



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Бојана Ј. Симовић Марковић

Галектин-3 у експрименталном моделу акутног
КОЛИТИСА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2016. године

Својим научним радом који сам писала црпећи позната и тражећи нова сазнања се најтоплије и најискреније захваљујем свом ментору доц. др Владиславу Воларевићу за неизмерну подршку и разумевање у тренуцима посустајања кроз све ове године заједничког рада.

Сећајући се својих првих корака, упућујем најдубљу захвалност својој породици за безрезервну подршку у сваком тренутку. Без њихове љубави, не бих успела.

Хвала најдражи МОС-у!

Рад на овом докторату имао је посебну драж због екипе која ме је окруживала. Сања, Ацо, Марина и Јасмине од срца хвала на помоћи и подршци, били сте прави пријатељи када су се ствари чиниле безизлазне.

За велику помоћ и указано поверење на мом научном путу искрено се захваљујем проф. др Миодрагу Л. Лукићу и проф. др Небојши Арсенијевићу.

Посебну захвалност изражавам доц. др Слободанки Митровић и др Милошу Милосављевићу на стручној и пријатељској подршци.

Научни рад тражи упорност, стрпљење и много одрицања, али је изазов бити део марљивог колектива Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија.

Велико хвала!

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. ИНФЛАМАЦИЈСКА БОЛЕСТ ЦРЕВА	1
1.1.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија	1
1.1.2. Патогенеза	4
1.1.2.1. <i>Неутрофили</i>	4
1.1.2.2. <i>Мастоцити и еозинофили</i>	5
1.1.2.3. <i>NKT и NK ћелије</i>	6
1.1.2.4. <i>Дендритске ћелије</i>	6
1.1.2.5. <i>Макрофаги</i>	7
1.1.3. Клиничка слика	8
1.1.4. Дијагноза	9
1.1.5. Терапија	12
1.1.5.1. <i>Биолошка терапија улцерозног колитиса</i>	12
1.2. DSS КОЛИТИС: МОДЕЛ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА	14
1.2.1. Опште карактеристике декстран натријум сулфата	14
1.2.2. Индукција колитиса	15
1.2.3. Клинички ток и хистолошке промене у колитису изазваном DSS-ом	16
1.2.4. Патогенеза колитиса изазваног DSS-ом	16
1.2.4.1. <i>Улога ћелија урођене имуности у патогенези колитиса изазваног DSS-ом</i>	17
1.2.4.2. <i>Улога цитокина у патогенези колитиса изазваног DSS-ом</i>	20
1.3. ГАЛЕКТИН 3	20
1.3.1. Класификација и структура галектинских молекула ...	21
1.3.2. Експресија и функција галектина	22
1.3.3. Структура галектина 3	25
1.3.4. Физиолошка улога галектина 3	28
1.3.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора	29
1.3.6. Експресија галектина 3 у ткиву колона	32
2. ЦИЉ РАДА	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
3.1. Лабораторијске животиње	35
3.1.1. Поступак добијања C57/BL6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3	35
3.2. Индукција експерименталног акутног колитиса декстран натријум сулфатом	37
3.3. Одређивање клиничког скорa	38
3.3.1. Фиксација и депарафинизација ткива колона	38
3.3.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	39
3.3.3. Одређивање хистолошког скорa	39
3.4. Апликација Gal-3INH	40
3.5. Апликација α-галактоцерамида	41
3.6. Апликација MSCs	41
3.7. Третман антибиотцима и антимикотиком	41

3.8. Изолација инфламаторних ћелија из <i>lamina propria</i>-е ткива колона	41
3.9. Проточна цитометријска анализа популација мононуклеарних ћелија ткива колона.....	42
3.9.1. Бојење мембранских маркера	43
3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина	45
3.9.2.1. Стимулација ћелија	45
3.9.2.2. Бојење површинских маркера	46
3.9.2.3. Фиксација и пермеабилитација ћелија	46
3.9.2.4. Бојење цитокина у ћелији	47
3.10. Изолација и <i>in vitro</i> активација макрофага.....	48
3.11. Делеција макрофага	48
3.12. Изолација и пасивни трансфер неутрофила	48
3.13. Изолација и пасивни трансфер дендритских ћелија	49
3.14. Кокултивација перитонеалних макрофага и MSCs	50
3.15. Мерење концентрације IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10 и TGF-β у серуму, изолату ткива колона и супернатанту	50
3.16. Имунохистохемијске анализе	52
3.17. Полимеризована ланчана реакција	53
3.17.1. Изолација РНК	53
3.17.2. Реверзна транскрипција	54
3.17.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, <i>real time polymerase chain reaction</i>)	54
3.18. Статистичка обрада података	55
4. РЕЗУЛТАТИ	56
4.1. Делеција Gal-3 гена значајно смањује оштећење ткива ткива колона изазвано DSS-ом	56
4.1.1. Gal-3 ^{-/-} мишеви имају мању концентрацију IL-1 β и TNF- α и већу концентрацију TGF- β и IL-10 у серуму 7 дана након примене DSS-а	59
4.1.2. Експресија Gal-3 молекула у ткиву колона	60
4.2. Процент и број активираних макрофага је значајно мања у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом	61
4.2.1. Gal-3 делеција узрокује алтернативну активацију макрофага.....	65
4.2.2. Макрофаги, изоловани из перитонеума здравих Gal-3 ^{-/-} мишева и <i>in vitro</i> активирани липополисахаридом и DSS-ом, продуковали су значајно мање TNF- α и IL-1 β у поређењу са C57BL/6 макрофагима.....	67
4.2.3. Пасивни трансфер перитонеалних макрофага	68
4.2.4. Делеција Gal-3 гена узрокује мању експресију NALP-а и IL-1 β	71
4.2.5. Делеција макрофага значајно смањује акутни колитис у C57BL/6 и Gal-3 ^{-/-} мишева.....	73
4.3. Gal-3^{-/-} мишеви имају мање инфламаторних дендритских ћелија, а више регулаторних дендритских ћелија.....	75
4.3.1. Пасивни трансфер дендритских ћелија	78

4.4. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом	80
4.5. Делација Gal-3 гена смањује број неутрофила у ткиву колона	83
4.6. Gal-3 делација не мења заступљеност мастоцита, еозинофила и nk ћелија у ткиву колона мишева третираних DSS-ом.....	86
4.7. Утицај микрофлоре на патогенезу акутног колитиса	89
4.8. Примена <i>Davanat</i>-а значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом	91
4.8.1. Gal-3INH значајно смањује ниво серумског IL-1 β и TNF- α	93
4.8.2. Примена <i>Davanat</i> -а смањује експресију NALP-а и IL-1 β	94
4.9. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага у ткиву колона	95
4.9.1.Превентивна примена MSCs значајно смањује колитис мишева третираних DSS-ом	95
4.9.2. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом	98
4.9.3 Примена MSCs значајно смањује инфилтрацију инфламаторних ћелија у ткиво колона мишева третираних DSS-ом	99
4.9.4. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага	100
5. ДИСКУСИЈА	103
5.1. Делација Gal-3 гена редукује оштећење ткива колона у колитису изазваном DSS-ом	103
5.2. Gal-3 делација смањује инфлукс M1 макрофага у ткиво колона у колитису изазваном DSS-ом	104
5.3. Делација Gal-3 гена смањују инфлукс инфламаторних ћелија у ткиво колона	108
5.4. Утицај и значај микрофлоре у колитису изазваном DSS-ом..	111
5.5. Превентивна примена Gal-3INH је смањила оштећење ткива колона и инфламацију изазвану DSS-ом	112
5.6. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs поспешила је алтернативну активацију макрофага у ткиву колона	113
6. ЗАКЉУЧАК	117
СКРАЋЕНИЦЕ	119
7. РЕФЕРЕНЦЕ	121

8. ПРИЛОГ	159
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	159
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION	163
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА	166
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	168
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS	170
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ	173

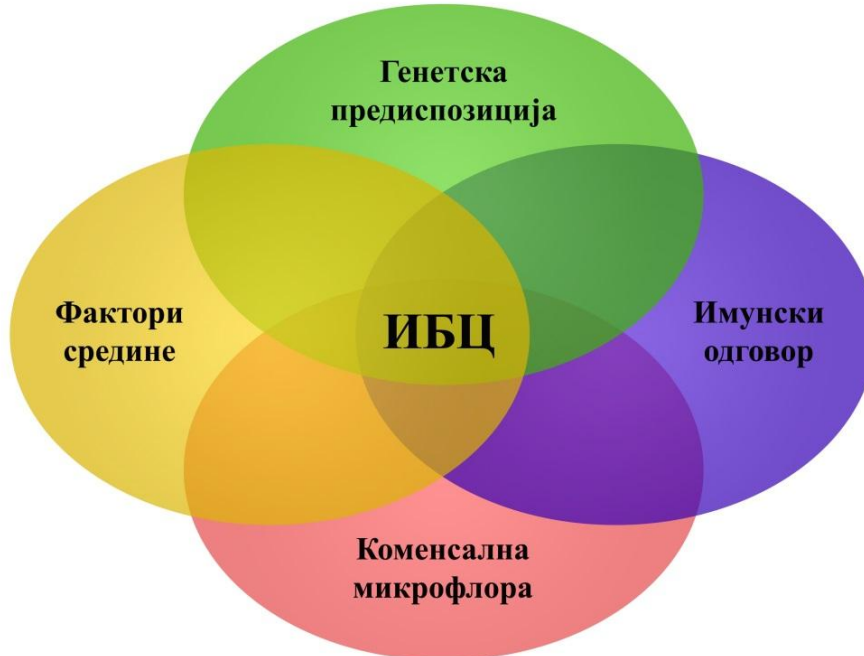
1. УВОД

У уводном делу објашњене су етиологија и патогенеза инфламацијске болести црева у људи, описана имунопатогенеза експерименталног колитиса, приказани биолошки ефекти галектина 3 и указано је на његов утицај у имунском одговору.

1.1. ИНФЛАМАЦИЈСКА БОЛЕСТ ЦРЕВА

1.1.1. Дефиниција, етиологија и епидемиологија

Инфламацијска болест црева представља хроничну инфламацију црева. Два главна клиничка ентитета ове болести су улцерозни колитис и Кророва болест (1). Постоји и интермедијарни облик болести у који се убраја 10-15% пацијената, који се на темељу клиничких и дијагностичких критеријума, не могу са сигурношћу сврстати ни у улцерозни колитис или Кророву болест. Етиологија и патогенеза инфламацијске болести црева нису у потпуности разјашњене (Слика 1).



Слика 1. Етиолошки фактори у инфламацијској болести црева.

Инфламацијску болест црева су први описали *Wilks* и *Moxon* 1875. године. Претпоставља се да је инфламацијска болест црева резултат неадекватног одговора имунског система домаћина на коменсалне бактерије у особа са генетском предиспозицијом (2-5). Генетски фактори играју важну улогу у патогенези инфламацијске болести црева. Око 5 до 10 % пацијената потврђује позитивну породичну анамнезу (6). Фактори средине, као и навике особа могу да утичу на развој инфламацијске болести црева. Иако је попис инкриминишућих фактора дуг (Табела 1), пушење је једини јасно доказани фактор средине који повећава ризик од појаве Кроне болести, а смањује ризик од настанка улцерозног колитиса (7). Велики значај се придаје и психосоцијалним факторима који могу допринети клиничком погоршању болести (Табела 1) (7).

Подаци из литературе (7-10) указују да коменсална бактеријска флора утиче на развој инфламацијске болести црева. Запаљенска болест црева се не развија када се животиње гаје под стерилним условима.

Преваленца улцерозног колитиса и Кроне болести у Северној Америци и Европи је 10-200 случајева на 100.000 становника. Највећа инциденца ове болести је у развијеним земљама и јасно је повезана са северним географским ширинама, а релативно је ретка у Азији, Африци и Латинској Америци. Инциденца Кроне болести је порасла током последњих неколико деценија, док тренд за улцерозни колитис није јасно дефинисан. Претпоставља се да преко два милиона људи широм света болује од инфламацијске болести црева (11, 12). Болест се јавља између 15 и 35 године живота. Оба пола су подједнако погођена овом болешћу (13).

Табела 1. Фактори средине који су повезани са настанком и развојем инфламацијске болести црева.

Фактори	Епидемиолошка повезаност	Патофизиолошка повезаност
Пушење	<ul style="list-style-type: none"> • активно пушење: смањује ризик и повезано је са блажим клиничким током болести • бивши пушачи: повећан ризик од појаве улцерозног колитиса •• активно пушење: повећава ризик и повезано је са тежом клиничком сликом болести 	<p>Мења цитокински профил мукозе</p> <p>Мења бактерицидну активност и еикосаноидну каскаду</p> <p>Смањује секрецију интестиналног IgA. Утиче на стварање слободних кисеоничких радикала</p>
Апендектомија	<ul style="list-style-type: none"> • смањује ризик од појаве болести 	<p>Мења баланс између ефекторских и регулаторних фактора</p>
Социоекономски фактори	<p>◇ Високи економски статус повећава ризик за појаву инфламаторне болести црева.</p>	<p>“Хигијенска теорија”. Виши економски статус је повезан са мањим излагањем паразитским инфестацијама током детињства. Ово резултира смањеним Th2 имунским одговором и продукцијом регулаторних цитокина.</p>

◇ Инфламацијска болест црева

• Улцерозни колитис

•• Кророва болест

1.1.2. Патогенеза

Патогенеза инфламацијске болести црева је мултифакторијална, а ток често непредвидив. У основи патогенезе улцерозног колитиса и Кроне болести је неконтролисани и продужени имунски одговор на цревне микроорганизме. Тип имунског одговора одредиће и манифестацију болести. Код Кроне болести патохистолошки се уочавају грануломатозни мукозни инфилтрати, док код улцерозног колитиса се јављају неутрофилне инфилтрације са епителном деструкцијом.

1.1.2.1. Неутрофили

Сматра се да у основи аутоимунског механизма инфламацијске болести црева лежи деструктивни инфламацијски одговор, који је директно усмерен на сопствене антигене муцина, пехарастих ћелија, епителних ћелија колона и других ћелија (14-17). Антитела усмерена против неутрофила су пронађена код већине пацијената оболелих од улцерозног колитиса (16, 18-20). Титар анти-неутрофилних антитела не корелира са активношћу болести (21) и њихов биолошки значај није још дефинисан у пацијената са улцерозним колитисом. *Hanai* и сарадници су показали да у пацијената са улцерозним колитисом број неутрофила је три пута већи у односу на онај у здравих особа (22). Запаљена мукоза у пацијената са улцерозним колитисом се карактерише продукцијом цитокина IL-8 и експресијом mRNA IL-8 (23). Интерлеукин-8 није само хемоатрактивна супстанца, него и супстанца која поспешује ослобађање кисеоничких радикала из неутрофила. Већина неутрофила који инфилтрирају мукозу колона су уочени код активне форме улцерозног колитиса (24).

Основна хистолошка карактеристика лезија активне форме улцерозног колитиса је инфилтрација неутрофилима, која се такође налазе и код активне форме Кроне болести (25, 26). Биохемијски фактори изазивају активно упућивање циркулишућих неутрофила на место запаљења. Неколико њих, међусобно различитих по хемијској структури, пореклу и рецепторској специфичности, као што су *lipid-derived mediators leukotriene B4 (LTB4)* (27), *platelet-activating factor (PAF)* (28), C5a, продукт активације система комплемента C5a (29) и IL-8 (30-32) поспешују миграцију неутрофила.

Макрофаги углавном продукују IL-8 (30-32), цитокин који је високо селективан за неутрофиле (30-34), па самим тим и представља најбољи фактор за миграцију неутрофила.

Неутрофили представљају кључне медијаторе инфламације у улцерозном колитису. Повећан број неутрофила корелира са активном фазом улцерозног колитиса, али не и током ремисије (35). Неутрофили екстензивно инфилтрирају ткиво колона пацијената са улцерозним колитисом, чак се могу детектовати током веома ране фазе инфламације мукозе (36, 37).

1.1.2.2. Мастоцити и еозинофили

Имунске ћелије мукозе црева, као што су мастоцити и еозинофили, играју важну улогу у патогенези улцерозног колитиса. Током активне инфламације у улцерозном колитису се секретују медијатори мастоцита, укључујући триптазу (38). Број еозинофила и мастоцита позитивних на триптазу био је значајно повећан у активној форми улцерозног колитиса у поређењу са пацијентима са неактивном формом обољења (39).

Еозинофили су резидентне ћелије у цревима у којим имају важну улогу у имунском одговору на хелминте (40). Због многобројних хемијских медијатора, претпоставило се да активирани еозинофили могу да иницирају инфламацију у цревима. Висок садржај медијатора ослобођен из еозинофила је детектован у фецесу (41) или течностима након перфузије колона (42) у пацијената са хроничним колитисом. Ово позитивно корелира са инфилтрацијом еозинофила у ткиву колона. Недавна студија (43) је показала да еозинофили експримирају CD98 и да се могу детектовати и у ткиву са инфламацијском болести црева, као и у здравих особа. Једно од објашњења ове појаве је да висока концентрација IFN- γ у ткиву колона у пацијената са инфламацијском болести црева, може да регулише експресију CD98 (44), а самим тим да индукује еозинофиле да експримирају CD98. Активацијом CD98⁺ еозинофила компромитује се функција епителне баријере, што доводи до веће апсорпције макромолекулских антигена у дубље ткиво црева у људи (43). Такође, активацијом CD98⁺ еозинофила, ослобађају се хемијски медијатори у запаљенској болести црева.

1.1.2.3. *NKT* и *NK* ћелије

У пацијената са улцерозним колитисом број NKG2A^+ Т лимфоцита је смањен у периферној крви, као и у мукози колона (45). Дендритске ћелије или епителне ћелије колона приказују антигене у склопу CD1d молекула *NKT* ћелијама, које затим продукују IL-13 и узрокују оштећење епителне баријере и развој улцерација у цревима (46).

Постоје опречни ставови о улози и броју *NK* ћелија у пацијената са улцерозним колитисом (47, 48). *NK* ћелије изоловане из крви пацијената са улцерозним колитисом имају дефекте у својој функцији, што укључује оштећење у цитотоксичности (49).

1.1.2.4. *Дендритске* ћелије

Интестиналне дендритске ћелије осигуравају баланс у гастроинтестиналном тракту између имуногености против патогена и толеранције на коменсалне бактерије (50). Нађене су промене у интестиналним дендритским ћелијама код пацијената са улцерозним колитисом (50, 51). Дендритске ћелије се сматрају кључним у иницијацији, одржавању и контроли запаљења у инфламацијској болести црева (52). Показано је да су TLR-2 и TLR-4, као и активирани маркер сазревања CD40 повећани на интестиналним дендритским ћелијама у пацијената са Кроновом болешћу (50). Број MDC8^+ моноцита који продукују TNF- α и који могу да буду прекурсори популације дендритских ћелија у мукози је повећан у пацијената са инфламацијском болести црева. Третман пацијената са Кроновом болешћу са анти-TNF- α антителима, редукује активацију дендритских ћелија (53, 54). Дендритске ћелије сазревају у запаљенском ткиву и уочен је повећан број $\text{CD86}^+\text{CD40}^+$ дендритских ћелија у периферној крви и ламини проприји пацијената са Кроновом болешћу и улцерозним колитисом. Дендритске ћелије изоловане из периферне крви пацијената са инфламацијском болести црева показују повећану способност да стимулишу имунски одговор (55-57). Ова ћелијска популација, као и њени прекурсори, је сензитивна на активацију проинфламаторним сигнаlima, што можда указује на локалну перзистенцију активације Т

лимфоцита поспешујући инфламацијску болест црева. Дендритске ћелије стимулишу примарни имунски одговор Т лимфоцита и детерминишу како ће овај имунски одговор да се развије, да ли ће бити имуногени (усмерен на патогене) или толерогени (усмерен на коменсалне бактерије) (58, 59). Примарна функција интестиналних дендритских ћелија је транспорт антигена у секундарно лимфно ткиво (мезентеричне лимфне чворове) и Пајерове плоче и на тај начин се ствара Т лимфоцитни имунски одговор специфичан за антигене у гастроинтестиналном тракту. Дендритске ћелије из ламине проприје гастроинтестиналног тракта, транспортују антигене интестиналних бактерија у мезентеричне лимфне чворове (60, 61) чиме изазива толеранцију на антигене из хране (62).

1.1.2.5. Макрофаги

Ткивни макрофаги, обично не мигрирају у лимфно ткиво, али могу да учествују у стеченом имунском одговору, тако што приказују обрађени антиген ефекторским Т лимфоцитима у ламини проприји (63, 64). Интестинални макрофаги и дендритске ћелије приказују МНС молекуле II класе, CD11c и CD11b. Само макрофаги из гастроинтестиналног тракта експримирају F4/80, CD68 и CD64. Сви мононуклеарни фагоцити који приказују CX3CR1 су макрофаги (65).

Активирани макрофаги продукују инфламаторне цитокине (TNF- α и IL-1 β) и слободне кисеоничке радикале (66, 67) и на тај начин посредују у патогенези улцерозног колитиса (68). Инхибиторни фактор миграције макрофага је прво описан као продукт активираних Т лимфоцита, који насумично инхибира перитонеалне макрофаге *in vitro* и поспешује акумулацију макрофага *in vivo* (69, 70). Показано је да су сами макрофаги извор овог инхибиторног фактора (71). Инхибиторни фактор миграције макрофага може да има улогу у акумулацији макрофага у мукози колона у пацијената са улцерозним колитисом, а проинфламаторни цитокини које продукују ови макрофаги могу да оштете мукозу колона (72). Серумска концентрација овог фактора је повишен у пацијената са улцерозним колитисом у поређењу са здравим особама, као и његова експресија у ткиву колона (73).

Потврђено је присуство активираниог NF- κ B у макрофагима и епителним ћелијама у запаљеној мукози у пацијената са инфламацијском болести црева (74). NF- κ B је нуклеарни транскрипциони фактор који има важну улогу у регулацији проинфламаторних цитокина у запаљенској болести црева (75).

1.1.3. Клиничка слика

Инфламаторни процес код улцерозног колитиса је ограничен на колон, док се промене код Крнове болести могу уочити дуж целог гастроинтестиналног тракта. У улцерозном колитису болест најчешће захвата цео колон (*pancolitis*), а ређе је сегменталног карактера (*proctitis*, *proctosigmoiditis*). Клинички симптоми улцерозног колитиса су тешка дијареја, ректално крварење и следствени губитак крви, тенезми и грчевити абдоминални болови, као и прогресивни губитак перисталтике, водећи у такозвани ригидни колон. Дијареја често може бити праћена великом количином гноја и слузи. Абдоминални бол је различитог интензитета и сразмеран је углавном степену болести. Бол је најчешће узрокован повећаном напетости зида колона, који је инфламиран, приликом мишићних контракција. Тежина симптома корелира са екстензивношћу болести. Иако, улцерозни колитис може почети акутно, симптоми обично постоје већ недељама и месецима.

Од екстраинтестиналних манифестација болести треба споменути: реуматоидни артритис, реуматоидни спондилитис, нодозни еритем, нодозну пиодермију и склерозирајући холангитис. Код дужег трајања болести (честе егзацербације) битно се ремети опште стање болесника, јавља се анемија, хипопротеинемија, мршављење, хиповитаминоза и хидроелектронски дисбаланс.

Као компликације улцерозног колитиса настају токсични мегаколон, перфорација, крварење и стриктуре колона. Након десет година од појаве првих знакова болести расте ризик од појаве карцинома у пацијената са улцерозним колитисом (1, 76, 77).

1.1.4. Дијагноза

До данас није пронађен тачан патогномични дијагностички тест за потврду улцерозног колитиса или Кронове болести. Дијагноза улцерозног колитиса се темељи на анамнестичким подацима, клиничкој слици, ендоскопском налазу, биопсији слузнице и радиолошком прегледу са лабораторијским налазима. У диференцијалној дијагнози је најважније да се разликује улцерозни колитис од Кронове болести. Разлике постоје у клиничкој слици, ендоскопском налазу, биопсији и радиолошком прегледу црева.

У лабораторијским налазима у активној фази инфламацијске болести црева карактеристична је убрзана седиментација еритроцита, повишене вредности С-реактивног протеина, као и повишене вредности фибриногена, хипоалбуминемија и повишени јетрини ензими, који могу бити последица токсикемије или сепсе (78). У хематолошким налазима се потврђује анемија, леукоцитоза и тромбоцитоза. Неопходна је детаљна микробиолошка анализа фецеса, којом је потребно искључити суперинфекцију у колону. Ендоскопски прегледи су најважнији дијагностички поступци за постављање дијагнозе и процену проширености болести у пацијената са улцерозним колитисом (проктосигмоидоскопија и колоноскопија) и Кроновом болешћу (колоноскопија са терминалном илеоскопијом, езофагогастроуденоскопија и ентероскопија). Слузница колона је нормално влажна и сјајна, са јасним васкуларним цртежом. Најраније промене слузнице колона које се дијагностикују ендоскопски у улцерозном колитису јесу хиперемеија, едем и губитак васкуларног цртежа, затим гранулираност, фријабилност и крварење слузнице, а у узнапредовалој болести могу се уочити улцерације, псеудополипи и стриктуре. Како еритематозна мукоза колона се карактерише фрагилношћу, она тежи да крвари и при најмањој стимулацији. Када је фрагилност значајна може се јавити спонтано крварење, без контакта (79). Површина слузнице показује неравномерност и неправилност, а степен ткивне грануларности варира у смислу финоће или грубости (80, 81, 82). Слузница између улкуса је увек запаљенски измењена. У фази ремисије слузница је равна и бледа. Псеудополипи су одраз процеса зацељења ранијих запаљенских промена са хипетрофијом преосталих делова слузнице. У Кроновој болести ректум је

захваћен тек у 50% пацијената тако да степен болести се процењује и тоталном колоноскопијом и илеоскопијом. Ендоскопске промене у Кроновој болести су по правилу дисконтинуиране (*skip lesions*). Карактеристична је оштра граница између запаљенски измењене и нормалне слузнице.

У тешким облицима болести важно је урадити нативни снимак абдомена којим се искључује или потврђује токсични мегаколон, илеус или перфорација црева. Иригографија је корисна за процену проширености болести у колону, као и откривање компликација попут стриктура и карцинома. Промене у улцерозном колитису су ограничене на слузницу колоне, док су у Кроновој болести трансмуралне. Свакако, најранија лезија у инфламацијској болести црева је запаљење крипти и формирање криптног абцеса. Стварање абцеса прелази у мале површинске улцерације које заузимају целу дебљину слузнице. У мишићном слоју нити поступно хипертрофирају што доводи до скраћења црева, а због оживљених промена често настају стриктуре. Лезија је слична и код улцерозног колитиса и код Кронове болести, али је код Кронове болести више фокалног карактера. Оток запаљеног ткива уз дубоке фисуре и улцерације, даје слузници калдрмаст изглед. Слузница око улкуса код улцерозног колитиса је увек промењена за разлику код Кронове болести где је улкус окружен нормалном слузницом. У 50-60% пацијената са Кроновом болешћу формирају се грануломи. Накупљају се макрофаги и друге запаљенске ћелије и формирају се грануломи без казеозне некрозе који садрже епителоидне и мултинуклеарне циновске ћелије (78). Грануломи могу бити у свим слојевима цревног зида, од слузнице до серозе, а макроскопски се могу видети као милијарни чворовићи (5). Поред цревног зида грануломи могу постојати и у лимфним чворовима, мезентеријуму, перитонеуму и јетри. Грануломи су присутни код 50-60% болесника (5).

Колитиси друге етиологије, као што су инфективни колитиси, исхемични колитис и радијациони колитис могу да отежају дефинитивну дијагнозу улцерозног колитиса. Амебна дизентерија може да створи дијагностичке потешкоће исто као ентероколитис узрокован хеликобактером, који у појединим случајевима може да опонаша и улцерозни колитис и Кронову болест. Сличну клиничку слику може да да и псеудомембранозни колитис узрокован са

Clostridium difficile. Једна од карактеристика инфективног колитиса је дијареја, често праћена крварењем (80, 83). Проспективна студија (84) је показала да трећина пацијената са крвавом дијарејом и почетном сумњом на улцерозни колитис има инфективни колитис. Дијагноза може бити додатно комплексна, због чињенице да пацијенти који имају инфламацијску болест црева могу да имају и инфекцију. За разлику од пацијената који пате од инфламацијске болести црева, пацијенти са инфективним колитисом се спонтано и веома често брзо сами опораве. Зато је неопходно у акутној фази пратити клинички прогрес. У случају оштећења мукозе, ректум остаје интактан, док су улцерације прекривене жутим ексудатом, што је индикација за озбиљније праћење болести. Биопсијом је могуће искључити инфективни колитис на основу хроничних промена, као што су нарушена морфологија крипти, атрофија крипти и базални лимфоидни агрегати, које се јављају код улцерозног колитиса и Кронове болести. Такође, инфективни колитис је могуће дијагностиковати ако су уочљиве псеудомембране, вирусне инклузије и трофозоити амеба. Тест засејавања култура користећи ткиво узето на биопсији је много валидније, неко микробиолошки тест фецеса у откривању патогена. У терапији улцерозног колитиса би требало имати у виду суперинфекцију са цитомегаловирусом, јер је могуће да не успе терапија или се основна болест погорша. Коришћење стероида и имуносупресивне терапије у улцерозном колитису, ствара се идеална средина за инфекцију и настањење цитомегаловируса. Цитомегаловирус се у великом проценту може детектовати у рекуретном улцерозном колитису, који не реагује добро на терапију. У неким случајевима клинички ток и погоршање улцерозног колитиса се може унапредити третирањем са антивиралним агенсом ганцикловиром (85-87).

Ишемични колитис се јавља најчешће код старијих пацијената и удружен је са срчаним болестима или васкуларном склерозом. Већина пацијената са ишемичним колитисом пати од изненадног абдоминалног бола и крвавих столица. Колоноскопијом се уочава едем мукозе и еритем, док ректум остаје интактан. Овај тип колитиса најчешће захвата ректосигмоидалну везу или спленичну флексуру, што може да доведе до инсуфицијентног снабдевања крвљу. Лезије се протежу дуж целог лумена и заузимају само фокалне сегменте,

док су остали делови прекривени нормалном слузницом. Лезије мукозе су сличне улцерозном колитису, али на основу клиничке прогресије се може поставити диференцијална дијагноза (80, 83).

Када су пацијенти подвргнути поновљеном излагању радијацијског зрачења приликом третмана код карцинома простате или цервикса, а имају кржаве дијареје, требало би посумњати на радијацијски колитис. У овом случају предилекциона места промена су проксимални ректум и дистални сигмоидни колон. Да би се диференцијално дијагностички разликовали радијацијски колитис од улцерозног колитиса потребно је обратити пажњу на карактеристичне промене мукозе код улцерозног колитиса (80, 83).

1.1.5. Терапија

Лечење улцерозног колитиса примарно је конзервативно и у већини болесника даје добре резултате. Прва терапија у лечењу улцерозног колитиса код блажих и средње активних форми је сулфасалазин и друга једињења 5-ASA-а. Аминосалицилати (месалазин 5-ASA-а) представљају активну супстанцу која делује анти-инфламаторно, тако што инхибира продукцију про-инфламаторних цитокина и медијатора. Недавно је откривено да овај лек делује преко појачане експресије PPA рецептора (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) на епителним ћелијама колона (88).

Упркос, бројним студијама антибиотици немају улогу у лечењу активне и мирне фазе улцерозног колитиса. Поред наведених лекова користе се и кортикостероиди, азатриоприн, интравенски циклоспорин и на крају колектомија. Скоро половина пацијената са екстензивним хроничним улцерозним колитисом се лечи хирушки у првих десет година болести (89). Процена квалитета живота пацијената са улцерозним колитисом или Кроновом болешћу игра значајну улогу у лечењу пацијената.

