у поређењу са WT мишевима (Слика 19А). Додатно, процентуална заступљеност мијелоидних дендритичних ћелија које експримирају CD86, порасла је у костној сржи и периферној крви WT животиња на исхрани са високим садржајем масти као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 19А).

Повећан број мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија у костној сржи и периферној крви WT мишева на исхрани са високим садржајем масти био је праћен повећаном процентуалном заступљеношћу проинфламаторних моноцита које смо окарактерисали као CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>, у пређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани. Повећано присуство проинфламаторних моноцита праћено је повећаном експресијом CCR2 на овим ћелијама у периферној крви WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 19Б).



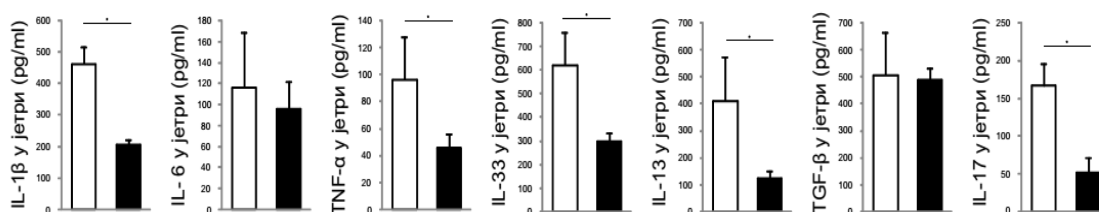
**Слика 19.** Смањена заступљеност зрелих дендритских ћелија и проинфламаторних моноцита у костној сржи и периферној крви LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти. Приказана је процентуална заступљеност зрелих дендритских ћелија и проинфламаторних моноцита у костној сржи и периферној крви након 12 недеља специјалног режима исхране. (А) Укупне CD11c<sup>+</sup> и зреле мијелоидне CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> дендритичне ћелије (Б) Укупне мијелоидне CD11b<sup>+</sup> и проинфламаторне моноцитно/макрофагне CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>Ly6G<sup>-</sup> и Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup> ћелије. Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### 4.16. СМАЊЕНА КОНЦЕНТРАЦИЈА ПРОИНФЛАМАТОРНИХ И ПРОФИБРОГЕНИХ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ И ТКИВУ ЈЕТРЕ LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

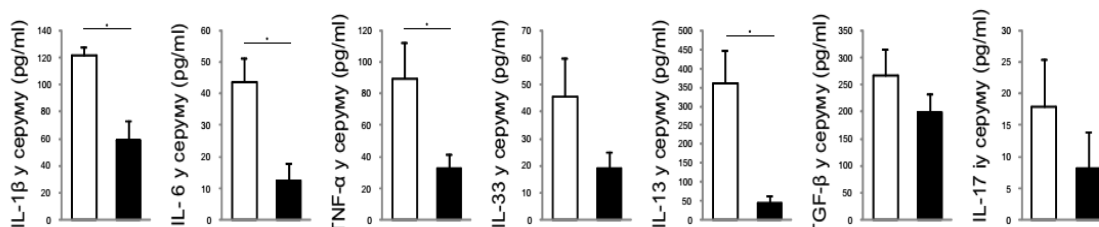
Параметри системске инфламације експерименталних животиња испитивани су мерењем нивоа проинфламаторних и профибругених цитокина у серуму након 24 недеље исхране са високим садржајем масти. Параметри ткивне инфламације испитивани су мерењем концентрације и експресије проинфламаторних и профибругених цитокина у ткиву јетре након 24 недеље специјалног режима исхране.

Након 24 недеље дијете са високим садржајем масти уочене су значајно веће концентрације IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33, IL-13 и IL-17 у хомогенату ткива јетре WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима (Слика 20А). Дуготрајна исхрана са високим садржајем масти резултирала је до значајно већом концентрацијом IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-13 у серуму WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве (Слика 20Б).

**А**

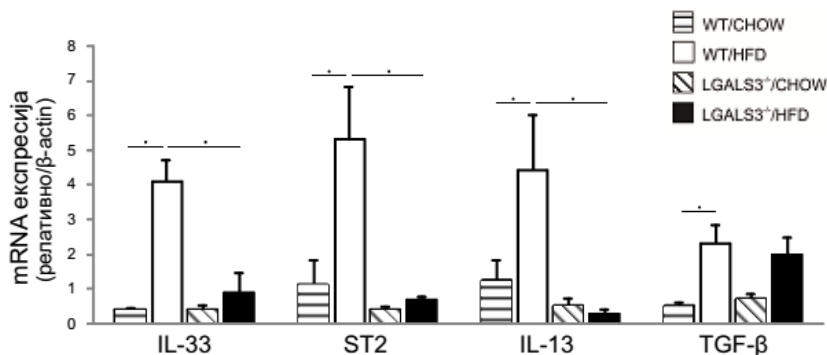


**Б**



**Слика 20.** Смањени нивои проинфламаторних и профибругених цитокина у јетри и серуму LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти. Нивои цитокина у хомогенату јетре (А) и серуму (Б), мерени су ELISA методом. Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност  $\pm$  SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

Додатно је показана статистички значајно већа експресија гена за IL-33, рецептора за IL-33 (ST2) и IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти методом ланчане полимеризације у реалном времену (Слика 21).



**Слика 21. Смањена експресија IL-33/ST2/IL-13/ у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти.** Методом ланчане полимеризације у реалном времену испитали смо експресију IL-33, рецептора за IL-33 (ST2), IL-13 и TGF-β у јетри. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију IL-33, ST2 и IL-13 у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05.

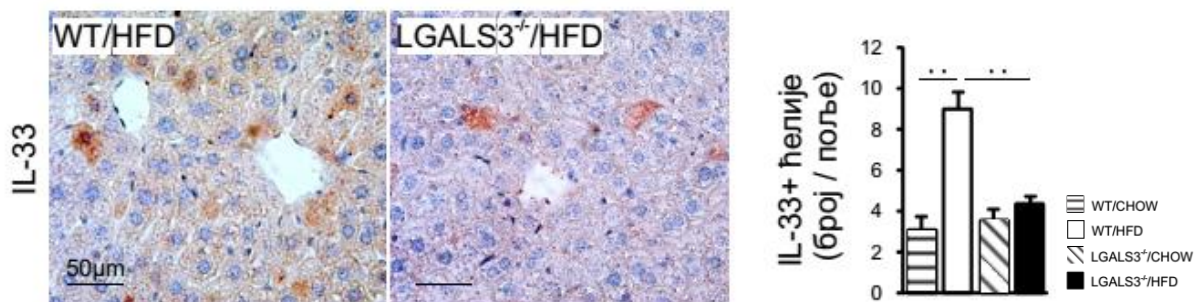
Системска, као и ткивна концентрација и експресија TGF-β, цитокина веома важног у процесу фиброгенезе, није се разликовала између два генотипа, оба на исхрани са високим садржајем масти.



#### 4.17. СМАЊЕНА ЕКСПРЕСИЈА IL-33 У ХЕПАТОЦИТИМА LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

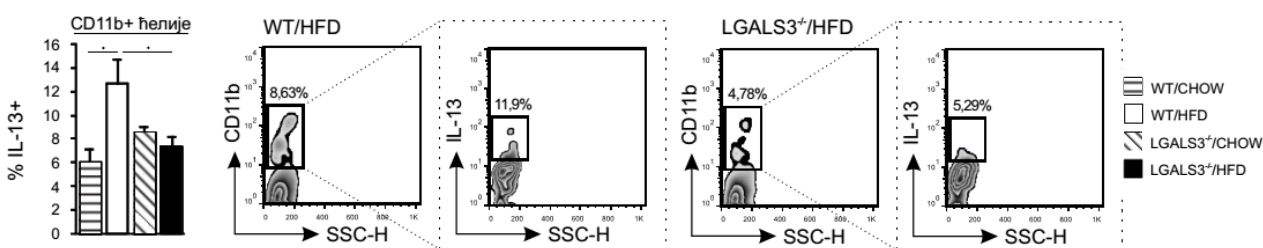
У циљу додатног испитивања улоге IL-33 у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, а на основу претходних резултата који су показали да је у ткиву јетре WT мишева након 24 недеље исхране са високим садржајем масти повећана концентрација и експресија IL-33, ST2 и IL-13 у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве, имунохистохемијски смо испитивали експресију IL-33 у ткиву јетре.

Имунохистохемијски је потврђена повећана заступљеност IL-33<sup>+</sup> хепатоцита у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 22).



**Слика 22. Повећана експресија IL-33 у јетри WT животиња на исхрани са високим садржајем масти.** Методом имунохистохемијског бојења IL-33 у јетри показана је повећана експресија овог молекула у хепатоцитима мишева на исхрани са високим садржајем масти, као и репрезентативне слике (увеличање x100). Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*\* p<0.01.

Додатно је показана статистички значајно већа процентуална заступљеност мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве након 24 недеље исхране са високим садржајем масти (Слика 23).

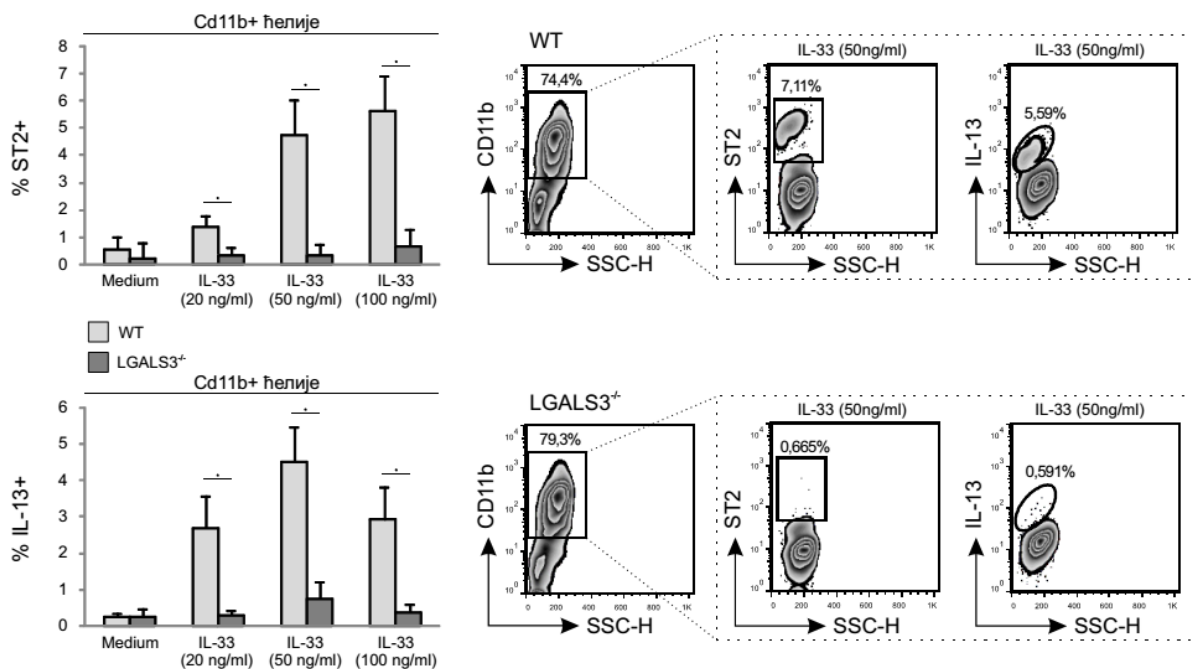


**Слика 23.** Смањена заступљеност мијелоидних ћелија које продукују IL-13 у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти. Мононуклеарне ћелије изоловане из ткива јетре анализирани су методом проточне цитометрије. Приказана је процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> мијелоидних ћелија које продукују IL-13 у мононуклеарном инфилтрату са репрезентативним плотовима. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \*p<0.05.

#### 4.18. IL-33 СТИМУЛИШЕ ПРОДУКЦИЈУ IL-13 У WT МАКРОФАГИМА *IN VITRO*

У циљу додатног испитивања механизма настанка фиброзе у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, а на основу претходних резултата који су показали да је у ткиву јетре WT мишева након 24 недеље исхране са високим садржајем масти повећана експресија IL-33 као и повећана процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13, изоловани перитонеални макрофаги су у 48-часовној култури стимулирани рекомбинантним IL-33 *in vitro*.

Одређивањем концентрације IL-13 у супернатантима, уочено је да WT макрофаги стимулирани са IL-33, продукују више IL-13 у поређењу са макрофагима LGALS3<sup>-/-</sup> мишева. Додатним испитивањем проточном цитометријом, показано је да изоловани перитонеални макрофаги WT мишева, у одговору на стимулацију са IL-33 имају повећану експресију ST2 рецептора и продукцију IL-13, у поређењу са стимулираним макрофагима LGALS3<sup>-/-</sup> мишева (Слика 24).



**Слика 24. Макрофаге изоловане из LGALS3<sup>-/-</sup> мишева продукују мање IL-13 након стимулације са IL-33 *in vivo*.** Макрофаге изоловане из перитонеалне шупљине анализирале су методом проточне цитометрије након стимулације са рекомбинантним IL-33 *in vivo*. Приказана је процентуална заступљеност CD11b<sup>+</sup> мијелоидних ћелија које експримирају ST2 рецептор и продукују IL-13 након стимулације са репрезентативним плотовима. Представљени резултати експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05.

