



Лични подаци руководиоца пројекта

Име : Илија

Презиме : Јефтић

E-mail адреса: ilijamb@yahoo.com

Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : Улога Галектина-3 у развоју стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности

Кључне речи : Галектин-3, стеатохепатитис, стеатоза, фиброза, гојазност, тип 2 Diabetes mellitus-a

Сажетак

Неалкохолна масна болест јетре (енгл. NAFLD - Nonalcoholic fatty liver disease) обухвата различит спектар болести, од једноставне стеатозе која представља акумулацију масти у јетри па до неалкохолног стеатохепатитиса (енгл. NASH - Nonalcoholic steatohepatitis), цирозе и могућег настанка хепатоцелуларног карцинома.¹ Тачан узрок NASH-а није познат, ипак зна се да се често јавља код особа са одређеним медицинским стањима као што су гојазност, дијабетес и инсулинска резистенција.² Патогенеза настанка NASH-а на пољу стеатозе није још увек у потпуности разјашњена, најшире је прихваћена теорија „два удараца“.³ „Први ударац“ представља екцесивну акумулацију липида која је последица инсулинске резистенције док се оксидативни стрес као последица митохондријалне β -оксидације масних киселина, продукција проинфламаторних цитокина и адипокина од стране висцералног адипозног ткива (ВАТ), ендотоксин из бактерија пореклом из гастроинтестиналног тракта (ГИТ), активација инфламазома, сматрају потенцијалним факторима који су одговорни за „други ударац“ односно оштећење хепатоцита, инфламацију и последичну фиброзу.⁴ Најновија истраживања су показала да се у мишијем моделу индуковане гојазности,



хронична инфламација ниског степена (енгл. low-grade inflammation) у ВАТ-у дешава од 6-16 недеље, док се сличан процес у јетри дешава у периоду између 16. и 26. недеље. Кључни показатељи инфламације у јетри укључују интерлеукин (IL)-1 β , фактор некрозе тумора (енгл. tumor necrosis factor, TNF) – α и CD11c и CD11b позитивне макрофаге.⁵ Са друге стране активација Toll-like рецептора 4 (TLR - engl. Toll-like receptors) слободним масним киселинама или ендотоксином пореклом из ГИТ-а, доводи до активације NF κ B (енгл. Nuclear factor- κ B) укљученог у регулацију експресије гена за проинфламаторне цитокине, што за последицу има продукцију проинфламаторних хемокина и цитокина који имају снажан ефекат на регрутовање циркулаторних моноцита у јетру и активацију Купферових и стелатних ћелија, кључних ћелија у процесу фиброгенезе.⁶ Такође је показано да хепатоцити изложени дејству палмитинске киселине у садејству липополисахарида продукују IL-1 β .⁷ Даља прогресија у правцу цирозе може захтевати и „трећи ударац“ који посебно промовише фиброзу, индукцијом диференцијације стелатних ћелија у правцу настанка миофибробласта, процеса који обухвата померање имунског одговора у правцу Th2 и поларизацију макрофага у правцу M2 фенотипа.⁸ Продукција IL-13 је веома битна у развоју фиброзе јетре када је у питању NASH.⁹ Механизам којим IL-13 фаворизује процес фиброзе подразумева стимулацију продукције TGF- β 1.¹⁰ Недавно је показана кључна улога IL-33 у процесу фиброзе јетре, посредоване преко ефеката IL-13 продукованог од стране резидентних лимфоидних ћелија природне имуности тип 2 (innate lymphoid cells, ILC2) у јетри.¹¹

Циљ истраживања

Циљ нашег истраживања је да испитамо улогу Gal-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти. Сходно основном циљу истраживања очекујемо да истраживање покаже протективну улогу Gal-3 у развоју стеатозе у условима повећаног енергетског уноса исхраном богатом мастима. Са друге стране очекујемо да покажемо профиброгену улогу Gal-3 у развоју фиброзе јетре.