1.1.5.1. Биолошка терапија улцерозног колитиса

У последње време придаје се велики значај новим терапијским могућностима у лечењу инфламацијске болести црева. Терапија матичним ћелијама све више добија на интересовању како у наследним, аутоимунским

болестима, тако и у инфламацијској болести црева. Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells* - MSCs) су адултне, мултипотентне ћелије, које се могу наћи у скоро сваком постнаталном ткиву (90, 91). MSCs могу да мењају имунски одговор, регулишу пролиферацију, активацију и ефекторске функције Т лимфоцита. Своје дејство могу да остварују преко директног ћелијског контакта, са ћелијама које презентују антигене (дендритске ћелије, макрофаги и В лимфоцити) као и са NK ћелијама или преко солубилних фактора (Схема 1) (92). Показано је да MSCs значајно смањују клинички ток и хистопатолошке промене у експерименталном колитису (93-99). Вероватни механизам који лежи у основи имуносупресивног ефекта ових ћелија је велика продукција анти-инфламаторног цитокина TGF- β (100). Група аутора (101) је показала да MSCs секретују галектин 3 и да MSCs код којих је овај молекул генетском делецијом "укинут" имају редуковане имуносупресивне ефекте. *Liu* и сарадници (102) су потврдили да MSCs експримирају и секретују молекул галектина 3 и да експресија овог молекула се није значајно мењала током пресејавања ћелија. Експресија овог молекула је позитивно корелирала са имуносупресивним функцијама MSCs (102). Требало би напоменути да примена матичних ћелија у терапији многих болести је још увек само у експерименталној фази, те да за њихову клиничку примену би требало сачекати још извесно време.

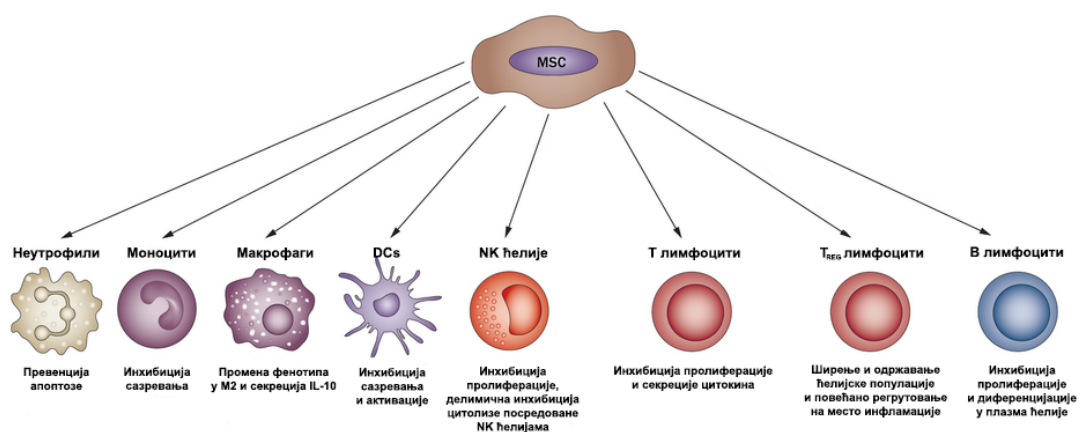


Схема 1. Имуносупресивни ефекти MSCs на различите ћелијске популације. MSCs имају имуносупресивно дејство на ћелије урођене и стечене имуности. Своје имуносупресивно дејство мезенхималне матичне ћелије испољавају преко процеса инхибиције пролиферације или диференцијације, као и сазревавања у функционалне имунске ћелије. (кориговано према: Tyndall A. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 10 (2):117-24).

1.2. DSS КОЛИТИС: МОДЕЛ УЛЦЕРОЗНОГ КОЛИТИСА

Да би се боље разумели различити етиолошки фактори инфламацијске болести црева, велики број експерименталних модела колитиса је развијен последњих неколико деценија у сврху научног истраживања. Ови експериментални приступи дају велики извор информација, у погледу сличности са биолошким системом и клиничким карактеристикама инфламацијске болести црева у људи.

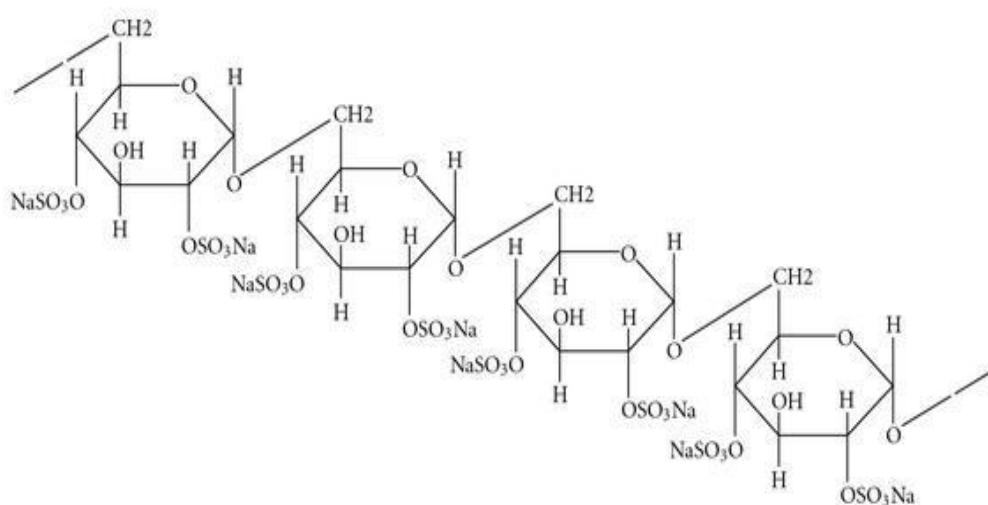
У ширем смислу експериментални модели колитиса се могу поделити на спонтано настали колитис, индуковани колитис, моделе настале генетском манипулацијом и оне настале адоптивним трансфером (103-105). Најчешће коришћени експериментални модели колитиса су хемијски индуковани модели инфламације у гастроинтестиналном тракту. Овоме доприноси лакоћа индукције модела, почетка, трајања и средње тежине инфламације која погодује контроли процеса. У хемијски индуковане моделе колитиса спадају колитиси индуковани са: декстран натријум сулфатом (енгл. *Dextran Sulphate Sodium - DSS*), тринитробензен сулфонском киселином (2,4,6 *Trinitrobenzene sulfonic acid- TNBS*), динитробензен сулфонском киселином (*Dinitrobenzene sulfonic acid- DNBS*), оксазолоном, сирћетном киселином, карагинаном и јодоацетамидом (106).

1.2.1. Опште карактеристике декстран натријум сулфата

Декстран је комплексни полимер синтетизован из сахарозе одређених бактерија, најчешће *Leuconostoc spp* и *Streptococcus spp* (107). Декстран натријум сулфат је полианјонски дериват декстрана, добијен естерификацијом са хлорсумпорном киселином, различите молекулске тежине, од 5 kDa до 1400 kDa (Слика 2). Садржај сумпора је приближно око 17%, који је распоређен на око две сулфатне групе по глукозним резидуама у молекулу декстрана. На собној температури је у облику белог пудера, док је високо солубилан у води (100 mg/ml).

Различити екстракти из морске траве, растворени у пијаћој води за мишеве, пацове и куниће узроковали су инфламацијске промене у колону ових

животиња (108). Поменути екстракти садрже карагинан (*carrageenan*), сулфатисан полисахарид са великом молекулском масом. Ово откриће је довело до развоја акутног модела колитиса изазваног деградираним карагинаном (109). *Okayasu* и сарадници су 1985. године први пут индуковали DSS колитис на хрчцима (110). Овај модел је модификован за коришћење у мишева (111), а такође је развијен и хронични модел у хрчака (112). Експериментални модел акутног колитиса изазваног DSS-ом је данас један од најчешће коришћених модела на мишевима, пацовима, хрчцима и гвинејским прасићима.



Слика 2. Хемијска структура декстран натријум сулфата. Декстран натријум сулфат је полианјонски дериват декстрана, добијен естерификацијом са хлорсумпорном киселином, различите молекулске тежине.

Мале количине DSS-а се могу наћи у макрофагима колона и мезентеричним лимфним чворовима, као и Купферовим ћелијама јетре, првог дана након администрације. У Купферовим ћелијама DSS се детектује и 8 недеља после примене DSS-а, али није детектован у ткиву мозга, тимуса, плућа и срца. DSS се излучује путем урина и фецеса (113).

1.2.2. Индукција колитиса

Молекулска тежина DSS-а је битан фактор у индукцији колитиса (114), као и моделу карциногенезе (115). Тежина колитиса и активност карциногенезе корелира са администрацијом DSS-а одређене молекулске тежине. У зависности

од концентрације раствора DSS-а, дужине и учесталости администрације DSS-а, животиње могу да развију акутни или хронични колитис (111).

Колитис се најчешће индукује давањем раствореног DSS-а у пијаћој води *ad libitum*. Акутни колитис се индукује администрацијом 2-5% раствора DSS-а у кратком периоду током 7 дана (111, 116-118). Хронични колитис се може развити константном индукцијом ниском концентрацијом DSS-а (1-2%) у раствору током дужих временским интервала примене (111, 112, 119-121).

1.2.3. Клинички ток и хистолошке промене у колитису изазваном DSS-ом

Клиничке и хистопатолошке карактеристике DSS колитиса су сличне као у пацијената са инфламацијском болести црева. Клиничке манифестације у акутној фази DSS колитиса су губитак телесне масе, дијареја, окултно крварење у столицу, пилоерекција, анемија и евентуална смрт (122). Типичне хистолошке промене су деплација муцина, дегенерација епитела и некроза која прогредира у нестанак епителних ћелија. Касније, се јавља инфилтрација ламине проприје и субмукозе неутрофилима, крипитис и сам абцес крипти (123).

1.2.4. Патогенеза колитиса изазваног DSS-ом

Тачан механизам како DSS иницира колитис није познат. Један од могућих механизма је повећање пропустљивости мукозе колона, што дозвољава пропуштање великих молекула као што је молекул DSS. Прве промене су уочљиве након првог дана DSS третмана у виду губитка једне компоненте чврсте везе (*tight junction*), *zonula occludens-1* и повећањем експресије проинфламаторних цитокина у ткиву колона (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ и IL-12) у колону (124-128).

Ови подаци подржавају теорију о повећаној пропустљивости у раној фази патогенезе колитиса индукованог DSS-ом. Други могући механизам је директно токсично дејство DSS-а на мукозу колона, што доводи до промене интегрин- $\alpha 4$ и M290 субјединице на епителним ћелијама, прекидајући њихову интеракцију са $\gamma\delta$ -интраепителним Т лимфоцитима (129). Улога $\gamma\delta$ -интраепителних Т лимфоцита у патогенези колитиса није позната. Сматра се да

учествују у очувању мукозе и зарастања након излагања различитим стимулусима као што је DSS (130).

Улога луминалних бактерија у патогенези DSS колитиса је нејасна. Примена метронидазола и ципрофлоксацина смањује тежину акутног експерименталног колитиса, али не и хроничног обољења у мишева (131). За разлику од већине експерименталних модела, под *germ-free* условима, мишеви развијају веома тежак колитис (132), док мишеви којима се апликују антигени нормалне интестиналне флоре, као што су анаероби ублажавају колитис (133).

CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити, такође немају кључну улогу у индукцији акутног DSS колитиса. Број CD8⁺ Т лимфоцита је смањен, док CD4⁺ Т лимфоцита остаје непромењен у акутном DSS колитису у BALB/c и C57BL/6 мишева (134). Колитис изазван DSS-ом се може развити у SCID, CD4⁺ дефицијентних, NK-дефицијентних и атимик CD-1 *nude* мишева, имплицирајући да ове ћелије немају кључну улогу у индукцији колитиса DSS-ом (135, 136).

Тачан механизам индукције колитиса DSS-ом није познат, али чињеница да губитак крипти и повећана пропустљивост обично претходе инфламацији, указују да се иницијалне промене одигравају на нивоу епителних ћелија, а инфламација се развија као секундарна реакција (122).

1.2.4.1. Улога ћелија урођене имуности у патогенези колитиса изазваног DSS-ом

Ћелије урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, еозинофили, неутрофили, NK и NKT ћелије) учествују у експерименталном акутном колитису изазваном DSS-ом (Схема 2) (137).

Новија истраживања указују (138) да макрофаги играју важну улогу у индукцији акутног колитиса изазваног DSS-ом. Макрофаги преузимају DSS и активирају NLRP3 инфламазом (енгл. *NOD-like receptor- NLR family, pyrin domain containing 3*), што повећава продукцију инфламаторних цитокина IL-1 β и IL-18. Каспаза-1 регулише секрецију биолошки активних IL-1 β и IL-18, за које је показано да имају улогу централних медијатора у колитису изазваном DSS-ом (139). Показано је да DSS индукује ослобађање IL-1 β из мишијих макрофага (140). Активација инфламазома је повезана са стварањем слободних радикала

кисеоника у одговору на различите стимулусе (141, 142), а DSS стимулише макрофаге да продукују слободне радикале кисеоника (143). Макрофаги који имају повећану продукцију азот монооксида (NO) и експресију азот монооксид синтазе (iNOS) погоршавају колитис изазван DSS-ом (144).

Декстран натријум сулфат са својим токсичним ефектом на епителне ћелије колона, изазива инвазију интестиналних бактерија у субепително ткиво. Дендритске ћелије хватају бактерије које прођу епител колона оштећен DSS-ом и активирају се посредством *Toll-like* рецептора (TLRs), ослобађају проинфламаторне цитокине (TNF- α , IL-12) и хемокине (*macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α , *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1, *keratinocyte-derived chemokine* (CXCL1/KC), CCL11), који пак индукују миграцију неутрофила, макрофага и еозинофила у ткиво колона (145, 146). Једна од главних карактеристика колитиса изазваног DSS-ом је активација неутрофила и њихово регрутовање у запаљено ткиво колона (147). Неутрофили мигрирају у ткиво колона које је оштећено DSS-ом, тако што бивају привучени хемокинима које продукују активирани дендритске ћелије (148). Такође, неутрофили играју важну улогу у фагоцитози интестиналних бактерија које су прошле кроз оштећен епител колона (148). Активирани неутрофили представљају велики извор инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и кисеоничких радикала (ROS), које изазивају оштећење колона и инфламацију (149).

Студије *in vitro* и *in vivo* су показале да NK ћелије имају протективну улогу у колитису изазваном DSS-ом (150). NK ћелије смањују проинфламаторну улогу неутрофила, укључујући производњу кисеоничких радикала и продукцију цитокина, директним контактом ћелија-ћелија преко инхибиторног рецептора NKG2A (150).

На месту инфламације узроковане DSS-ом повећан је број мастоцита, као и количина протеаза (151). Мастоцити продукују инфламаторне медијаторе и цитокине, као што су TNF- α , хистамин и триптазе, који могу да узрокују инфламацију и регрутовање неутрофила, као и других инфламаторних ћелија у ткиво колона (152).

Миграција еозинофила у гастроинтестинални тракт игра важну улогу у патогенези колитиса, посебно преко деловања својих запаљењских медијатора. Ослобађање еозинофилне пероксидазе и еозинофилног катјонског протеина повећава инфламацију (153, 154).

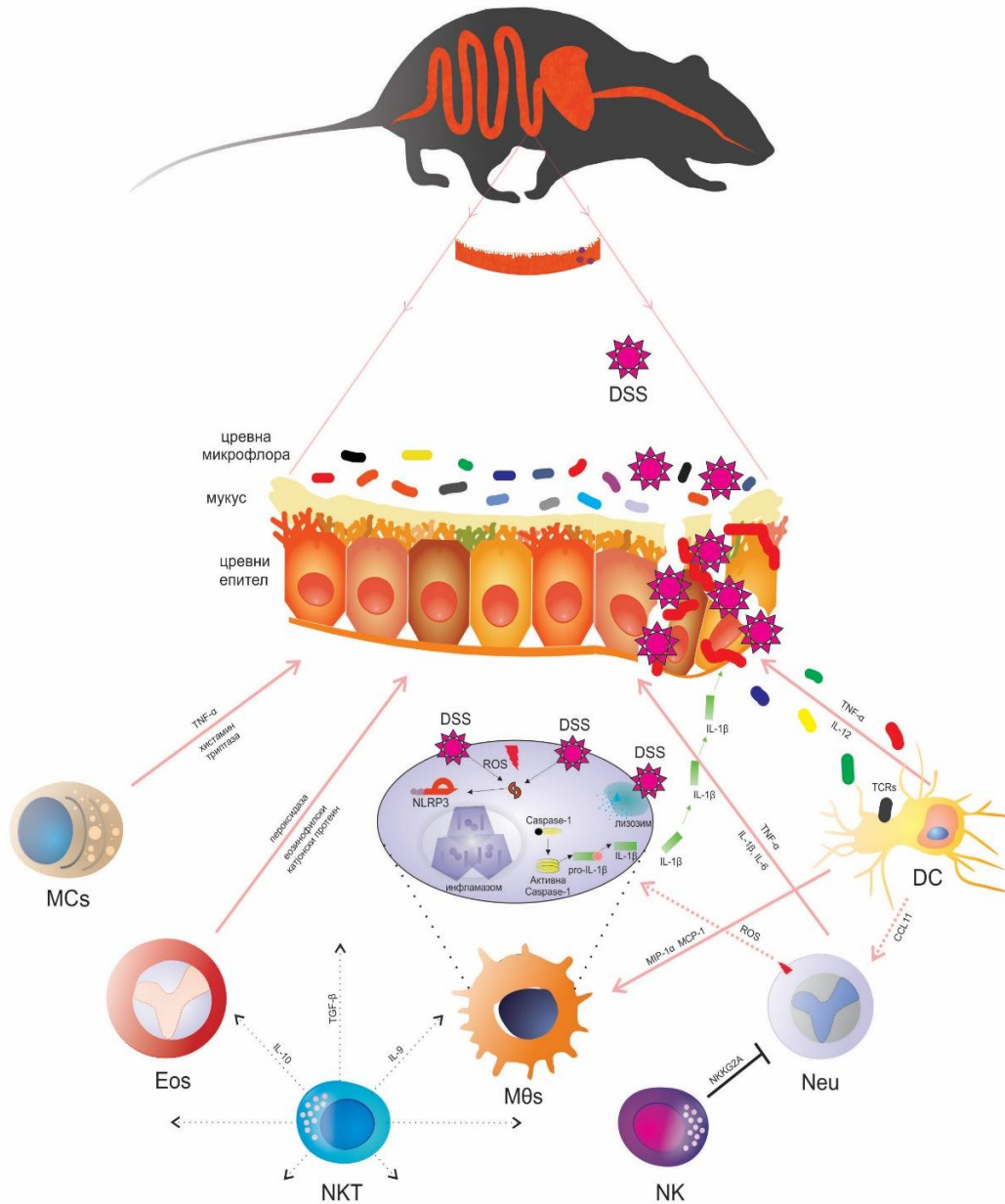


Схема 2. Патогенеза колитиса изазваног применом декстран натријум сулфата. Декстран натријум сулфат цепа компоненте чврсте везе између епителних ћелија и на тај начин омогућава пролазак бактерија из лумена црева у ткиво колона. Различите ћелије урођене имуности реагују на присуство бактерија и за резултат имају продукцију проинфламаторних цитокина и медијатора, који оштећују ламину проприју. Макрофаги могу да фагоцитију декстран натријум сулфат и активирају инфламазом и продукцију IL-1 β . NK и NKT ћелије имају протективну улогу у патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

Активација NKT ћелија α -галактоцерамидом (α -GalCer) у животиња са колитисом изазваним DSS-ом смањује клинички ток и оштећење ткива колона (155). Активиране NKT ћелије представљају потентни извор анти-инфламаторних цитокина. NKT ћелије повећавају продукцију IL-10 и TGF- β у ткиву колона током колитиса изазваног DSS-ом и тако посредују у смањењу обољења (156). Адоптивним трансфером NKT ћелија се такође смањује тежина колитиса (155).

1.2.4.2. Улога цитокина у патогенези колитиса изазваног DSS-ом

У колитису изазваном DSS-ом повећан је садржај IFN- γ и IL-4 у ткиву колона (157). Са повећањем дозе DSS-а појачава се инфламација у ткиву колона, која позитивно корелира са садржајем IL-1 β , IL-12 и TNF- α у ткиву (158). Повећана концентрација проинфламаторних цитокина IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF- α је запажена у активној форми инфламацијске болести црева и корелира са тежином инфламације (159-161).

1.3. ГАЛЕКТИН 3

Главни циљ овог истраживања је испитивање улоге и значаја галектина 3 (Gal-3) у патогенези акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом. Зато, у уводном делу детаљно је објашњена структура, експресија, биолошки ефекти Gal-3 и описан његов значај у регулацији имунског одговора.

1.3.1. Класификација и структура галектинских молекула

Галектини су први пут изоловани 1976. године из мишића кокошке и ткива срца и плућа телета (162). Неколико фамилија протеина који се везују за глукане (лектине), укључујући С тип лектина (селектини, DC-SIGN, дектини и протеини који везују серумску манозу) (163-167), S тип лектина (галектини) (168-172) и сиглеке (173), су показале да учествују у различитим имунским функцијама. Функције су укључивале прву линију одбране против патогена, миграцију и диференцијацију ћелија, као и имунску регулацију. Присуство ових протеина у најједноставнијим облицима живота, као и у људи и њихова експанзија током еволуције сугерише на битну улогу галектина у основним ћелијским функцијама (174).

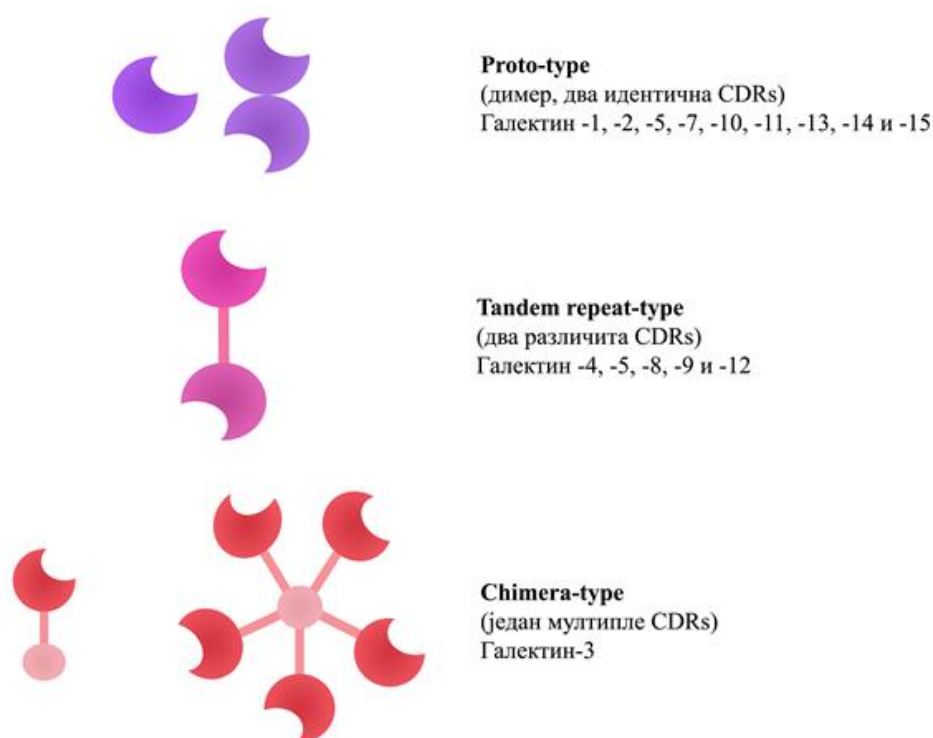
Галектини су фамилија од 15 чланова (од 1 до 15), који се карактеришу двама особинама: способношћу да вежу јединице аминалактозе унутар гликана и поседовањем у структури конзервативног домена за препознавање угљених хидрата (енгл. *Carbohydrate recognition domains*- CDRs). Домени за препознавање угљених хидрата су састављени од око 130 аминокиселинских остатака (175, 176). Кристална структура домена за препознавање угљених хидрата детерминисана је са високо конзервативним чврстим сендвич навојима, који се састоје од две антипаралелно постављене β плоче. Једна плоча је 5 пута набрана, а друга 6 пута. Место где се везује шећер формира аминокиселински ланац β плоче, који је шест пута навијен (177-181).

Чланови фамилије галектина су подељени у три групе:

- *Prototype*
- *Tandem repeat type*
- *Chimera type* (182-184; Слика 3).

Прототип галектина (1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15) су нековалентни хомодимери, који су састављени од два индентична домена за препознавање угљених хидрата. *Tandem repeat* тип галектина (4, 6, 8, 9, 12) поседују два различита домена за препознавање угљених хидрата спојених кратким пептидом, док је само галектин 3 химера тип галектина. Састављен је од само

једног домена за препознавање угљених хидрата, који је повезан са N терминалним крајем богатим пролином, глицином и тирозином (174, 185).



Слика 3. Структура и класификација галектина. На основу структуре, као и броја и организације CRD региона, сви галектини су класификовани у три подгрупе: 1) „proto“-тип галектина: садрже по један CRD регион који може да димеризује, 2) „tandem-repeat“-тип галектина: садрже по два идентична међусобно удаљена CRD региона, 3) „chimeric“-тип галектина: карактерише их присуство не-лектинског сегмента спојеног са једним CRD регионом.

1.3.2. Експресија и функција галектина

Галектини могу бити присутни у свим ћелијама и ткивима, или могу бити присутни само у појединим органима, што зависи од функције коју обављају. Галектини се уобичајено експримирају и дистрибуирају у хуманом ткиву, укључујући већину ћелија урођене имуности (макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, NK ћелије, $\gamma\delta$ T лимфоцити и B-1 лимфоцити) и стечене имуности (активирани B и T лимфоцити), као и на другим ћелијама (183, 186). Галектини су присутни и у различитим ћелијским одељцима- у једру, цитоплазми, на површини ћелије (везани за гликокоњугате). Када су у

солубилном облику, галектини могу бити присутни и у ткивним течностима (182). Сваки члан фамилије галектина има јединствени образац дистрибуције. Неки галектини (галектин 1 и галектин 3) се експримирају у различитим ткивима и различитим ћелијама, док су други чланови галектинске фамилије углавном ткивно ограничени. Тако, галектин 2 је ограничен само на дигестивни епител (187), док галектин 7 је највише експримиран у епидермису (188).

Сви галектини имају афинитет према галактози и везују се за галактозу, али су различити галектини поред галактозе специфични и за различите олигосахариде повезане са галактозом (189, 190). Структура галектина је прилагођена структури олигосахарида за које се везују (182, 189, 191). Галектини су способни да препознају различите комплексне структуре угљених хидрата, створене током процеса ланчане елонгације. Мада галектини углавном повезују два гликопротеина, понекад групишу и велики број молекула формирајући мултивалентне гликокоњугате који просторно заузимају решеткасту формацију (182) (Схема 3). Галектини иницијално везују сопствене ендogene гликане и посредују у процесима развоја, као што су ћелијска диференцијација и организација ткива, такође и у регулацији имунске хомеостазе (176, 185). У различитим фазама диференцијације и активације ћелије (192) активирају се ензими гликозилтрансферазе. Што је већа активност ензима гликозилтрансфераза већи број гликокоњугата биће присутан на мембрани ћелије што омогућава везивање галектина и њихов последичан утицај на ћелијске процесе (183). Функција екстрацелуларног галектина директно зависи од активности ензима гликозилтрансфераза. Функција интрацелуларног галектина не зависи од повезивања са угљеним хидратима јер се овај молекул директно везује за различите интрацелуларне протеинске лиганде и регулише сигналне путеве важне за бројне ћелијске процесе (193). Недавно је показано да галектини, могу да вежу гликане на површини хелминта и на тај начин да посредују у препознавању и ефекторским функцијама урођене имуности (194). Гликани који садрже N-ацетиллактоаминске и полилактоаминске ланце [(Gal β 1, 4GlcNAc) n] (ламинин, фибронектин, мембрански протеини лизозома и муцини) имају већи афинитет за ендogene лиганде за хумане галектине, као и галектине птица и амфибије (179, 195-200). Биолошка функција одређених галектина може

варирати од места до места, у зависности од расположивости погодних лиганда. Карактеристике везивања и биолошке функције галектина у екстрацелуларној средини са кисеоником, могу да зависе од њихове непосредности везивања за лиганде, која превенира оксидацију слободних цистеинских резидуа, као и осетљивост галектина на протеолизу (177, 201). Експресија галектина се мења током ембриогенезе и ћелијске диференцијације, а мења се и у различитим физиолошким и патолошким условима (202). Пилећи галектини учествују у фузији миобласта, док галектин 1 и галектин 3 глодара имају улогу у развоју нотохорде, семитогенези и развоју мишићног ткива, као и централног нервног система (203-206). У недавним студијама (207-209) је показано да галектини учествују у регулацији урођене и стечене имуности.

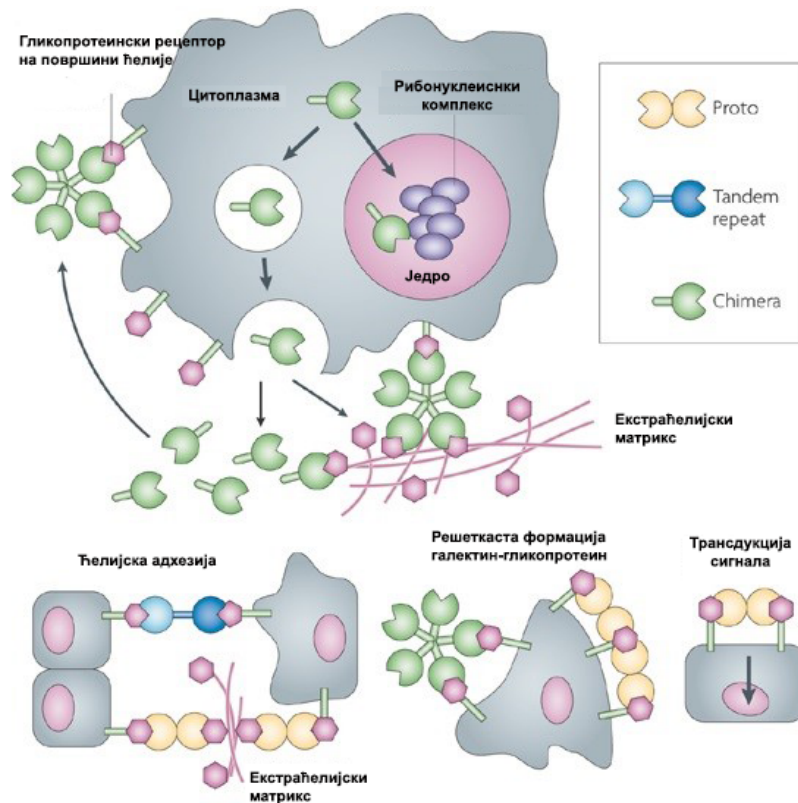


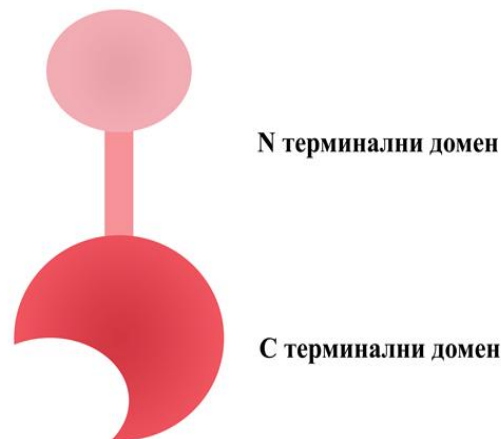
Схема 3. Галектини унакрсно повезују површинске гликопротеине и тако формирају решеткасту формацију на површини ћелије. Галектини реагују са бројним гликоконјугатима на површини ћелија, унакрсно их повезују и започињу каскаду сигналних догађаја у процесима ћелијске пролиферације, диференцијације, апоптозе, продукције цитокина. (кориговано према: Gerardo R. Vasta. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:6).