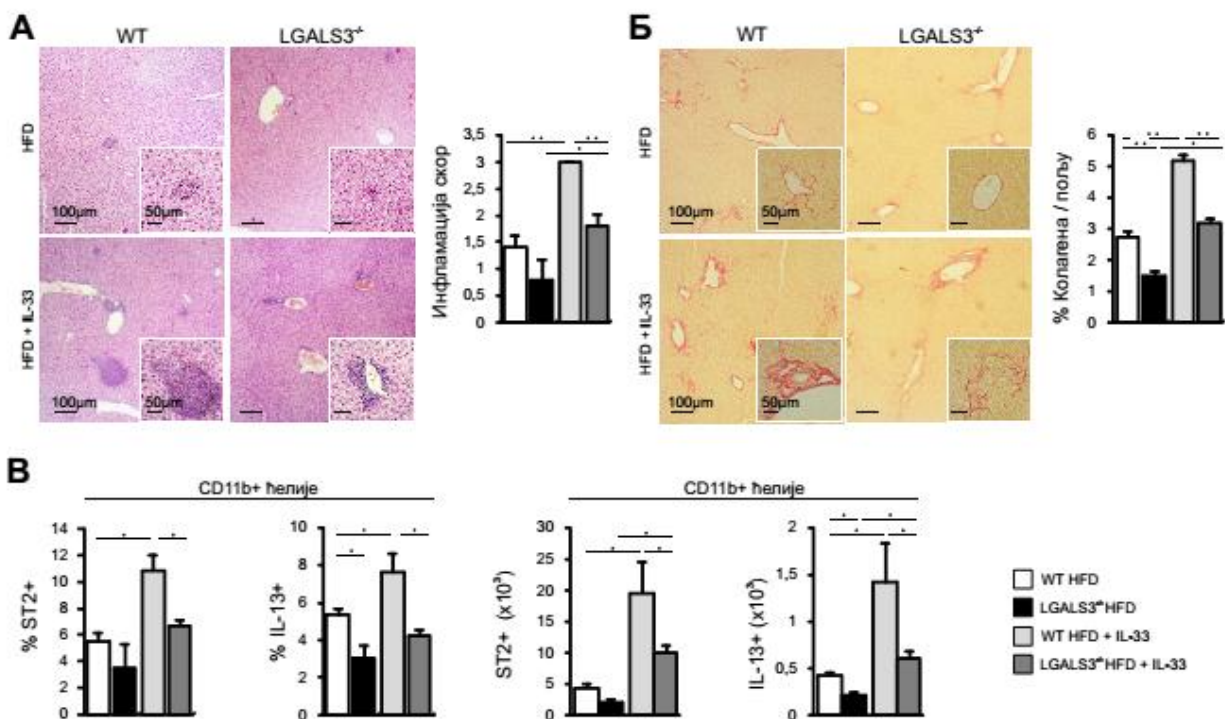
#### **4.19. LGALS3<sup>-/-</sup> МИШЕВИ НА ИСХРАНИ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ НАКОН АПЛИКАЦИЈЕ IL-33 IN VIVO ИМАЛИ СУ МАЊЕ ИЗРАЖЕНУ ФИБРОЗУ ЈЕТРЕ**

С обзиром да су изоловани перитонеални макрофаги WT мишева након стимулације са IL-33 *in vitro* имају повећану експресију ST2 рецептора и IL-13 у поређењу са стимулираним макрофагима LGALS3<sup>-/-</sup> мишева, упоредили смо ефекте интраперитонеално убризганог рекомбинантног IL-33 на развој стеатохепатитиса и фиброзе јетре у оба генотипа мишева.

Интраперитонеална апликација IL-33, животињама које су претходно биле на исхрани са високим садржајем масти, довела је до израженије инфилтрације у оба генотипа у поређењу са експерименталним животињама на стандардној исхрани. LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су статистички значајно мање изражену инфилтрацију у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 26А).

Када је у питању фиброза, мишеви оба генотипа на исхрани са високим садржајем масти имали су израженију фиброзу у односу на животиње које су биле на стандардној исхрани. Додатним испитивањем, показано је да WT мишеви, у одговору на стимулацију са IL-33 *in vivo* имају израженију фиброзу у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су били на исхрани са високим садржајем масти у трајању од 12 недеља (Слика 26Б).

Већу инфилтрацију и фиброзу, пратила је већа процентуална заступљеност као и апсолутни број мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти у трајању од 12 недеља, након интраперитонеалне апликације рекомбинантног IL-33 (Слика 26В).



Слика 25. Смањена инфилтрација и фиброза јетре LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти и акон стимулације са рекомбинантним IL-33 *in vivo*. (A) Методом хистохемијског Н&Е бојења (увеличање, x40; x100) показали смо да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мањи степен инфилтрације након стимулације са IL-33 у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. (Б) Методом селективног хистохемијског бојења колагена *Picrosirius red* (увеличање, x40; x100) показали смо да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти након стимулације са IL-33 имају мањи степен фиброзе у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране. (В) LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су мању заступљеност мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13 након стимулације са IL-33. Представљени резултати два експеримента, n=5-7 животиња по групи, средња вредност ± SE, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

## 5. ДИСКУСИЈА

Галектин-3 је члан фамилије  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и паренхимским ћелијама различитих ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације испољава своју мултифункционалност у процесима регулације инфламације која може бити уско повезана са метаболичким абнормалностима.

Основни закључак спроведеног истраживања указује на чињеницу да делеција гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности индуковане применом дијете са високим садржајем масти и поспешује депоновање масти у јетри. Упркос израженијој стеатози, галектин-3 дефицијентни мишеви имали су мање хепатоцелуларно оштећење, лобуларну инфилтрацију и депоновање екстрацелуларног матрикса у ткиву јетре. Делеција гена за галектин-3 праћена је и мањом инфилтрацијом зрелим мијелоидним дендритским и проинфламаторним моноцитно/макрофагним ћелијама у јетри и мањом секрецијом проинфламаторних цитокина. Механизам настанка инфламације у галектин-3 позитивних животиња, подразумева активацију проинфламаторних сигналних путева, NLRP3 инфламазома и продукцију IL-1 $\beta$ , који може испољити хепатотоксичан ефекат. Као последица оштећења из хепатоцита се ослобађа већа количина алармина IL-33 који је одговоран за поларизацију имунског одговора у правцу профиброгеног тип 2 одговора. Након ослобађања IL-33 повећава продукцију IL-13 у макрофагама *in vitro* и *in vivo*, цитокина који индукује настанак израженије фиброзе у галектин-3 позитивних животиња.

Сумарно, наше истраживање је показало да су галектин-3 дефицијентни мишеви на исхрани богатој мастима имали значајно увећање телесне тежине и количине висцералног масног ткива у односу на WT мишеве на истој исхрани (Слика 1, Табела 4). Додатно смо показали да су гојазни галектин-3 дефицијентни мишеви имали значајно веће вредности гликемије и серумског инсулина наше у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Табела 5). Гојазни LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви имали су веће вредности НОМА-IR индекса што указује на изражен степен инсулинске

резистенције у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране (Табела 5). Инсулинска резистенција сматра се кључним механизмом за настанак периферне липолизе и последично појачано допремање, депоновање и синтезу масних киселина и триглицерида у јетри. Израженија стеатоза у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на дуготрајној исхрани са високим садржајем масти праћена је серумском хиперлипидемијом (Табела 6) и значајно већом експресијом транслоказе CD36 и транскрипционог фактора PPAR- $\gamma$  у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране (Табела 7), указујући на повећано допремање и транспорт масних киселина у јетру. Упркос израженијој стеатози, галектин-3 дефицијентни мишеви су имали мање хепатоцелуларно оштећење (Слика 8). Мање хепатоцелуларно оштећење у галектин-3 дефицијентних мишева праћено је и мањом експресијом компоненти NADPH оксидазног система (Слика 6). Познато је да дијета са високим садржајем масти може да резултира измењеном флором у гастроинтестиналном тракту као и повећаном пропустљивошћу цревног епитела. Иако је хистолошки показано да није било разлике у инфилтрацији у дебелом цреву (Слика 7А), исхрана са високим садржајем масти довела је до повећања серумских вредности LPS-а само у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева (Слика 7Б). Упркос повећаним системским вредностима LPS-а, LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију TLR4 и CD14 у јетри у поређењу са WT животињама на истој исхрани (Слика 7В). Додатно је показано да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мањи степен лобуларне инфилтрације у поређењу са WT мишевима на истом режиму исхране (Слика 8).

У сагласности са претходно приказаним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију мононуклеарних ћелија у јетри WT животиња на исхрани са високим садржајем масти показана је повећана заступљеност зрелих дендритских ћелија (Слика 12, 13) и проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија (Слика 14, 15) као и повећана продукција проинфламаторних цитокина, укључујући продукцију IL-1 $\beta$  од стране макрофага (Слика 16) у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране. Додатно, показали смо да је продукција IL-1 $\beta$  била праћена повећаном експресијом компоненти NLRP3 инфлазома у ткиву јетре WT мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани

богатој мастима (Слика 18). Као што је претходно показано, упркос израженијој стеатози, галектин-3 дефицијентни мишеви су имали мање хепатоцелуларно оштећење, мању лобуларну инфилтрацију и последично мање депоновање екстрацелуларног матрикса тј. фиброзу (Слика 10). Мање депоновање екстрацелуларног матрикса у ткиву јетре праћено је мањом експресијом  $\alpha$ -SMA, маркера активираних стелатних ћелија, ћелија кључних када је продукција и депоновање колагена у питању (Слика 10, 11). Мање изражена фиброза јетре била је праћена и мањим ослобађањем IL-33 из оштећених хепатоцитима као и мањом продукцијом профиброгеног IL-13 од стране мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија. У циљу додатног испитивања улоге IL-33 у индукцији продукције IL-13 од стране макрофага у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, показали смо да изоловани перитонеални макрофаги WT мишева, у одговору на стимулацију са IL-33 *in vitro* имају повећану експресију ST2 рецептора и продукцију IL-13, у поређењу са стимулираним макрофагима LGALS3<sup>-/-</sup> мишева (Слика 24). Додатно смо показали да WT мишеви, у одговору на стимулацију са IL-33 *in vivo* развијају израженију фиброзу у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су били на исхрани са високим садржајем масти. Већу фиброзу у WT мишева, пратила је већа процентуална заступљеност као и апсолутни број мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које експримирају ST2 рецептор и продукују IL-13 (Слика 25). Сумарно резултати указују на то да галектин-3 игра веома важну улогу у развоју стеатохепатитиса као и у регулацији IL-33/ST2/IL-13 осовине у процесу фиброгенезе у ткиву јетре.



## 5.1. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ГОЈАЗНОСТИ, ИНФЛАМАЦИЈЕ И ИНСУЛИНСКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Гојазност је поремећај телесне композиције који настаје као последица прекомерног уноса нутритијената, а дефинише се као увећање количине висцералног адипозног ткива у организму. Улога галектина-3 у настанку гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus*-а није до краја објашњена. Наиме, показано је да гојазни болесници имају повећане серумске вредности галектина-3 и да ове вредности негативно корелирају са вредностима гликозираног хемоглобина (278). Опречно, *Okhura* и сарадници су показали да је инсулинска резистенција у склопу тип 2 *Diabetes mellitus*-а праћена ниским серумским вредностима галектина-3 (279). Код мишева, висцерално адипозно ткиво локализовано је у абдомену, превасходно у перигонадалним и периреналним депоима. Након 24 недеље исхране са високим садржајем масти уочено је да  $LGALS3^{-/-}$  мишеви имају значајно већу телесну тежину као и количину укупног висцерално масног ткива (Слика 1). У складу са овим резултатом су и подаци из новијих студија који су показали да делеција гена за галектин-3 индукује увећање масног ткива, настанак системске инфламације, инсулинске резистенције (227, 281) и убрзава настанак тип 2 *Diabetes mellitus*-а применом дијете са високим садржајем масти у трајању од 11. и 18. Недеља (227). Главне манифестације убрзаног настанка болести у  $LGALS3^{-/-}$  мишева на дијети са високим садржајем масти, огледају се у значајно већој телесној маси и количини висцералног адипозног ткива, појави хипергликемије, порасту НОМА-IR индекса, израженом инсулитису и прогресивној инфилтрацији про-инфлматорних макрофага у панкреасна острвца (227, 228). У складу са овим резултатима су и подаци из најновије студије које су документовале да аблација гена за галектин-3 индукује увећање адипозног ткива што је праћено развојем системске инфламације и инсулинске резистенције (227, 281). Праћењем параметара развоја инсулинске резистенције и тип 2 *Diabetes mellitus*-а показали смо да  $LGALS3^{-/-}$  мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају значајно веће вредности гликемије наште и инсулинемије након 24 недеље специјалног режима исхране у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране. (Табела 5). Гојазни  $LGALS3^{-/-}$  мишеви имају веће вредности НОМА-IR индекса

инсулинске резистенције у поређењу са WT животињама на истој исхрани (Табела 5). Додатно је показано да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на стандардној исхрани имају веће вредности гликемије наше, инсулинемије наше и НОМА-IR индекса у поређењу са WT животињама на стандардној исхрани (Табела 5), што указује на протективну улогу галектина-3, независно од развоја системске инфламације.

Хронична инфламација ниског степена у висцералном масном ткиву игра веома важну улогу у настанку гојазности (228). Значајан допринос разумевању настанка инфламације у висцералном масном ткиву дала су истраживања која су указала на важну улогу ћелија урођене имуности у прогресији гојазности и патогенези настанка компликација индукованих гојазношћу. Тако је иницијално указано на значај инфилтрације, локализације и функционалне хетерогености макрофага у настанку инфламације у склопу гојазности (303). Додатно је показано да важну улогу у уотпочињању и прогресији инфламације у висцералном масном ткиву могу имати дендритичне ћелије које индукују миграцију проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија (176). Наши резултати су показали да су LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви који су били на дијети са високим садржајем масти имали повећану заступљеност дендритичних ћелија и проинфламаторних макрофага у односу на WT мишеве након 24 недеље на исхрани богатој мастима (Слика 2). Новија истраживања истичу улогу Т лимфоцита у започињању инфламаторне каскаде у висцералном масном ткиву, превасходно продукцијом цитокина и модулацијом активације и функције макрофага (304). Такође је показано да у висцералном масном ткиву расте проценат Т лимфоцита и NKT ћелија које продукују IFN- $\gamma$  након 11. недеља исхране са високим садржајем масти (227). Дуготрајна исхрана са високим садржајем масти у нашем моделу индуковала је пораст количине масног ткива што је било праћено и већом заступљеношћу укупних лимфоцита у односу на експерименталне животиње које су биле на стандардној исхрани (Слика 3). Додатно, показали смо да је однос CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> лимфоцита био статистички значајно већи у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти.