Актуелност истраживања

Галектин-3 (Gal-3) је члан фамилије β -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У јетри Gal-3 је нормално експримиран у Купферовим ћелијама и епителним ћелијама билијарног канала, док га здрави хепатоцити не експримирају. Досадашњим истраживањима делеција гена за Gal-3 доведена је у везу са неалкохолном масном јетром, тачније показано је да Gal-3 дефицијентни мишеви у узрасту од 6 месеци развијају NAFLD.¹² Такође је показано да је делеција Gal-3 повезана са дисрегулацијом у метаболизму глукозе, повећаном количином висцералног адипозног ткива као и системском инфламацијом.¹³ Један од могућих механизма протективног ефекта Gal-3 везан је за његову функцију рецептора за крајње продукте метаболизма глукозе (енгл.



advanced glycation end-products, AGE) и липида (енгл. advanced lipoxidation endproducts, ALE), њиховој деградацији и уклањању из циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита, који настаје као последица енергетског дизбаланса организма.¹⁴ Најновија истраживања су такође показала да се у мишијем моделу индуковане гојазности, делеција Gal-3 погоршава инфламацију у панкреасу и висцералном адипозном ткиву.^{15,16} Са друге стране када је процес фиброгенезе у јетри у питању, показано је да делеција гена за Gal-3 блокира активацију миофибробласта и експресију проколагена I *in vitro* и *in vivo* и значајно редукује фиброзу у јетри.¹⁷ Активиране стелатне ћелије, тј. миофибробласти, експримирају Gal-3, а такође је показано да је Gal-3 неопходан за активацију ових ћелија од стране Купферових ћелија.¹⁸

Предмет и опис истраживања:

Главни циљ истраживања: Испитати улогу Gal-3 у патогенези стеатохепатитиса и фиброзе јетре у експерименталном моделу гојазности применом дијете са високим садржајем масти;

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

- Дефинисати и квантификовати масну инфилтрацију јетре (стеатозу јетре) коришћењем циљаних хистолошких бојења
- Дефинисати и квантификовати фиброзу јетре коришћењем циљаних хистолошких бојења
- Дефинисати и квантификовати стеатохепатитис применом скор система (инфилтрација 0-3, стеатоза 0-4, фиброза 0-4, дегенерација хепатоцита 0-1)
- Испитати биохемијске параметре оштећења јетре одређивањем концентрације АЛТ и АСТ у серуму;
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и процесу фиброзе у јетри
- Пратити развој гојазности мерењем увећања телесне масе и количине висцералног адипозног ткива, као и утврђивањем липидног статуса након индукције болести; утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у висцералном адипозном ткиву
- Утврдити фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у панкреасу
- Пратити развој инсулинске резистенције одређивањем параметара гликорегулације: гликемије, концентрације инсулина у крви, гликозилираног



хемоглобина (HbA1c) и израчунавањем НОМА-IR (енгл. *Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance*);

- Одредити концентрације цитокина TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33 и TGF- β у системској циркулацији и супернатантима добијеним из хомогенизованог ткива јетре.
- Одредити нивое експресије гена значајних за метаболизам масти у јетри и висцералном масном ткиву методом ланчане реакције полимеразе;
- Одредити нивое експресије гена значајних за развој инфламације у јетри и висцералном масном ткиву методом ланчане реакције полимеразе;
- Одредити нивое експресије гена значајних за развој фиброзе у јетри методом ланчане реакције полимеразе;

Експерименталне животиње:

Као експерименталне животиње биће коришћени Gal-3 дефицијентни (енгл. knockout, LGALS3^{-/-}) и Gal-3 позитивни мишеви соја C57BL/6 (енгл. wild-type, WT), мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Гојазност и тип 2 Diabetes mellitus-а биће индуковани применом дијете са високим садржајем масти (60%) у трајању 24 недеље. Део експерименталних животиња ће у 19. недељи примити две дозе стрептозотоцина са циљем индукције тип 2 Diabetes mellitus-а. Метаболички параметри развоја болести биће праћени периодично.

Хистолошка анализа:

Морфологију јетре и степен инфламације испитаћемо на препаратима бојеним хематоксилин-еозин техником (HE). Масну инфилтрацију јетре испитаћемо селективном *Oil Red O* методом за бојење масти. Степен фиброзе испитаћемо селективним методама за бојење колагена, *Picro Sirius Red* и *Trichrome Masson*. Коришћењем програма за анализу фотомикрографија *ImageJ* извршићемо семиквантитативну анализу количине липида и колагена у ткиву.