1.3.3. Структура галектина 3

Галектин-3 (29-35-kD) је убиквитарни лектин који је најпре идентификован као површински антиген кога исказују перитонеални макрофаги мишева под утицајем тиогликолата и тада је означен као Mac-2 (210). Молекул галектина 3 је јединствене структуре која га разликује од осталих чланова фамилије галектина у кичмењака (211). Овај лектин је углавном исказан на епителним и ендотелним ћелијама, као и на ћелијама имунског система, са различитом дистрибуцијом: присутан је у једру, цитоплазми митохондријама, на површини ћелија везан за гликокоњугате, док се у секретованом облику може наћи у ткивним течностима, што зависи од бројних фактора, као што су тип ћелије, пролиферативни статус (212), малигна алтерација (213). Галектин 3 конститутивно експримирају моноцити, макрофаги, дендритске ћелије, мастоцити, еозинофили и мијелоидне ћелије, док га В и Т лимфоцити експримирају након активације (214). Галектин 3 се синтетише на слободним рибозомима у цитоплазми, без транслоцирања у ендоплазматски ретикулум (215). Иако се не помера у ендоплазматски ретикулум/ Голџијев апарат, постоје многобројни докази да галектин 3 има екстрацелуларну локализацију. Овај протеин се секретује новим механизмом, до сада још неиспитаним, ектоцитозом, који је независан од класичног пута секреције преко ендоплазматског ретикулума и Голџи апарата (196, 215-217). Један од могућих начина секреције галектина 3 је његово везивање за липиде мембране и пенетрација кроз фосфолипидни двослој (218). Неке студије (219) показују да галектин 3 најпре улази у везикуле богате гликопротеинима за које се везује и да се онда у везикулама које се одвајају од цитоплазматске мембране на апикалној страни ћелије секретује у екстрацелуларни простор. Структура гена за галектин 3 је састављена од шест егзона и пет интрона (*human locus 14q21-22*) (220, 221).

Галектин 3 је мономер, тако да један полипептидни ланац има два различита функционална домена (Слика 4) (221-224). Овај протеин је јединствен у фамилији галектина, јер има један додатно дугачак и флексибилни N-терминални домен, кога чине 100-150 аминокиселинских остатака. За разлику од осталих чланова фамилије који имају секвенце од девет аминокиселинских

остатака који се понављају, а богати су пролином, глицином, тирозином и глутамином. Ове такође, имају и велики ланац са хидрофобним остацима (215, 220, 221, 224). На N-терминалном региону молекула галектина 3 се налази место за фосфорилацију серина у првих 12 аминокиселина (225, 226). Овај регион има и места за друге важне процесе, као што је секреција лектина, неklasичним механизмом (227). N-терминални регион садржи и понављајуће секвенце сличне колагену- α које су богате глицином, пролином и тирозином (228-230). Овај регион обезбеђује стабилну структуру и биолошку активност галектина 3 (179). Заједно са CRD регионом преко тирозина на позицији 102 и суседних аминокиселина учествује у везивању олигосахарида (231). Овај регион учествује у формирању угљено-хидратних пентамера и ћелијској активацији. У присуству мултивалентних угљенохидратних лиганда молекули галектина 3 се својим N-терминалним доменима повезују у пентамер који унакрсно повезује гликане на површини ћелије након чега се активирају интрацелуларни сигнални путеви и експримирају различити гени (182, 227, 232). У N-терминалном домену, у делу који је богат глицином, пролином и тирозином (тзв. секвенца слична колагену- α), налази се циљно место деловања протеаза (колагеназа и MMP-2 и MMP-9 металопротеиназе матрикса (енгл. *Matrix metalloproteinase*)) које разграђују и инактивишу галектин 3 (233). Кидање везе између аланина (на позицији 62) и тирозина (на позицији 63) повећава афинитет домена за препознавање угљених хидрата за лиганде, али истовремено смањује способност међусобног повезивања молекула галектина 3 чиме се ремете све оне биолошке функције које се заснивају на олигомеризацији молекула (233). N-терминални домен је такође важан за секрецију галектина 3 (234), јер делеција првих 11 аминокиселина овог домена блокира секрецију галектина (230). N-терминални домен је важан и за улогу галектина 3 у регулацији апоптозе. Показано је да мутација серина на позицији 6 (конзервирана позиција) ремети антиапоптоличку активност галектина-3 (235).



Слика 4. Структура галектина 3. Галектин 3 се састоји од једног полипептидног ланца кога чине два структурно и функционално различита домена: атипични или N-терминални домен, који обезбеђује стабилну структуру и биолошку активност галектина 3 и C-терминални домен који служи за препознавање угљених хидрата.

C-терминални крај је домен за препознавање угљених хидрата, који се састоји од око 135 аминокиселинских остатака, што у суштини и дефинише овај молекул као лектин. Интерреакција галектина-3 односно његовог CRD региона са гликокоњугатима праћена је конформационим променама (176) и реаранжирањем секвенце у близини везујућег места (236). Овај домен има важну улогу у антиапоптоичкој активности галектина 3. Унутар домена за препознавање угљених хидрата се налази високо конзервирани (Asp-Trp-Gly-Arg) NWGR мотив који се сматра кључним за антиапоптоичку активност галектина-3, јер јеструктурно сличан са VN1 доменом Vcl-2 фамилије протеина (237).

Лиганди за Gal-3 поседују поли-N-ацетиллактозаминске секвенце за које се Gal-3 везује са високим афинитетом (189, 215, 238). Лиганди за Gal-3 који се налазе екстрацелуларно (на површини ћелије и на екстрацелуларном матриксу) су: ламинин, витронектин, еластин, фибронектин, интегрини и протеин који везује Mac-2 (238-231), док су интрацелуларно локализовани (у цитоплазми и једру): Vcl-2, K-Ras и анексин VII (240). Поједини адхезиони молекули на површини ћелије, као што су интегрини могу да буду лиганди за галектин 3. Галектини преко екстрацелуларних домена једне или обе субјединицеинтегрин

могу позитивно или негативно да модулишу активацију интегрина и утичу на везивање екстрацелуларних лигананда (242). Потенцијални лиганди за галектин 3 су и мембрански протеини повезани са лизозомима (енг. *lysosomal associated membrane proteins 1 и 2- Lamp 1 и 2*) (243). Ови протеини се углавном налазе на мембрани лизозома и ретко се могу наћи на мембрани нормалних ћелија. Показано је да постоји повећана експресија ових протеина на површини ћелија тумора, посебно на метастатским, који су главни носиоци N-ацетилактоамина.

1.3.4. Физиолошка улога галектина 3

Галектин 3 је плеотропан молекул који модулира ћелијску функцију везивањем за различите молекуле у једру, цитоплазми или на површини ћелије. У једру се галектин 3 везује за рибонуклеопротеине (244), Gemin 4 (245), транскрипцијске факторе CREB (енгл. *cAMP Response Element-Binding*) и Sp1 (енгл. *Specificity protein 1*) (246) и β -catenin (247, 248). Галектин 3 и галектин 1 се везују за рибонуклеопротеине и формирају сплајсејозом који прекраја пре-информациону РНК (249). Галектин 3 модулира ћелијски циклус и пролиферацију регулацијом транскрипције гена (246). Галектин 3 стабилизује везивање транскрипционих фактора CREB и Sp1 за промотерски регион гена за циклин D1 и појачава његову експресију (246), а везујући се за β -catenin модулира Wnt сигнални пут (247, 248).

У цитоплазми, галектин 3 подстиче пролиферацију, регулише ћелијску диференцијацију и инхибира апоптозу. Он се везује за K-Ras протеин, активира киназе Raf-1/MEK/ERK сигналног пута и подстиче ћелијску пролиферацију (250). Галектин 3 има важну улогу у диференцијацији макрофага, В лимфоцита и дендритских ћелија (251-253). Током *in vitro* диференцијације макрофагима из хуманих моноцита повећава се експресија галектина 3 на макрофагима (251). Већа експресија галектина 3 утиче на диференцијацију В лимфоцита у плазмоците смањујући регулацију Blimp-1 транскрипционог фактора (252). Насупрот томе, диференцијацију дендритских ћелија из њихових прекурсора прати смањена експресија галектина 3 (253).

Интрацелуларни галектин 3 инхибира, а екстрацелуларни галектин 3 подстиче апоптозу (240). Галектин 3 унутар домена за препознавање угљених

хидрата, поседује мотив, који је структурно сличан са фамилијом Bcl-2 протеина, за који се сматра да је одговоран за његову антиапоптотичку активност (237). Мада се још увек не зна прецизан механизам оваквог ефекта, претпоставља се да се галектин 3, присутан у цитоплазми и једру, под утицајем различитих апоптотичких стимулуса концентрише на митохондријалној мембрани и штити је од оштећења истовремено инхибирајући ослобађање цитохрома С што заједно спречава активацију каспаза (254).

Екстрацелуларни галектин 3 има улогу у адхезији ћелија, хемотакси, сазревању тимоцита и ангиогенези. Везујући се за угљено-хидратне молекуле на ћелијама или екстрацелуларном матриксу, галектин 3 омогућава интеракцију ћелија и њихову адхезију за екстрацелуларни матрикс (240). Галектин 3 као хемотактички молекул стимулише миграцију ћелија моноцитно/макрофагне линије (255). У тимусу, галектин 3 омогућује тимоцитима да напусте тимус тако што прекида њихову адхезију са тимусном микросредином (256). Екстрацелуларни галектин 3 стимулише формирање капиларне тубе *in vitro* и *in vivo* и подстиче ангиогенезу (257).

Екстрацелуларни галектин 3 индукује апоптозу Т лимфоцита што је најпре показано на хуманој ћелијској линији Т лимфоцитне леукемије, на Т лимфоцитима изолованим из периферне крви и на мишјим активираним Т лимфоцитима (258).

1.3.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора

Галектин 3 је експримиран на многим ћелијама имунског система и има важну улогу у регулацији инфламације (Схема 4). Конститутивно је експримиран на моноцитима, макрофагима, дендритским ћелијама, мастоцитима, неутрофилима, еозинофилима, док га Т и В лимфоцити експримирају тек након активације (214).

Галектин 3 утиче на адхезију и хемотаксу, као и алтернативну активацију макрофага (255, 259). Галектин 3 активира фагоците и појачава њихову микробицидну и фагоцитну способност, јер функционише као рецептор који препознаје молекулске обрасце, гликокоњугате, на површини микроорганизама: *Neisseria gonorrhoeae*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni* и *Trypanosoma*

cruzi и стимулише опсонизацију (214, 260-264). Галектин 3 повећава продукцију IL-1 (214) и кисеоничких радикала макрофага (251). Недавна студија (265) је показала да макрофаги Gal-3^{-/-} мишева (*knockout* мишеви за молекул Gal-3) имају смањену фагоцитну активност у односу на Gal-3^{+/+} макрофаге.

Постоје супротни ставови о улози галектина 3 у алтернативној активацији макрофага. Показано је да је *in vitro* алтернативна активација макрофага под утицајем IL-4 и IL-13 редукована у Gal-3^{-/-} мишева у односу на Gal-3^{+/+} мишеве. Алтернативна активација макрофага се не мења под утицајем липополисахарида и IFN- γ у Gal-3^{-/-} мишевима (266). Ова студија је такође потврдила да примена рекомбинантног галектина 3 стимулише алтернативну активацију макрофага, док примена инхибитора галектина 3 блокира алтернативну активацију макрофага (266). Група аутора (267) је показала да под утицајем липополисахарида макрофаги Gal-3^{-/-} мишева продукују већу количину про-инфламаторних цитокина IL-6, IL-12 и TNF- α , него макрофаги Gal-3^{+/+} мишева, што указује на анти-инфламаторне ефекте галектина 3 у макрофагима. Друга група аутора (268) је показала про-инфламаторну улогу галектина 3 у макрофагима, јер је галектин 3 у микроглији индуковао фосфорилацију транскрипционих фактора JAK2, STAT1, STAT3 и STAT5 и активацију бројних JAK/STAT сигналних путева што је узроковало масовну продукцију про-инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-6, IL-1 β и IFN- γ). Сматра се да су микросредина инфламираног ткива, као и локална и серумска концентрација цитокина одговорне за стимулацију или инхибицију алтернативне активације макрофага.

Активирани неутрофили представљају велики извор инфламаторних цитокина (TNF- α , IL-1 β и IL-6) и кисеоничких радикала, који могу да одштете ткиво колона и узрокују инфламацију (149). Галектин 3 служи као хемоатрактант за неутрофиле и има важну улогу у фагоцитози (269). Галектин 3 повећава фагоцитну активност неутрофила у процесу независном од CD66a и CD66b, тако што реагује са липополисахаридом из различитих врста бактерија и повећава активацију неутрофила.

Функција и миграција дендритских ћелија, неутрофила и макрофага је посредована галектином 3 у инфламираном ткиву (147, 270). Галектин 3 је

хемоатрактант за дендритске ћелије и има кључну улогу у њиховој миграцији, адхезији и сазревању (270).

Миграција еозинофила у ткиво гастроинтестиналног тракта игра важну улогу у патогенези колитиса, тако што посредством медијатора које ослобађа као што су еозинофилна пероксидаза и еозинофилни катјонски протеин, оштећује ткиво колона (153, 154). Галектин 3 игра важну улогу у котрљању еозинофила, као и за њихову функцију (269).

На месту инфламације, која је изазвана декстран натријум сулфатом повећава се број мастоцита као и протеаза које ослобађају (151). Мастоцити продукују инфламаторне медијаторе и цитокине, као што су TNF- α , хистамин и триптаза и на тај начин изазивају инфламацију, регрутују неутрофиле и друге инфламаторне ћелије у ткиво колона (152). Галектин 3 игра важну улогу у ћелијској биологији мастоцита (271), након активације Fc ϵ RI мастоцити из коштане сржи Gal-3^{-/-} мишева продукују значајно мање количине хистамина и цитокина у поређењу са мастоцитима WT мишева (271).

Активација NKT ћелија α -GalCer-ом делује протективно у колитису у мишева (155). Овако активирани NKT ћелије представљају извор антиинфламаторних цитокина. NKT ћелије повећавају продукцију IL-10 и TGF- β у ткиву колона током колитиса изазваног DSS-ом, што може бити објашњење за протективну улогу ових ћелија (156). Пасивни трансфер NKT ћелија значајно смањује симптоме колитиса (155). Показана је разлика у фенотипу NKT ћелија јетре у WT и Gal-3^{-/-} мишева, али прецизна улога Gal-3 у активацији и функцији NKT ћелија у ткиву колона још није позната (272).

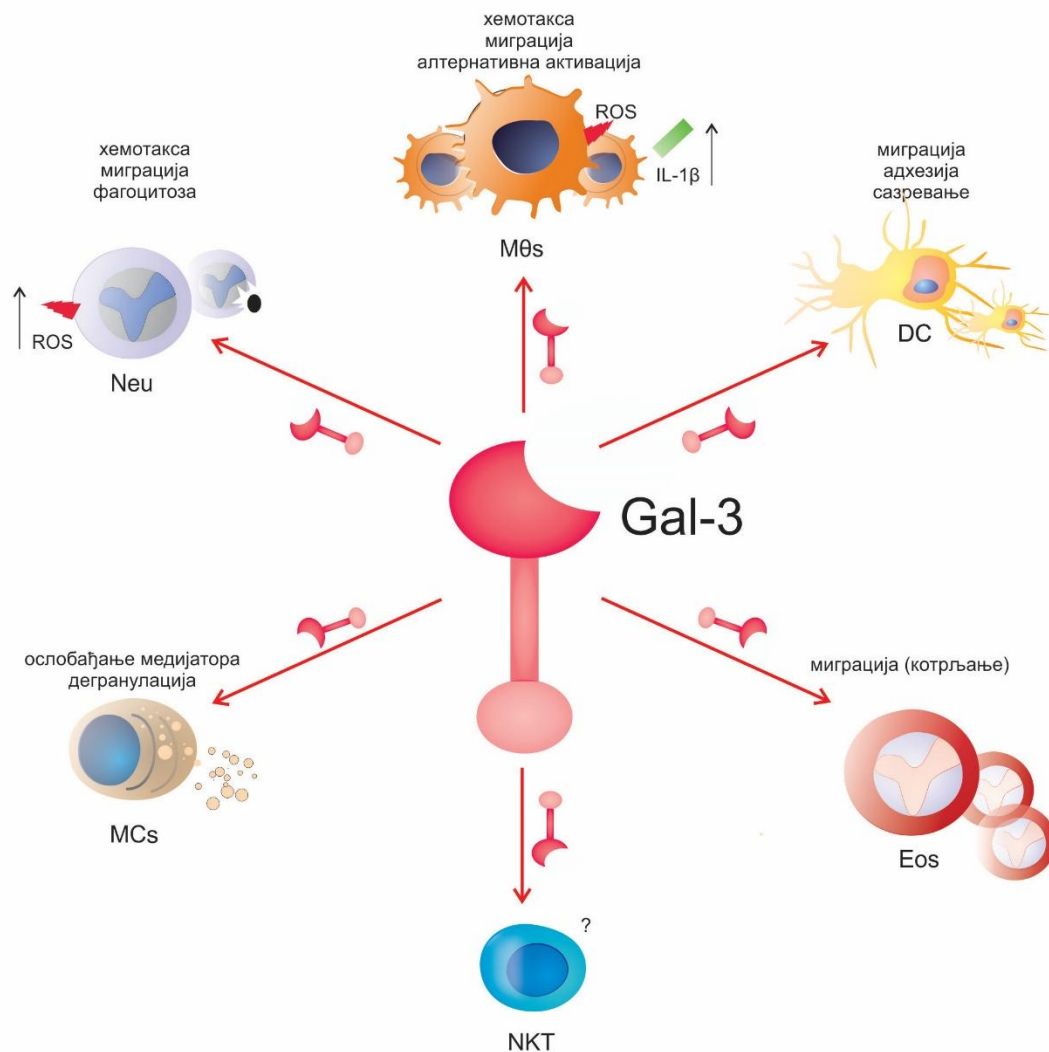


Схема 4. Улога и значај Gal-3 у регулацији имунског одговора. Gal-3 учествује у различитим процесима ћелија урођеног имунског одговора.

1.3.6. Експресија галектина 3 у ткиву колону

Литературни подаци (269, 272, 273) указују на улогу Gal-3 у патогенези канцера и аутоимунских болести. Једина до данас објављена студија (274) о улози Gal-3 у акутном колитису изазваном декстран натријум сулфатом је показала да се повећава експресија Gal-3 у цревној ламини проприји и криптама епитела током прогресије болести. Експресија Gal-3 је варирала у зависности од врсте мишева и модела колитиса. Серумска концентрација Gal-3 је била

повећана у пацијената са активном формом улцерозног колитиса и Кронове болести (275).

Иако је Gal-3 експримиран на свим ћелијама имунског система које имају важну улогу у настанку акутног колитиса, улога и значај Gal-3 за активацију, миграцију, фенотип и функцију ћелија имунског система одговорних за настанак и прогресију акутног колитиса нису још увек разјашњени.

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај галектина 3 у патогенези колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

У складу са основним циљем постављени су и следећи експериментални задаци:

1. Праћењем клиничког скорa и патохистолошких промена утврдити утицај генетске делеције за Gal-3 на оштећење ткива колона у акутном колитису изазваном декстран натријум сулфатом.
2. Испитати утицај генетске делеције за Gal-3 на фенотип и функције ћелија имунског система у ткиву колона.
3. Испитати ефикасност примене новосинтетисаног инхибитора Gal-3 (GM-ST-01, *Davanat*) у моделу акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ

Ова студија је изведена на мишевима чистог соја C57BL/6 ("wild type") и на мишевима истог соја са циљаном делецијом гена за галектин-3 (*knock-out* или Gal-3^{-/-}C57BL/6). Gal-3^{-/-} мишеви су набављени из одгајалишта за мишеве Универзитета Калифорније захваљујући проф. др Hsu-у (Daniel K. Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, California, USA). Сви мишеви (wild type односно Gal-3^{+/+} мишеви као и Gal-3^{-/-} мишеви) су одгајани у виваријуму Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

У појединачним експериментима коришћени су увек мишеви истог пола и врло блиске старости (разлика у старости није била већа од 7 дана). Такође, коришћени су мишеви приближне телесне масе (разлика у маси није била већа од 0.5 грама).

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

Хомолога рекомбинација представља замену гена између пара хомологих секвенци два молекула ДНК, који имају сличне или индентичне нуклеотиде (276). Овим поступком се замењује функционални ген неактивним геном, чиме се уоптпуности елимише, односно "искључује" функција постојећег гена (277). Методологија стварања "*knock-out*" мишева се заснива на замени само једног дела или комплетног циљног (нормалног) гена нефункционалним (мутираним) геном помоћу хомологе рекомбинације (277).

Процес добијања "*knock-out*" мишева се заснива на одабиру оних ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација. Пре свега врши се трансфекција вектора са страним, нефункционалним геном у ембрионалне матичне ћелије. Фрагмент ДНК са мутираним геном (или фрагмент ДНК са "искљученим" геном) се најпре угради у циљни вектор који садржи и два додатна гена којима се контролише рекомбинација: ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) и ген за вирусну тимидин киназу (ТК ген) (278, 279). *Neo* ген се увек уграђује у геном

ћелије, док се ТК ген губи само уколико се одиграла хомолога рекомбинација. Овај вектор се убацује у културу ћелија чији медијум садржи неомицин и *ganciklovir* или FIAU (енгл. 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil) који се под утицајем тимидин киназе метаболишу у токсични продукт. Уколико је фрагмент ДНК са мутираним геном насумице интегрисан у ћелију, оваква ћелија биће резистентна на неомицин, али ће бити уништена помоћу *ganciklovir*-а или FIAU. Преживеће све ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација, јер ће бити резистентне и на неомицин и на *ganciklovir* или FIAU (278, 279).

Показано је да мишији ген за галектин-3 садржи шест егзона (280) при чему егзон 2 и 3 кодирају аминокиселински крај молекула галектина-3, док егзони 4, 5 и 6 кодирају карбокси-терминални крај са доменом којим препознаје угљенохидрате. У лабораторији проф. др *Hsu*-а у циљу добијања Gal-3^{-/-} мишева направљен је прекид гена за галектин-3 на нивоу ембрионалних матичних ћелија (281). При томе је коришћен вектор који је конструисан тако да садржи фрагмент клониране ДНК за галектин 3, а стратегија за добијање Gal-3^{-/-} мишева се заснивала на прекиду оног генског региона који кодира домен за препознавање угљенохидрата. Другим речима, кратак сегмент (од 0.5 кило база) кога чине интрон-4 и егзон-5 је замењен геном за резистенцију на неомицин. Сегмент од егзона-4 до егзона-5 мишијег гена за галектин-3 је уграђен у рMC1Neo Poly(A) вектор (*Stratagene, La Jolla, CA*) и то на горњем крају у близини промотера за тимидин киназу-Neo касете. Други сегмент од егзона-5 до егзона-6 је уграђен низходно од Neo касете, док је у вектору сегмент на споју интрона-4 и егзона-5 прекинут Neo геном што се може видети на схеми 1 (281). Циљни вектор је уграђен у мишије матичне ћелије, D3, а затим су трансфектоване ћелије селектоване уз помоћ G418, док је хомолога рекомбинација у G418-51 резистентним ћелијама детектована помоћу две технике: PCR (енгл. *Polimerase Chain Reaction*) коришћењем прајмера специфичних за Neo ген, као и *Southern*- блот хибридизацијом. Скринингом 894 клонова ембрионалних матичних ћелија идентификована су само два клона 4A2 и 9A4 у којима је детектована хомолога рекомбинација помоћу пробе 4 (281).

Један клон ембрионалних матичних ћелија у коме се одиграла хомолога рекомбинација је најпре пропагиран а онда су овакве ћелије убризгане у три и по дана старе бластоцисте C57BL/6 мишева, а затим су овакве бластоцисте имплантиране у лажно гравидне CD1 женке (сурогат мајке). На тај начин су прво добијени химерични мишеви, а затим укрштањем химеричних мужјака са C57BL/6 женкама најпре су добијени хетерозиготни *knock-out* мишеви (Gal-3^{-/+} мишеви). Инбредним укрштањем оваквих хетерозиготних мишева након девет генерација добијени су хомозиготни *knock-out* мишеви који су генски дефицијентни у експресији молекула галектина-3 (Gal-3^{-/-} мишеви) (281).

У Gal-3^{-/-} мишева добијених на овакав начин изоловани су различити органи (надбубрежна жлезда, мозак, срце, јетра, плућа, лимфни чворови, слезина и тимус) у којима хистолошком анализом нису уочене било какве промене. Није било разлике у броју крвних ћелија између Gal-3^{-/-} и Gal-3^{+/+} мишева. Анализиране су субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини и лимфним чворовима. Показано је да је укупан број лимфоцита као и однос CD4⁺/CD8⁺ ћелија приближно исти у Gal-3^{-/-} и Gal-3^{+/+} мишева (281).

3.2. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ АКУТНОГ КОЛИТИСА ДЕКСТРАН НАТРИЈУМ СУЛФАТОМ

Експериментални модел колитиса изазваном помоћу декстран натријум сулфата је један од најчешће коришћених модела, коришћен и у овој студији. Уколико је мишевима 7 дана доступан 3% DSS, растворен у пијаћој води животиње ће развити симптоме болести сличне улцерозном колитису у људи (111). DSS (TdB Consultancy, Upssala Sweden; DB001-500g/ 40kDa) је био растворен у дестилованој води. Експерименталне групе WT и Gal-3^{-/-} мишева су пиле 3% DSS-у, док су контролне групе животиња имале приступ обичној води током 7 дана. За процену степена развијености болести праћен је клинички скор у животиња, а за степен оштећења ткива колона рађена је патохистолошка анализа.

3.3. ОДРЕЂИВАЊЕ КЛИНИЧКОГ СКОРА

Клинички скор (енгл. *Disease Activity Index* - DAI) је обухватао праћење губитка телесне масе, конзистенције столице и присуства/одсуства ректалног крварења током 7 дана третмана DSS-ом (146) (Табела 2).

Табела 2. Клинички скор (*Disease Activity Index-DAI*)*

Скор	Губитак телесне масе	Конзистенција фецеса	Ректално крварење
0	нема губитка	нормална	нема крварења
1	1-5%	нормална	нема крварења
2	6-10%	ретка	слабо крварење
3	11-15%	ретка, слузава	видљиво крварење
4	>15%	дијареја	огромно крварење

*DAI се рачуна као сума сва три параметра

Губитак телесне масе и честе дијареје су клинички симптоми улцерозног колитиса. Мишеви су жртвовани 7 дана после третмана са DSS-ом у пијаћој води (експерименталне групе), односно појења обичном водом (контролне групе) у атмосфери засићеној диетилетром (BETA NEM, Београд).

Након жртвовања животиња изолован је колон за патохистолошку анализу. Ткиво колоне је лонгитудинално пресечено и "уроловано" у такозване "швајцарске ролнице", као што је приказано на слици 5 (282).

3.3.1. Фиксација и депарафинизација ткива колоне

У рутинској обради препарата, добијени узорци ткива су фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци су дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласт. Попречни серијски пресеци, дебљине 4 μm , сечени су на микротому *Leica RM 2135, Austria*.



Слика 5. *Swiss roll*. Техника припреме ткива колоне за хистопатолошке анализе.

3.3.2. Бојење хематоксилином и еозином (Н&Е)

После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду концентрације алкохола, исечци су бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и постављани на плочице са *Canada balsam*. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом након 24- часовног сушења.

3.3.3. Одређивање хистолошког скорa

На хистолошким препаратима одређивано је оштећење епитела и инфилтрација инфламаторним ћелијама (Табела 3) према претходно описаном протоколу (283). Препарат су, након бојења хематоксилин-еозином, посматрани под светлосним микроскопом (увећање 100×) и фотографисани дигиталним апаратом (BX51, *Olympus, Japan*).

Табела 3. Хистолошки скор*

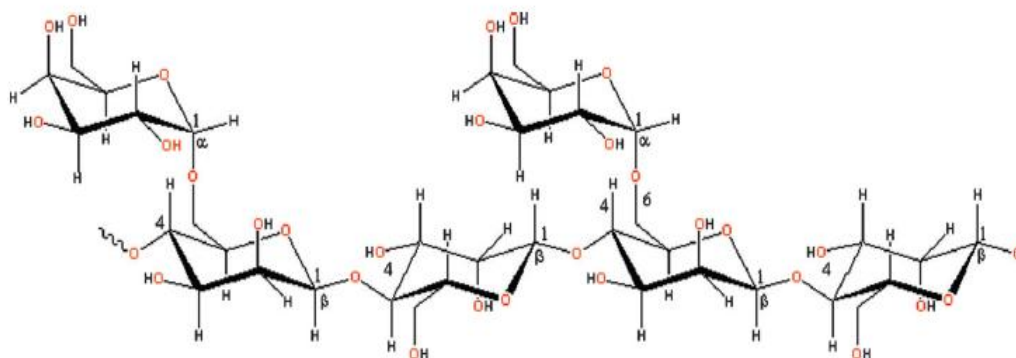
Скор	Инфилтрација	Епител
0	нема инфилтрације	нормална морфологија
1	инфилтрат око базе крипте	губитак пехарстих ћелија
2	инфилтрат досеже до <i>laminae muscularis mucosae</i>	губитак пехарстих ћелија на већој површини
3	екстензивни инфилтрат досеже до <i>laminae muscularis mucosae</i> , истањена мукоза и појава едема	губитак крипти
4	инфилтрација до <i>laminae submucosa-e</i>	губитак крипти на већој површини

*Скор се рачуна тако што се сабирају оба параметра, са максималним скором 8.

3.4. АПЛИКАЦИЈА Gal-3INH

У експериментима у којима је испитивано да ли интраперитонеална примена инхибитора Gal-3 (Gal-3INH, GM-CT-01) може да превенира колитис изазван DSS-ом, коришћени су WT мишеве. GM-CT-01 је линеарни полисахарид, оквирне молекулске тежине 54KDa, изолован из *Cyamopsis tetragonoloba guar bean/gum* (регистрован као патент US 7,893,252). Gal-3 инхибитор (*Davanat*) је добијен од професора др *Anatole Klyosov* (*Galectin Therapeutics Inc, Norcross, Georgia, United States of America*).

Davanat® је угљенохидратни полимер, састављен од манозе и галактозе, молекулске тежине 59kDa (Слика 6). Просечна полимерна јединица α -галактоманана садржи 17 β -D-Ман резидуа и 10 α -D-Gal резидуа градећи полимерни молекул од око 12 таквих јединица (284). У току је евалуација ефекта *Davanat*-а на метастазе колоректалног канцера у II фази клиничког испитивања (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00110721>). Појединачна доза *Davanat*-а која је коришћена у експериментима је била 100 μ g Gal-3INH (интраперитонеално 0, 2., 4. и 6. дана током 7 дана третмана са DSS-ом (285).



Слика 6. Хемијска структура Davanat-a. Davanat® је угљенохидратни полимер, састављен од манозе и галактозе.

3.5. АПЛИКАЦИЈА α - ГАЛАКТОЦЕРАМИДА (α - GalCer)

α - GalCer је потентни активатор NKT ћелија. У експериментима у којима је испитивано да ли одсуство Gal-3 утиче на протективну улогу NKT ћелија у акутном колитису, мишевима је интраперитонеално апликован α - GalCer (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесне масе) свакодневно током седмодневне примене DSS-a (155).