Поремећаји у метаболизму и транспорту липида, који за последицу имају настанак хиперлипидемије уско су повезани са гојазношћу и инсулинском резистенцијом (85). Инсулинска резистенција сматра се кључним механизмом за настанак периферне липолизе и појачано допремање и синтезу масних киселина и триглицерида у јетри (72). Анализом липидног статуса експерименталних животиња на дуготрајној масној исхрани показали смо да је концентрација укупног холестерола и триглицерида у серуму била значајно већа код мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3 у поређењу са мишевима дивљег соја на истом режиму исхране (Табела 6).

Један од могућих механизма протективног ефекта галектина-3 у гојазности и метаболичким абнормалностима везан је за његову функцију рецептора чистача. Наиме, галектин-3 учествује у деградацији и уклањању AGE и ALE из циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита (227, 282).

## **5.2 УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ СТЕАТОЗЕ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Основна хистолошка карактеристика неалкохолне масне болести јетре садржана је у самом називу болести и карактерише је масна инфилтрација хепатоцита, односно стеатоза. Стеатоза јетре може се манифестовати као присуство микро- или макровезикула масти у хепатоцитима. Повећано депоновање масти у јетри може бити последица постојања неравнотеже између допремања и транспорта слободних масних киселина и синтезе масних киселина и триглицерида у јетри. Повећано допремање масних киселина може бити последица повећаног уноса путем хране или повећаног ослобађања од стране масног ткива које настаје као последица инсулинске резистенције (8, 9).

Узимајући у обзир значајну улогу галектина-3 у метаболичким абнормалностима, као и његове значајне улоге у регулацији имунског одговора и процеса фиброзе, испитана је експресија овог молекула у јетри WT животиња у зависности од исхране. Уочено је да храна са високим садржајем масти индукује повећану експресију галектина-3 у јетри у поређењу са стандардном исхраном. Повећана експресија галектина-3 није детектована у

хепатоцитима, већ у инфилтришућим ћелијама које по морфологији и локализацији одговарају макрофагама (Слика 4).

Исхрана са високим садржајем масти довела је до масне инфилтрације јетре у оба генотипа у поређењу са експерименталним животињама на стандардној исхрани (Слика 5), што је било у сагласности са претходним резултатима (292, 293). Галектин-3 дефицијентни мишеви имали су статистички значајно израженију стеатозу у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти, што је било у сагласности са резултатом који је добијен када је коришћена CDAА дијета (292). Додатно, у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти доминантно је била присутна макровезикуларна стеатоза док је код WT мишева преовладава микровезикуларна стеатоза (Слика 5), што је резултат супротан добијеном када су животиње храњене атерогеном дијетом (293).

С обзиром да масна инфилтрација јетре може бити последица различитих поремећаја у транспорту, синтези и метаболизму липида у јетри, испитали смо експресију гена важних у метаболичким процесима. Наше истраживање је показало да је израженија стеатоза у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на исхрани са високим садржајем масти праћена значајно већом експресијом PPAR- $\gamma$ , CD36 као и ензима задуженог за де ново синтезу масних киселина FAS, у поређењу са WT животињама на истом режиму исхране (Табела 7). У сагласности са нашим добијеним резултатом, показано је да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви који су били на исхрани атерогеном дијетом имају експресију PPAR- $\gamma$  (293). Транскрипционог фактора PPAR- $\gamma$  промовише депоновање циркулишућих масних киселина повећавајући експресију транслоказе CD36 (304). Повећана експресија PPAR- $\gamma$  и транспортера масних киселина CD36 у одсуству галектина-3 сугерише да је израженија стеатоза у јетри LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у нашем моделу пре последица повећаног транспорта и депоновања него процеса де ново синтезе.

### **5.3. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ХЕПАТОЦЕЛУЛАРНОГ ОШТЕЋЕЊА У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Иако депоновање масти у јетри представља бенигни поремећај, масно измењени хепатоцити постају осетљиви на настанак оштећења и последични развој запаљенске реакције, инфилтрације паренхима јетре и настанка стеатохепатитиса (10). Поред стеатозе, кључне хистолошке компоненте неопходне за дијагнозу стеатохепатитиса су и хепатоцелуларно оштећење праћено лобуларном инфилтрацијом. Оштећење хепатоцита манифестује се присуством балонираних хепатоцита и порастом серумске активности јетриних ензима. Иако су имали изаженију стеатозу LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мање хепатоцелуларно оштећење уз мање присуство балонираних хепатоцита (Слика 8) што је у сагласностима са резултатом добијеним коришћењем галектин-3 дефицијентних мишева и атерогене дијете (293).

Новији радови показују, да за разлику од бенигне непрогресивне масне инфилтрације, стеатозу у сколопу NASH-а карактерише депоновање засићених масних киселина, холестерола и церамида који остварују липотоксични ефекат (11-13). Механизам којим засићене масне киселине доводе до настанка оштећења подразумева настанак реактивних облика кисеоника, који могу директно или индиректно да индукују настанак оштећења.

Оксидативни стрес, као последица  $\beta$ -оксидације масних киселина и стварање хепатотоксичних ROS, један је од претпостављених механизма прогресије стеатозе у правцу настанка стеатохепатитиса (113, 114). Реактивни облици кисеоника могу настати у митохондријама као последица оксидативне фосфорилације (16), затим могу бити последица активације оксидативних ензима у склопу стреса ендоплазматског ретикулума (17), а могу бити продуковани од стране инфламаторних ћелија у којима је активиран NADPH оксидазни систем (18, 19). С обзиром да активирани макрофаге продукују реактивне облике кисеоника посредством активације NADPH оксидазне каскаде испитали смо експресију компоненти овог ензимског система у јетри. Добијени

резултати су показали да је исхрана са високим садржајем масти резултирала повећаном експресијом компоненти NADPH оксидазног система у јетри у поређењу са стандардном исхраном, као и у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве који су били на истом режиму исхране тј. дијети са високим садржајем масти (Слика 6). Нижа експресија компоненти NADPH оксидазног система у јетри одсуству галектина-3 сугерише да је галектин-3 веома важан у настанку оксидативног стреса, хепатоцелуларног оштећења и настанка запаљенске реакције (305).

Механизам настанка оштећења и инфламације подразумева и активацију TLRs експримираних на хепатоцитима и ћелијама урођеног имунског система. Показано је да активација TLRs посредством FFA или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, доводи до активације NFκB посредованих проинфламаторних сигналних путева и настанка хепатоцелуларног оштећења (111, 112). С обзиром да дијета са високим садржајем масти може бити индукована измењеном флором гастроинтестиналног тракта и повећаном пропустљивошћу цревног епитела, испитали смо присуство инфламације у дебелом цреву као и системске вредности LPS-а. Додатно, активација TLR4 рецептора посредством LPS-а игра веома важну улогу у патогенези настанка оштећења и инфламације у јетри због директне изложености ендотоксину пореклом из гастроинтестиналног тракта. Поред тога, новији подаци показују да галектин-3 може имати важну улогу у одржавању хомеостазе у цревном тракту пошто овај анимални лектин експримиран на дендритичним ћелијама у присуству дектина 1 и FcγRIIB везује муцин 2 и индукује толеранцију (306). Иако је хистолошки показано да није било разлике у инфилтрацији у дебелом цреву (Слика 7А), исхрана са високим садржајем масти довела је до повећања серумских вредности LPS-а само у LGALS3<sup>-/-</sup> мишева у поређењу са животињама на стандардној исхрани, као и у односу на WT мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 7Б). Упркос повећаним системским вредностима LPS-а, LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имали су мању експресију TLR4 и CD14 у јетри у поређењу са WT животињама на истој исхрани (Слика 7В). Нижа експресија TLR4 и CD14 у јетри упркос порасту серумских вредности LPS-а у одсуству галектина-3 импликује веома важну регулаторну улогу овог молекула у LPS-TLR4 интеракцији. У сагласности са нашим резултатом је и податак да је атерогена

дијета индуковала пораст експресије TLR4 у галектин-3 позитивних животиња у односу на стандардну исхрану (293).

#### **5.4. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ИНФЛАМАЦИЈЕ ЈЕТРИ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА**

Стеатохепатитис, за разлику од једноставне стеатозе, карактерише присуство некроинфламаторне компоненте. Поред тога, лобуларна инфилтрација је неопходна да би се поставила дијагноза NASH-а. Наши резултати су показали да LGALS3<sup>-/-</sup> мишеви на исхрани са високим садржајем масти имају мање хепатоцелуларно оштећење у поређењу са WT мишевима на истој исхрани (Слика 8). Пораст активности АСТ-а и АЛТ-а изнад референтних вредности може указати на обољење јетре. Дакле, због чињенице да је пораст активности оба ензима у серуму сигуран показатељ оштећења хепатоцита, у нашем истраживању смо мерили нивое АСТ-а и АЛТ-а у серуму мишева на стандардној и исхрани са високим садржајем масти. Уочили смо да су након 24 недеље исхрана са високим садржајем масти серумске вредности АСТ и АЛТ трансаминаза статистички значајно ниже у галектин-3 дефицијентних мишева. Мање оштећење паренхима ткива јетре у одсуству галектина-3 праћено је нижом серумском активношћу трансаминаза АСТ и АЛТ које су важан лабораторијски параметар који указује на оштећење. Делеција галектина-3 резултирала је мањим оштећењем хепатоцита што се манифестује мањим бројем балонираних хепатоцита (Слика 8). Резултати нашег истраживања сугеришу на веома важну улогу галектина-3 у настанку хепатоцелуларног оштећења, инфламације и лобуларне инфилтрације. Наиме показано је да се елиминацијом галектина-3 смањује ацетаминофеном индуковано оштећење јетре што је праћено мањом експресијом гена за проинфламаторне протеине (307).

Неколико механизма објашњава оштећењем индуковану активацију проинфламаторних сигналних путева у јетри и настанак лобуларне инфилтрације. Веома важну улогу у патогенези настанка стеатохепатитиса на пољу стеатозе игра активација урођеног имунског одговора. Имуни систем може бити активиран како посредством РAMPs ослобођених из гастроинтестиналног тракта, тако и продукцијом DAMPs од стране оштећених ћелија (158). Иако све ћелијске популације, како

паренхимске, тако и непаренхимске, играју улогу у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре, опште је прихваћено да је инфламација посредована активацијом урођених имунских механизма, пре свега дендритичних и моноцитно/макрофагних ћелија (159, 308, 309).

Као што је већ поменуто значајан допринос разумевању настанка и прогресије NASH-а на пољу стеатозе, дала су истраживања која су указала на важну улогу ћелија урођене имуности (158, 159). Тако је иницијално указано на кључни значај инфилтрације, локализације и функционалне хетерогености дендритских ћелија и макрофага у процесу настанка инфламације током развоја стеатохепатитиса на пољу стеатозе (163, 308-310).

Дендритичне ћелије, професионалне антиген презентујуће ћелије, присутне су у многим ткивима и органима, укључујући и јетру. У јетри су локализоване у синусоидалним просторима и чине око 1% непаренхимских ћелија (310). Резидентне дендритичне ћелије чине део ретикулоендотелног система поред синусоидалних ендотелних ћелија и Купферових ћелија (311). Дендритичне ћелије имају велики миграторни капацитет, а показано је и да могу да диферентују из циркулишућих моноцита (312). С обзиром да улога дендритичних ћелија у развоју стеатохепатитиса није до краја разјашњена, испитивали смо фенотипске и функционалне карактеристике ових ћелија у ткиву јетре. Исхрана са повећаним садржајем масти након 24 недеље довела је до пораста броја укупних дендритских ћелија као и пораста експресије костимулаторних молекула у односу на мишеве истог генотипа на стандардној исхрани, као и у поређењу са мишевима којима је циљаном генецијом уклоњен ген за галектин-3 а који су били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 12А). Већа заступљеност дендритичних ћелија у WT мишева на исхрани богатој мастима последица је веће процентуалне заступљености мијелоидних док су лимфоидне дендритске ћелије биле ниже у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на истој исхрани (Слика 12Б). Додатно је показано да су присутне мијелоидне дендритичне ћелије у WT животиња на исхрани богатој мастима показивале зрели матурациони статус, имале су повећану експресију МНС молекула II класе, као и костимулаторних молекула (Слика 13). Додатно смо показали да у костној сржи и периферној крви WT мишева постоји повећана



процентуална заступљеност и апсолутни број зрелих дендритичних ћелија у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на истом режиму исхране (Слика 19). Сумарно, резултати нашег истраживања су показали да у одсуству галектина-3 мања заступљеност дендритичних ћелија у ткиву јетре, праћена је нижом експресијом МНС молекула II класе и костимулаторних молекула. Додатно смо показали да је у одсуству галектина-3 смањена миграторна способност дендритичних ћелија, сугеришући важну улогу галектина-3 у пролиферацији и активацију дендритичних ћелија.

У патогенези стеатохепатитиса веома важну улогу играју мијелоидне ћелије, хетерогена популација ћелија пореклом из костне сржи. Повећан број мијелоидних ћелија у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти био је праћен повећаном процентуалном заступљеношћу проинфламаторних моноцита/макрофага у пређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 14). Један од најважнијих хемокина у миграцији макрофага у ткиво јетре, CCL2 се везује за хемокински рецептор CCR2 на макрофагима (165). Показано је да делеција односно фармаколошка инхибиција гена за CCL2 или CCR2 смањује инфилтрацију макрофага у ткиво јетре, редукује параметре инфламације и смањује хронично хепатоцелуларно оштећење (166). Повећано присуство проинфламаторних моноцита праћено је повећаном експресијом CCL2 у ткиву јетре WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 15). У сагласности са претходним резултатима показали смо повећан број мијелоидних ћелија у костној сржи и периферној крви WT мишева на исхрани са високим садржајем масти. Повећано присуство проинфламаторних CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> моноцита у периферној крви WT мишева праћено је повећаном експресијом CCR2 на овим ћелијама у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 19). Дакле, у одсуству галектина-3 смањена је процентуална заступљеност као и апсолутни број проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија које на својој површини експримирају CCR2 молекулу, указујући на важну улогу CCL2-CCR2 интеракције у процесу активације и миграције ових ћелија у ткиво јетре.