Имунохистохемија:

На препаратима јетре, масног ткива и панкреаса испитаћемо експримирање следећих молекула: Gal 3, CD68, α -SMA, RAGE, AGE, F4/80, NLRP3 инфламазома и IL-1 β

Биохемијска анализа:



Трансаминазе (AST, ALT), липиди (укупни холестерол и триглицериди) и гликозирани хемоглобин (HbA1c) из серума жртвованих животиња биће одређене применом *Olympus* китова за одређивање трансаминаза и коришћењем *AU 400 Olympus chemistry analyzer-a*.

ELISA:

Нивои цитокина (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33 и TGF- β) и инсулина у серуму биће одређивани ELISA тестом.

Проточна цитометрија:

Параметри инфламације (степен и фенотип инфилтрованих инфламаторних ћелија и експресија интраћелијских цитокина) биће одређивани у циљним ткивима методом проточне цитометрије коришћењем следећих антитела: CD3, CD4, CD8, CD11c, CD11b, F4/80, CCR7, CXCR3, Lin cost, Sca-1, IL-1 β , NLRP3, IL-13 и TGF β .

RT-PCR:

Квантификација експресија гена укључених у процес инфламације, стеатозе и фиброзе биће одређивана методом ланчане реакције полимеразе (Realtime polimerase chain reaction-RT-PCR). Овом методом ћемо испитати експресију следећих гена: CD11c, CD36, TNF- α , collagen I, α -smooth muscle actin, IL-13, ASC, NLRP3, pro-caspase-1, pro-Collagen 1, pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-IL-33, IL-33, TGF β 1, IL-10, RAGE, F4/80, GFAP. Експресија гена ће бити нормализована у односу на експресију β актина.

Аблација гена за Gal-3 индукује убрзан развој гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a у условима повећаног енергетског уноса дијетом са високим садржајем масти. Gal-3 дефицијентни мишеви имају повећану телесну масу, количину висцералног адипозног ткива, гликемију наше и инсулинемију, као и присутне параметре инфламације у висцералном масним ткиву, панкреасу и системској циркулацији. У условима дијете са високим садржајем масти долази до повећања крајњих продуката метаболизма липида и глукозе (АЛЕ и АГЕ), који покрећу инфламацију у различитим метаболичким ткивима, укључујући и јетру. Могућа протективна улога Gal-3 у развоју стеатозе и следствене инфламације у јетри (стеатохепатитиса) огледа се у томе што овај молекул има улогу у везивању и одстрањивању крајњих продукте метаболизма глукозе и липида, као и ендотоксина који су окидачи хроничне инфламације у метаболичким ткивима. Са друге стране када је процес фиброгенезе у јетри у питању, очекујемо да делеција гена за Gal-3 блокира активацију миофибробласта, и тиме следствено процес фиброзе.

Значај истраживања



Значај предложеног истраживања се састоји у расветљавању механизма стеатохепатитиса и фиброзе јетре у условима гојазности и тип 2 дијабетеса након примене дијете са високим садржајем масти и посебно улоге Gal-3 у овим процесима што може имати значај у креирању могућих нових терапијских приступа.

Временски оквир

Планирано истраживање биће спроведено у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Очекивани временски оквир за реализацију пројекта је две године.

Литература

1. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2009;50:412–416.
2. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917–923.
3. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006;87:1–16.
4. Hideki F, Norifumi Kawada. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterology* 2012;47:215-225.
5. Stanton MC, Shen SC, Jakson JV, et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *J Inflamm* 2011;8:8-15
6. De Minicis S, Svegliati-Baroni G. Fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5:179-87.
7. Weng HL. et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor- β 1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology*. 2009; 50: 230-243.
8. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:702–707.
9. Shimamura T. et al. 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.
10. Csac T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Syabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 2011;54:133-144.
11. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Neurath MF, Pflanz S, Wirtz S. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 2013;39(2):357-71).
12. 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;210:469-77.



13. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, et al. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice PLoS One. 2013; 8: e57915
14. 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
15. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013; 62:1932-44. doi: 10.2337/db12-022
16. Pejnovic N, Pantic J, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic A, Arsenijevic N, et al. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte* 2013; 2:4, 1-6
17. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirer F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:5060-5065.
18. Neil C.Henderson, Alison, C.Mackinnon,Sarah L. Farnworth, Françoise Poirier, Francesco P. Russo, John P. Iredale, Christopher Haslett, Kenneth J. Simpson, and Tariq Sethi. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5060–5065.