3.6. АПЛИКАЦИЈА MSCs

Након 12 сати од почетка третмана DSS-ом, мишевима су интраперитонеално апликоване MSCs (0.5×10^6 ћелија) у 200 μl PBS-a (286), односно MSCs култивисане у медијуму са додатим инхибитором за Gal-3 (287).

3.7. ТРЕТМАН АНТИБИОТИЦИМА И АНТИМИКОТИКОМ

С обзиром да микрофлора црева има значајан утицај на патогенезу улцерозног колитиса и да Gal-3 може да служи као рецептор за *C.albicans* (288), мишевима је свакодневно интраперитонеално апликован метронидазол (1mg/g) и ципрофлоксацин (0,5mg/g), као и флуконазол (1mg/kg) *per os* (131, 289), да би се елиминисала микрофлора црева.

3.8. ИЗОЛАЦИЈА ИНФЛАМАТОРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ *LAMINE PROPRIA*-ТКИВА КОЛОНА

Након жртвовања мишева издвојено је ткиво колона и изоловане ћелије из ламине проприје по већ утврђеном протоколу (290). Колон је пресечен

лонгитудинално и додатно уситњен на 3-4 секције, након тога је испран HBSS-ом (енгл. *Hank's balanced salt solution*), који не садржи магнезијум и калцијум. Дигестију парчића колона је извршена у 20 ml HBSS медијума са 10% FBS-ом, 15 mM HEPES-ом, 5 mM EDTA, 30 минута у воденом купатилу на 37°C. Након тога су додатно испрани са HBSS-ом фрагменти црева и додатно што је више могуће уситњени. Садржај је третиран са 1 ml 4000 Mandl јединица колагеназе D и 200 μ l 1mg/ml DNase, током једног сата на 37°C у воденом купатилу. Добијени супернатант је филтриран кроз серију ћелијских сита различитог промера (100 μ m и 40 μ m) и центрифугиран на 450 g током 10 минута. Након одливања супернатанта, пелет је ресуспендован 30% Percoll-ом, а затим пажљиво, низ зидове епрувете је додан 70% Percoll. Целокупни садржај је центрифугиран на 1100 g током 20 минута. Мртве ћелије и дебрис су се наталожиле на дну епрувете, док површински слој чине епителне ћелије. Мононуклеарне ћелије су се издвојиле између ова два центрифугата, што је чинило 30% до 70% слојева. Полако је пипетом извучен средњи слој и ресуспендован у комплетном медијуму. На овај начин се добила ћелијска суспензија, која је коришћена за проточну цитометрију.

3.9. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА КОЛОНА

Применом проточне цитометрије одређена је релативна, односно процентуална заступљеност и апсолутан број инфламаторних ћелија у ткиву колона WT и Gal3^{-/-} мишева. Одређен је проценат и број различитих ћелијских популација: макрофага, дендритских ћелија, неутрофила, мастоцита, еозинофила, NK ћелија и NKT ћелија након 7-мо дневног третмана DSS-ом (експерименталне групе), односно 7 дана приступа обичној води (контролне групе).

Анализа је рађена на свеже изолованим инфламаторним ћелијама из ткива колона. Након изолације, приликом бројања ћелија, одређивана је вијабилност ћелија помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У свим експериментима вијабилност ћелија је износила 90% до 95%.

3.9.1. Бојење мембранских маркера

У техници бојења мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа популације инфламаторних ћелија колона примењена су анти-мишија моноклонска антитела различите специфичности (Табела 4).

Табела 4. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији.

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT или REF
FcεRI	PerCp	MAR-1	Armenian Hamster IgG	BioLegend	134319
CD117	FITC	2B8	Rat IgG2b, κ	BioLegend	105806
ST2	PE	DIH9	Rat IgG2a, κ	BioLegend	145304
CD45	APC	30-F11	Rat (LOU) IgG2b, κ	BD Pharmingen	559864
IL-4	PE	BVD4-1D11	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554389
IL-6	PE	MP5-20F3	Rat IgG1	BD Pharmingen	554401
SiglecF	PE	E50-2440	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	552126
CD11c	PerCp	N418	Armenian Hamster IgG	Molecular probes	A14788
IL-13	FITC	eBio13A	Rat IgG1, κ	eBioscience	12-7133-82
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
CD11b	PerCp	M1/70	Rat	Molecular	A14787

			IgG2b	probes	
I-A	PE	AF6-120.1	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553552
CD206	APC		Goat IgG	RnDSystems	FAB2535 A
IL-12 (p40/p70)	PE	C15.6	Rat IgG1	BD Pharmingen	554479
IL-1	PE	166931	Rat IgG2b	RnDSystems	IC4013P
IL-10	PE	JES5-16E3	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554467
CD3e	PerCp	145-2C11	Armenia Hamster IgG1 κ	BD Pharmingen	553067
NK1.1.	FITC	PK136	Mouse IgG2a, κ	eBioscience	11-5941-81
IFN-γ	PE	BM8	Rat IgG2a, κ	eBioscience	12-4801
TNF-α	PE	MP6-XT22	Rat IgG1	BD Pharmingen	554419
CD11c	PE	N418	Hamster IgG	Molecular probes	MCD11c04
CD8a	APC	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553035
CD80	PE	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, κ	BD Pharmingen	553769

Процедура бојења површинских маркера је изведена на следећи начин: На 1×10^6 ћелија изолованих из ламине проприје ткива колона ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додата је одговарајућа

количина примарно коњугованих моноклонских антитела обележених различитим флуоресцентним бојама у следећим комбинацијама:

3.9.2. Интрацелуларно бојење цитокина

Интрацелуларно бојење цитокина је изведено по BD *Cytofix/Cytoperm*™ методи. У овој студији ћелије су стимулисане са форбол 12-миристанат 13-ацетатом (PMA, енгл. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, Sigma) и јономицином (енгл. *Ionomycin*, Sigma). Форбол 12-миристанат 13-ацетат и јономицин су веома моћни активатори протеин киназе C (PKC, енгл. *Protein Kinase C*) покрећу инфлукс јона калцијума у ћелију чиме индукују експресију цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима (291). Инкубациони период у трајању 4-6 часова је довољан за индукцију већине цитокина.

Дужа инкубација изазива интензиван цитопатогени ефекат поменутих активатора. Препоручује се да се током *in vitro* стимулације ћелија користе инхибитори интрацелуларног транспорта протеина. BD *GolgyStop*™ (садржи моненсин) и BD *GolgyPlug*™ (садржи брефелдин А) су инхибитори које препоручује BD *Cytofix/Cytoperm*™ протокол. Поменути инхибитори блокирају интрацелуларни транспорт што доводи до акумулације већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу. Ово повећава могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Како и моненсин и брефелдин А имају дозно- и временски- завистан цитотоксични ефекат, излагање ћелија овим агенсима мора да се ограничи. Инкубације са поменутиим инхибиторима дуже од 12 часова су токсичне за ћелије.

Управо зато, ради повећања могућности детекције ћелија које продукују цитокине коришћен је BD *GolgyStop*™ и BD *GolgyPlug*™ према BD *Cytofix/Cytoperm*™ протоколу.

3.9.2.1. Стимулација ћелија

Суспензија појединачних ћелија изолованих из ткива колона (1×10^6 /ml), припремљене у медијуму (DMEM са 10% FBS-ом), су инкубиране на 37°C у присуству 5% CO₂. У суспензију ћелија је додат PMA (Sigma; 50ng/ml) и јонофор (*Ionomycin*, Sigma; 500ng/ml). Након 2 сата инкубације додат је BD *GolgyStop*™ (0,7µl/ml), чиме је блокирана секреција цитокина и повећана

интрацелуларна акумулација цитокина. После 6 сати инкубације (2 сата деловања активатора, а затим 4 сата истовременог деловања и активатора и инхибитора транспорта цитокина), ћелије су опране и ресуспендоване у медијуму. Затим су ћелије пребачене у пластичне епрувете за имунофлуоресцентно бојење (*Falcon round-bottom test tubes*, BD). Током бојења и чувања, ћелије су држане на +4°C у мраку.

3.9.2.2. Бојење површинских маркера

Површинско бојење је увек боље обавити пре фиксације ћелија, јер епитопи површинских маркера могу да се оштете током фиксације и пермеабилитације. На 1×10^6 ћелија изолованих из колона ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додата је одговарајућа количина примарно коњугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација ћелија из ламине проприје (Табела 4). Ћелије изоловане из ткива колона су инкубиране са одговарајућим изотипским контролама (Табела 5). Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле коришћене су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији ћелија ($V \approx 80 \mu\text{l}$) била 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута у мраку на температури +4°C.

3.9.2.3. Фиксација и пермеабилитација ћелија

Након инкубације са примарно коњугованим антителима за површинске антигене, ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење и центрифугирали (250 G, 5 минута). Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (BD *Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на температури +4°C. Затим су ћелије опране са 1 ml *Perm/Wash*™ пуфера (BD *Pharmingen*) и центрифугиране (250 G, 5 минута).

Табела 5. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији

Назив антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT или REF
PE Rat IgG2a, κ Isotype Control	PE	R35-95	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	554689
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	PerCP	MOPC-21	Mouse IgG1, κ	BioLegend	400150
APC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl	APC	MOPC-173	Mouse IgG2a, κ	BioLegend	400220
FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control	FITC	G15-178	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen	53456

3.9.2.4. Бојење цитокина у ћелији

Ћелијски талог је ресуспендован у 50 µl *Perm/Wash*™ пуфера. Додат су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине: анти-TNF, анти-IFN *gamma*, анти-IL-10, анти-IL-12, анти-IL-6, анти-IL-1 и анти-IL-4 (Табела 3). Коришћен су и одговарајуће изотипске контроле (Табела 4). Сва антитела као и изотипске контроле користили смо у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији ћелија из колона ($V \approx 80$ µl) буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута у мраку на +4°C. Након инкубације, ћелије су опране у *Perm/Wash*™ пуферу (1ml/епрувети; 250 G, 5 минута). Ћелијски талог је ресуспендован у 250 µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Граничник је направљен у FSC/SSC дијаграму као регион вијабилних ћелија. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој

цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу FACSCalibur (BD Biosciences) и *Flowing Software* програма.

3.10. ИЗОЛАЦИЈА И *IN VITRO* АКТИВАЦИЈА МАКРОФАГА

Мишевима је након жртвовања етром, убризган хладан стерилан фосфатни пуфер (PBS) у перитонеалну дупљу. Благом перитонеалном лаважом је масирана трбушна дупља и извучена течност највише што се могло. Након додавања по 200 μ l FBS-а у сваку од суспензија, узорци су центрифугирани 5 минута на 1500 rpm. По завршеном центрифугирању, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich*) са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пеницилина G и 100 μ g/ml стрептомицина) и проверена је вијабилност и број ћелија. У есеју за проточну цитометрију ћелије су култивисане у 24 микротитар плочи и стимулисане са 10 ng/ml LPS-а 2 сата, а након тога инкубиране 24 сата у присуству 5% DSS-а на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у инкубатору (292). Есејом ELISA је анализирано присуство цитокина у (TNF- α и IL-1 β) супернатанту у складу са препоруком произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Макрофаги су свакодневно изоловани из перитонеалне дупље WT и Gal3^{-/-} мишева (1x10⁶) и интравенски апликовани првог дана од почетка примене DSS-а у Gal3^{-/-} мишеве (293).

3.11. ДЕПЛЕЦИЈА МАКРОФАГА

Да би се показало да ли су макрофаги кључни у развоју инфламације током експерименталног акутног колитиса за њихову деплецију коришћени су липозоми (*Standard macrophage depletion kit; Encapsula NanoSciences LLC*). Мишеви су примили 200 μ l липозома интраперитонеално 5 пута у току експеримента: -4, 0, 2, 4 и 6-ог дана (294).

3.12. ИЗОЛАЦИЈА И ПАСИВНИ ТРАНСФЕР НЕУТРОФИЛА

Мишевима је 4 сата пре жртвовања етром, интраперитонеално убризган 1 ml стерилног 3% тиогликолата (295) (Природно-математички факултет, Катедра Института за хемију, Универзитет Крагујевац). Благом перитонеалном лаважом

је масирана трбушна дупља и извучена течност највише што се могло. Узорци су центрифугирани током 10 минута на 300 g. Након тога су ресуспендовани у 10 ml PBS-а и поново центрифугирани током 10 минута на 300 g. По завршеном центрифугирању, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пеницилина G и 100 µg/ml стрептомицина) и проверена им је вијабилност и број ћелија. Неутрофили изоловани из перитонеалне дупље WT и Gal3^{-/-} мишева (2×10^6) и интраперитонеално апликовани 4. дана од почетка примене DSS-а у Gal3^{-/-} мишеве (296).

3.13. ИЗОЛАЦИЈА И ПАСИВНИ ТРАНСФЕР ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА

Ћелијска суспензија, која је коришћена за добијање чисте популације дендритских ћелија на магнетним колонама, је изолована из слезине WT и Gal3^{-/-} мишева. Спленоцити су издвојени на следећи начин: слезина је хомогенизована клипом шприца и материјал је пропуштен кроз ћелијско сито (*cell strainer*, BD Pharmingen, USA) у епрувету уз додавање 5 ml комплетног медијума. Овако раздвојене појединачне ћелије су центрифугиране на 250 g током 5 минута, а онда је одливен супернатант. Еритроцити присутни у ткивном хомогенату су лизирани током инкубације ткивног материјала у 5 ml *lysing* раствора у трајању од 5 минута на +4°C. Након истека инкубације, додато је 5 ml комплетног медијума чиме је заустављено даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране, одливен супернатант и ћелије ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума. На тај начин је добијена суспензија појединачних спленоцита која је коришћена за даљу изолацију дендритских ћелија на колонама.

Издвајање дендритских ћелија на магнетним колонама се састоји из две фазе. Прва фаза представља магнетно обележавање. Након што су ћелије пребројане (10^8 ћелија), центрифугиране су на 200 g током 10 минута. Одливен је супернатант и талог је ресуспендован у 400 µl пуфера (PBS pH 7.2, 0.5% *bovine serum albumin* (BSA) и 2 mM EDTA. Додато је 100 µl CD11c *MicroBeads*-а. Суспензија је добро измешана и инкубирана током 15 минута у фрижидеру (2–8 °C). Након инкубације ћелије су опране у 1–2 ml пуфера и центрифугиране на 200 g током 10 минута. Затим је аспириран супернатант и талог

ресуспендован у 500 μ l пуфера. Друга фаза је магнетно издвајање (позитивна селекција). Колоне су постављене на MACS сепаратор и опране са 3 ml пуфера. Затим је постављена ћелијска суспензија на колоне. Сакупљене су необележене ћелије које су прошле кроз колоне, а колоне су опране још три пута са 3 ml пуфера. Колоне су пренешене са сепаратора на епрувете. Додато је 5 ml пуфера и снажним и брзим покретом је притиснут клип колоне. Ћелије које су прошле кроз колоне су CD11c⁺ дендритске ћелије.

Сви мишеви су интраперитонеално примили 200.000 дендритских ћелија ресуспендованих у 200 μ l PBS-а, једнократно 5-ог дана експеримента (297).

3.14. КОКУЛТИВАЦИЈА ПЕРИТОНЕАЛНИХ МАКРОФАГА И MSCs

Из здравих Gal-3^{-/-} мишева су по већ објашњеном протоколу (3.10.) изоловани перитонеални макрофаги и кокултивисани током 24 сата са MSCs и MSCs и инхибитором. Есејом ELISA је анализирано присуство цитокина (IL-10 и TGF- β) у супернатанту у складу са препоруком произвођача (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Проточном цитометријом је анализиран фенотип макрофага.

3.15. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 И TGF- β У СЕРУМУ, ИЗОЛАТУ ТКИВА КОЛОНА И СУПЕРНАТАНТУ

Мишеви експерименталних и контролних група су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром 7 дана након појења са раствором DSS-а (експерименталне групе), односно појењем обичном водом (контролне групе). Крв узоркована из трбушне аорте је центрифугирана 20 минута на 14 000 rpm на 4°C. Затим је издвојен серум за сваког појединачног миша и замрзнут на температури од -20°C до извођења анализе. Након жртвовања, колон сваког миша је извађен и ткиво уситњено, а затим центрифугирано на 3000 rpm 10 минута. Супернатант издвојен након центрифугирања ткива је замрзнут на -20°C до извођења анализе.

Концентрација анализираних цитокина (Gal-3, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 и TGF- β) у серуму, изолату ткива црева и супернатанту *in vitro* активираних макрофага је одређивана колориметријском методом односно комерцијалним

ELISA (енгл. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) китовима специфичним за мишије цитокине (*Mouse Gal-3 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-1 β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TGF- β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Коришћена је индиректна ELISA-а, такозвана "сендвич" ELISA-а.

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у (pH 7.2) тако да почетне концентрације буду 2000 pg/mL за Gal-3, TNF- α , IL-10 и 1000 pg/mL за TGF- β , IL-6 и IL-1 β .

Да би се добила стандардна крива са 8 тачака направљени штокови су серијски 8 пута двоструко разблажени у растварачу (енгл. *Reagent Diluent* (1%-тни BSA у PBS-у)). Непосредно пре извођења теста сви серуми (узорци) су разблажени 20 пута у дејонизованој води. Затим је 100 μ l радне концентрације "везујућег" антитела (енгл. *Capture Antibody*) додато у бунарчиће микротитар плоча (МТР од енгл. *MicroTiter Plate*) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). 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*) мануелно. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) у финалном волумену од 200 μ l и МТР су остављене минимум 1 сат на собној температури.

Након тога МТР су испране пуфером за испирање. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у бунарчиће, а затим су МТР прекривене адхезивном фолијом и остављене 2 сата на собној температури. После инкубације и испирања МТР, у све бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. *Detection Antibody*), а онда су плоче поново обложене адхезивном фолијом и остављене још 2 сата на собној температури. По истеку инкубације МТР су испране, а онда је у бунарчиће сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin*

HorseRadish Peroxidase) и остављене да се инкубирају 20 минута на собној температури без директног излагања светлости. Након инкубације је уследило испирање МТР, а онда је у бунарчиће сипано 100 μl *Substrate Solution* (*Color reagent A* и *Color reagent B* у односу 1:1). Ова инкубација са *Substrate Solution*-ом на собној температури и без директног излагања светлости је након 20 минута прекинута додавањем 50 μl *Stop Solution*-а. После држања плоча током неколико минута на мешачу, измерена је оптичка густина узорака на *Microplate Reader*-у (*Zenyth, Anthos, UK*) на таласној дужини од 450 nm. Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанци слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.16. ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Експресија IL-1 β , NALP3-а и Gal-3 молекула у ткиву колона WT мишева на C57BL/6 подлози и Gal3^{-/-} мишева на истој подлози испитана је имунохистохемијски, коришћењем зечјег поликлонског анти-IL-1 антитела (енгл. *rabbit polyclonal anti- IL-1 antibody*; ABCAM; ab9722), зечјег поликлонског анти- NALP3 антитела (енгл. *rabbit polyclonal to CIAS1/NALP3* ; ABCAM; ab91525) и зечјег поликлонског анти- Gal-3 антитела (енгл. *rabbit polyclonal anti- Gal-3 antibody*; ABCAM; ab53082).

Ткиво је током 24 часа фиксирано у 4%-тном неутралном, пуферизованом формалдехиду и калупљено у парафин. Резови дебљине 4-5 μm су монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost*[®] и сушени на температури од 56°C у току 1 сата. Како би обавила депарафинизација исечака, узорци ткива на плочицама су провлачени кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Процес ослобађања антигена је обављен „кувањем“ у микроталасној пећи на 560W у цитратном пуферу. „Кување“ је обављено у два интервала у трајању од 5 минута и у једном додатном интервалу у трајању од 8 минута након чега су плочице са ткивним узорцима испирани текућом водом у трајању од 5 минута. Овако припремљене плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоник-пероксида (H₂O₂) у трајању од 5 минута, а затим су их

испиране дестилованом водом. По завршеном испирању плочице су пласиране у кивете са фосфатним пуфером (PBS). Плочице су осушене брисањем и ткиво „овичено“ посебном оловком за ту намену, након чега су плочице постављене на носач у влажној комори. Накапано је примарно антитело у запремини од 100µl и инкубирано у трајању од 30-60 минута. По истеку инкубације, плочице су испиране у фосфатном пуферу, кроз три кивете, а затим је накапано секундарно антитело, дефинисано препорукама произвођача за свако примарно антитело. Секундарно антитело је такође инкубирано према протоколу произвођача. Како би се визуализовала реакција, узорци су накапани са АЕС (3-*Amino-9-EthylCarbazole*) и инкубирани током 5-10 минута. После испирања узорака на плочицама уследило је бојење са *Mayer*-овим хематоксилином и прекривање покровним стаклом применом глицерола.

Ћелије које су биле црвене/браон боје означене су као позитивне, сматрано је да експримирају IL-1β, NALP3-а и Gal-3 молекуле.

3.17. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА (PCR)

3.17.1. Изолација РНК

Да би се из ткива колона изоловала РНК, ткиво је претходно уситњено и лизирано RNA Isolator-ом (*Invitrogen, Paisley, UK*). Уситњено ткиво је преливено са 250 µl изолатора. Добијене смеше су скупљене у пластичне епрувете (1,5 ml), а након 5 минута инкубације на собној температури додато им је по 50 µl хлороформа. Након интензивног мешања узорци су инкубирани 10 минута на +4 °C, а затим центрифугирани током 15 минута на 12000 g на + 4 °C. Центрифугирање је довело до јасног издвајања горње водене фракције, која је садржала РНК, доња хлороформска фракције са протеинима и липидима и интермедијарне фазе са ДНК. Водена фракција је скупљена у пластичне епрувете, а затим јој је додавана истоветна запремина изопропанола. Након мешања садржаја епрувете, ткиво је инкубирано 30 минута на собној температури и центрифугирано током 15 минута на 12000 g на + 4 °C. После центрифугирања на дну епрувете формирао се талог РНК. Супернатант је одливан, а талог опран два пута по 5 минута на 7500 g у 1 ml 70 % етанола.

Након одливања етанола, пипетом је скупљен преостали етанол. Талог РНК је сушен око 5 минута, док не испари сав етанол и потом растваран у 20 μl дестиловане воде.

3.17.2. Реверзна транскрипција

Након мерења РНК концентрације на *Gene Quant* колориметру 1 μg РНК растваран је у 15 μl воде са 0,2 μg насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*) и dNTP (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*) у финалној концентрацији 1 mM. Као контрола за евентуалну контаминацију служила је вода. Раствори су инкубирани током 10 минута на 70°C, када су се хексамери насумично везивали за РНК, после чега су узорци стављани 5 минутана лед. Након тога је у узорке додавано по 4 μl пуфера за реверзну транскрипцију (5 x *First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius, Litvanija*) и 1 μl (200 U/ μl , *Fermentas, Vilnius, Litvanija*) M-MuLV реверзне транскриптазе, а затим су узорци инкубирани 10 минута на 25°C и 60 минута на 42°C, на којој се одигравала реакција реверзне транскриптазе. Реакција је прекинута инкубацијом узорака током 10 минута на 70°C. На овај начин добијена је cДНК, која је у раствореном стању чувана на +4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

3.17.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, *real time polymerase chain reaction*)

Реакција ланчаног умножавања у реалном времену је проведена на апарату *ABI Prism 7500 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)*. Реакције су припремане према стандардном протоколу за *QuantiTectSYBR Green RT-PCR* у једном кораку (*Applied Biosystems, Cheshire, Velika Britanija*), користећи комерцијално доступне прајмере за *NLRP3* и *IL-1 β* (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Прајмери за β актин (*sens 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3'* и *antisens 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3'*) су дизајнирани користећи *Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems, Cheshire, Velika Britanija)*. Иницијални корак RT-PCR је био 2 минута на 50 °C, праћен задржавањем од 10 минута на 95 °C. У реакцији је било 40 циклуса, који су се састојали од 15 подциклуса с топљења на 95°C, за којим је следио 1 минут везивања прајмера за

ДНК и синтезе ДНК ланца на 60°C. Завршни корак је био инкубација на 60°C у трајању од 1 минут. Све реакције су рађене у трипликату. Праг анализе циклуса (Ct, *cycle of threshold*) је био подешен на 0,1 релативних флуоросцентних јединица. Просечне Ct вредности контролних трипликаата (актин) су одузете од просечних Ct вредности трипликаата гена од интереса и на тај начин је добијен ΔCt , док је релативна експресија гена изражена као $2^{-\Delta Ct}$. Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, која је арбитарно подешена на 1.

3.18. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

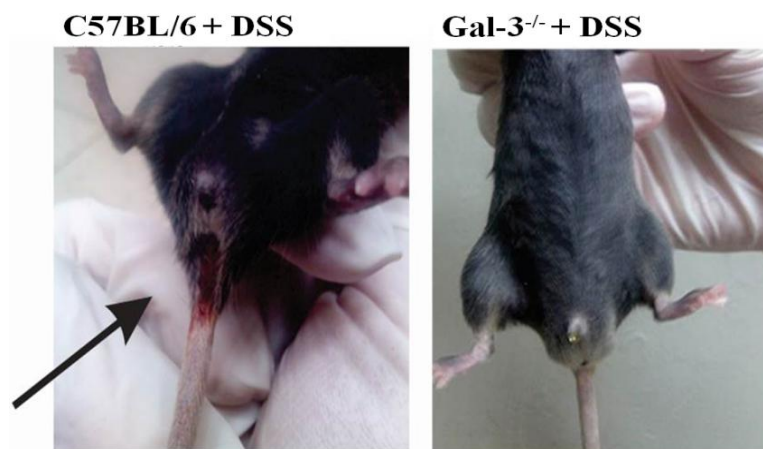
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 19. Пре статистичке обраде података, прво је испитана правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев U тест. Резултати експеримента су изражени као вредност \pm стандардна грешка (SEM). Сматраће се статистички значајном разликом у добијеним вредностима за групе када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$. *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикона и табела.

4. РЕЗУЛТАТИ

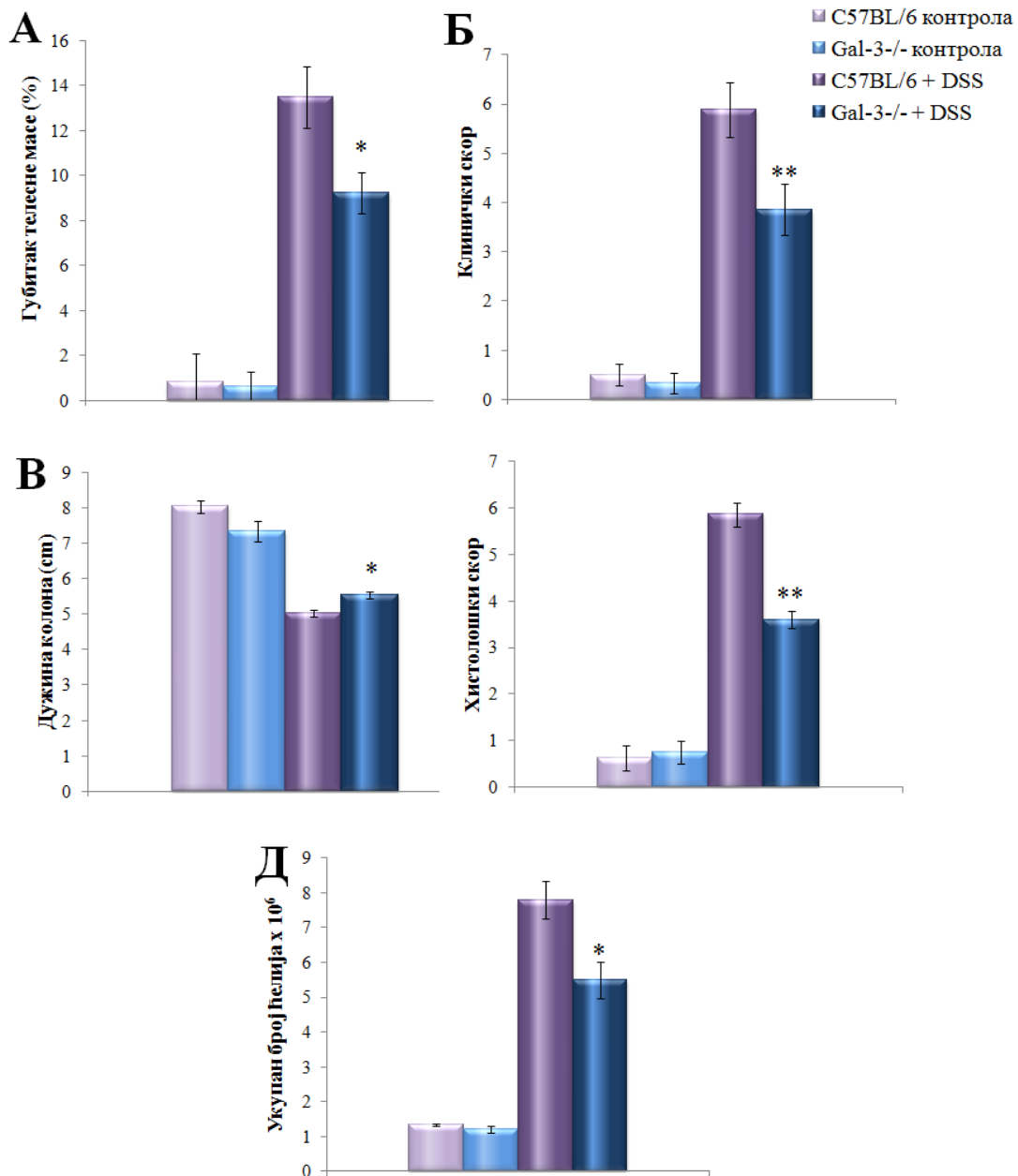
4.1. Делеција Gal-3 гена значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом

Да би се проценило да ли постоји разлика у степену развијености акутног колитиса и оштећења ткива колона између C57BL/6 и Gal3^{-/-} мишева одређен је клинички скор за сваког миша, измерена дужина колона и урађена патохистолошка анализа ткивних препарата колона. У ту сврху, сви мишеви су жртвовани 7. дана након индукције колитиса.

Резултати су показали да Gal-3 делеција значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом. Током експеримента су свакодневно праћени показатељи клиничког тока болести: телесна маса, ректално крварење и конзистенција фецеса. Губитак телесне масе био је статистички значајно мањи у Gal3^{-/-} мишева ($p < 0.05$) у поређењу са губитком телесне масе у C57BL/6 мишева (Фигура 1А). Ректално крварење је било видљивије и обилније у C57BL/6 мишева у поређењу са карактеристикама ректалног крварења у Gal-3^{-/-} мишева (Слика 7). Као што је приказано на Фигури 1, седам дана након примене DSS-а, уочено је, да је клиничка манифестација болести Gal-3^{-/-} мишева статистички значајно мања ($p < 0.05$) у поређењу са клиничком манифестацијом болести у C57BL/6 мишева (Слика 7). Није било статистичке значајности у клиничкој манифестацији болести у здравих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 1Б).



Слика 7. Ректално крварење у C57BL/6 након седмодневне примене DSS-а (означено стрелицом).