Макрофаги су веома хетерогена популација ћелија, а у зависности од ткивне микросредине могу да испоље различите фенотипске и функционалне карактеристике (168). Наиме, у анималном моделу дијетом индукованог стеатохепатитиса као и код

оболелих који развију стеатохепатитис показано је да су макрофагне ћелије прве ћелије које се активирају у одговору на оштећење хепатоцита (308, 313). Продукуцијом проинфламаторних цитокина и хемокина привлаче моноците из циркулације који инфилтришу ткиво јетре и пролиферишу. Активација и поларизација макрофага у правцу про-инфламаторног M1 фенотипа игра веома важну улогу у настанку стеатохепатитиса и прогресији болести како код људи тако и код експерименталних животиња (169, 170). Неколико проинфламаторних цитокина, а пре свих IL-1 $\beta$  продукован од стране макрофага, је укључено у процес настанка стеатохепатитиса и фиброзе јетре (171). Процентуална заступљеност M1 макрофага била је значајно већа у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој дијети. Насупрот томе, процентуална заступљеност алтернативно активираних M2 макрофага, фенотипа дефинисаног као антиинфламаторног, била је значајно редукована у јетри WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 17). Резултати нашег истраживања су показали да у одсуству галектина-3 смањена класична активација макрофага, указујући на важну улогу овог анималног лектина у процесу активације, пролиферације и миграције проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија.

С обзиром да троструко позитивне макрофаге (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) играју веома важну улогу у патогенези инфламације у метаболички активним ткивима као што је висцерално адипозно ткиво и јетра, испитали смо процентуалну заступљеност ових ћелија у ткиву јетре (176). Уочено је да дијета са високим садржајем масти значајно утиче на инфилтрацију троструко позитивних проинфламаторних макрофага у WT животиња на исхрани са високим садржајем масти као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани са високим садржајем масти (Слика 16). Додатно је имунохистохемијски показана повећана заступљеност CD68<sup>+</sup> проинфламаторних макрофага у у WT животиња у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим садржајем масти (Слика 9), макрофага за које је познато да су важни у настанку стеатохепатитиса и цирозе (314). Резултати које смо показали у нашем истраживању

указују на важну улогу галектина-3 у диферентовању моноцитно/макрофагних ћелија у правцу проинфламаторног фенотипа.

У складу са претходно добијеним резултатима који указују на значајно већу инфилтрацију проинфламаторним макрофагама у ткиву јетре WT мишева на исхрани богатој мастима, и студијама које су показале да продукција IL-1 $\beta$  игра веома важну улогу у патогенези неалкохолног стеатохепатитиса, испитали смо продукују IL-1 $\beta$  у макрофагама (152, 198). Процент селекованих F4/80<sup>+</sup> макрофага који продукују IL-1 $\beta$  је био значајно већи у групи WT мишева на исхрани богатој мастима у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> на истој врсти дијете (Слика 16). Додатно, показали смо да је продукција IL-1 $\beta$  била праћена повећаном експресијом компоненти NLRP3 инфлазома у ткиву јетре WT мишева на исхрани богатој мастима у поређењу са мишевима истог генотипа на стандардној исхрани као и у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су такође били на исхрани богатој мастима (Слика 18). Сprovedено истраживање је показало да је у одсуству галектина-3 смањена активација NLRP3 инфлазома у ткиву јетре и следствене активације каспазе-1 и продукције IL-1 $\beta$ , указујући на потенцијални механизам прогресије у правцу развоја стеатохепатитиса у одговору на настало оштећење хепатоцита.

Различита галектином-3 посредована регулација процеса инфламације у јетри у односу на висцерално масно ткиво, може се објаснити различитом експресијом рецептора за AGE у овим метаболичким ткивима (285).

## 5.5. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА ПРОДУКЦИЈУ ЦИТОКИНА У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

С обзиром да локална продукција цитокина, као и њихов системски ефекат, играју веома важну улогу у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре, нивои проинфламаторних и профиброгенних цитокина испитивани су мерењем у хомогенату ткива јетре и серуму након 24 недеље исхране са високим садржајем масти.

У ткиву јетре WT мишева на дијете са високим садржајем масти уочене су значајно веће концентрације IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33, IL-13 и IL-17 у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истом режиму исхране. Системске вредности цитокина, показале су да у серуму WT мишева постоје значајно веће концентрације IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-13 у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве, оба генотипа на исхрани са високим садржајем масти (Слика 20).

У сагласности са претходно добијеним резултатима смањене продукције IL-1 $\beta$  од стране макрофага, која је била праћена и нижом експресијом компоненти NLRP3 инфламазома у ткиву јетре, галектин-3 дефицијентни мишеви су имали ниже ткивне као и серумске вредности интерлеукина-1 $\beta$ . Новији радови показују да снажан проинфламаторни одговор у ткиву јетре може довести до оштећења хепатоцита који ослобађају алармин IL-33 који потом може индуковати антитинфламаторни одговор (315). Претпостављени механизам је у сагласности са резултатима нашег истраживања који су показали да се у ткиву јетре галектин-3 позитивних животиња налазе значајно веће концентрације IL-33.

Додатно је показана статистички значајно већа експресија гена за IL-33, рецептора за IL-33 и IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти методом ланчане полимеризације у реалном времену (Слика 21). Системска, као и ткивна концентрација и експресија TGF- $\beta$  није се разликовала између два генотипа, оба на исхрани са високим садржајем масти.

## 5.6. УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 НА РАЗВОЈ ИЛ-33/ИЛ-13 ПОСРЕДОВАНЕ ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У МИШЕВА НА ДУГОТРАЈНОЈ ИСХРАНИ БОГАТОЈ МАСТИМА

Иако присуство фиброзе није неопходно да би се поставила дијагноза стеатохепатитиса, показано је да фиброза значајно корелира са настанком компликација болести. Кључне ћелије у процесу стварања колагена и депоновању екстрацелуларног матрикса су миофибробласти, ћелије које најчешће настају активацијом резидентних стелатних ћелија.

Исхрана са високим садржајем масти довела је до израженије фиброзе јетре у мишева са делецијом гена за галектин-3 у односу на WT мишеве (Слика 10). Додатно, у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти процес фиброгенезе био је израженији са депоновањем екстрацелуларног матрикса између портних простора (енгл. *bridging fibrosis*), што није детектовано код LGALS3<sup>-/-</sup> мишева на истом режиму исхране. С обзиром да су кључне ћелије у депоновању екстрацелуларног матрикса активирани миофибробласти који експримирају  $\alpha$ -SMA, имунохистохемијски и методом ланчане полимеризације је потврђена повећана експресија гена и  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> ћелија у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 11). Резултати нашег истраживања су у сагласности са претходно приказаном значајном улогом галектина-3 у процесу фиброгенезе у бројним ткивима и органима (316).

С обзиром да је у ткиву јетре WT мишева на исхрани са високим садржајем масти детектована повећана концентрација профиброгених ИЛ-33 и ИЛ-13 (Слика 20), у циљу додатног испитивања улоге ИЛ-33 у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, имунохистохемијски смо испитивали експресију ИЛ-33 у ткиву јетре. Уочена је повећана заступљеност ИЛ-33 позитивних хепатоцита у WT мишева на исхрани са високим садржајем масти у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на истој исхрани (Слика 22). Познато је да ИЛ-33 може бити алармин, ослобођен из оштећених ћелија (316). Већа експресија ИЛ-33 у хепатоцитима је била у корелацији са већим хепатоцелуларним оштећењем код WT мишева у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима на исхрани са високим

садржајем масти. Резултати нашег истраживања су показали је у одсуству галектина-3 мање хепатоцелуларно оштећење праћено мањом експресијом IL-33 у хепатоцитима указујући на потенцијални механизам прогресије стеатохепатитиса у правцу развоја фиброзе јетре.

Новија истраживања показују да IL-33 може стимулирати алтернативну активацију макрофага (173), као и да продукција IL-13 игра веома важну улогу у развоју фиброзе јетре (35). Постоје опречни ставови о улози галектина-3 у алтернативној активацији макрофага. Наши као и недавно објављени резултати показују да је делеција гена за галектина-3 супримира инфламацију у јетри и индуковала алтернативну активацију макрофага (293). Сматрамо да је поред експресије галектина-3, микросредина инфламиране јетре, односно локална продукција цитокина одговорна за стимулацију алтернативне активације макрофага. IL-13 игра веома важну улогу у процесу фиброзе и депоновања екстрацелуларног матрикса. Наиме показано је да IL-13 остварује свој профиброгени ефекат у јетри дејством на HSCs, повећавајући експресију  $\alpha$ -SMA, колагена и TGF- $\beta$  (207). Иако IL-13 посредована фиброгенеза најчешће подразумева стимулацију продукције TGF- $\beta$ , показано је да стимулацију HSC може да оствари директно (36). У сагласности са претходно добијеним резултатима који су показали веће нивое IL-13 у хомогенату ткива јетре галектин-3 позитивних животиња, методом проточне цитометрије смо испитали експресију IL-13, и уочена је статистички значајно већа процентуална заступљеност мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти. Наше истраживање је по први пут показало да галектин-3 игра веома важну улогу у новоописаном IL-33/IL-13 сигналном путу у процесу депоновања екстрацелуларног матрикса тј процесу фиброгенезе.

У циљу додатног испитивања механизма настанка фиброзе у односу на генотипске разлике експерименталних животиња, изоловани перитонеални макрофаги из оба генотипа мишева су у култури стимулирани рекомбинантним IL-33 *in vitro*. Испитивањем проточном цитометријом, показано је да изоловани перитонеални макрофаги WT мишева, у одговору на стимулацију са IL-33 имају повећану експресију ST2 рецептора и продукцију IL-13, у поређењу са стимулираним макрофагима LGALS3<sup>-/-</sup>

мишева (Слика 24). Индукција експресије ST2 рецептора након стимулације рекомбинантним IL-33 указује на потенцијални механизам и улогу галектина-3 у алтернативној активацији перитонеалних макрофага и следствене продукције профиброгеног интерлеукина 13.

У сагласности са добијеним резултатом, упоредили смо ефекте интраперитонеално убризганог рекомбинантног IL-33 *in vivo* на развој фиброзе јетре у оба генотипа мишева. Показали смо да WT мишеви, у одговору на стимулацију са IL-33 *in vivo* имају израженију фиброзу у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима који су били на исхрани са високим садржајем масти у трајању од 12 недеља. Већу фиброзу, пратила је већа процентуална заступљеност као и апсолутни број мијелоидних CD11b<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13 у WT мишева у односу на LGALS3<sup>-/-</sup> мишеве на исхрани са високим садржајем масти (Слика 25). На основу добијених резултата показали смо да је мањи степен фиброзе јетре у одсуству галектина-3 праћен је мањом експресијом ST2 као и мањом продукцијом IL-13 у CD11b<sup>+</sup> макрофагама након апликације рекомбинантног IL-33 *in vivo*.

## 6. ЗАКЉУЧАК

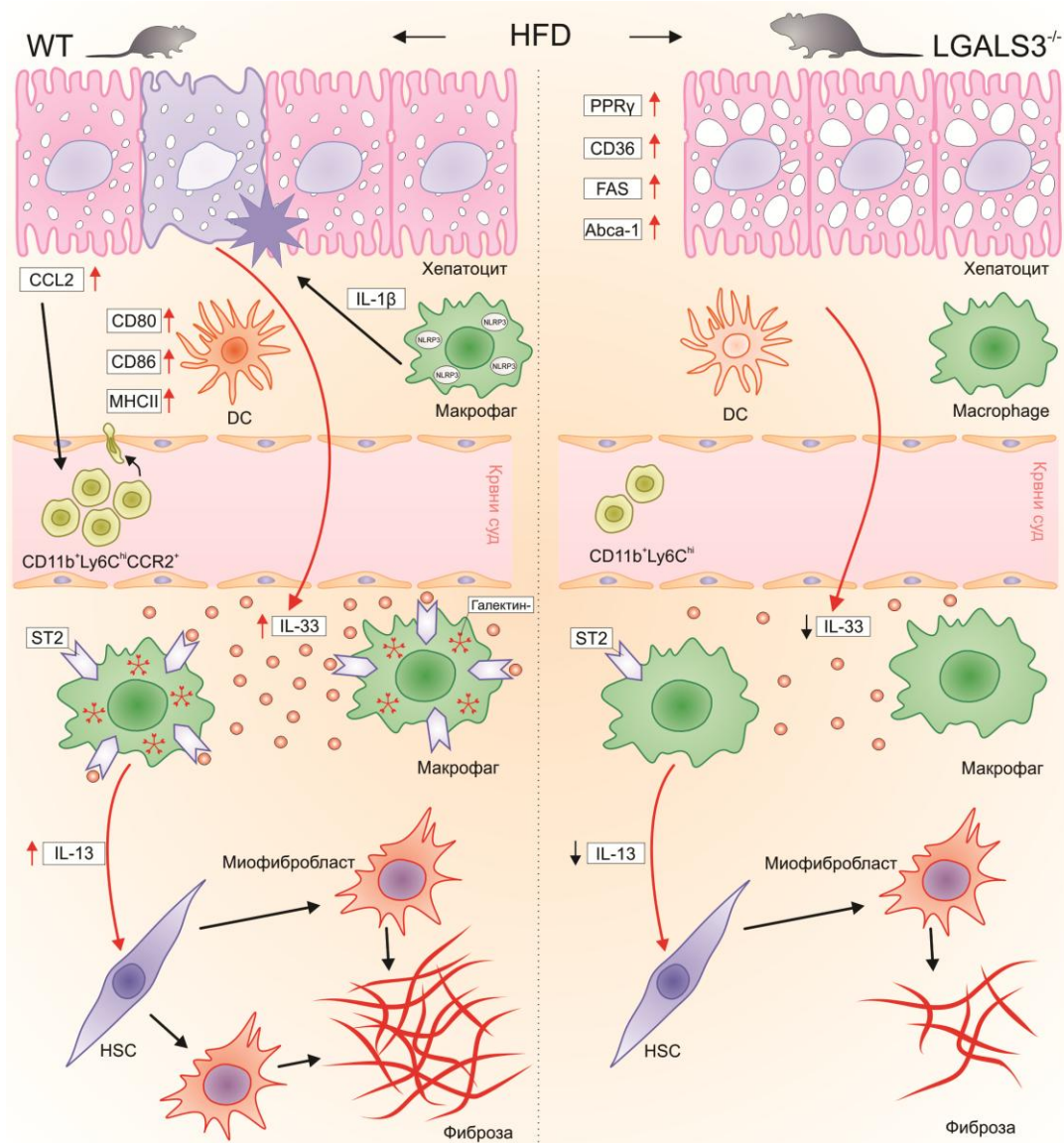
Делација гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности и тип 2 *Diabetes mellitus-a* у мишијем моделу гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и праћена је израженијим депоновањем масти у јетри. Упркос израженијој стеатози, галектин-3 дефицијентни мишеви имали су мање хепатоцелуларно оштећење и лобуларну инфилтрацију. Делација гена за галектин-3 праћена је мањом инфилтрацијом зрелим дендритским ћелијама и проинфламаторних моноцита/макрофага у јетри и мањом секрецијом проинфламаторних цитокина. Механизам настанка оштећења у галектин-3 позитивних животиња, подразумева активацију NLRP3 инфлазома и продукцију IL-1 $\beta$  и активацију проинфламаторних сигналних путева. Као последица оштећења хепатоцита ослобађа се већа количина алармина IL-33 који је одговоран за поларизацију имунског одговора у правцу алтернативне активације макрофага и профиброгеног тип 2 одговора. Након ослобађања IL-33 повећава експресију ST2 и продукцију IL-13 у макрофагама, који индукује појачано депоновање екстрацелуларног матрикса и настанак израженије фиброзе у галектин-3 позитивних животиња (схема 6).

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Галектин-3 дефицијентни мишеви на дуготрајној дијети са високим садржајем масти убрзано развијају гојазност, хиперлипидемију и масну инфилтрацију у јетри
2. Галектин-3 дефицијентни мишеви на дуготрајној дијети са високим садржајем масти развијају стеатозу која је праћена повећаном експресијом гена задужених за транспорт и синтезу масних киселина
3. Галектин-3 дефицијентни мишеви упркос израженијој стеатози имају мање хепатоцелуларно оштећење и лобуларну инфилтрацију
4. Мање оштећење хепатоцита у галектин-3 дефицијентних мишева праћено је мањом продукцијом реактивних облика кисеоника
5. Мања инфилтрација у галектин-3 дефицијентних мишева, праћена је мањом заступљеношћу зрелих дендритских ћелија као и проинфламаторних моноцитно/макрофагних ћелија



6. Делеција гена за галектин-3 утиче на смањену експресију NLRP3 инфламазома, каспазе-1 и IL-1 $\beta$  у јетри, као и смањену продукцију IL-1 $\beta$  у макрофагама у јетри мишева на дуготрајној исхрани са високим садржајем масти
7. Галектин-3 дефицијентни мишеви имају мање изражену фиброзу која је праћена мањом експресијом колагена и мањом активацијом хепатичних стелатних ћелија
8. Мање хепатоцелуларно оштећење у галектин-3 дефицијентних мишева праћено је мањим ослобађањем профиброгеног IL-33
9. Перитонеални макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева у одговору на стимулацију IL-33 *in vitro* продукују мање IL-13
10. Мањи степен фиброзе јетре у галектин-3 дефицијентних мишева праћен је мањом експресијом ST2 као и мањом продукцијом IL-13 у CD11b<sup>+</sup> макрофагама након апликације рекомбинантног IL-33 *in vivo*



**Схема 6. Улога галектина 3 у развоју неалкохолног стеатохепатитиса и фиброзе јетре.** Делација гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности индуковане исхраном са високим садржајем масти и праћена је израженијом масном инфилтрацијом у јетри. Упркос израженијој стеатози, галектин-3 дефицијентни мишеви имали су мање хепатоцелуларно оштећење. Делација гена за галектин-3 праћена је и мањом инфилтрацијом зрелим дендритским ћелијама и проинфламаторних моноцита/макрофага у јетри и мањом секрецијом проинфламаторних цитокина. Механизам настанка инфламације у галектин-3 позитивних животиња, подразумева активацију NLRP3 инфлазома и продукцију IL-1 $\beta$  и активацију проинфламаторних сигналних путева. Као последица оштећења хепатоцита ослобађа се већа количина алармина IL-33 који је одговоран за поларизацију имунског одговора у правцу профиброгеног тип 2 одговора. Након ослобађања IL-33 повећава продукцију IL-13 у макрофагама *in vitro* и *in vivo*, који индукује настанак израженије фиброзе у галектин-3 позитивних животиња.

## СКРАЋЕНИЦЕ

ACC	ацетил коензим А карбоксилаза (енгл. <i>acetyl-CoA carboxylase</i> )
AGE	крајњи продукти гликозилације протеина (енгл. <i>advanced glycation endproducts</i> )
ALE	крајњи продукти гликозилације протеина (енгл. <i>advanced lipoxidation endproducts</i> )
ASC	енгл. <i>apoptotic speck protein</i>
Bcl-2	енгл. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCP	1-бромо-3-хлоропропан (енгл. <i>1-bromo-3-chloropropane</i> )
BSA	албумин телећег серума (енгл. <i>bovine serum albumin</i> )
CARD	енгл. <i>caspase recruitment and activation domain</i>
CCL2	енгл. <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCR2	енгл. <i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CD	енгл. <i>cluster of differentiation</i>
CDAА	холин дефицијентна дијета (енгл. <i>choline-deficient amino acid-defined</i> )
cDNA	комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>complementary DNA</i> )
CHOW	енгл. <i>standard-fat diet</i>
CHREBP	енгл. <i>carbohydrate response element binding protein</i>
CPT	карнитин палмитоил трансфераза (енгл. <i>carnitine palmitoyl-transferse</i> )
CRD	домен за препознавање угљених хидрата (енгл. <i>carbohydrate recognition domain</i> )

CT	енгл. <i>cycle treshold</i>
DAMPs	молекуларни обрасци оштећених ћелија (енгл. <i>danger-associated molecular pattern molecules</i> )
DCs	дендритичне ћелије (енгл. <i>dendritic cells</i> )
DGAT	диацилглицерол ацилтрансфераза (енгл. <i>diacylglycerol acyltransferase</i> )
DMEM	енгл. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMT2	шећерна болест тип 2 (енгл. <i>diabetes mellitus type 2</i> )
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ECM	екстрацелуларни матрикс (енгл. <i>extracellular matrix</i> )
EMT	епително мезенхимна транзиција (енгл. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
FAS	енгл. <i>fatty acyl synthase</i>
FAs	масне киселина (енгл. <i>free faty acids</i> )
FBS	фетални телећи серум (енгл. <i>fetal bovine serum</i> )
FFAs	слободне масне киселина (енгл. <i>free faty acids</i> )
FFPE	енгл. <i>formalin-fixed and paraffin-embedded</i>
FIAU	енгл. <i>1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil</i>
FoxP3	енгл. <i>forkhead box P3</i>
FSC/SSC	енгл. <i>forward scattered light/Side-scattered light</i>
HBSS	енгл. <i>Hank's balanced salt solution</i>
HDL	липопротеини велике густине (енгл. <i>high density lipoprotein</i> )
HFD	дијета са високим садржајем масти (енгл. <i>high-fat diet</i> )
HL-29	енгл. <i>29-kDa lectin in human lung tissue</i>

HOMA-IR	енгл. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
HSCs	јетрине звездасте ћелије (енгл. <i>hepatic stellate cells</i> )
IFN- $\gamma$	интерферон- $\gamma$ (енгл. <i>Interferon-<math>\gamma</math></i> )
IL	интерлеукин (енгл. <i>interleukin</i> )
ILCs	лимфоидне ћелије природне имуности (енгл. <i>innate lymphoid cells</i> )
JNK	C-Jun N-терминалне киназе (енгл. <i>C-Jun N-terminal kinase</i> )
LBP	енгл. <i>non-integrin laminin binding protein</i>
LPS	липополисахарид (енгл. <i>lipopolysaccharide</i> )
LRR	енгл. <i>leucine-rich repeat</i>
LXR	енгл. <i>Liver X receptor</i>
MCD	метионин/холин дефицијентна дијета (енгл. <i>methionine/choline-deficient diet</i> )
M-CoA	енгл. <i>Malonyl-CoA</i>
MCP-1	енгл. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MDA	малонилдиалдехид (енгл. <i>malondialdehyde</i> )
NADPH	енгл. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFL	неалкохолна масна јетра (енгл. <i>nonalcoholic fatty liver</i> )
NAFLD	неалкохолна масна болест јетре (енгл. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> )
NAS	енгл. <i>NAFLD activity score</i>
NASH	неалкохолни стеатохепатитис (енгл. <i>nonalcoholic steatohepatitis</i> )
NF $\kappa$ B	нуклеарни фактор- $\kappa$ B (енгл. <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> )
NK ћелије	Урођено убилачке ћелије (енгл. <i>Natural killer cells</i> )

NKT ћелије	Урођено убилачке ћелије Т ћелије (енгл. <i>Natural killer T cells</i> )
NLRP3	енгл. <i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3</i>
NLRs	енгл. <i>nucleotide binding and oligomerization domain, NOD-like receptors</i>
PAMPs	молекулски обрасци микроорганизама (енгл. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	енгл. <i>Phosphate Buffered Salline</i>
PCR	реакција ланчане полимеризације (енгл. <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PKC	протеин киназа C (енгл. <i>Protein Kinase C</i> )
PMA	енгл. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR- $\gamma$	енгл. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PUFA	полинезасићене масне киселине (енгл. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
PYD	енгл. <i>pyrin-containing domain 3</i>
qRT-PCR	квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (енгл. <i>Quantitative Real Time-PCR</i> )
RAGE	рецептор за AGE (енгл. <i>Receptor for advanced glycation endproducts</i> )
RL-29	енгл. <i>29-kDa lectin in rat lung tissue</i>
RNA	рибонуклеинска киселина (енгл. <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	реактивни облици кисеоника (енгл. <i>reactive oxygen species</i> )
SE	стандардна грешка (енгл. <i>standard error</i> )
SREBP1c	енгл. <i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
TGF- $\beta$	трансформишући фактор раста- $\beta$ (енгл. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )

---

Th	помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper</i> )
TLRs	рецептори слични Toll -у (енгл. <i>Toll-like receptors</i> )
TNF- $\alpha$	фактор некрозе тумора- $\alpha$ (енгл. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
VAT	висцерално масно ткиво (енгл. <i>visceral adipose tissue</i> )
WT	мишеви дивљег соја (енгл. <i>wild type</i> )
$\alpha$ -SMA	енгл. <i>alpha-smooth muscle actin</i>
$\epsilon$ BP	енгл. <i><math>\epsilon</math>-binding protein from rat basophilic leukemia cells</i>
4-HNE	енгл. <i>4-hydroxy-2-nonenal</i>

## **7. ЛИТРАТУРА**

1. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009; 50:412–416.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012; 142:1592-1609.
3. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, Srishord M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9:524-530.
4. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330:326-335.
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55:434–438.
6. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15:246-258.
7. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Sveglia-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 2010; 42:320-330.
8. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917–923.
9. Dietrich P, Hellebrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28:637-653.



- 10.** Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114:842-845.
- 11.** Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut and Liver* 2012; 6:149-171.
- 12.** Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis (Nash): pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012; 142:711-725.
- 13.** Ginsberg HN. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell Metab* 2006; 4:179-181.
- 14.** Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008; 47:1495-1503.
- 15.** Nolan CJ, Larter CZ. Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:703-706.
- 16.** Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 2009; 284:14809-14818.
- 17.** Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:275-281.
- 18.** Gornicka A, Morris-Stiff G, Thapaliya S, Papouchado BG, Berk M, Feldstein AE. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in a dietary murine model of steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:437-445.
- 19.** Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011; 412:1297-1305.

- 20.** Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006; 44:197-208.
- 21.** Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting J. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology* 2011; 12:408-415.
- 22.** Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011; 54:133-144.
- 23.** Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008;8:279-289.
- 24.** Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464:104-107.
- 25.** Tosello-Tramont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J Biol Chem* 2012; 287:40161-40172.
- 26.** Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891-928.
- 27.** Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012; 61:416-426.
- 28.** Eckert C, Klein N, Kornek M, Lukacs-Kornek V. The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. *Front Immunol* 2015; 6: 179. doi: 10.3389/fimmu.2015.00179.

29. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Ptlanz S, Neurath MF, Wirtz S. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 2013; 39:357-371.
30. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6:67-80.
31. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:618-633.
32. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178-196.
33. Bafaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209-18.
34. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28:370–379.
35. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Kioi M, Nakajima A, Puri RK. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J Immunol* 2008; 181: 4656-4665.
36. Liu Y, Muller A, Singer MV, Dooley S, Weng H. IL-13 induces liver fibrosis via TGF- $\beta$ -dependent and independent pathways. *Gastroenterol* 2009; 47:29-37.
37. Feigl SF, Strober W, Kawakami K, Puri RK and Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 $_{\alpha 2}$  receptor is involved in induction of TGF- $\beta_1$  production and fibrosis. 2005; 12:99-106
38. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Ptlanz S, Neurath MF, Wirtz S. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 2013; 39:357-371.
39. Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014; 147:754-764.

40. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16:5286-5296.
41. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22:643-650.
42. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease *Histopathology* 2006; 49:450-465.
43. Torruellas C, French SW, Medici V. Diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20:11684-11699.
44. Hellerbrand C. Pathophysiological similarities and synergisms in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* 2010; 28:783-791
45. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007; 128:837–847.
46. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116:1413–1419.
47. Yamaguchi K, Yang L, McCall S , Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting Triglyceride Synthesis Improves Hepatic Steatosis but Exacerbates Liver Damage and Fibrosis in Obese Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis *Hepatol* 2007; 45:1366-1374.
48. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-2474.
49. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M , MBehling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ.

Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41:1313-1321.

**50.** Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C: Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000; 132:112–117.

**51.** Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S: Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos Nutrition and Liver Study. *Hepatology* 2005; 42:44–52.

**52.** Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH: Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40:1387-95.