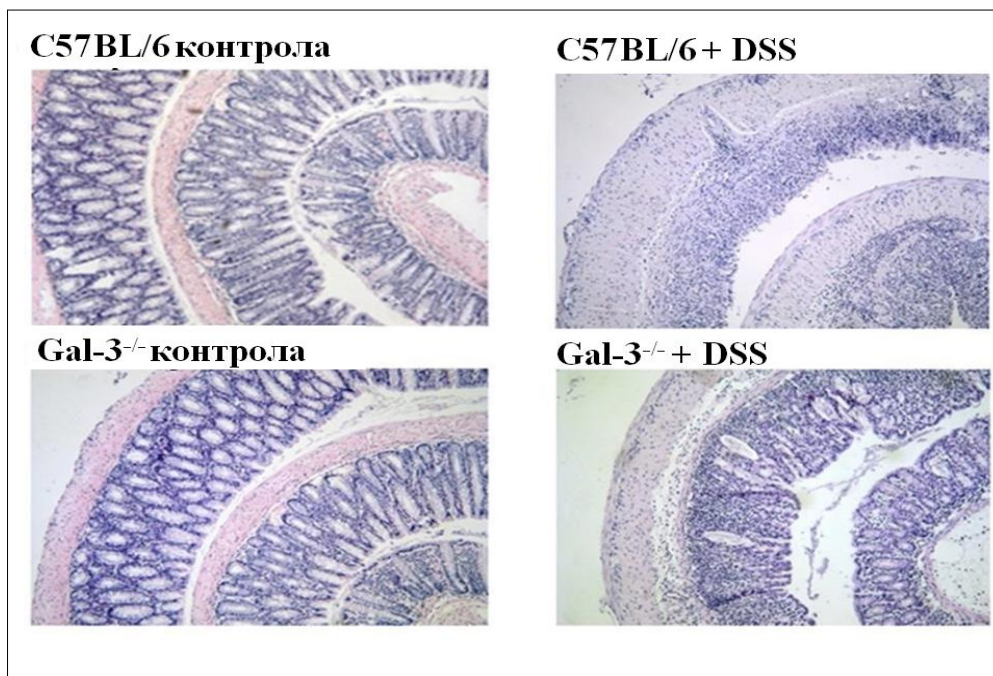


Фигура 1. Gal-3 делеција значајно смањује оштећење колона изазвано DSS-ом. **А.** Губитак телесне масе у процентима. **Б.** Клинички скор C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након 7 дана примене DSS-а. Клинички скор је статистички значајно мањи у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са клиничким скором у C57BL/6 мишева. **В.** Дужина колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а. Дужина колона је статистички значајно мања у C57BL/6 мишева у поређењу са дужином колона Gal-3^{-/-} мишевима. **Г.** Хистолошки скор C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а. **Д.** Укупни број ћелија је статистички значајно мањи у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност ± SE (експерименталне групе: 40 мишева по групи; контролне групе: 10 мишева по групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Дужина колона у Gal-3^{-/-} мишева била је статистички значајно већа у поређењу са дужином овог органа у C57BL/6 мишева (Фигура 1В).

Патохистолошка анализа колона је показала значајно слабије оштећење ткива колона у Gal-3^{-/-} мишева након 7 дана примене DSS-а (Фигура 1 Г; Слика 8). Као што је приказано на слици 8, код свих C57BL/6 мишева била је присутна опсежна инфилтрација инфламаторним ћелијама праћена губитком нормалне грађе ткива колона. У ткиву колону C57BL/6 мишева јасно је видљива и деструкција крипти и истањена ламина проприја, уз присуство ерозија епитела. Супротно, очуване или делимично збрисане крипте се могу видети у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а.

Потврђена је јасно видљива интезивна инфилтрација инфламаторним ћелијама унутар свих слојева ткива колона C57BL/6 мишева за разлику од Gal-3^{-/-} мишева код којих се види само ограничено присуство инфламаторних ћелија (Слика 8). Укупни број инфламаторних ћелија у ламини проприји у Gal-3^{-/-} мишева је био статистички значајно мањи у поређењу са C57BL/6 мишевима (Фигура 1Д). Не постоји статистички значајна разлика у грађи колона нетретираних C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Слика 8).

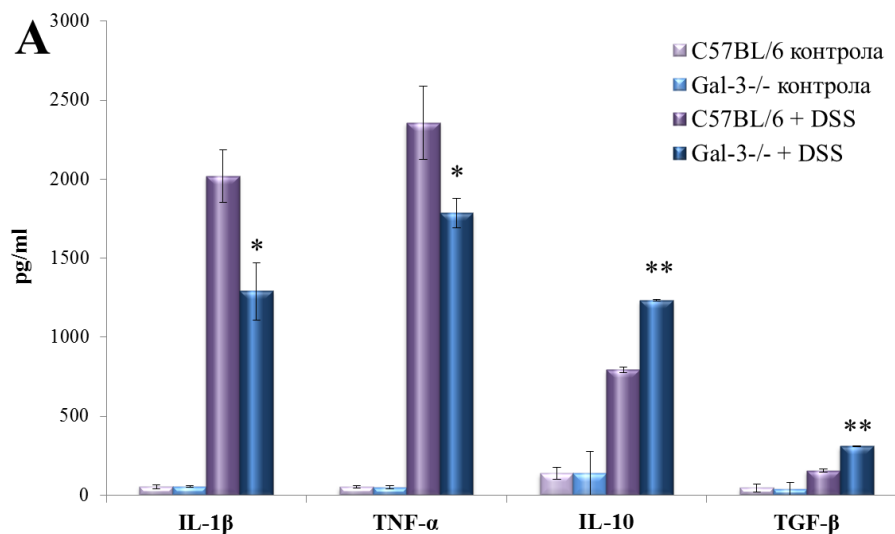


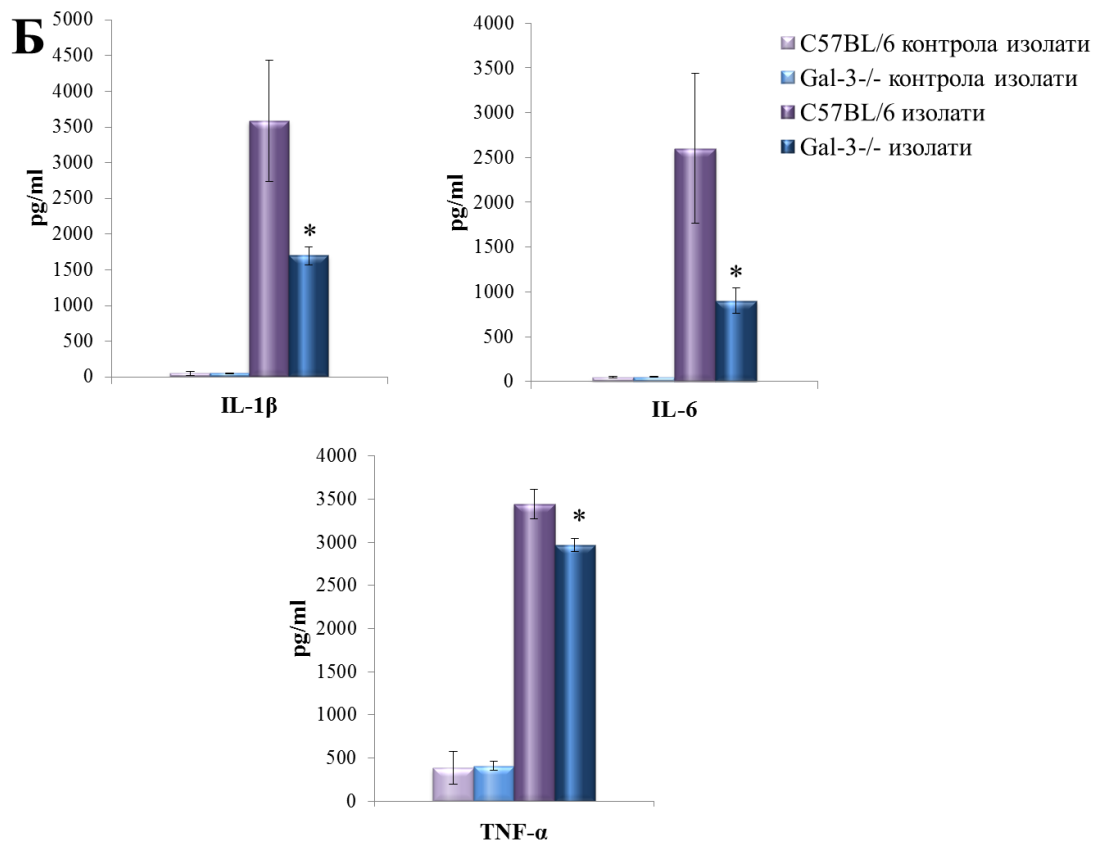
Слика 8. Репрезентативни исечци ткива колона обојени стандарним патохистолошким бојењем (H&E, увећање 100x). На левој страни слике ткивни исечци контролних мишева, док на десној страни слике су приказани ткивни исечци експерименталних група мишева.

4.1.1. *Gal-3^{-/-} мишеви имају мању концентрацију IL-1 β и TNF- α и већу концентрацију TGF- β и IL-10 у серуму 7 дана након примене DSS-a*

Како је код *Gal-3^{-/-}* мишева уочен мањи клинички скор, значајно слабије оштећење ткива колона и мањи број инфламаторних ћелија након 7 дана третмана DSS-ом, испитано је да ли је слабије оштећење колона *Gal-3^{-/-}* мишева последица разлике у концентрацији инфламаторних цитокина. Концентрација цитокина измерена је у серуму мишева ELISA методом.

Као што је приказано на Фигури 2А, делеција гена за Gal-3 узроковала је статистички значајно смањење концентрације IL-1 β и TNF- α у серуму, 7 дана након примене DSS-a. Статистички значајно мања концентрација IL-1 β ($p < 0.05$) и TNF- α ($p < 0.05$) уочена је у серуму *Gal-3^{-/-}* мишева у поређењу са серумском концентрацијом ових цитокина у C57BL/6 мишевима. Уз то, запажено је и смањење концентрације IL-1 β , TNF- α и IL-6 у изолатима ткива колона у *Gal-3^{-/-}* мишева у поређењу са концентрацијом IL-1 β , TNF- α и IL-6 у изолатима ткива колона у C57BL/6 мишевима (Фигура 2Б). Концентрација анти-инфламаторних цитокина (IL-10 и TGF- β) је била статистички значајно већа у серуму *Gal-3^{-/-}* у поређењу са концентрацијом ових цитокина у серуму у C57BL/6 мишевима. Концентрације свих анализираних цитокина у серуму и изолатима ткива колона нетретираних *Gal-3^{-/-}* мишева нису се статистички значајно разликовале од концентрације испитиваних цитокина у нетретираних C57BL/6 мишева.



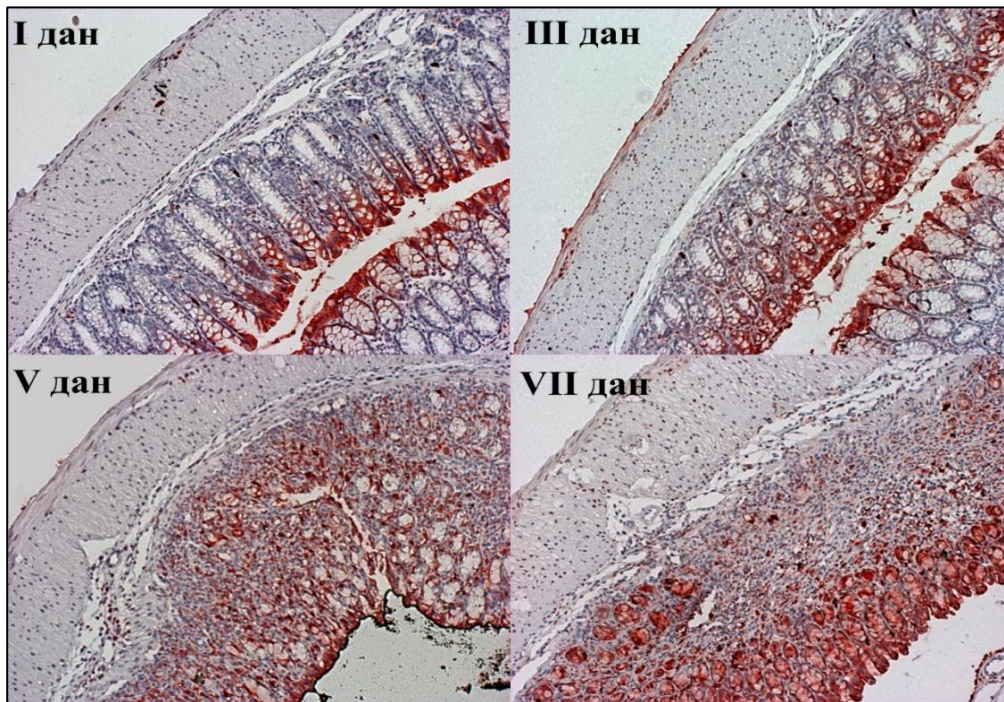


Фигура 2. Вредности концентрација цитокина у крвном серуму и у изолатима ткива колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. А. Концентрација IL-1β и TNF-α је статистички значајно мања у серуму Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а у поређењу са концентрацијом серумских цитокина у C57BL/6 мишева, док је концентрација TGF-β и IL-10 била статистички значајно повећана. Није било статистички значајне разлике у концентрацији серумских цитокина између контролних група. Б. Концентрација IL-1β, TNF-α и IL-6 је статистички значајно мања у изолатима ткива колона Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а у поређењу са концентрацијама ових цитокина у C57BL/6 мишева. Није било статистички значајне разлике у концентрацији цитокина у ткиву црева између контролних група. Измерене вредности три поновљена експеримента су приказане као средња вредност ± SE (експерименталне групе: 20 мишева по групи; контролне групе: 8 мишева по групи) (*p<0.05, **p<0.01).

4.1.2. Експресија Gal-3 молекула у ткиву колона

Након запажања да делеција Gal-3 гена редукује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом, жртвовани су C57BL/6 мишеви у различитим временским интервалима током седмодневне примене DSS-а и анализирана је експресија Gal-3 молекула. Имунохистохемијским бојењем је показано да у току индукције

болести, расте и експресија Gal-3 у ткиву колона (Слика 9). Првог дана се уочава релативно мали број епителних ћелија неизмењених крипти позитивних на Gal-3, док трећег дана се може уочити већи број позитивних ћелија на Gal-3. Током петог дана јасно је уочљива експресија Gal-3 у цитоплазми и једру великом броја епителних ћелија већ измењених крипти, као и инфилтрату инфламаторних ћелија. Док седмог дана велики број ћелија је био позитиван на Gal-3, уочава се и да су позитивне ћелије на Gal-3 биле дуж свих слојева ткива колона.



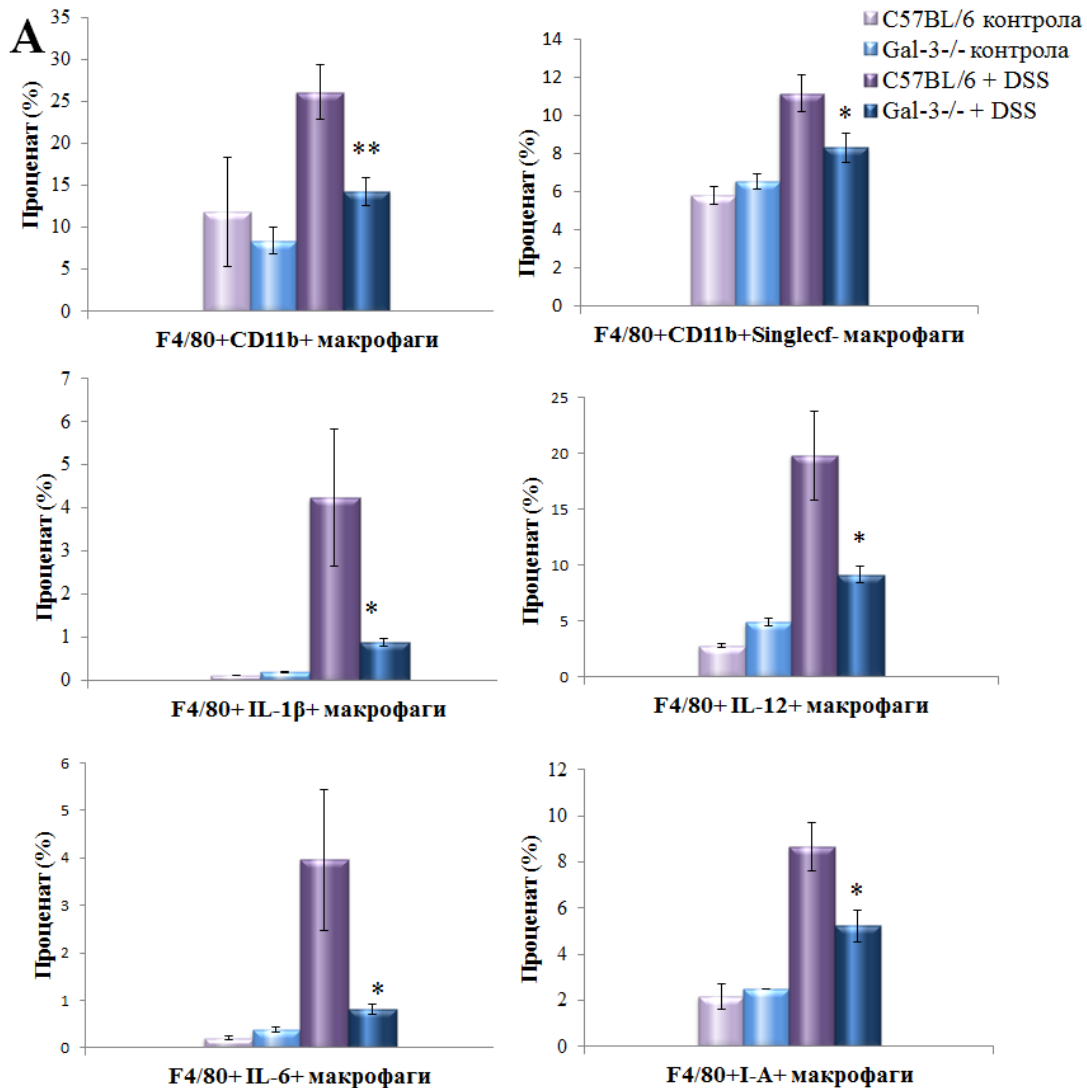
Слика 9. Експресија Gal-3 у ткиву колона C57BL/6 мишева у различитим временским интервалима.

4.2. Процент и број активираних макрофага је значајно мањи у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом.

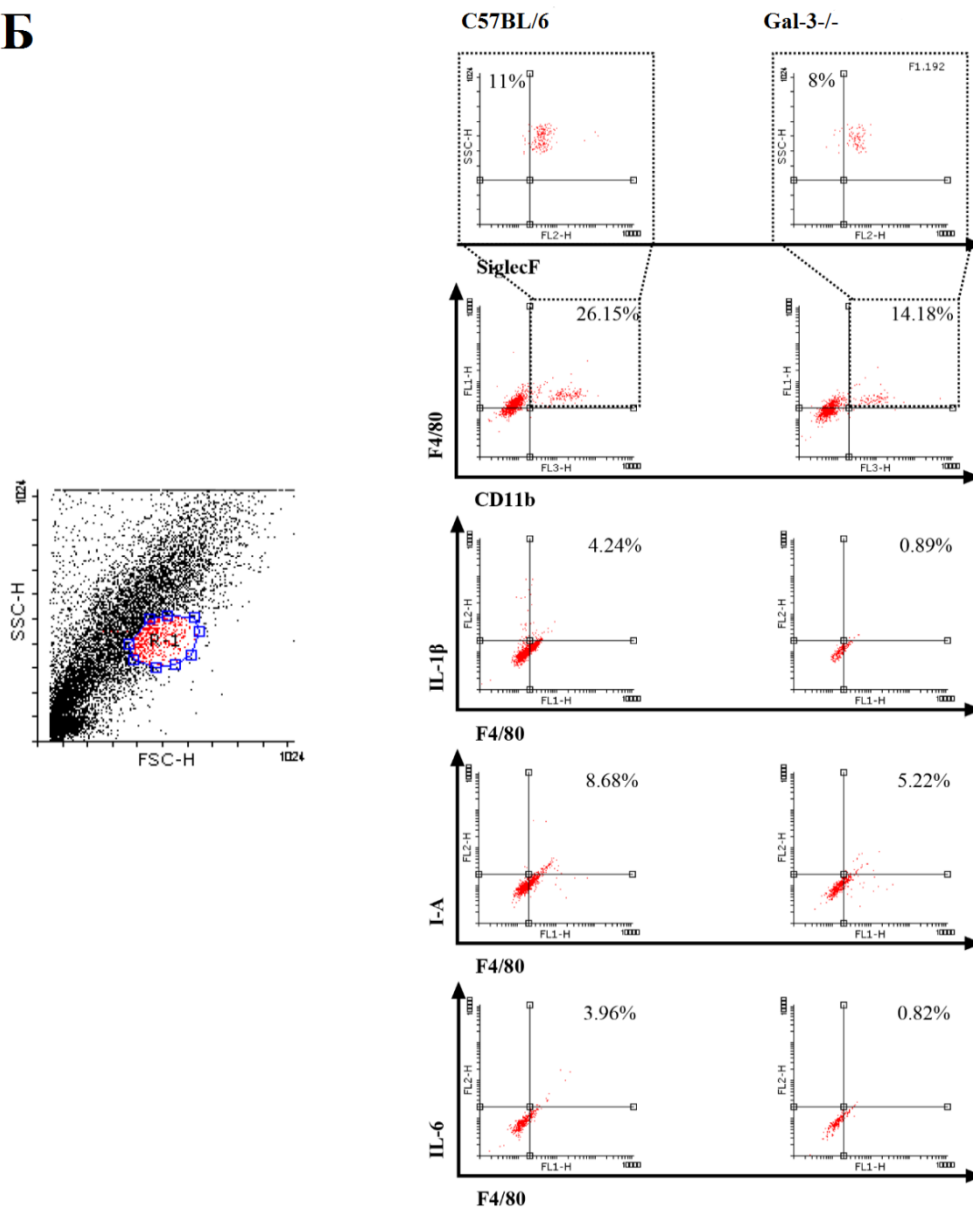
C57BL/6 мишеви имају значајно теже оштећење ткива колона и укупни број инфилтришућих ћелија био значајно већи у ових животиња, тестирана је претпоставка да су макрофаги одговорни за такве промене. Зато је проточном цитометријом, одређен процент макрофага, као и број макрофага који инфилтрише ткиво колона у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева 7 дана након примене DSS-а.

Као што је приказано на Фигури 3, статистички значајно мањи проценат F4/80+CD11b+ макрофага ($p < 0.01$), макрофага који продукују IL-1 β , IL-6 и IL-12 ($p < 0.05$) као и F4/80+CD11b+SinglecF- „colonic” макрофага и макрофага који експримирају МНС молекул II класе ($p < 0.05$) је запажен у ламини проприји ткива колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са процентима макрофага у ламини проприји ткива колона у C57BL/6 мишева након 7 дана примене DSS-а.

Процент анализираних макрофага у ткиву колона у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева, који нису примали DSS није се статистички значајно разликовао ($p > 0.05$; Фигура 1).

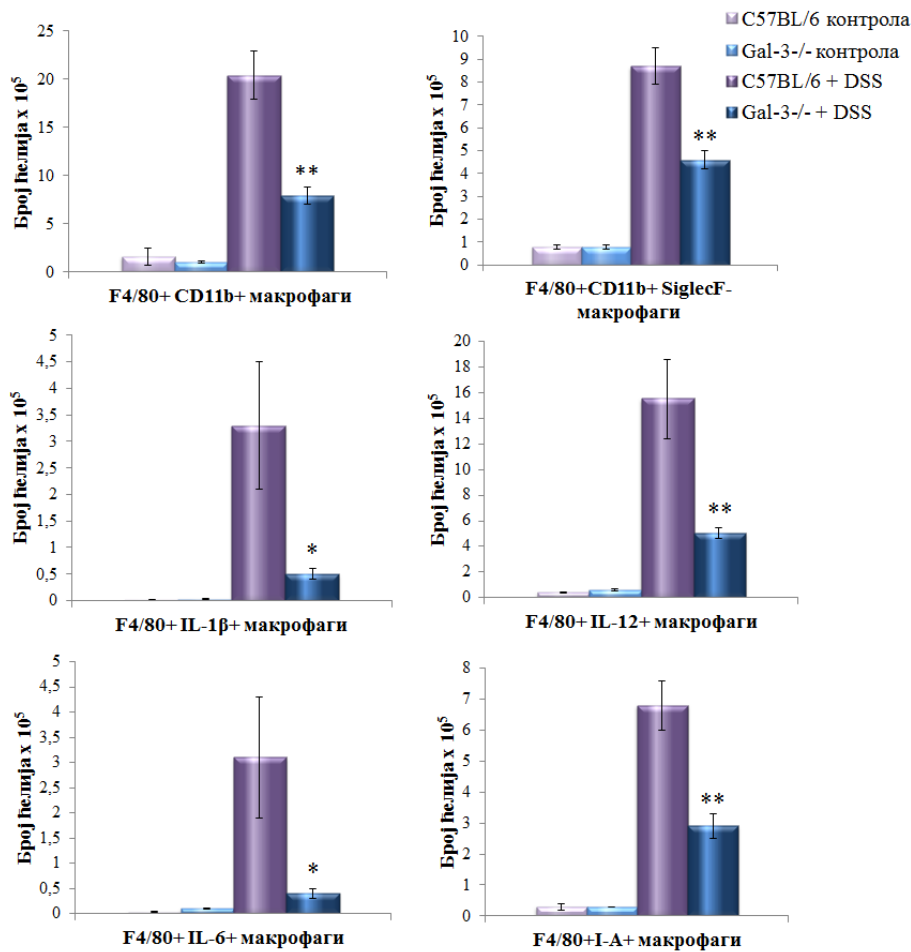


Б



Фигура 3. Процент макрофага у ткиву колона у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. А. Запажен је статистички значајно мањи проценат F4/80+CD11b+ макрофага који продукују IL-1β и IL-6 као и број F4/80+CD11b+SiglecF- „colonic” макрофага у ламини проприји ткива колона Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима 7 дана након примене DSS-а. **Б.** Репрезентативни „дот плотови“ проточне цитометријске анализе. Први „дот плот“ показује „gate-оване“ ћелије; други „дот плот“ репрезентује проценат F4/80+CD11b+ макрофага колона, F4/80+CD11b+SiglecF- „colonic” макрофага, као и макрофага који продукују IL-1β, IL-6 и макрофага који експримирају МНС молекул II класе, а који су изоловани из C57BL/6 мишева; трећи „дот плот“ показује проценат ових макрофага, а који су изоловани из Gal-3^{-/-} миша. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Када је анализиран број макрофага који инфилтрише ламину проприју у ткиву колоне у *C57BL/6* и *Gal-3^{-/-}* мишева након 7 дана примене DSS-а (Фигура 4), уочена је јасна, статистички значајна разлика у броју *F4/80+CD11b+* макрофага, макрофага који продукују $IL-1\beta$, $IL-6$ и $IL-12$ као и *F4/80+CD11b+SiglecF⁻* „colonic” макрофага (макрофага колоне) и макрофага који експримирају МНС молекулу II класе у ламини проприји ткива колоне *Gal-3^{-/-}* у поређењу са *C57BL/6* мишевима. Није запажена значајна разлика у броју анализираних макрофага у ткиву колоне између *C57BL/6* и *Gal-3^{-/-}* мишева контролних група (Фигура 5).



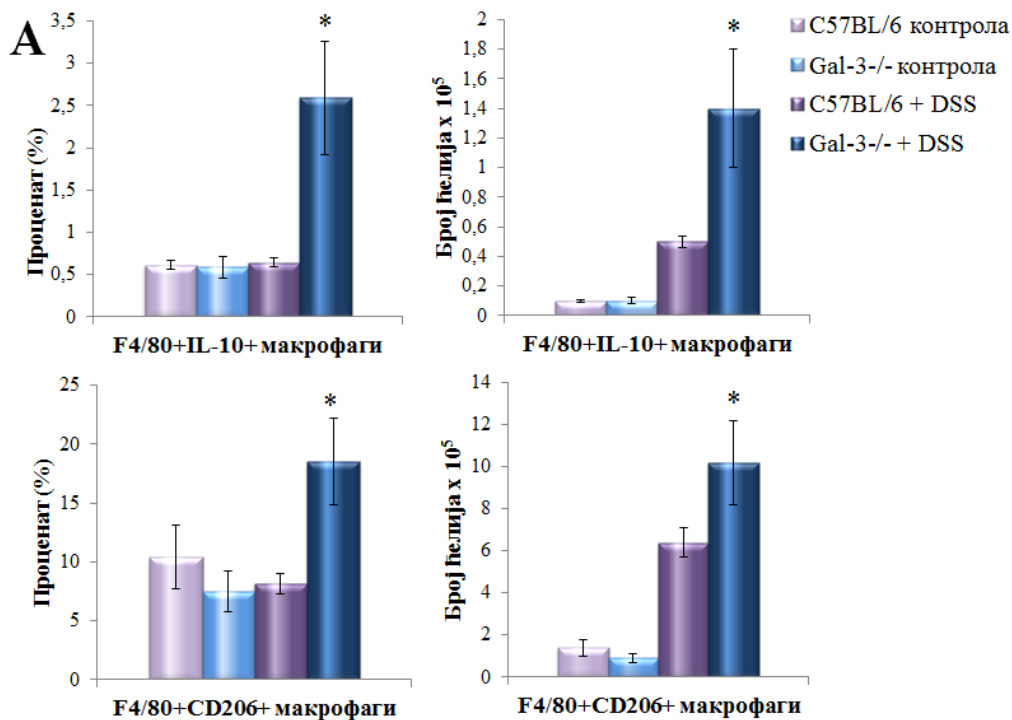
Фигура 4. Број макрофага у ткиву колоне *C57BL/6* и *Gal-3^{-/-}* мишева. Број *F4/80+CD11b+* макрофага који продукују $IL-1\beta$ и $IL-6$ као и број *F4/80+CD11b+SiglecF⁻* „colonic” макрофага у ламини проприји ткива колоне *Gal-3^{-/-}* мишева био је статистички значајно већи у поређењу са овим профилима макрофага у *C57BL/6* мишева 7 дана након примене DSS-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2.1. Gal-3 делеција узрокује алтернативну активацију макрофага

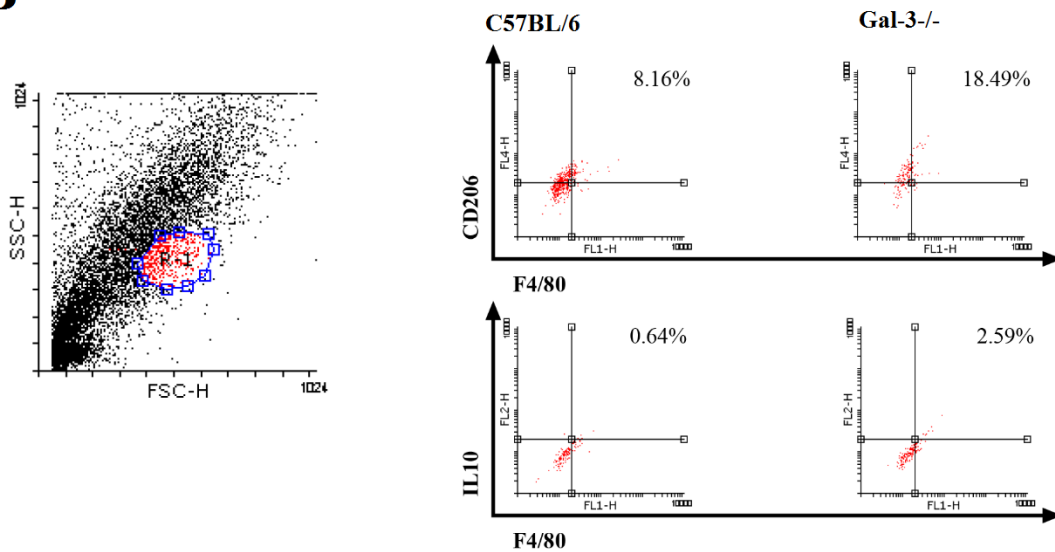
Како је у овој студији уочено значајно повећање процента и броја макрофага који продукују IL-10 и експримирају рецептор за манозу тј. маркер за алтернативну активацију макрофага (CD206) у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом у поређењу са C57BL/6 животињама, тестирана је претпоставка да је пораст броја макрофага који производе IL-10 последица утицаја Gal-3 на алтернативну активацију макрофага.