**53.** Björnsson E, Angulo P: Non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42:1023-1030.

**54.** Angulo P: Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221–1231.

**55.** Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34:274-285.

**56.** Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation.II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:852-858.

**57.** Boza C, Riquelme A, Ibañez L, Duarte I, Norero E, Viviani P, Soza A, Fernandez JI, Raddatz A, Guzman S, Arrese M. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obesity Surgery* 2005; 15:1148-1153.

**58.** Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome-a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-1062.

- 59.** Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; 45:600–606.
- 60.** Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009; 29:113–119.
- 61.** Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age? *World J Gastroenterol* 2014; 20:9072-9089.
- 62.** Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelly F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37:917-923.
- 63.** Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Marzochi R, Zannoni C, Vanni E, Manini R, Rizzetto M, Melchionda N. Non-alcoholic steatohepatitis in patients cared in metabolic units. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 63:143–151.
- 64.** Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, Parrella A, Terracciano ML, Vecchione R, Garqiulo G, Gennarelli N, Labello R. Silent non-alcoholic fatty liver disease-a clinical-histological study. *J Hepatol* 2004; 41:751-757.
- 65.** Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30:1356-1362.
- 66.** Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004; 40:820-826.
- 67.** Kuk JL, Katzmarzyk PT, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:336-341.

- 68.** Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991;14:1132-1143.
- 69.** Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 1994; 74:761-811.
- 70.** Mirza MS. Obesity, Visceral Fat, and NAFLD: Querying the Role of Adipokines in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Gastroenterol* 2011; 2011:592404
- 71.** Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2009; 9:26–32.
- 72.** Svedberg J, Björntorp P, Smith U, Lönnroth P. Free fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39:570-574.
- 73.** Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46:3-10.
- 74.** Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46:1768-1774.
- 75.** Klein S, Romjin JA. Chapter 35: Obesity. In Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of endocrinology*. Saunders Elsevier 2008; 1563-1587.
- 76.** Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002; 36:403-409.
- 77.** Marra F. Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. *Gastroenterology* 2002; 122:1529-1532.

- 78.** Otte C, Otte JM, Strodthoff D, Bornstein SR, Folsch UR, Monig H, Kloehn S. Expression of leptin and leptin receptor during the development of liver fibrosis and cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112:10-17.
- 79.** Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37:206-213.
- 80.** Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:91-100.
- 81.** Szendroedi J, Roden M. Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:50–56.
- 82.** Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796–1808.
- 83.** Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichosi A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821–1830.
- 84.** Marra F, Bertolani C, Adipokines in liver diseases, *Hepatology*, 2009; 50:957–969.
- 85.** Cohen DE, Fisher EA. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2013; 33:380-388.
- 86.** Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49:306-317.
- 87.** Van Rooyen DM, Gan LT, Yeh MM, Haigh WG, Larter CZ, Ioannou G, Teoh NC, Farrell GC. Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome. *J Hepatol* 2013; 59:144-152



- 88.** Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2009; 2:re3
- 89.** Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CLM, Ong H, Vance DE, Dyck JRB. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007; 56:2863–2671.
- 90.** Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kivilouto T, Laitinen S, Kolak M, Fisher RM, Hamsten A, Aunien P, Yki-Janinen H. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:1281–1287.
- 91.** Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2009; 39:366–373.
- 92.** Coburn CT, Knapp FF, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*. 2000; 275:32523–32529.
- 93.** Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, Luiken JJ. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 2004; 63:245-249.
- 94.** He J, Lee JH, Febbraio M, Xie W. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp Biol Med* 2011; 236:1116–1121.
- 95.** Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MW, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hou AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney DE. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab* 2010; 11:70–76.

- 96.** Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetylCoA carboxylase 2. *Science* 2001; 291:2613–2616.
- 97.** Harada N, Oda Z, Hara Y, Fujinami K, Okawa M, Ohbuchi K, Yonemoto M, Ikeda Y, Ohwaki K, Aragane K, Tamai Y, Kusuoki J. Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2007; 27:1881–1888.
- 98.** Qi J, Lang W, Geisler JG, Wang P, Petrounia I, Mai S, Smith C, Askari H, Struble GT, Williams R, Bhano TS, Mania BP, Bayommy S, Grant E, Caldwell GW, Todd MJ, Liang J, Gaul MD, Demarest KT, Connelly MA. The use of stable isotope-labeled glycerol and oleic acid to differentiate the hepatic functions of DGAT1 and -2. *J Lipid Res* 2012; 53:1106–1116.
- 99.** Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12:83–92.
- 100.** Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9116–9121.
- 101.** Guha P, Aneja KK, Shilpi RY, Haldar D. Transcriptional regulation of mitochondrial glycerophosphate acyltransferase is mediated by distal promoter via ChREBP and SREBP-1. *Arch Biochem Biophys* 2009; 490:85–95.
- 102.** Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. Islet Inflammation Impairs the Pancreatic b-Cell in Type 2 Diabetes. *Physiology* 2009; 24:325-331.
- 103.** Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA and Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver International* 2009; 1:113-119.
- 104.** Cusi K, The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports* 2010; 4:306-315.

- 105.** Williams KH, Shackel NA, Gorrell MD, McLennan SV, Twigg SM. Diabetes and nonalcoholic Fatty liver disease: a pathogenic duo. *Physiology* 2009; 24:325-331.
- 106.** Fracanzani AF, Valenti L, Bugianesi E et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008; 48:792-798.
- 107.** Lo L, McLennan SV, Williams PF, Bonner J, Chowdhury S, McCanqhan GW, Gorrell MD, Yue DK, Twigg SM. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis *J Hepatol* 2011; 55:435-444.
- 108.** Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114:842-845.
- 109.** Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:1–16.
- 110.** Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115:1343-1351.
- 111.** Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006; 44:197-208.
- 112.** Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martine D. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:518–525.
- 113.** Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin. Liver Dis* 2001; 21:43–55.

- 114.** George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003; 39:756–764.
- 115.** Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120:1183-1192.
- 116.** Seki E, Kluwe J, Osawa Y, Brenner D, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nature med* 2007; 13:1324-1332.
- 117.** Bryne CD, Targher G. NAFDL: A multisystem disease. *J Hepatol* 2015; 62:47-64
- 118.** Asrih M, Jornavvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol* 2015: doi: 10.1016/j.mce.2015.02.018
- 119.** Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 2008; 14:1225–1230.
- 120.** Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulinsensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008; 118:2992–3002.
- 121.** Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I( $\kappa$ )B kinase- $\beta$ . *Nature* 1998; 396:77–80.
- 122.** Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B $\beta$ . *Science* 2001; 293:1673–1677.
- 123.** Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11:191–198.
- 124.** Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver Dis* 2004; 24:3–20.

- 125.** Staton MC, Chen SC, Jakson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *Journal of Inflammation* 2011, 8:8.
- 126.** Schuffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:273-280.
- 127.** Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen Nico, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 47:571-579.
- 128.** De Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002; 21:219-223.
- 129.** Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 2011; 12:5–9.
- 130.** Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011; 121:2126–2132.
- 131.** Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon L. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:15718-15723.
- 132.** Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010; doi: 10.1155/2010/362847.
- 133.** Tasukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo Ep, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1986-1998.

- 134.** Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-1772.
- 135.** Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) *Int J Mol Sci* 2013; 14:20704-20728.
- 136.** Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, van Breusegem F. ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci* 2011; 16:300-309.
- 137.** Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin. Liver Dis.* 2007; 11:191-207.
- 138.** Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:59–69.
- 139.** Fritz R, Bol J, Hebling U, Angermuller S, Volkl A, Fahimi HD, Mueller S. Compartment-dependent management of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peroxisomes. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42:1119–1129.
- 140.** Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199:316–331.
- 141.** Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417:1–13.
- 142.** Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40:46–54.

- 143.** Minicis de S, Seki E, Paik YH, Osterreicher CH, Kodama Y, Kluwe J, Torozzi L, Miyai K, Benedetti A, Schwabe RF, Brenner DA. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010; 52: 1420–1430.
- 144.** Hernandez-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, Devi LA, Friedman SL. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol* 2013; 59:98–104.
- 145.** Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, Friedman SL. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938–946.
- 146.** Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol Cell* 2002; 10:417–426.
- 147.** Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* 2012; 13:333-342.
- 148.** Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002; 10:417–426.
- 149.** Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140:805–820.
- 150.** Netea MG, van der Meer JW. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*. 2011; 364:60–70.
- 151.** Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011; 17:179-88.

- 152.** Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol* 2012; 57:642–654.
- 153.** Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140:805–820.
- 154.** de Roos B, Rungapamestry V, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Horgan G, Toomey S, Browne J, Loscher CE, Mills KH, Roche HM.. Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet. *Proteomics* 2009; 9:3244–3256.
- 155.** Dixon LJ, Berk M, Thapaliya S, Papouchado BG, Feldstein AE. Caspase-1-mediated regulation of fibrogenesis in diet-induced steatohepatitis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2012; 92:713–723.
- 156.** Wree A, 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. *Hepatology.* 2013; 59:898–910.
- 157.** Wree A, McGeough MD, Pena 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* 2014; 92:1069-1082.
- 158.** Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 2013; 59:583-594.
- 159.** Meli R, Raso GM, Caligano A. Role of Innate Immune response in Non-Alcoholic Fatty liver disease: Metabolic complications and therapeutic tools. *Front Immunol* 2014; 5:177.
- 160.** Roh YS, Seki A. Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 1: 38-42.
- 161.** Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007; 56:1124–1131.



- 162.** Bawa M, Saraswat VA. Gut-liver axis: role of inflammasomes. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3:141-149.
- 163.** Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; 48:670–678.
- 164.** Labonte AC, Tosello-Trampton AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells* 2014; 37:275-285.
- 165.** Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302:1310-1321.
- 166.** Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:891–928.
- 167.** Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. 2012; 61:416-426.
- 168.** Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453–461.
- 169.** Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:535–542.
- 170.** Marra F, Gastaldelli A, Svegliati-Baroni G, Tell G, Tribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008; 14:72-81.

- 171.** Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guera M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors p55 and p 75 in non-alcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34:1158-1163.
- 172.** Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Kamai-Koma M, Jabir MS, Yhang L, Graham GJ, Stolarska MK, Liew FY, McSharry C, Xu D. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:1422-1432.
- 173.** Liu Y, Munker S, Mulenbach R, Weng HL. IL-33 signaling in liver fibrogenesis. *Front Immunol* 2012; 3:116.
- 174.** Connolly MBA, Mallen-St. Clair J, Mitchell A, Ibrahim J, Stroud A, Pachter HL, Bar-Sagi D, Frey A, Miller G. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation via TNF-a. *J Clin Invest* 2009; 119:3213–3225.
- 175.** Henning JR, Graffeo CS, Rehman A, Fallon NC, Zambirinis CP, Ochi A, Barilla R, Jamal M, Deutsch M, Greco S, Ego-Osuala M, Bin-Saeed U, Rao RS, Badar S, Quesada JP, Acehan D, Miller G. Dendritic cells limit fibro-inflammatory injury In NASH. *Hepatology* 2013; 58:589-602
- 176.** Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, Sipula IJ, Dedousis N, Scott DK, Morel PA, Thomson AW, O Doherty RM. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* 2012; 61:2330-2339.
- 177.** Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, Vivier E, Friedman SL, Merad M, Aloman C. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology* 2012; 55:244–255.

- 178.** Kahraman A, Schlattjan M, Kocabayoglu P, Yildiz-Meziletoglu S, Schlensak M, Fingas CD, Wedemeyer I, Marquitan G, Grieseler R, Baba HA, Gerken G, Canbaz A. Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51:92–102.
- 179.** Gao B, Radaeva S, Jeong WI. Activation of natural killer cells inhibits liver fibrosis: a novel strategy to treat liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007; 1:173–180.
- 180.** Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 42:880–885.
- 181.** Kremer M, Thomas E, Milton RJ, Perry AW, van Rooijen N, Wheeler MD, Zacks S, Fried M, Rippe RA, Hines IN. Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology*. 2010; 51:130–141.
- 182.** Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *AnnuRev Immunol* 2007; 25:297-336.
- 183.** Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:457–466.
- 184.** Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348–2357.
- 185.** Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009; 15:930-939.
- 186.** Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, Han X, Peng Y, Chen X, Shen L, Qiu D, Li Z, Ma X. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol* 2011; 166:281-290.

- 187.** Harley IT, Stankiewicz TE, Giles DA, Softic S, Flick LM, Cappelletti M, Sheridan R, Xanthakos SA, Steinbrecher KA, Sartor RB, Kohli R, Karp CL, Divanovic S. IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2014; 59:1830-1839.
- 188.** Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; 48:670–678.
- 189.** Gadd VL, Skoien R, Powell EE, Fagan KJ, Winterford C, Horsfall L, Irvine K, Clouston AD. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human non alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013; 59:1393–1405.
- 190.** Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3666-3672.
- 191.** Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10:45-65.
- 192.** Stojšavljević S, Palčić MG, Jukić LV, Duvnjak LS, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20:18070-18091.
- 193.** Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004; 40:46–54.
- 194.** Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumaikai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006; 55:415–24.
- 195.** Tilg H, Moschen AR. IL-1 cytokine family members and NAFLD: Neglected in metabolic liver inflammation. *J Hepatol* 2011; 55: 960-962.

- 196.** Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Lipids Health Dis* 2010; 9:42.
- 197.** Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulangé A, Capeau J, Caron M. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 2006; 49:2162–2173.
- 198.** Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van Rooijen N, Staels B, Kersten S, Müller M. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* 2010; 51:511–522.
- 199.** Dooley S, ten Dijke P. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 2012; 347:245–256.
- 200.** Kumar R, Prakash S, Chhabra S, Singla V, Madan K, Gupta SD, Panda SK, Khanal S, Acharya SK. Association of pro-inflammatory cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res* 2012; 136:229–236.
- 201.** Yang L, Roh YS, Song J, Yhang B, Liu C, Loomba R, Seki E. TGF- $\beta$  signaling in hepatocyte participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism. *Hepatology* 2014; 59:483-495
- 202.** Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209–218.
- 203.** Cayon A, Crespo J, Mayorga M, Guerra A, Pons-Romero F. Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF-beta1 and the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26:1065–1071.
- 204.** Tan CK, Leuenberger N, Tan MJ, Yan YW, Chen Y, Kambadur R, Wahli W, Tan NS. Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet. *Diabetes* 2011; 60:464–476.