У том циљу, анализирана је релативна заступљеност и апсолутан број F4/80+CD206+ и F4/80+IL-10+ алтернативно активираних макрофага у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

Број и проценат макрофага који експримирају CD206 и продукују IL-10 је био статистички значајно већи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 5А).



Б



Фигура 5. Процент и број макрофага у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. А. Број и процент макрофага који експримирају CD206 и продукују IL-10 је био статистички значајно већи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 мишевима. **Б.** Репрезентативни „дот плотови“ проточне цитометријске анализе. Први „дот плот“ показује „gate-оване“ ћелије; други „дот плот“ репрезентује процент F4/80⁺CD206⁺ макрофага колона и макрофага који продукују IL-10, а који су изоловани из C57BL/6 мишева; трећи „дот плот“ показује процент ових макрофага, а који су изоловани из Gal-3^{-/-} миша. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

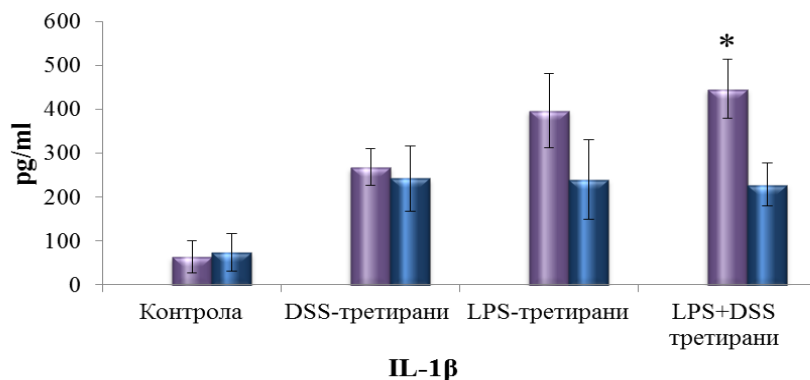
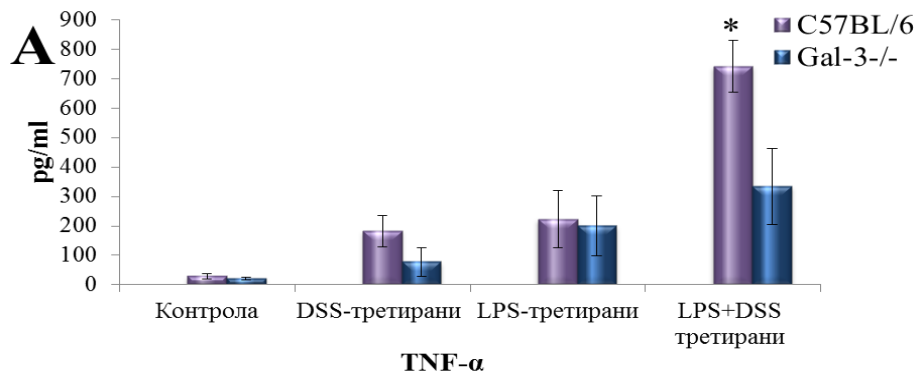
Значајна разлика у проценту M2 фенотипа макрофага у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева је приказана и репрезентативним дотплотовима (Фигура 5Б). Није било статистички значајне разлике (p>0.05) у проценту и броју анализираних ћелија између мишева контролних група.

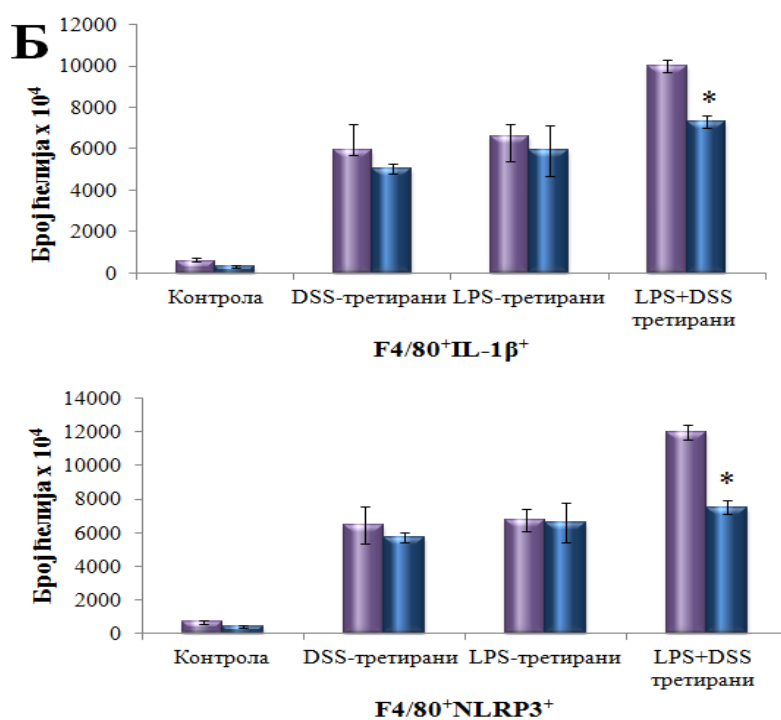
Добијени подаци показују да Gal-3 делеција узрокује алтернативну активацију макрофага у колитису индукованом DSS-ом.

4.2.2. Макрофаги, изоловани из перитонеума здравих $Gal-3^{-/-}$ мишева и *in vitro* активирани липополисахаридом и DSS-ом, продуковали су значајно мање TNF- α и IL-1 β у поређењу са C57BL/6 макрофагима

Пошто је показана разлика у броју и проценту макрофага у ламини проприји ткива колона у C57BL/6 и $Gal-3^{-/-}$ мишева, испитано је да ли се ова разлика задржава и *in vitro*. Макрофаги изоловани из перитонеума клинички здравих C57BL/6 и $Gal-3^{-/-}$ мишева стимулирани су липополисахаридом и 5% DSS-ом. Концентрација TNF- α и IL-1 β је мерена у супернатанту и анализирана проточном цитометријом. Концентрације цитокина TNF- α и IL-1 β у супернатанту LPS-ом и DSS-ом стимулираних макрофага изолованих из перитонеума здравих $Gal-3^{-/-}$ мишева су биле статистички значајно мање у поређењу са C57BL/6 макрофагима (Фигура 6А).

Проточном цитометријом је показано да су макрофаги изоловани из перитонеума здравих $Gal-3^{-/-}$ мишева, стимулирани и LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање IL-1 β и експримирали статистички значајно мање NLRP3 у поређењу са C57BL/6 макрофагима (Фигура 6Б).





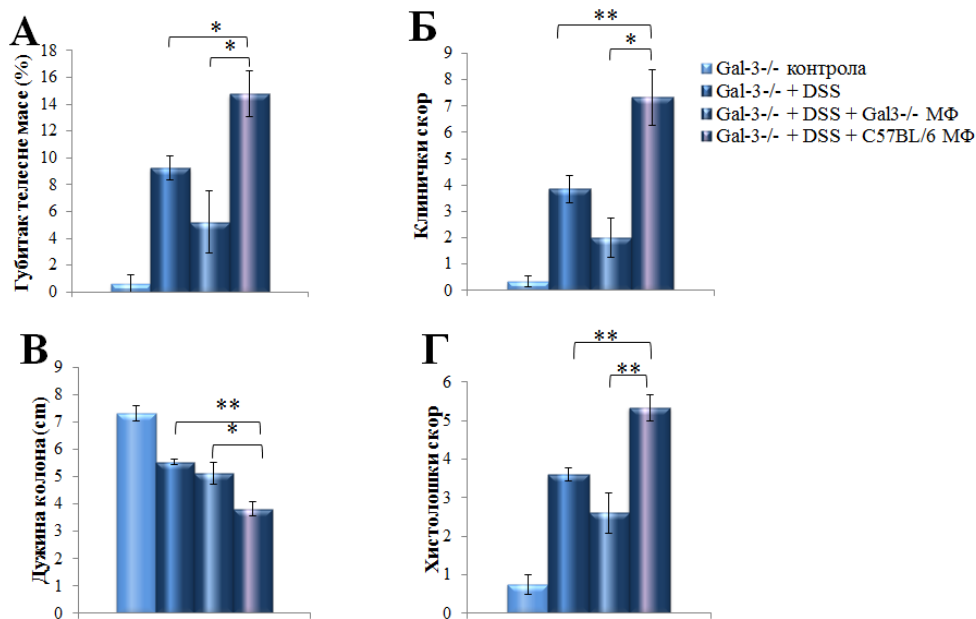
Фигура 6. *In vitro* стимулирани макрофаги изоловани из перитонеума здравих мишева. **А.** Макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева стимулирани LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање TNF-α и IL-1β у поређењу са C57BL/6 макрофагима. **Б.** Макрофаги здравих Gal-3^{-/-} мишева стимулирани са LPS-ом и DSS-ом продуковали су статистички значајно мање IL-1β и експримирали статистички значајно мање NLRP3 у поређењу са C57BL/6 макрофагима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (10 мишева по групи) (*p<0.05, **p<0.01).

4.2.3. Пасивни трансфер перитонеалних макрофага

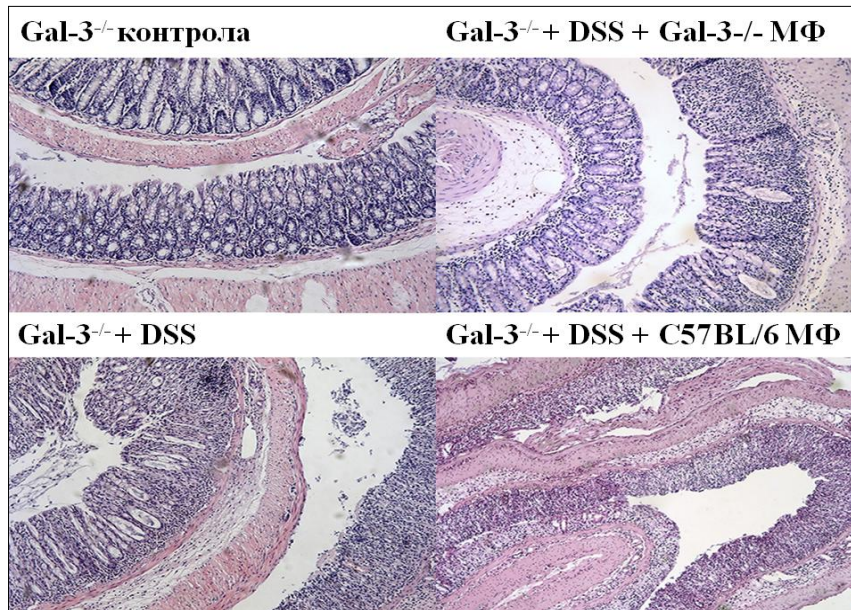
Свакодневни пасивни трансфер перитонеалних макрофага (10⁶ ћелија) током седмодневне примене DSS-а, изолованих из здравих C57BL/6 животиња значајно је погоршао оштећење ткива колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (Фигура 7). Губитак телесне масе је био статистички значајно већи у Gal-3^{-/-} мишева који су примили макрофаге изоловане из C57BL/6 мишева у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима који су примили макрофаге изоловане из Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 7А). Клиничка манифестација болести је била статистички значајно снажнија у Gal-3^{-/-} мишева који су примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима који су примили перитонеалне макрофаге из Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 7Б). Gal-3^{-/-} мишеви који су

примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња имали су статистички значајно краћи колон у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима који су примили перитонеалне макрофаге из Gal-3^{-/-} животиња (Фигура 7В).

Оштећење ткива колоне је опсежније у Gal-3^{-/-} мишева, који су примили перитонеалне макрофаге здравих C57BL/6 животиња (Слика 10). Екстензивно оштећење мукозе и дубљих структура зида колоне, као и присуство инфламаторних ћелија у субмукози је јасно уочљиво у Gal-3^{-/-} мишева, који су примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима који су примили перитонеалне макрофаге из здравих Gal-3^{-/-} животиња. Хистолошке промене у Gal-3^{-/-} мишева након 7 дана примене DSS-а су биле статистички значајно мање у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима који су пасивним трансфером примили перитонеалне макрофаге из здравих C57BL/6 животиња. На препаратима Gal-3^{-/-} мишева који су примали DSS се може уочити мањи крипти абцес и очуваније структуре самих крипти, док је присуство инфламаторних ћелија ограничено на мукозу.

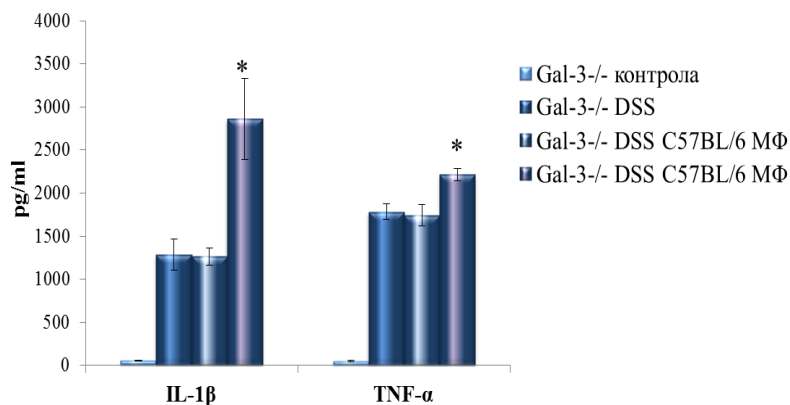


Фигура 7. Пасивни трансфер макрофага. Пасивни трансфер перитонеалних макрофага изолованих из здравих C57BL/6 животиња значајно је погоршао оштећење ткива колоне Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. **А.** Процент губитка телесне масе након пасивног трансфера макрофага. **Б.** Клинички скор. **В.** Скраћење дужине колоне након пасивног трансфера макрофага. **Г.** Хистолошки скор. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).



Слика 10. Репрезентативни патохистолошки препарати пасивног трансфера макрофага (H&E, 100x). На десној страни слике приказани су ткивни исечци $Gal-3^{-/-}$ мишева након пасивног трансфера C57BL/6 и $Gal-3^{-/-}$ макрофага.

Серумске концентрације IL-1 β и TNF- α у $Gal-3^{-/-}$ мишева, који су примили макрофаге изоловане из здравих C57BL/6 мишева су биле статистички значајно веће у поређењу са серумским концентрацијама ових цитокина у $Gal-3^{-/-}$ мишева који су примили перитонеалне макрофаге $Gal-3^{-/-}$ животиња (Графикон 1).

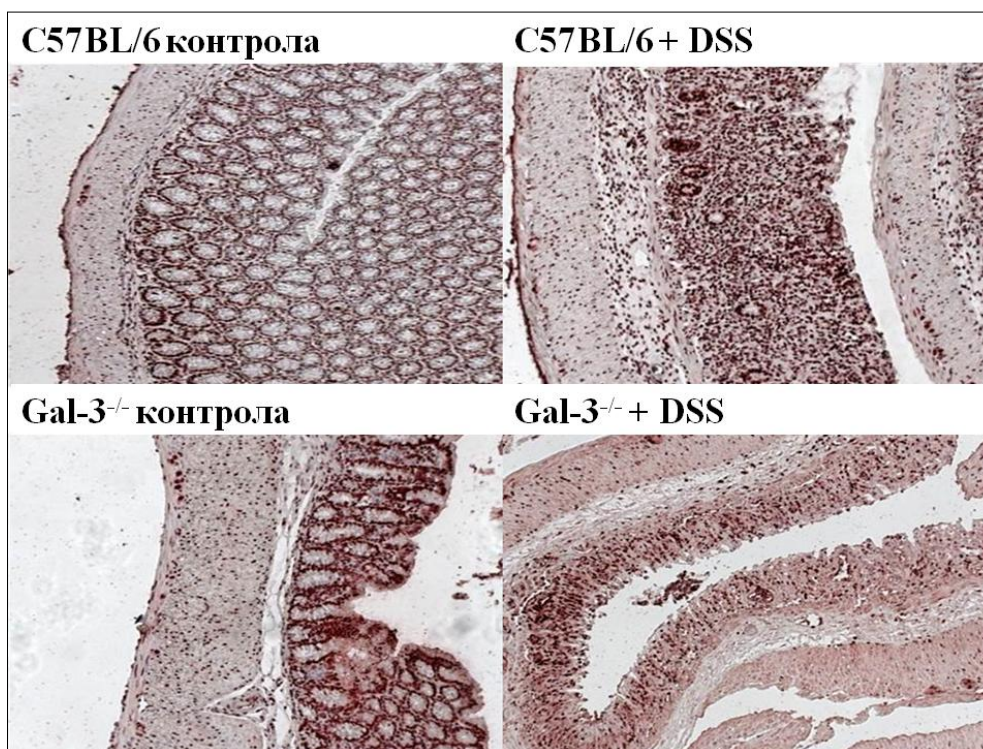


Графикон 1. Промене концентрације цитокина у $Gal-3^{-/-}$ мишева након пасивног трансфера макрофага. Пасивни трансфер перитонеалних макрофага изолованих из здравих C57BL/6 животиња значајно је повећао продукцију IL-1 β и TNF- α у $Gal-3^{-/-}$ мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

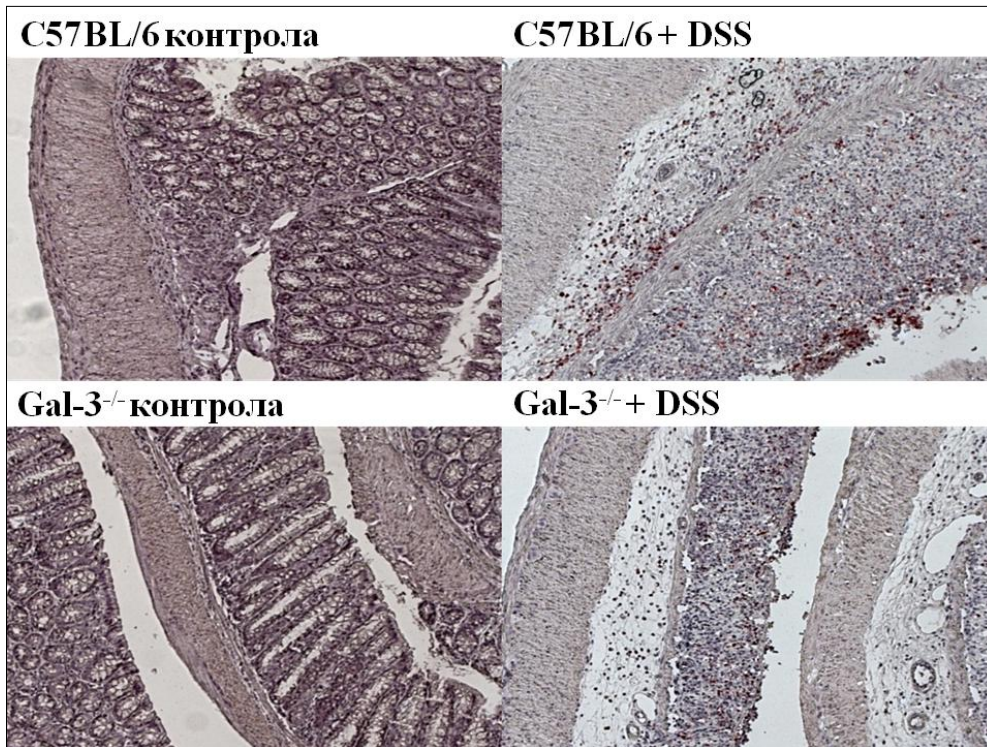
4.2.4. Делеција *Gal-3* гена узрокује мању експресију *NALP-a* и *IL-1 β*

У ткиву колона одређивана је експресија *NALP-a* и *IL-1 β* имунохистохемијском и PCR методом.

У експерименталном колитису изазваном DSS-ом делеција *Gal-3* узрокује мању експресију *NALP-a* и *IL-1 β* у ткиву колона (Слика 11а и б). У ткивним препаратима C57BL/6 мишева се уочава значајно већи дифузни инфилтрат који досеже до субмукозе у поређењу са ткивним препаратима *Gal-3*^{-/-} мишева. У *Gal-3*^{-/-} мишева уочава се очувана морфологија крипти и инфилтрат инфламаторних ћелија не продире у субмукозу. Експресија *NALP-a* је била значајно већа у инфилтратима ткивних препарата у C57BL/6 мишева у поређењу са ткивним препаратима *Gal-3*^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Локализација експресије *NALP-a* у C57BL/6 мишева и *Gal-3*^{-/-} мишева је била у цитоплазми. Експресија *IL-1 β* у C57BL/6 мишева је била значајно већа у поређењу са експресијом овог цитокина у ткиву колона *Gal-3*^{-/-} мишева.

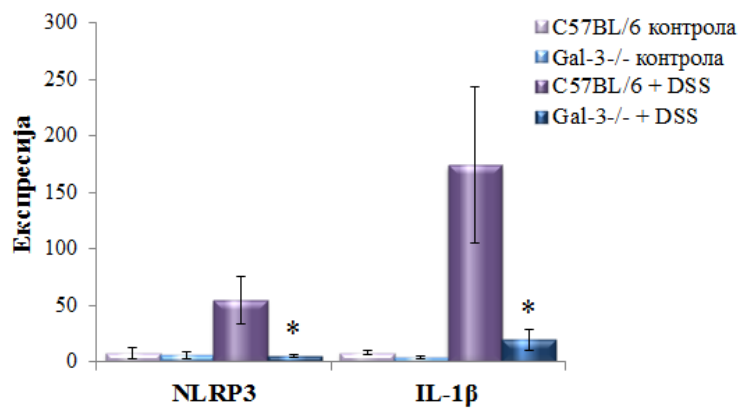


Слика 11а. Експресија *NALP-a* у ткиву колона C57BL/6 и *Gal-3*^{-/-} мишева (десна страна слике) третираних DSS-ом.



Слика 116. Експресија IL-1 β у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (десна страна слике) третираних DSS-ом.

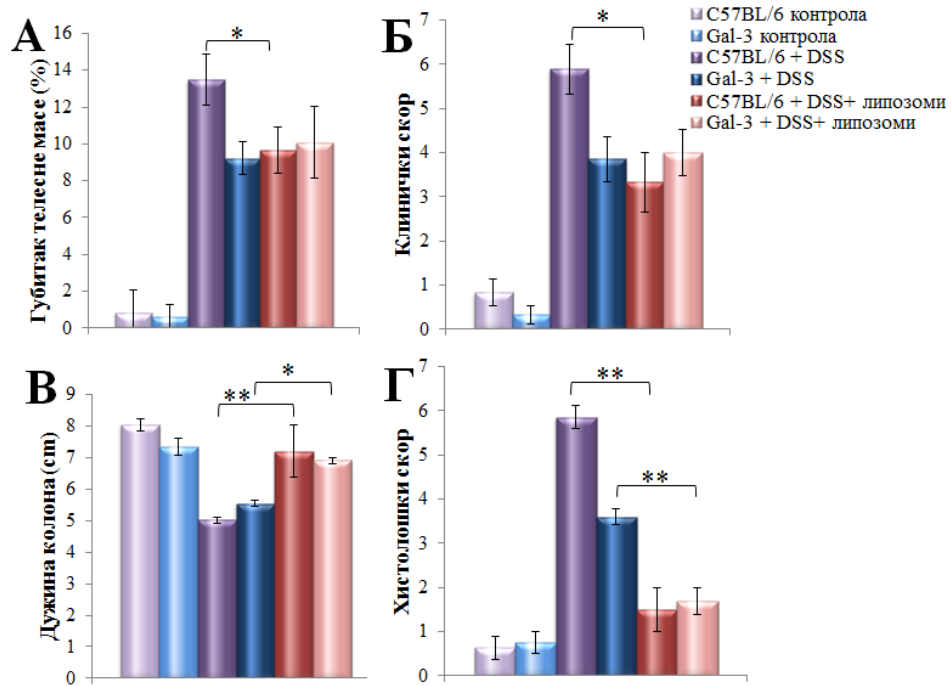
У ткиву колона, експресија гена за NLRP3 и IL-1 β је одређена методом PCR. Експресија NLRP3 и IL-1 β у ткиву колона је била статистички значајно мања у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са експресијом ових гена у C57BL/6 мишева (Графикон 2).



Графикон 2. Смањена експресија гена за NALP и IL-1 β у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. У ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом била је смањена експресија гена за NALP и IL-1 β . Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

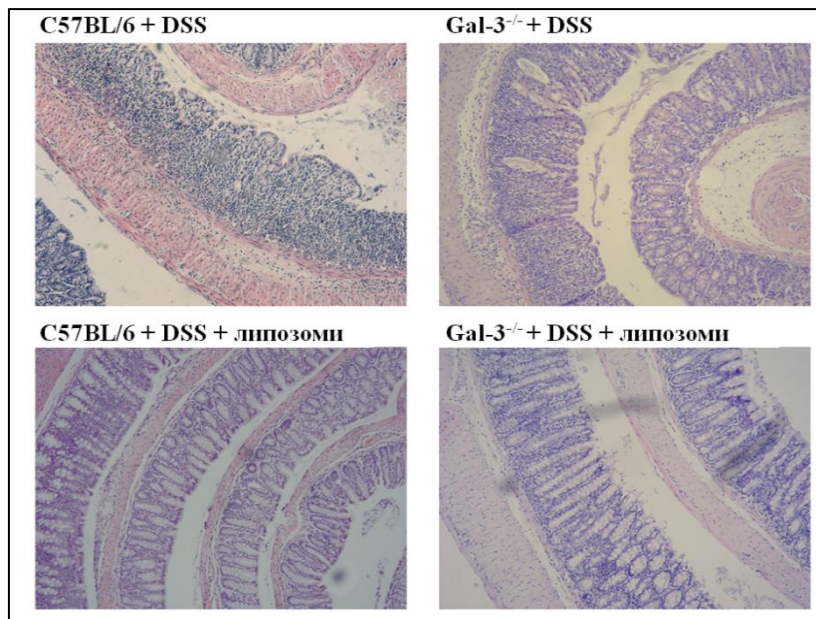
4.2.5. Деплеција макрофага значајно смањује акутни колитис у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева

Да би се утврдио значај макрофага у овом моделу акутног колитиса, макрофаги су деплетирани липозомима (-4, 0, 2, 4 и 6-ог дана) у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева који су третирани DSS-ом. Деплеција макрофага је значајно смањила развој колитис у обе експерименталне групе (Фигура 8). Није било значајне разлике у губитку телесне масе, у клиничкој манифестацији болести, као ни у скраћењу дужине колона након примене липозома између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (Фигура 8А, Б и В). Патохистолошким анализом је потврђено да није било статистички значајне разлике у нарушавању морфологије ткива колона у групама животиња које су примиле липозоме (Фигура 8Г; Слика 12). У групама мишева које су примиле липозоме не уочавају се инфилтрати инфламаторним ћелијама, као ни деструкција крипти. Хистолошки скор C57BL/6 мишева који су примили липозоме је био статистички значајно мањи у поређењу са хистолошким скором C57BL/6 мишева који су примали само DSS. На ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су примали DSS уочавају се збрисане структуре крипти и инфилтрација инфламаторним ћелијама дуж свих слојева колона, као и истаљена ламина проприја. Насупрот томе, C57BL/6 мишеви који су примили липозоме имају очувану морфологију крипти са минималним инфилтратом инфламаторних ћелија око бази крипти. Оштећење ткива колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом је било статистички значајно веће у поређењу са оштећењем ткива колона Gal-3^{-/-} мишева који су примили липозоме. На ткивним препаратима Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом уочава се изражен крипитис са местимичним криптним абцесом и највећим делом очуваним структурама крипти. Инфилтрација инфламаторним ћелијама је ограничена на мукозу колона. Патохистолошким анализом препарата Gal-3^{-/-} мишева који су примили липозоме уочава се очувана ламина проприја колона, прожета ретким инфилтратом инфламаторних ћелија.



Фигура 8. Деpleција макрофага у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. А, Б, В, Г.

Није било значајне разлике у губитку телесне масе, у клиничком скору, као ни у скраћењу дужине колоне након примене липозома између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Није било значајне разлике у хистолошком скору између група које се примиле липозоме. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).

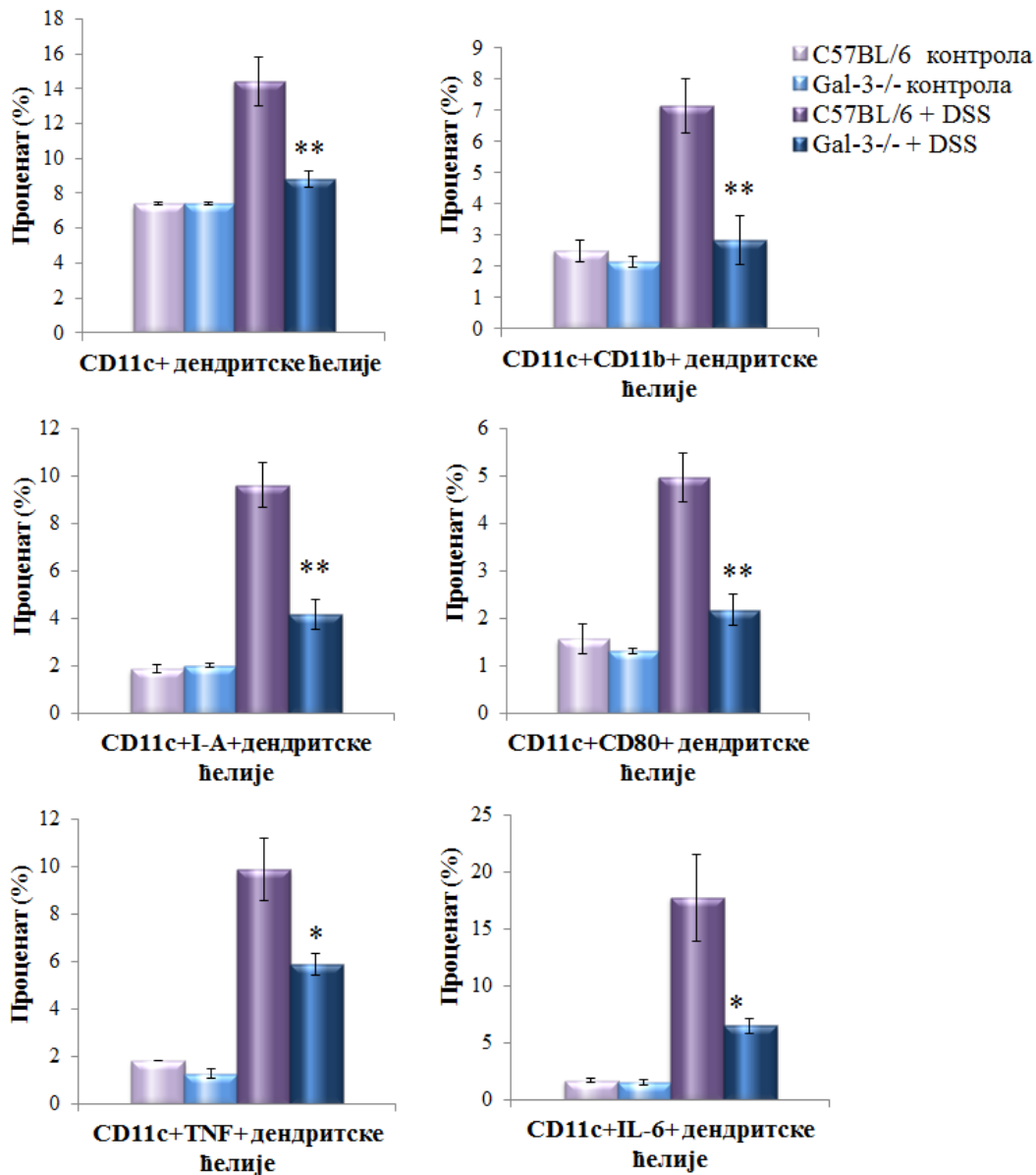


Слика 12. Репрезентативни патохистолошки препарати C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након примене липозома. H/E 100x (доња половина слике).