- 205.** Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:677–690.
- 206.** Brombacher F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays* 2000; 22:646-656.
- 207.** Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohijima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25:420–428.
- 208.** Chiamonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 2001; 34:273–282.
- 209.** Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:237–264.
- 210.** Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269:20807–20810.
- 211.** Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:209-231.
- 212.** Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19:433–440.
- 213.** Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Transact* 1997; 25:1194–1198.
- 214.** Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate binding proteins. *Biochim BiophysActa* 1999; 1473:172–185.
- 215.** Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29-41.

- 216.** Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1183:158–182.
- 217.** Rini JM. and Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9:578-584.
- 218.** Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 232–254.
- 219.** Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1673:75-93.
- 220.** Chiarioti L, Salvatore P, Frunzio R. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2002; 1183:158-182.
- 221.** Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
- 222.** Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Brazil J Med Biol Res* 1999; 32:383–393.
- 223.** Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23:313-320.
- 224.** 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.
- 225.** Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52:100-110.

- 226.** Yilmaz H, Cakmak M, Inan O, Darcin T, Ackay A. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor. *J Endocrinol Invest* 2014; 38:527-533.
- 227.** Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013; 62:1932-1944.
- 228.** Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Djukic ALj, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte*. 2013; 12:266-271.
- 229.** Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351:336-343.
- 230.** Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32.000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128:1221-1228.
- 231.** Roff CF, Wang JI. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; 258:10657-10663.
- 232.** Liu FT, Orida N. Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1984; 259:10649-10652.
- 233.** Cerra RF, Gitt MA. and Barondes SH. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *J Biol Chem* 1985; 260:10474-10477.
- 234.** Sparrow CP, Leffler H. and Barondes SH. Multiple soluble beta-galactosidebinding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262:7383-7390.



- 235.** Raz A, Meromsky L, Zvibel I, Lotan R. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer* 1987; 39:353-360.
- 236.** Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* 1990; 265:7097-7099.
- 237.** Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:263–273.
- 238.** Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597–598.
- 239.** Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
- 240.** Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597–598.
- 241.** Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous praline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacteria and tissue collagenase. *J Biol Chem* 1993; 268:26704–26711.
- 242.** Agrwal N, Sun Q, Wang SY, Wang JL. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem* 1993; 268:14932-14939.
- 243.** Mehul B, Bawumia S, Martin SR, Hughes RC. Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP30, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 1994; 269:18230-18258.

- 244.** 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.
- 245.** Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, Hughes RC. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 2000; 10:1201-1208.
- 246.** Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19:527-535.
- 247.** Almkvist J. and Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19: 575-581.
- 248.** 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; 379:97-106.
- 249.** Menon RP and Huges RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 1999; 264:569-576.
- 250.** Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hong V, Mayurak N, Bresalier RS, Raz A. The NH<sub>2</sub> terminus of galectin-3 governs cellular compartmentization and functions in cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59:6239-6245.
- 251.** Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2002; 277:6852-6857.
- 252.** Liu FT and Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; 20:455-460.

- 253.** Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156:3939-3944.
- 254.** Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Björstad A, Brown KL, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H, Bylund J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 2009; 19:16-20.
- 255.** Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* 1993; 32:7644-7649.
- 256.** Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol* 2002; 168:1813-1822.
- 257.** Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp /Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 1995;154:3479-3487.
- 258.** Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073-1083.
- 259.** Cerliani JP, Stowel 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; 31:10-21.
- 260.** 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; 112:389-397.
- 261.** 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; 147:1016-1028.

- 262.** MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Hendersin NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 2008; 180:2650-2658.
- 263.** Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, Xu D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181:2781-2789.
- 264.** Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions throught the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010; 185:7037-7046.
- 265.** Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. Endogenous Galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129:573-583.
- 266.** Vray B, Camby I, Vercruyse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 2004; 14:647-657.
- 267.** Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fucada SY, Liu FT, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 182:1167-1173.
- 268.** Mensah-Brown E, Al Rasebi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptoyotocine-induced diabetes in mice. *Clin Immunol* 2009; 130:83-88.
- 269.** Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Grosset P, Trottein F. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun* 2007; 75:5148-5157.

- 270.** Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63:8302-8311.
- 271.** Joo Hg, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstroff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a  $\beta$ -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69:555-564.
- 272.** Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T cell functions. *Immunol Rev* 2009; 230:114-127.
- 273.** Demotte N, Stroobant V, Courtoy PJ, Van Der Smissen P, Colau D, Luescher IF, Hivroz C, Nicaise J, Squifflet JL, Mourad M, Godelaine D, Boon T, van der Bruggen P. Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human-infiltrating lymphocytes. *Immunity* 2008; 28:414-428.
- 274.** 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; 28:451-462.
- 275.** Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616-635.
- 276.** Rhodes DH, Pini M, Castellanos KJ, Montero-Melendez T, Cooper D, Perretti M et al. Adipose tissue-specific modulation of galectin expression in lean and obese mice: evidence for regulatory function. 2013; 21:310-19.
- 277.** Kiwak K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT and Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity* 2007; 15:32-39.

- 278.** Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer NN, Schnitzbauer A, Schaffler A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1404–1411.
- 279.** Okhura T, Fujioka Y, Nakanishi R, Shiochi H, Sumi K, Yamamoto N, Matsuzawa S, Izawa S, Ohkura K, Ueta E, Kato M, Miyoshi E, Taniguchi S, Yamamoto K. Low serum galectin-3 concentrations are associated with insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6:106.
- 280.** Darrow AL, Shohet RV. Galectin-3 deficiency exacerbates hyperglycemia and the endothelial response to diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14:73.
- 281.** Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, Cooper D, Perretti M, Fantuzzi G. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One* 2013; 8: e57915.
- 282.** Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of Disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Endocrinol Metabol* 2008; 4:285-293.
- 283.** Christensen UB, Kockum I, Luthman H, Nerup J, Pociot F. Immune-mediated beta-cell destruction in vitro and in vivo-A pivotal role for galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:406-415.
- 284.** Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, Olivieri A, Sorcini M, Di Mario U, Pesce C, Pugliese G. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J* 2004; 18:1773–1775.
- 285.** Pugliese G, Iacobini C, Pesce CM, Menini S. Galectin-3: an emerging all-out player in metabolic disorders and their complications. *Glycobiology* 2015; 25: 136-150.

- 286.** Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A- induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012; 55:1954-1964.
- 287.** Ocklenburg F, Moharreggh-Khiabani D, Geffers R, Janke V, Pfoertner S, Garritsen H, Groebe L, Klempnauer J, Dittmar KE, Weiss S, Buer J, Probst-Kepper M. UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Lab Invest* 2006; 86:724–737.
- 288.** Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*.1999; 81:519-526
- 289.** Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, Troncoso MF. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis,liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013; 19:8831-8849.
- 290.** Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with balectn inhibitors. *PLoS One* 2013; 18:e83481.
- 291.** Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol* 2006; 210:469-477.
- 292.** Nakanishi Y, Tsuneyama K, Nomoto K, Fujimoto M, Salunga TL, Nakajima T, Miwa S, Murai Y, Hayashi S, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepatology* 2008; 38:1241-1251.
- 293.** 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; 54:975-983.

- 294.** Dragomir AC, Sun R, Choi H, Laskin JD, Laskin DL. Role of galectin-3 in classical and alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication. *J Immunol* 2012; 189:5934-5941.
- 295.** 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.
- 296.** Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripan B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100:2077-2084.
- 297.** 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.
- 298.** Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14:32.
- 299.** Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
- 300.** Gritzmacher CA, Mehl VS, Liu FT. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 59 untranslated regions. *Biochemistry* 1992; 31:9533-9538.
- 301.** Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073-1083.
- 302.** Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124.
- 303.** Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008; 3:545-556.



- 304.** Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J ClinInvest* 2003; 112:1821–1830.
- 305.** Zhou J, Febbraio M, Wada T, Yhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, Khadem S, Ren S, Li S, Silverstein RL, Xie W. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008; 134:556-567.
- 306.** Matute JM, Lindholt JS, Fernandez-Garsia CE, Benito-Martin A, Burillo E, Zalba G, Beloqui O, Liamas-Granada P, Ortiz A, Egido J, Miguel L, Martin-Ventura JL. Galectin-3, a Biomarker Linking Oxidative Stress and Inflammation With the Clinical Outcomes of Patients With Atherothrombosis. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3:e000785.
- 307.** Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, He B, Cassis L, Bigas A, Cols M, Comerma L, Huang B, Blander JM, Xiong H, Mayer L, Berin C, Augenlich LH, Velcich A, Cerruti A. Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals. *Science* 2013; 342:447-453.
- 308.** Dragomir AC, Sun R, Mishin V, Hall LB, Laskin JD, Laskin DL. Role of Galectin-3 in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Inflammatory Mediator Production. *Toxicol Sci* 2012; 127:609-619.
- 309.** Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol.* 2015; 7:2184-2188.
- 310.** Almeda-Valdez P, Aguilar Olivos NE, Barranco-Fragoso B, Uribe M, Mendez-Sanchez N. The Role of Dendritic Cells in Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomed Res Int.* 2015: 768071.
- 311.** Hsu W, Shu SA, Gershwin E, Lian ZX. The current immune function of hepatic dendritic cells. *Cell Mol Immunol.* 2007; 4:321–328.

- 312.** Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:753–766.
- 313.** Rahman AH, Aloman C. Dendritic cells and liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832:998–1004.
- 314.** Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol.* 2002; 15:699–704.
- 315.** Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15539-15548.
- 316.** Bleroit C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disso O, Lecuit M. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 2015; 42:145-158.
- 317.** Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351:336-343.

## 8. ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

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

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Илија Д. Јефтић

Ментор/коментор:

МН

Проф. др Нада Пејновић

Наслов рада:

НР

УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ  
СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:

ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања:

ЗП

Србија

Уже географско подручје:

Србија

УГП

Година: ГО	2015.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МС	34000, Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 167 страну, садржи 8 поглавља, 25 слика, 7 табела, 6 схема и 317 референци
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Имунологија
Предметна одредница/ ПО	Галектин-3, гојазност, стеатохепатитис, фиброза јетре, IL-33/ST2/IL-13 осовина

УДК

Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
----------------	---

Важна напомена:  
МН

Извод:  
ИД

Неалкохолна масна болест јетре (NAFLD) обухвата различит спектар болести, од једноставне стеатозе која представља акумулацију масти у јетри, преко неалкохолног стеатохепатитиса (NASH), па до цирозе и могућег настанка хепатоцелуларног карцинома и уско је повезана са гојазношћу и шећерном болешћу тип 2. Галектин-3 је мултифункционални  $\beta$ -галактозид-везујући лектин експримиран у различитим ћелијама, како имунског система тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од локализације и болести може испољити како проинфламаторне, тако и

антиинфламаторне карактеристике. Улога галектина-3 у развоју масне болести јетре индуковане гојазношћу није до краја објашњена.

У циљу испитивања улоге галектина-3 у развоју NASH-а и фиброзе јетре, галектин-3 дефицијентни (LGALS3<sup>-/-</sup>) и мишеви дивљег соја на C57Bl/6 подлози (LGALS3<sup>+/+</sup>), стављени су на исхрану са високим садржајем масти (60% kcal од масти) или стандардну исхрану (10% kcal од масти) у трајању од 12 односно 24 недеље.

Делеција гена за галектин-3 убрзава настанак гојазности индуковане дуготрајном исхраном са високим садржајем масти и праћена је израженијом масном инфилтрацијом у јетри. Израженија стеатоза у јетри праћена је већом експресијом гена укључених у транспорт и метаболизам масти PPAR- $\gamma$ , CD36 и FAS-а. Супротно, галектин-3 позитивни мишеви су имали веће хепатоцелуларно оштећење, инфламацију и фиброзу која је била праћена већим бројем зрелих дендритичних ћелија, проинфламаторних CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> моноцитно/макрофагних ћелија у јетри, периферној крви и костној сржи, као и већом експресијом CCL2, F4/80, CD11c, TLR4, CD14, NLRP3 инфлазома, IL-1 $\beta$  и компоненти NADPH-оксидазног система у јетри. Упркос израженијој стеатози, гојазни галектин-3 дефицијентни мишеви нису развили фиброзни NASH. Додатно, веће хепатоцелуларно оштећење гојазних галектин-3 позитивних мишева праћено је већом експресијом IL-33 у хепатоцитима, као и већом заступљеношћу мијелоидних CD11b<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> ћелија и већом експресијом гена за IL-33, ST2 и IL-13 у јетри у поређењу са LGALS3<sup>-/-</sup> мишевима. Перитонеални макрофаги галектин-3 дефицијентних мишева у одговору на стимулацију IL-33 *in vitro* експримирају мање ST2 и продукују мање IL-13. Мањи степен фиброзе јетре у галектин-3 дефицијентних мишева праћен је мањом експресијом ST2 као и мањом продукцијом IL-13 у CD11b<sup>+</sup> макрофагама након апликације рекомбинантног IL-33 *in vivo*.

Закључак спроведене студије је да галектин-3 игра веома важну регулаторну улогу у IL-33/ST2/IL-13 зависној фибрози јетре.

Датум прихватања теме од стране ННВ:  
ДП

26.03.2014.

Датум одбране:  
ДО

Чланови комисије:

КО

Председник:

**Проф. др Миодраг Л. Лукић**, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Ментор:

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

Члан:

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

Члан:

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

Члан:

**Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија

Члан:

**НС Станислава Стошић Грујичић**, научни саветник за ужу научну област Биологија-Имунологија, Институтза биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду

## **8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION**

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

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Ilija D. Jeftić

Menthor/co-menthor:

MN

Prof. dr Nada Pejnović

Title:

TI

ROLE OF GALECTIN-3 IN PATHOGENESIS OF  
STEATOHEPATITIS AND LIVER FIBROSIS IN  
EXPERIMENTAL MODEL OF OBESITY

Language of text:

LT

Serbian (Cyrillic)

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

Serbia

Publication year:

2015.