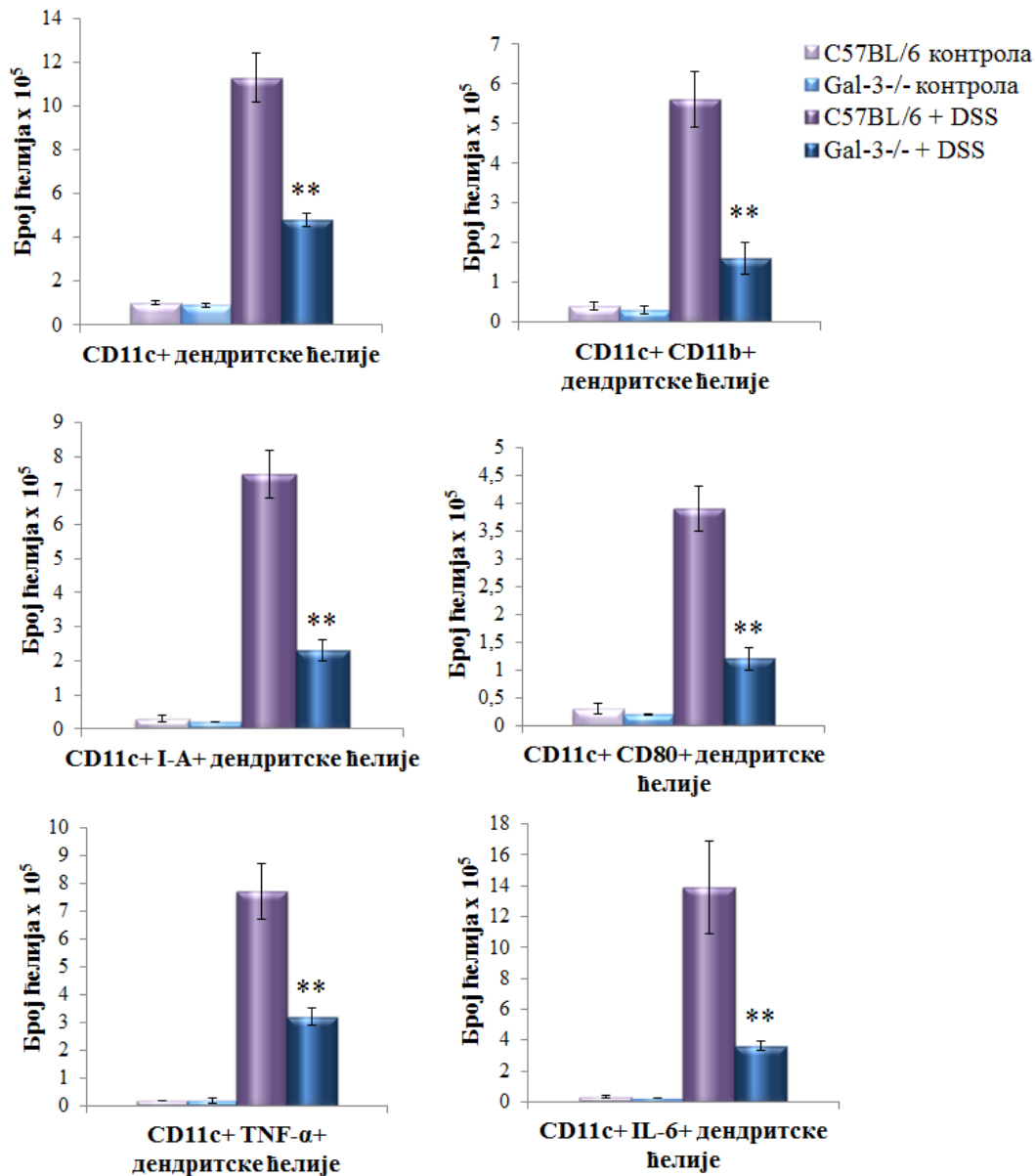
4.3. Gal-3^{-/-} мишеви имају мање инфламаторних дендритских ћелија, а више регулаторних дендритских ћелија

Након анализираних фенотипа и функције макрофага, испитана је популација дендритских ћелија. Процент CD11c⁺ дендритских ћелија, дендритских ћелија које експримирају МНС молекулу II класе и експримирају CD80⁺ ($p < 0.01$), као и дендритске ћелије које продукују TNF α и IL-6 ($p < 0.05$) био статистички значајно мањи у ламини пропријети ткива колона Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 животињама (Фигура 9). Није постојала статистички значајна разлика у проценту дендритских ћелија између експерименталних група (Фигура 9).

Укупан број дендритских ћелија, као и инфламаторних дендритских ћелија је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима (Фигура 10). Дендритске ћелије које експримирају МНС молекулу II класе и CD80 су биле мање заступљене у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом у поређењу са C57BL/6 мишевима. Број дендритских ћелија које продукују TNF- α и IL-6 је био статистички значајно мањи у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 10).

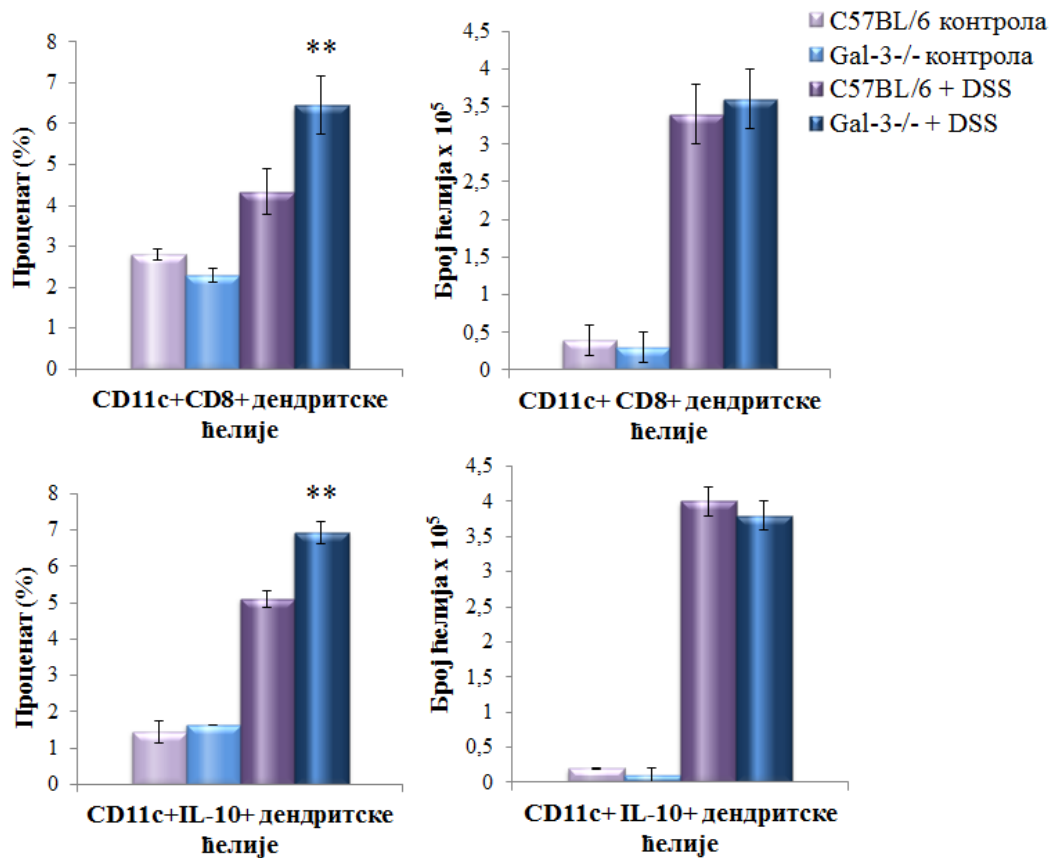


Фигура 9. Процент дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент CD1c+, CD11c+CD11b+, CD11c+I-A+, CD11c+CD80+, као и оних које продукују TNF- α и IL-6 је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} у поређењу са C57BL/6 мишевима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).



Фигура 10. Укупни број дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Број CD11c+, CD11c+CD11b+, CD11c+I-A+, CD11c+CD80+, као и оних које продукују TNF- α и IL-6 је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Процент регулаторних дендритских ћелија CD11c+CD8+ (p<0.001), као и дендритских ћелија које продукују IL-10 је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Није било статистички значајне разлике у апсолутном броју регулаторних дендритских ћелија, као и дендритских ћелија које продукују IL-10 (Фигура 11).

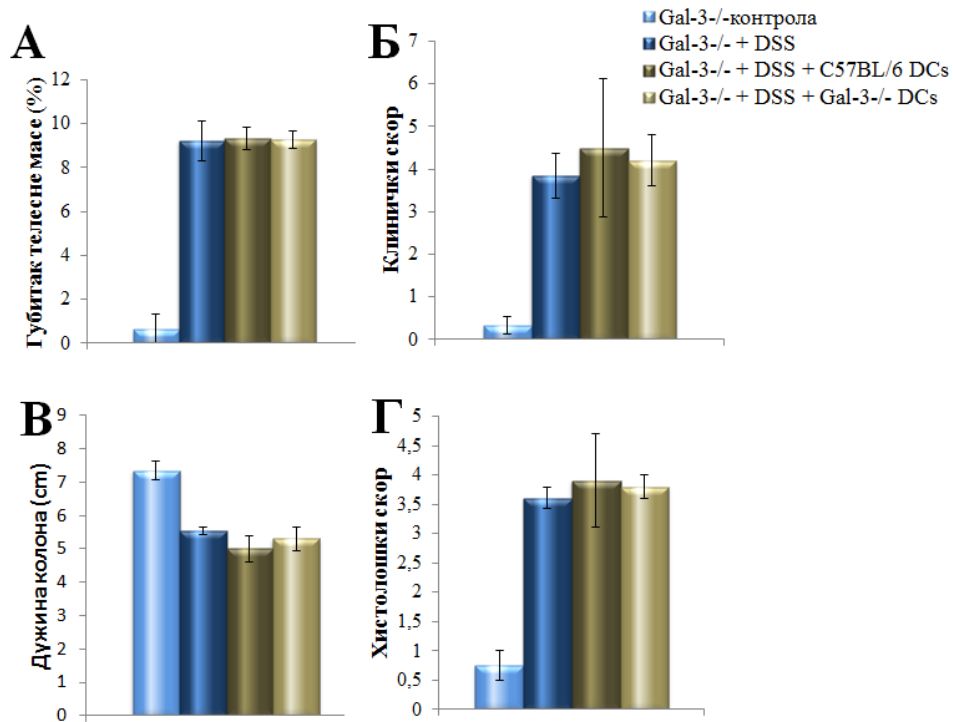


Фигура 11. Процент и укупан број регулаторних дендритских ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент CD11c+CD8+ је био статистички значајно мањи у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима ($p < 0.01$). Измерене вредности из ксперимента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

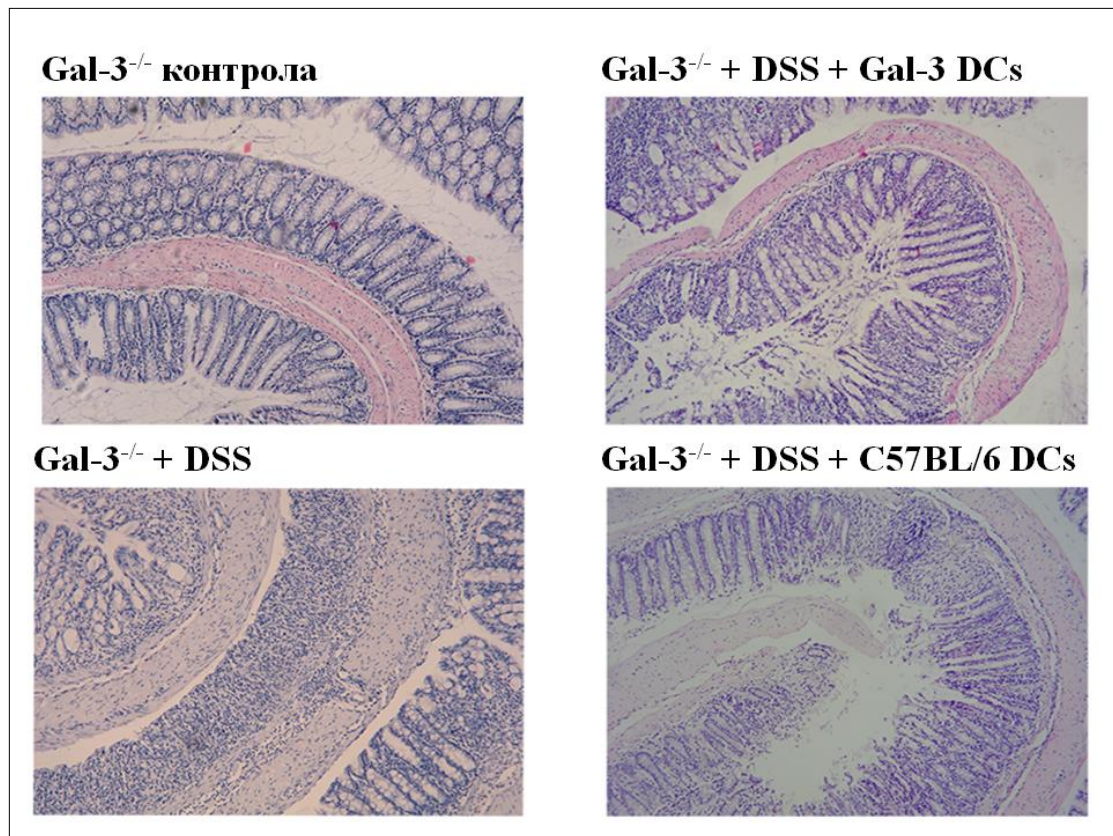
4.3.1. Пасивни трансфер дендритских ћелија

Пасивни трансфер дендритских ћелија изолованих из слезина нетретираних C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева у Gal-3^{-/-} реципијенте није изазвао значајно веће оштећење колона. Није било статистички значајне разлике између експерименталних група у губитку телесне масе, клиничком скору, и скраћењу колона (Фигура 12). Није било статистички значајне разлике у хистолошком скору између Gal-3^{-/-} мишева који су примили дендритске ћелије из здравих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 12Г). На хистолошким препаратима не уочава се знатна разлика у оштећењу ткива колона између Gal-3^{-/-} мишева који су примили дендритске ћелије из здравих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Слика 13). На ткивним препаратима Gal-3^{-/-} мишева који су примили дендритске ћелије из

здравих C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева се уочава лако едематозна ламина проприја и хиперплазија крипти. Инфилтрати инфламаторних ћелија су локализовани око бази крипти и ограничени на мукозу колона.



Фигура 12. Пасивни трансфер дендритских ћелија. А, Б, В, Г. Пасивни трансфер C57BL/6 и Gal-3^{-/-} дендритских ћелија у Gal-3^{-/-} реципијенте није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).



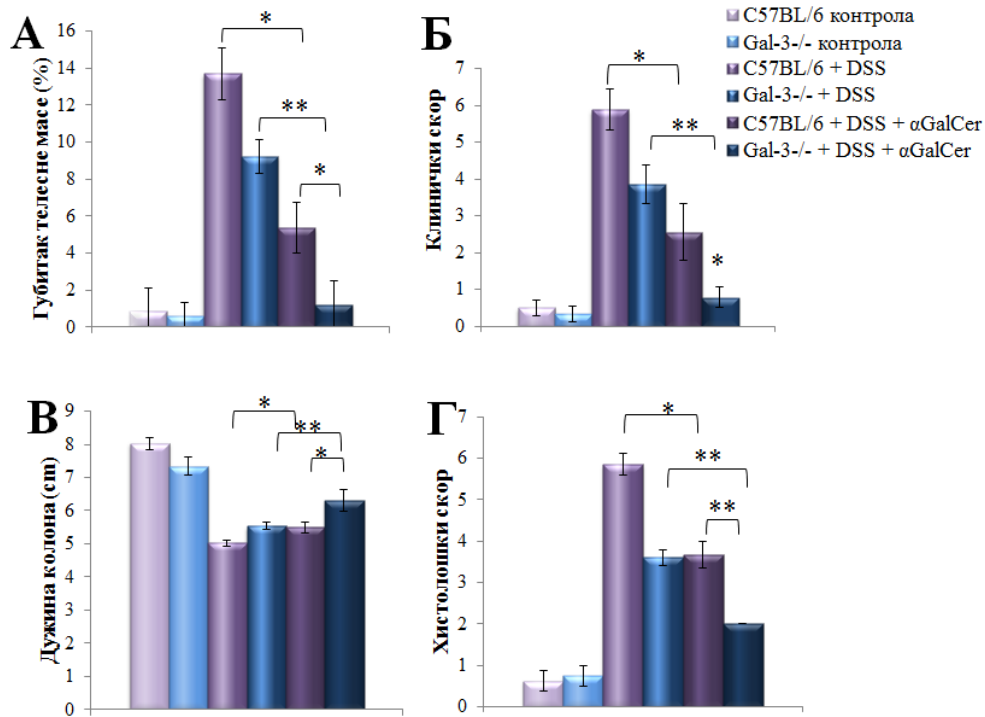
Слика 13. Репрезентативни патохистолошки препарати $Gal-3^{-/-}$ мишева третираних DSS-ом након трансфера C57BL/6 и $Gal-3^{-/-}$ дендритских ћелија (десна страна слике). H/E 100x

4.4. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом

α -GalCer је потентни активатор NKT ћелија. У експериментима у којима је испитивано да ли одсуство Gal-3 утиче на протективну улогу NKT ћелија у акутном колитису, мишевима је интраперитонеално даван α -GalCer (100 μ g/kg телесне масе) свакодневно током седмодневне примене DSS-а. Мишеви C57BL/6, који су третираны DSS-ом, а свакодневно примали α -GalCer су имали статистички значајно већи губитак телесне масе, клиничку манифестацију болести и скраћење дужине колона у поређењу са губитком масе, клиничком манифестацијом болести и скраћењем колона у $Gal-3^{-/-}$ мишева третираных DSS-ом, а који су такође свакодневно примали α -GalCer (Фигура 13А, Б и В). Хистолошки скор C57BL/6 мишева третираных DSS-ом, а који су свакодневно примали α -GalCer је био статистички значајно већи у поређењу са хистолошким скором у $Gal-3^{-/-}$ мишева третираных DSS-ом, а који су свакодневно примали α -

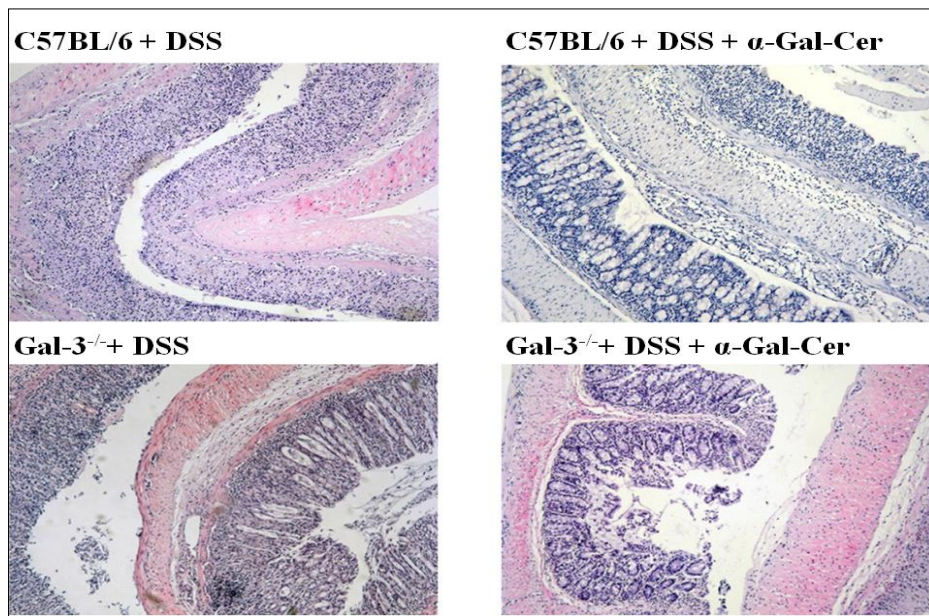
GalCer (Фигура 13Г). На хистолошким препаратима се јасно може уочити знатно очување структуре ткива колона и мањом и ограниченом инфилтрацијом инфламаторним ћелијама у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом, који су примали α -GalCer у поређењу са C57BL/6 мишева третираних DSS-ом, а који су свакодневно примали α -GalCer (Слика 14).

Губитак телесне масе, клинички скор, дужина колона и хистолошки скор су били статистички значајно већи у C57BL/6 мишева третираних DSS-ом у поређењу са C57BL/6 мишевима, који су третираны DSS-ом, а свакодневно примали α -GalCer. На хистолошким препаратима C57BL/6 мишевима третираных DSS-ом се јасно уочава тотална деструкција структуре колона и инфилтрација инфламаторних ћелија дуж свих слојева колона. Насупрот томе, хистолошки препарати C57BL/6 мишева третираных DSS-ом, а који су свакодневно примали α -GalCer су имали делимично очуване крипте и локализован инфилтрат инфламаторних ћелија на мукозу. Такође, губитак телесне масе, клинички скор, дужина колона и хистолошки скор су били статистички значајно већи у Gal-3^{-/-} мишева третираных DSS-ом у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима, који су третираны DSS-ом, а свакодневно примали α -GalCer. Gal-3^{-/-} мишеви третираны DSS-ом, а који су свакодневно примали α -GalCer су имали већи број очуваних структура крипти и мањи инфилтрат на хистолошким препаратима у поређењу са Gal-3^{-/-} мишевима третираным само DSS-ом. Иако је апликација α -GalCer-а и последична активација NKT ћелија значајно смањила оштећење ткива колона, није се мењала разлика између експерименталних група (Фигура 13) што указује да NKT ћелије нису директно одговорне за разлике у патогенези колитиса између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.



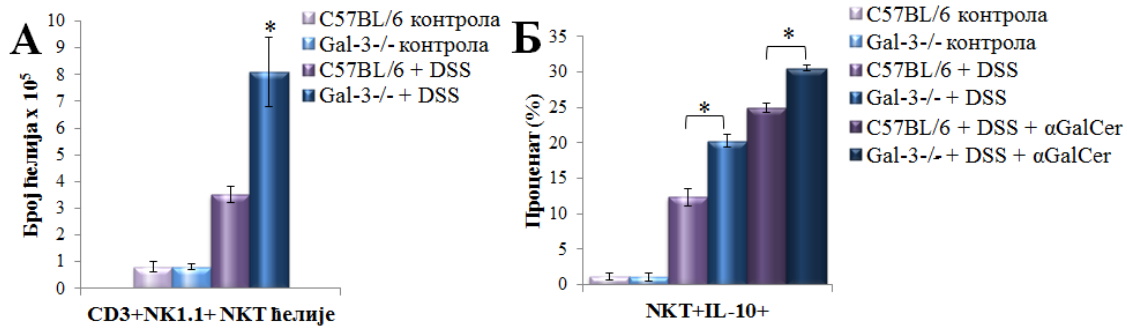
Фигура 13. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колоне изазваном DSS-ом.

А, Б, В. Губитак телесне масе, клинички скор, као и скраћење колоне је било статистички значајно мање у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима након примене α GalCer-а. Г. Хистолошки скор након примене α GalCer-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (*p < 0.05, **p < 0.01).



Слика 14. Репрезентативни хистолошки препарати C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након примене α -GalCer-а (на десној страни слике) (H/E, 100x).

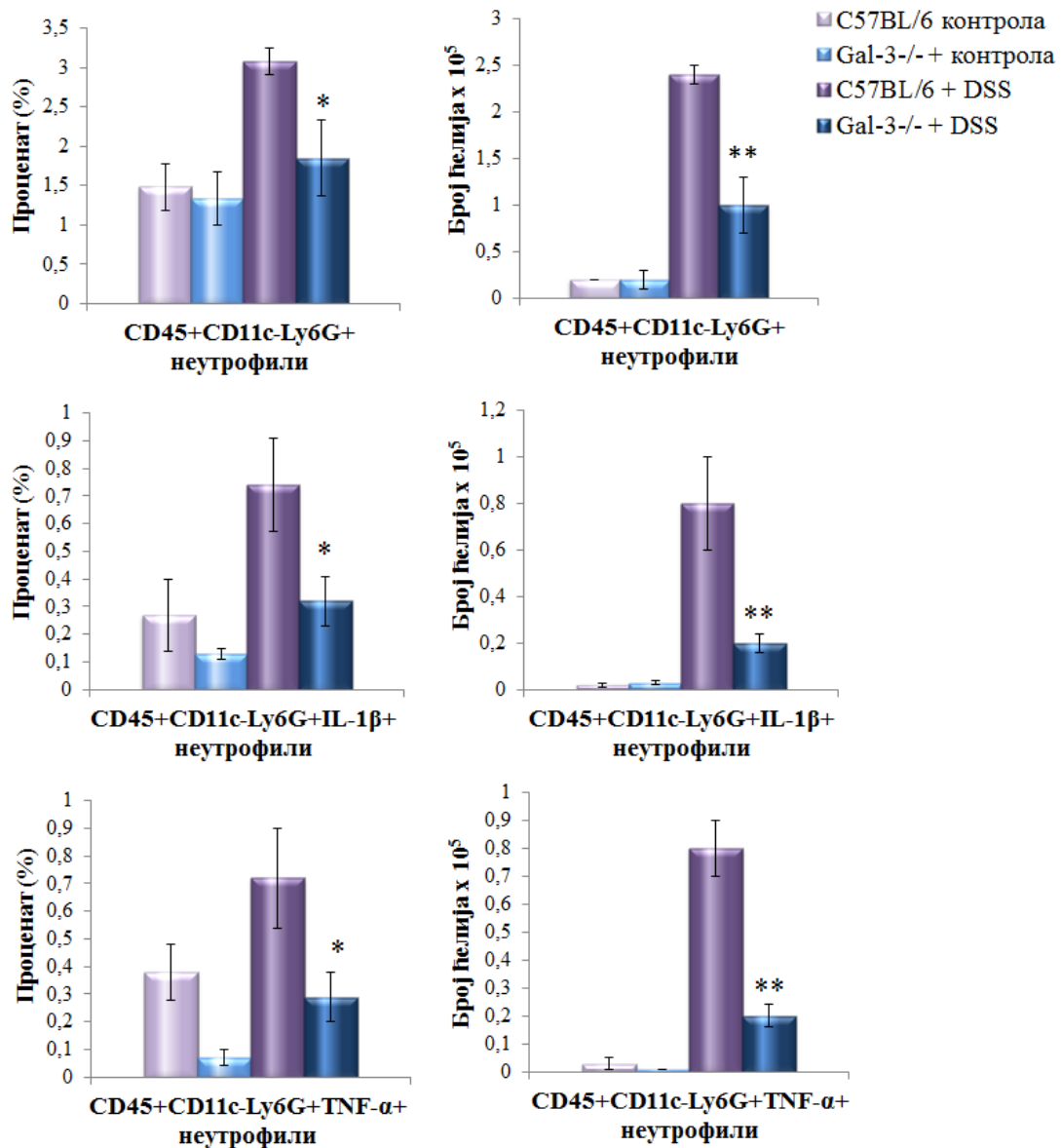
Проточном цитометријском анализом уочен је значајно повећан укупан број CD3+NK1.1+NKT ћелија у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева који су третирани DSS-ом. Након апликације α-GalCer-а запажа се повећан проценат NKT ћелија које продукују IL-10 у ткиву колона у обе експерименталне групе (Фигура 14).



Фигура 14. Протективна улога NKT ћелија у оштећењу ткива колона изазваном DSS-ом.
А. Број NKT ћелија је био статистички значајно већи у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. **Б.** Процентуална заступљеност NKT ћелија које продукују IL-10 је била статистички значајно већа у ткиву колона у Gal-3^{-/-} мишева само на DSS-у, као и Gal-3^{-/-} мишева који су примили α-GalCer у поређењу са C57BL/6 мишевима само на DSS-у, али и који су примили α-GalCer. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

4.5. Делетија Gal-3 гена смањује број неутрофила у ткиву колона

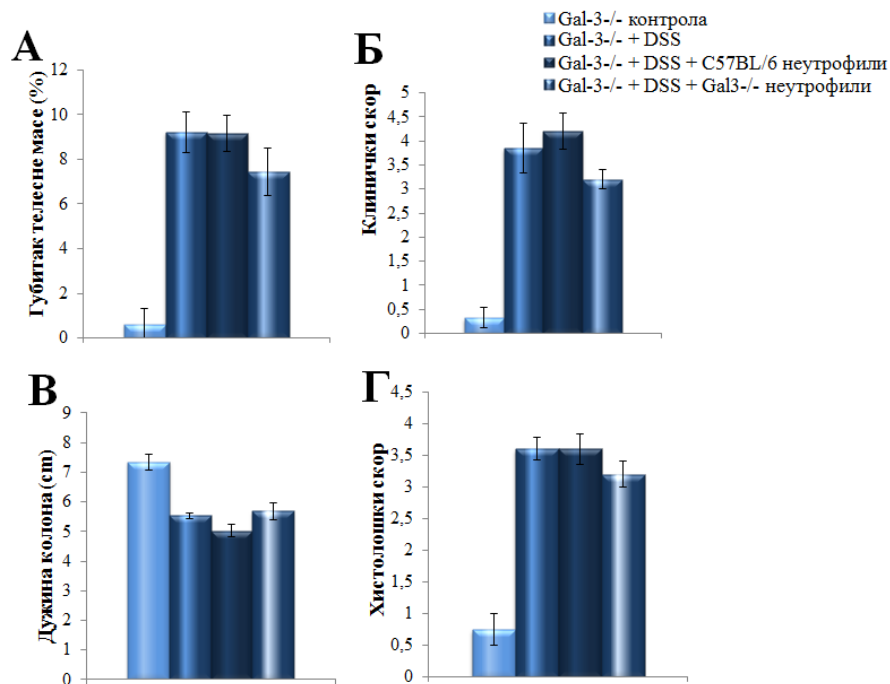
С обзиром на значајну улогу полиморфонуклеарних леукоцита у патогенези колитиса индукованог декстран натријум сулфатом (137) испитиван је утицај и улога Gal-3 у активацији полиморфонуклеарних леукоцита у овом моделу колитиса. Подаци указују на мању заступљеност неутрофила, као и неутрофила који продукују IL-1β и TNF-α (p<0.05) у ламини проприји ткива колона у Gal-3^{-/-} мишева у поређењу са C57BL/6 мишевима. Број CD45⁺CD11c⁻ Ly6G⁺ неутрофила и неутрофила CD45⁺CD11c⁻Ly6G⁺ који продукују IL-1β и TNF-α, је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (p<0.001; Фигура 15).