PY

Publisher: Author reprint  
PU

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

Physical description: Thesis contains 167 pages,  
PD 8 chapters, 25 pictures, 7 tables,  
6 schemes и 317 citations

Scientific field: Medicine  
SF

Scientific discipline: Immunology  
SD

Subject/ key words Galectin-3, obesity, steatohepatitis,  
SKW liver fibrosis, IL-33/ST2/IL-13 axis

UDC

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

Note:  
N

Abstract:  
AB

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) which encompasses simple steatosis, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis, and possibly liver carcinoma is strongly associated with obesity and type 2 diabetes mellitus. Galectin-3 is a multifunctional  $\beta$ -galactoside-binding lectin expressed by a variety of cell types, exerts both pro- and anti-inflammatory roles depending on localisation and disease condition. The importance of Galectin-3 in obesity-associated liver pathology is incompletely defined.



In order to dissect the role of Gal-3 in fibrotic nonalcoholic steatohepatitis (NASH), Gal-3-deficient (LGALS3<sup>-/-</sup>) and wild-type (LGALS3<sup>+/+</sup>) C57Bl/6 mice were placed on obesogenic high-fat diet (HFD, 60% kcal fat) or standard chow diet for 12 and 24 weeks.

Compared to WT mice, HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice developed, in addition to increased visceral adiposity and diabetes, marked liver steatosis. Liver steatosis was accompanied with higher expression of hepatic PPAR- $\gamma$ , CD36 and FAS. However, as opposed to LGALS3<sup>-/-</sup> mice, hepatocellular damage, inflammation and fibrosis were more extensive in WT mice which had elevated number of mature myeloid dendritic cells, proinflammatory CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> monocytes/macrophages in liver, peripheral blood and bone marrow, and increased hepatic CCL2, F4/80, CD11c, TLR4, CD14, NLRP3 inflammasome, IL-1 $\beta$  and NADPH-oxidase enzymes mRNA expression. Thus, obesity-driven greater steatosis was uncoupled with attenuated fibrotic NASH in Gal-3 deficient mice. HFD-fed WT mice had higher number of hepatocytes that strongly expressed IL-33 and hepatic CD11b<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> cells, increased levels of IL-33 and IL-13 and upregulated IL-33, ST2 and IL-13 mRNA in liver compared to LGALS3<sup>-/-</sup> mice. IL-33 failed to induce ST2 upregulation and IL-13 production by LGALS3<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages *in vitro*. *In vivo* administration of IL-33 enhanced liver fibrosis in HFD-fed mice in both genotypes, albeit to a significantly lower extent in LGALS3<sup>-/-</sup> mice which was associated with less numerous hepatic IL-13 expressing CD11b<sup>+</sup> cells.

The present study provides evidence of a novel role for Gal-3 in regulating IL-33/ST2/IL-13 dependent liver fibrosis.

Accepted by the Scientific Board on :  
ASB

26.03.2014.

Defended on:  
DE

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

- President: **Prof. dr Miodrag L. Lukić**, Professor Emeritus of University of Kragujevac
- Menthor: **Prof. dr Nada Pejnović**, Associate professor of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
- Member: **Prof. dr Nebojša Arsenijević**, Professor of Microbiology and Immunology and Basic oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
- Member: **Prof. dr Aleksandar Đukić**, Professor of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
- Member: **Prof. dr Snežana Živančević Simonović**, Professor of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
- Member: **Dr Stanislava Stošić Grujičić**, Research professor at Institute for Biological research “Siniša Stanković” Belgrade

### 8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Илија Јефтић рођен је 26. септембра 1982. године у Краљеву где је са одличним успехом завршио основну школу и гимназију природно-математички смер као носилац дипломе „Бук Караџић“ за постигнут успех у основној школи. Медицински факултет у Крагујевцу завршио је 2007. године са просечном оценом 9.14.

Докторске академске студије, смер Клиничка и експериментална Интерна медицина, подпроручје Ендокринологија, је уписао 2007. године. Усмени докторски испит је положио 02.03.2011. године добивши оцену 10 (десет). Од децембра 2008. до децембра 2010. радио је као сарадник у настави на предмету Патолошка физиологија на Медицинском факултету у Крагујевцу. Од децембра 2010. до данас запослен на Факултету медицинских наука као асистент на предмету Патолошка физиологија. Члан је Друштва патофизиолога Србије, Друштва имунолога Србије као и Европског удружења за истраживање болести јетре.

Кандидат др Илија Јефтић се активно бави научно истраживачким радом у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Университета у Крагујевцу.

Континуиран научно-истраживачки рад се огледа у учешћу на међународним научним пројектима:

1. Galectin-3 in the pathogenesis of type 2 diabetes: the role in  $\beta$ -cell proliferation, insulin secretion and anti-inflammatory mechanisms within islets, IZ73Z0\_152407, Joint research projects (SCOPEs)

Јуниор пројектима Факултета медицинских наука у Крагујевцу:

1. „ЈП 26-12 Апоптоза лимфоцита периферне крви и фреквенција микронуклеуса код пацијената са диферентованим карциномом штитасте жлезде који су лечени радиоактивним јодом  $^{131}$ “
2. „ЈП 02-14 Улога галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“
3. „ЈП 03-14 Улога IL-33/ST2 сигналног пута у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности“

Илија Јефтић је остварио 40 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- 5 радова у целини публикованих у часописима међународног значаја;
- 4 рада у целини публикована у националним часописима
- већи број сажетака на међународним научним скуповима

## 8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Јефтић И**, 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: 21:453-465. **M21=8 бодова**
2. Jovicic N\*, **Јефтић И\***, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic LM, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. Plos One 2015: 10(7):e0134089. (\* први аутори - contributed equally) **M21=8 бодова**
3. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, **Јефтић И**, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. J Oral Pathol Med 2015: doi: 10.1111/jop.12312. **M21=8 бодова**
4. Vrndic O, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, Mijatovic L, **Јефтић И**, Zivancevic Simonovic S. Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer. Neoplasma 2013; 60:568-575. **M23=3 бода**

5. Vrndic O, Savin S, Mijatovic Lj, Djukić A, **Jeftić I**, Simonovic SZ. Concentration of thyroglobulin and thyroglobulin-specific autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after treatment with radioactive Iodine 131. Labmedicine 2011; 42:27-31. **M23=3 бода**

**Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:**

1. Jovicic N\*, **Jeftić I\***, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic L M, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c Mice. Serb J Exp Clin Res 2015; 16:9-20. (\* први аутори - contributed equally) **M52=1,5 бод**
2. **Jeftić I**, Kostić I, Vrndić O, Kovačević V. Feohromocitom: genska osnova, klinička slika i savremene mogućnosti dijagnostike. Medicinski časopis 2010; 44(1):45-50. **M52=1,5 бод**
3. Vrndić O, **Jeftić I**, Kostić I, Stanojević M, Živančević- Simonović S. Hashimoto encefalopatija, Medicinski časopis 2010, vol 44:41-44. **M52=1,5 бод**
4. Baskić D, Radosavljević G, Čokanović V, **Jeftić I**, Zelen I, Popović S, Pavlović S. Serumski nivoi NO, IL-2 i MDA kod pacijenata sa karcinomom dojke. Medicus 2005; 6:62-65. **M52=1,5 бод**

**Зборници међународних научних скупова**

1. **Jeftić I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. **M34=0,5 бодова**

2. Jovicic N, Pejnovic N, **Jeftic I**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L M. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. **M34=0,5 бодова**
3. Lukic A, Velickovic M, **Jeftic I**, Kanjevac T, Mitrovic S. IL-33/ST2 signaling in human periapical lesions. 19th Congress of the Balkan stomatological society, Belgrade, Serbia, April 2014. **M34=0,5 бодова**
4. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 3<sup>rd</sup> Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. **M34=0,5 бодова**
5. Jovicic N , Pejnovic N, **Jeftic I**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N , Lukic ML. Immunometabolic Differences in Prototypical Th1- And Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet Induced Obesity. 3<sup>rd</sup> Belgrade EFIS Symposium on Immunoegulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. **M34=0,5 бодова**
6. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Increases High-Fat Diet Induced Obesity, Liver Steatosis and Metaflammation In Adipose Tissue and Pancreatic Islets. EMBO Workshop, Cell biology of animal lectins, Rehovot, Israel, June 2015. (Selected for short talk) **M34=0,5 бодова**
7. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion attenuates inflammation and IL-33 dependent fibrosis in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. **M34=0,5 бодова**

8. Jovicic N , Jeftic I , Miletic Kovacevic M , Tanaskovic I, Arsenijevic N , Lukic ML, Pejnovic N. ST2 deletion attenuates high fat diet-induced steatosis, inflammatory cell infiltration and collagen deposition in liver. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. **M34=0,5 бодова**

## **8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS**

### **The published papers in extenso in international journals:**

1. **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: 21:453-465. **M21=8 бодова**
2. Jovicic N\*, **Jeftic I\***, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic LM, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. Plos One 2015: 10(7):e0134089. (\* први аутори - contributed equally) **M21=8 бодова**
3. Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, Mitrovic S, **Jeftic I**, Kanjevac T, Lukic A. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts. J Oral Pathol Med 2015: doi: 10.1111/jop.12312. **M21=8 бодова**
4. Vrndic O, Milosevic-Djordjevic O, Djurdjevic P, Jovanovic D, Mijatovic L, **Jeftic I**, Zivancevic Simonovic S. Radioiodine therapy accelerates apoptosis in peripheral blood lymphocytes of patients with differentiated thyroid cancer. Neoplasma 2013; 60:568-575. **M23=3 бода**
5. Vrndic O, Savin S, Mijatovic Lj, Djukić A, **Jeftic I**, Simonovic SZ. Concentration of thyroglobulin and thyroglobulin-specific autoantibodies in patients with differentiated thyroid cancer after treatment with radioactive Iodine 131. Labmedicine 2011; 42:27-31. **M23=3 бода**



**The published papers in extenso in national journals:**

1. Jovicic N\*, **Jeftić I\***, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic L M, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c Mice. Serb J Exp Clin Res 2015; 16:9-20. (\* први аутори - contributed equally) **M52=1,5 бод**
2. **Jeftić I**, Kostić I, Vrndić O, Kovačević V. Feohromocitom: genska osnova, klinička slika i savremene mogućnosti dijagnostike. Medicinski časopis 2010; 44(1):45-50. **M52=1,5 бод**
3. Vrndić O, **Jeftić I**, Kostić I, Stanojević M, Živančević- Simonović S. Hashimoto encefalopatija, Medicinski časopis 2010, vol 44:41-44. **M52=1,5 бод**
4. Baskić D, Radosavljević G, Čokanović V, **Jeftić I**, Zelen I, Popović S, Pavlović S. Serumski nivoi NO, IL-2 i MDA kod pacijenata sa karcinomom dojke. Medicus 2005; 6:62-65. **M52=1,5 бод**

**The international congress presentations published as abstracts:**

1. **Jeftić I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. **M34=0,5 бодова**
2. Jovicic N, Pejnovic N, **Jeftić I**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic L M. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck, Austria, February 2015. **M34=0,5 бодова**

3. Lukic A, Velickovic M, **Jeftic I**, Kanjevac T, Mitrovic S. IL-33/ST2 signaling in human periapical lesions. 19th Congress of the Balkan stomatological society, Belgrade, Serbia, April 2014. **M34=0,5 бодова**
  
4. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Promotes Hepatic Inflammation and Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. 3<sup>rd</sup> Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. **M34=0,5 бодова**
  
5. Jovicic N, Pejnovic N, **Jeftic I**, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML. Immunometabolic Differences in Prototypical Th1- And Th2-Type Mouse Strains in High-Fat Diet Induced Obesity. 3<sup>rd</sup> Belgrade EFIS Symposium on Immunoregulation, Arandjelovac, Serbia, May 2015. **M34=0,5 бодова**
  
6. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Increases High-Fat Diet Induced Obesity, Liver Steatosis and Metaflammation In Adipose Tissue and Pancreatic Islets. EMBO Workshop, Cell biology of animal lectins, Rehovot, Israel, June 2015. (Selected for short talk) **M34=0,5 бодова**
  
7. **Jeftic I**, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion attenuates inflammation and IL-33 dependent fibrosis in mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. **M34=0,5 бодова**
  
8. Jovicic N, Jeftic I, Miletic Kovacevic M, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. ST2 deletion attenuates high fat diet-induced steatosis, inflammatory cell infiltration and collagen deposition in liver. 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 2015. **M34=0,5 бодова**

## 8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>	
Име и презиме: Илија Д. Јефтић	
Датум и место рођења: 26.09.1982. године у Краљеву	
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Патолошка физиологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу	
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ	
Број страница: 167	
Број слика: 31	
Број библиографских података: 317	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Имунологија	
Ментор: Проф. др Нада Пејновић	
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 20.09.2013.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-184/10 од 02.04.2014.	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;</li><li>2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;</li><li>3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;</li><li>4. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;</li><li>5. НС Станислава Стошић Грујичић, научни саветник за ужу научну област Биологија-Имунологија, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан.</li></ol>	
Комисија за оцену докторске дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;</li><li>2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;</li></ol>	

3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
4. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
5. НС Станислава Стошић Грујичић, научни саветник за ужу научну област Биологија-Имунологија, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан.

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емирутус, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, члан;
3. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
4. Проф. др Снежана Живанчевић Симоновић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
5. НС Станислава Стошић Грујичић, научни саветник за ужу научну област Биологија-Имунологија, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан.

Датум одбране дисертације:

**ОБРАЗАЦ 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Илија Д. Јефтић  
број уписа 2007/94

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ  
У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 30.09.2015.

Јефтић Илија

**ОБРАЗАЦ 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Илија Д. Јефтић  
Број уписа 2007/94  
Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ  
Наслов рада УЛОГА ГАЛЕКТИНА 3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ У  
Ментор проф. др Нада Пејновић ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ

Потписани Илија Д. Јефтић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 30.09.2015.

Јефтић Илија

**ОБРАЗАЦ 3.**

**Изјава о коришћењу**

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

УЛОГА ГАЛЕКТИНА-3 У РАЗВОЈУ СТЕАТОХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ  
ЈЕТРЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ГОЈАЗНОСТИ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис аутора**

У Крагујевцу, 30.09.2015.

Љејпана Чмија