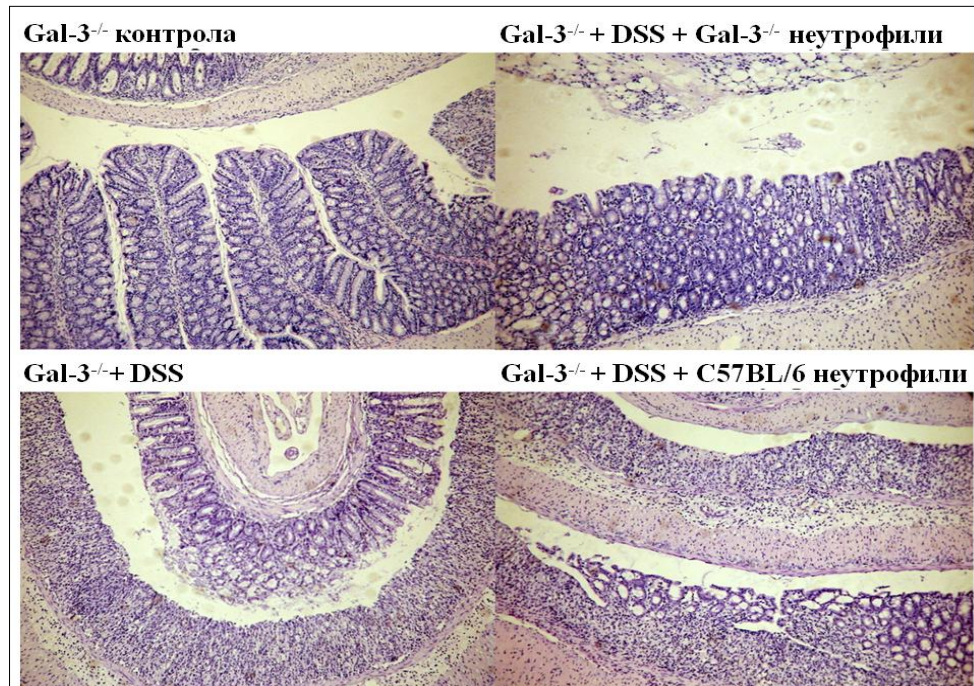
Фигура 15. Процент и укупни број неутрофила у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Процент и број CD45+CD11c-Ly6G⁺ неутрофила, као и број CD45+CD11c-Ly6G⁺ неутрофила који продукују IL-1β и TNF-α је био статистички значајно мањи у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом ($p < 0.001$). Измерене вредности из два поновљена експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (6 мишева у групи) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Међутим, иако је била значајно већа заступљеност ове ћелијске популације у ткиву колона C57BL/6 мишева, пасивни трансфер неутрофила изолованих из здравих C57BL/6 мишева у Gal-3^{-/-} реципијенте није изазвао статистички значајно веће оштећење колона у поређењу са пасивним трансфером неутрофила здравих Gal-3^{-/-} мишева. Пасивни трансфер неутрофила

(2×10^6 , интраперитонеално) није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група у губитку телесне масе, клиничком и хистолошком скору, нити скраћењу колона (Фигура 16). На хистолошким препаратима такође се не уочава значајна разлика у оштећењу ткива колона (Слика 15), што указује да неутрофили нису директно одговорни за разлике у патогенези колитиса између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.



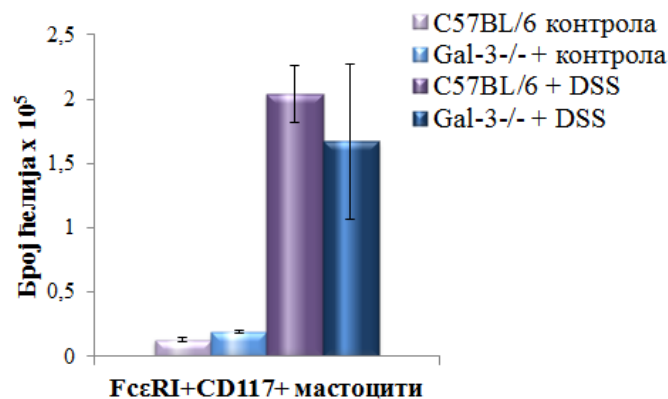
Фигура 16. Пасивни трансфер неутрофила. А, Б, В, Г. Пасивни трансфер неутрофила није узроковао статистички значајну разлику између експерименталних група у клиничкој манифестацији колитиса. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



Слика 15. Репрезентативни патохистолошки препарати $Gal-3^{-/-}$ мишева након пасивног трансфера $C57BL/6$ и $Gal-3^{-/-}$ неутрофила (десна страна слике)(H/E, 100x).

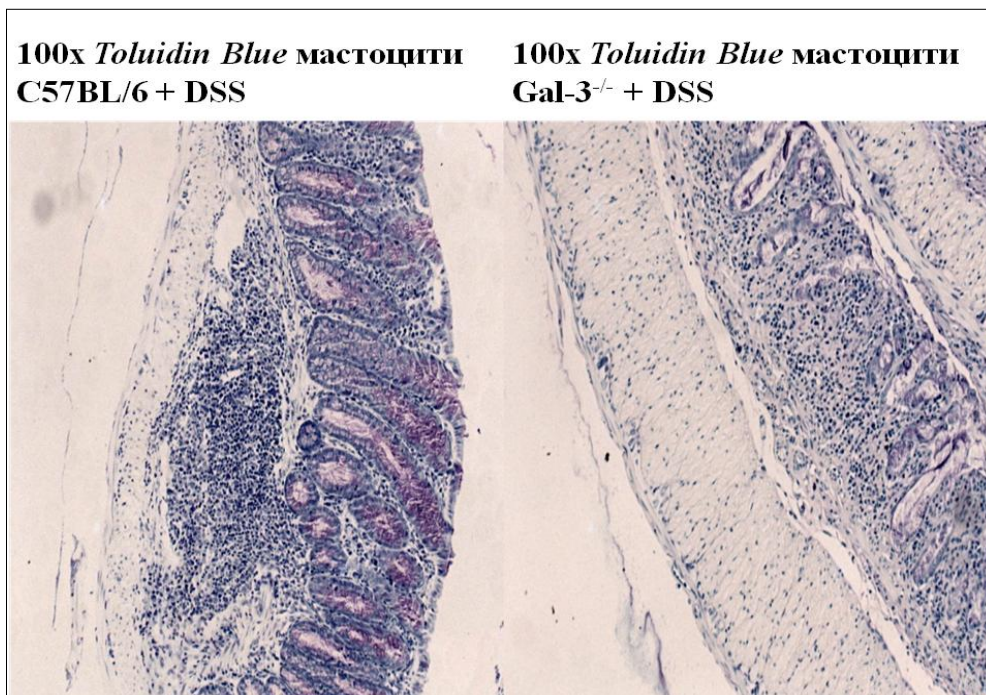
4.6. Gal-3 делеција не мења заступљеност мастоцита, еозинофила и НК ћелија у ткиву колона мишева третираних DSS-ом

Проточном цитрометријом су анализирани остале популације ћелија у ткиву колона. У популацији мастоцита анализираној проточном цитометријом, није било статистичке значајне разлике у броју мастоцита у ткиву колона $Gal-3^{-/-}$ мишева у поређењу са бројем мастоцита у ткиву колона $C57BL/6$ мишевима (Графикон 3).



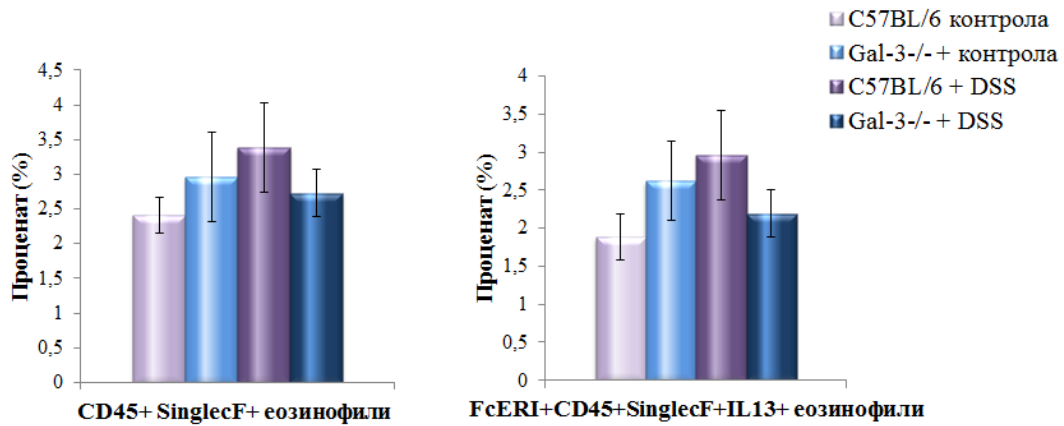
Графикон 3. Укупни број мастоцита у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Није било статистички значајне разлике у броју FcεRI+CD117⁺ мастоцита у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

Специфичним *Toluidin Blue* бојењем је потврђено да није било разлике у процентуалној заступљености мастоцита у ткиву колона у C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (Слика 16). Тамно љубичасто пребојени мастоцити су били заступљени у инфилтратима инфламаторних ћелија у ткиву колона.



Слика 16. Специфично бојење мастоцита у ткивним исечцима C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

Проточном цитометријом анализирана је популација еозинофила у ламини проприји колона. У колитису изазваном DSS-ом није било статистички значајне разлике у процентуалној заступљености CD45+SiglecF⁺ еозинофила, као и еозинофила CD45+SiglecF⁺ који продукују IL-13 у ткиву колона Gal-3^{-/-} и C57BL/6 мишева (Фигура 17). Специфичним *Congo red* бојењем ове ћелијске популације показано је да није било статистички значајне разлике у присутности еозинофила у ткиву колона између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева (Слика 17). Тамно црвено пребојени еозинофили су присутни у инфилтрату инфламаторних ћелија.



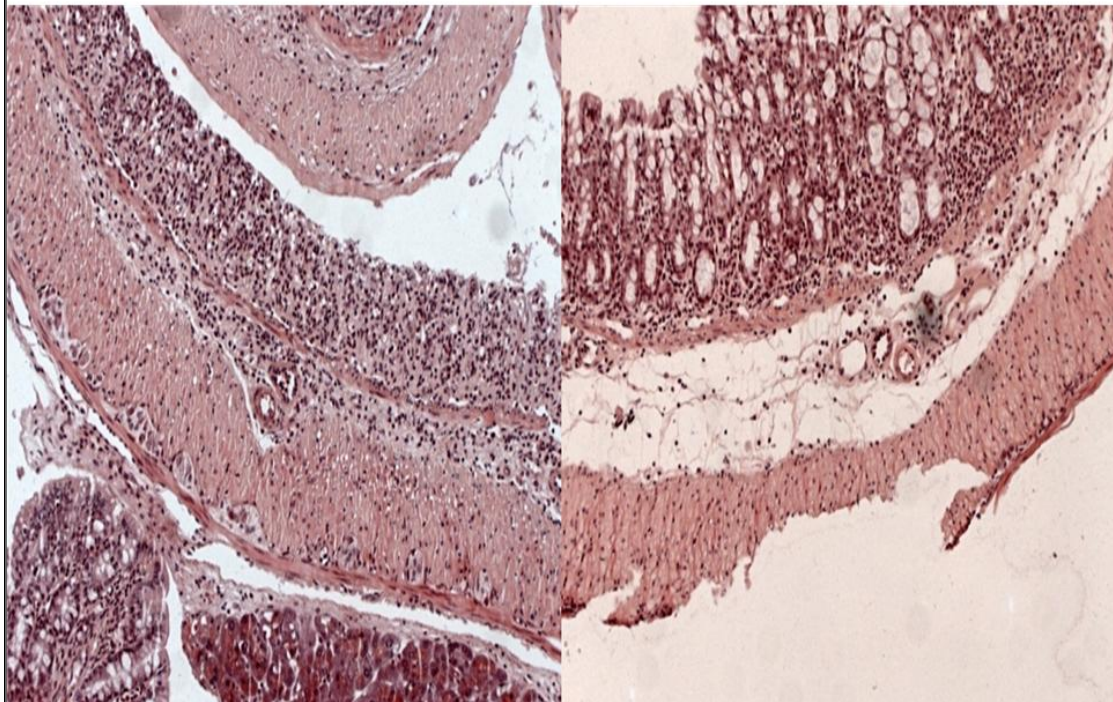
Фигура 17. Присуство еозинофила у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева. Није било статистички значајне разлике у проценту CD45+SiglecF+ еозинофила, као и еозинофила CD45+SiglecF+ који продукују IL-13 између Gal-3^{-/-} мишева и C57BL/6 мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

100x Congo Red еозинофили

100x Congo Red еозинофили

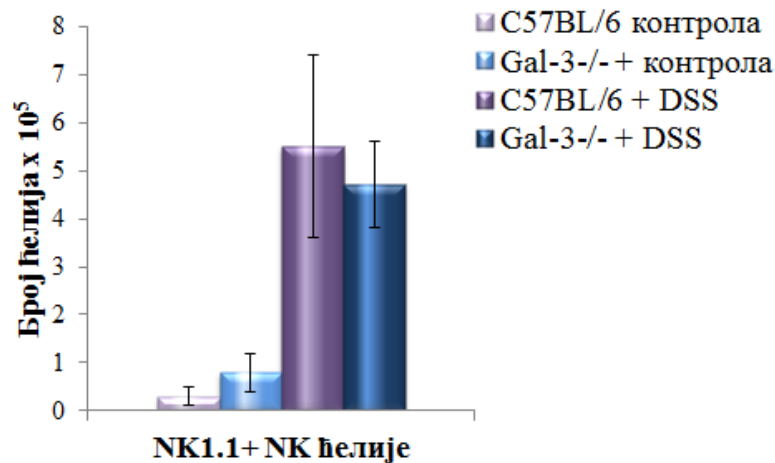
C57BL/6 + DSS

Gal-3^{-/-} + DSS



Слика 17. Специфично бојење еозинофила у ткивним исечцима C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева.

Проточном цитометријском анализом је показано да није било разлике у укупном броју NK ћелија у ткиву колона између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева, у којих је изазван колитис (Графикон 4).



Графикон 4. Укупни број NK ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-}. Није било статистички значајне разлике у броју NK ћелија у ткиву колона C57BL/6 и Gal-3^{-/-}. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (6 мишева у групи) (*p<0.05, **p<0.01).

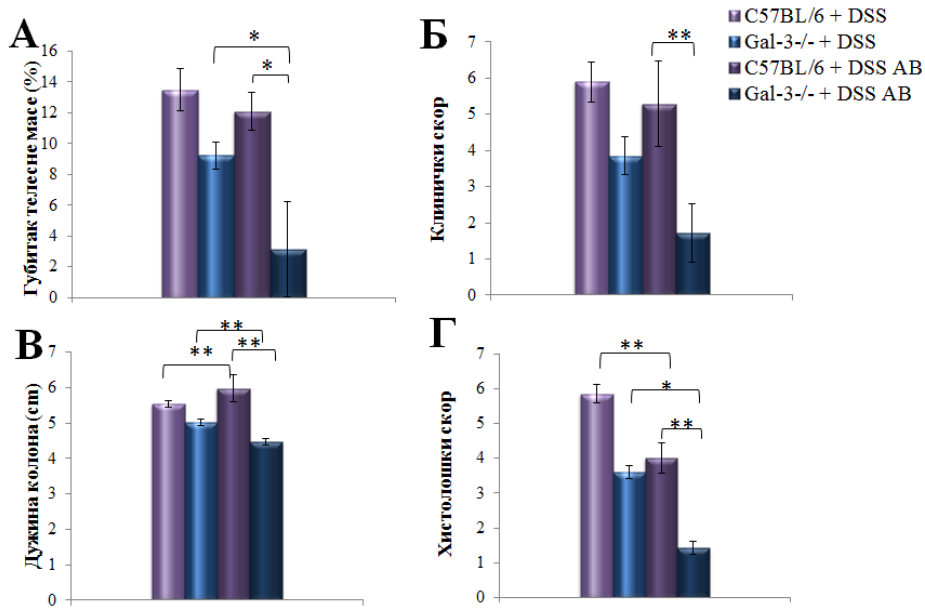
4.7. Утицај микрофлоре на патогенезу акутног колитиса

Како микрофлора црева има значајан утицај на патогенезу улцерозног колитиса и обзиром да Gal-3 може да служи као рецептор за *C.albicans*, у циљу елиминасања утицаја микрофлоре на патогенезу колитиса зависну од Gal-3, мишеви су свакодневно интраперитонеално примали метронидазол (1mg/g) и ципрофлоксацин (0,5mg/g), као и флуконазол (1mg/kg) per os (131).

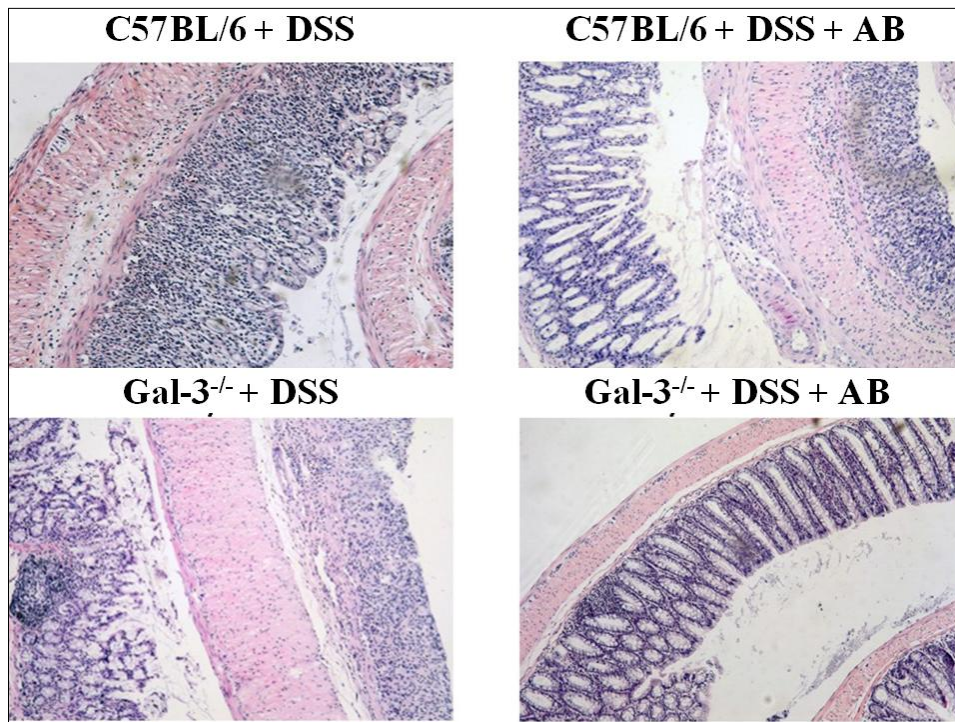
Примена антибиотика и антимикотика значајно је смањила клиничко испољавање колитиса, али није утицала на већ уочену разлику у клиничкој слици између C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом (Фигура 18).

Група Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом и антибиотикама је имала мањи губитак телесне масе и мањи клинички скор у односу на C57BL/6 мишеве изложене истом третману (Фигура 18А, Б). Колон је био статистички значајно дужи у Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом и антибиотикама у поређењу са C57BL/6 мишевима третираних DSS-ом и антибиотикама (18В). Оштећење ткива колона је било статистички значајно мање у Gal-3^{-/-} мишева третираних

мишева третираних DSS-ом и антибиотцима у поређењу са C57BL/6 мишевима третираних са истом комбинацијом агенаса (18Г). На хистолошким препаратима се јасно уочава да је примена антибиотика смањила оштећење епитела, као и инфилтрисаност инфламаторним ћелијама (Слика 18), али да није утицала на разлику у колитису између експерименталних група.



Фигура 18. Утицај микрофлоре на акутно оштећење ткива колона индуковано DSS-ом. А, Б, В, Г. Губитак телесне масе, клинички скор, скраћење колона и хистолошки скор су били мање изражени у Gal-3^{-/-} мишева са колитисом третираних антибиотцима. Измерене вредности из два поновљена експеримента су приказане као средња вредност ± SE (*p<0.05, **p<0.01).



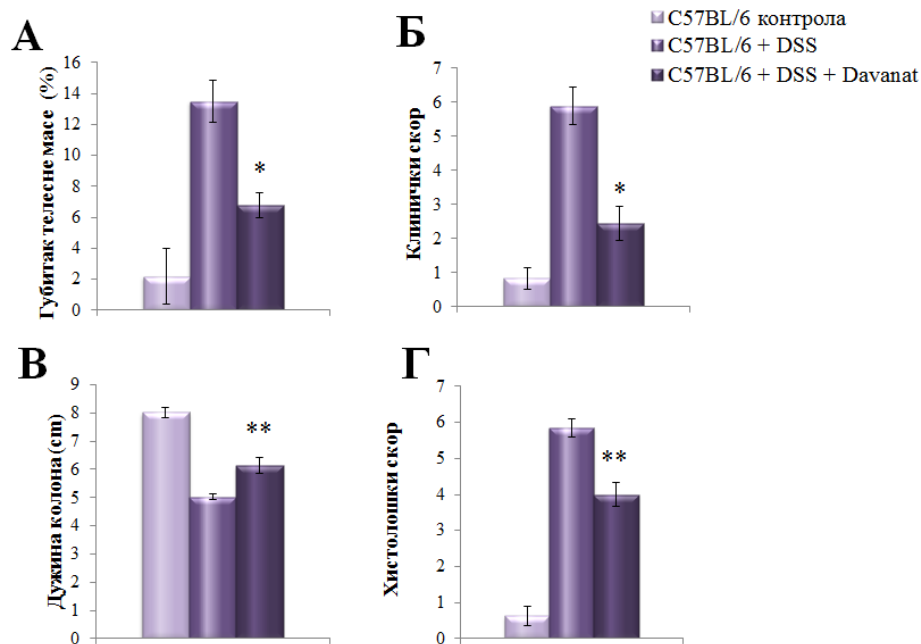
Слика 18. Репрезентативни патохистолошки препарати C57BL/6 и Gal-3^{-/-} мишева након примене антибиотика (десна страна слике) (H&E, 100x).

4.8. Примена *Davanat*-а значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом

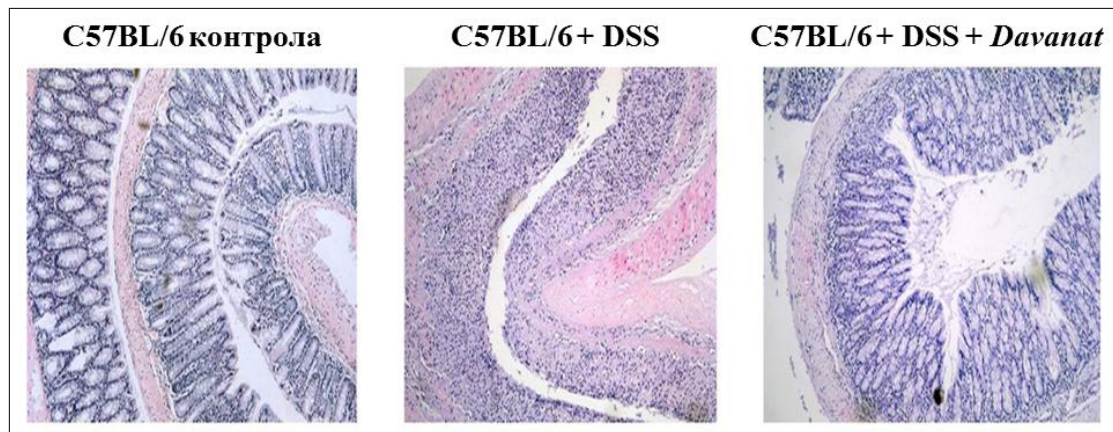
Након што је запажено да делеција Gal-3 гена значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом, услед смањеног инфлуksа инфламаторних ћелија које продукују цитокине у ламини проприји ткива колона, слабије продукције цитокина (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и подстицања алтернативне активације макрофага испитан је ефекат превентивне примене *Davanat* на оштећење ткива колона у колитису изазваног DSS-ом.

Клинички скор експерименталне групе која је примала *Davanat*, је показао да интраперитонеална примена *Davanat*-а (100 μ g 0, 2., 4. и 6. дана током 7 дана примене DSS-а) превенира тешко оштећење ткива колона изазвано DSS-ом. Као што је приказано на Фигури 19, клинички скор је статистички значајно мањи у мишева који су превентивно примили *Davanat*, у поређењу са мишевима који су примили само DSS-ом ($p < 0.05$). Дужина колона је била статистички значајно већа у C57BL/6 мишева који су примили *Davanat* ($p < 0.01$).

Патохистолошка анализа колоне је потврдила клиничка и макроскопска запажања о ублажавању болести (Слика 19). Значајно мање оштећење колоне уочено је у C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat*. У C57BL/6 мишева третираних само DSS-ом запажена је масовна инфилтрација инфламаторним ћелијама праћена губитком нормалне грађе ткива колоне са истањеном ламином пропријом. У мишева третираних *Davanat* запажени су само фокални инфилтрати инфламаторних ћелија са очуваним криптама. Као што показује слика 16, колон мишева, који су имали приступ само пијаћој води, је био очуван и непромењене грађе што је у сагласности са клиничким скором.



Фигура 19. Ефекат *Davanat* на експериментални колитис. А, Б, В, Г. Губитак телесне масе, клинички скор скраћење колоне и хистолошки скор су били умеренији после примене *Davanat*-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



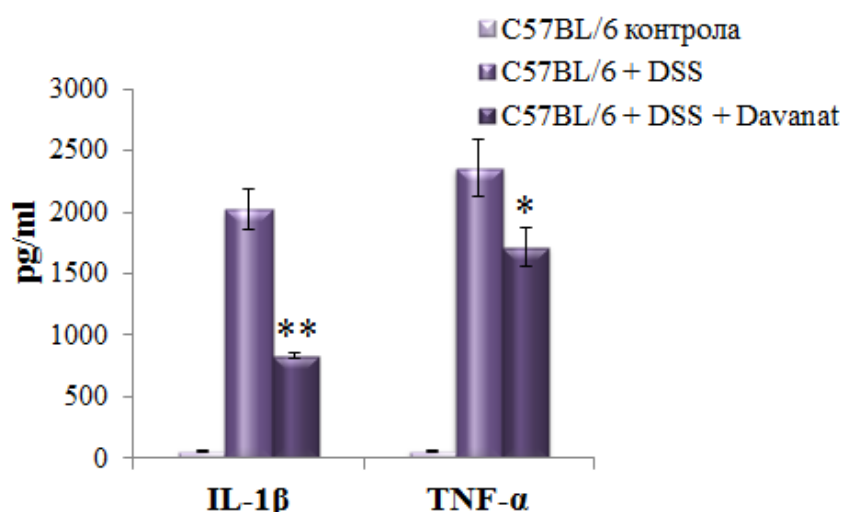
Слика 19. Репрезентативни препарати колона C57BL/6 мишева након примене *Davanat*. Стандарно патохистолошко бојење (H&E; увећање $\times 100$).

Како су клинички показатељи и патохистолошка испитивања показали да превентивна примена *Davanat*-а смањује оштећење ткива колона у колитису изазваном DSS-ом и да ови подаци корелирају са онима добијених анализом промена у Gal-3^{-/-} мишева испитан је утицај *Davanat*-а на продукцију цитокина, експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона и упоређен са резултатима добијеним након индукције болести Gal-3^{-/-} мишева.

4.8.1. *Davanat* значајно смањује ниво серумског IL-1 β и TNF- α

Пошто превентивна примена *Davanat*-а значајно смањује клинички скор, хистолошки препарати колона мишева који су примили *Davanat* показују мање оштећење овог органа и мању инфилтрисаност инфламаторним ћелијама, испитан је ефекат *Davanat*-а на запаљење у колитису изазваном DSS-ом.

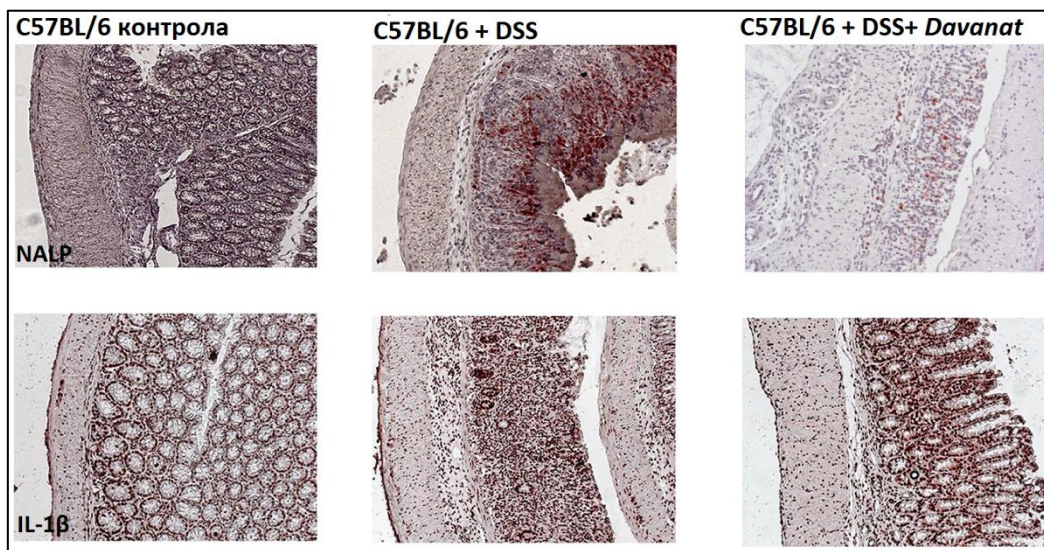
Концентрација IL-1 β и TNF- α , 7 дана након примене DSS-а је била статистички значајно мања у серуму мишева којима је дат *Davanat* у поређењу са мишевима којима је дат само DSS ($p < 0.01$ за IL-1 β , $p < 0.05$ за TNF- α , Графикон 5).



Графикон 5. Промена концентрације цитокина у серуму након примене *Davanat*-а. Концентрација IL-1 β и TNF- α у крвном серуму је статистички значајно мања у C57BL/6 мишева са колитисом након примене *Davanat*-а у поређењу са колитисом C57BL/6 мишева који нису претретирани *Davanat*-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

4.8.2. Примена *Davanat*-а смањује експресију NALP-a и IL-1 β

Имунохистохемијска анализа експресије NALP-a и IL-1 β у ткиву колона C57BL/6 мишева, 7 дана након примене DSS-а показала је да *Davanat* значајно смањује експресију IL-1 β и NALP-a у ткиву колона (Слика 20). На ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat*, се уочава значајно мања експресија NALP-a у цитоплазми инфламаторних ћелија у поређењу са ткивним препаратима C57BL/6 мишева који су примили само DSS. Присутност ћелија које експримирају NALP у ткиву колона C57BL/6 мишева који су примили само DSS је била локализована у мукози и субмукози. Насупрот томе, присутност ћелија које експримирају NALP у ткиву колона C57BL/6 мишева који су превентивно примили *Davanat* је била ограничена на мукозу колона. У ткиву колона C57BL/6 мишева који су примили само DSS је имунохистохемијски потврђена значајно већа присутност ћелија које секретују IL-1 β у поређењу са C57BL/6 мишевима који су превентивно примили *Davanat*.

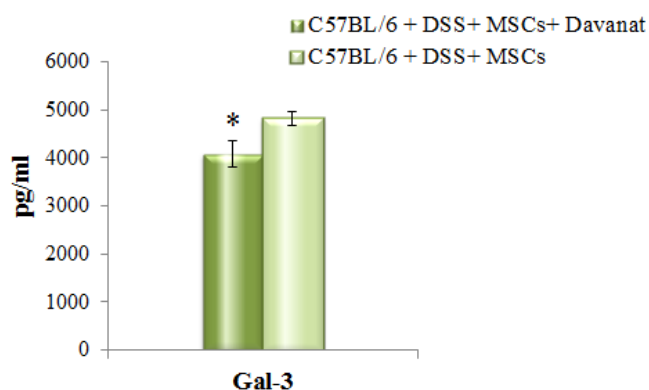


Слика 20. Експресија IL-1 β и NALP-а у ткиву колона C57BL/6 мишева након примене Davanat-а.

4.9. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага у ткиву колона

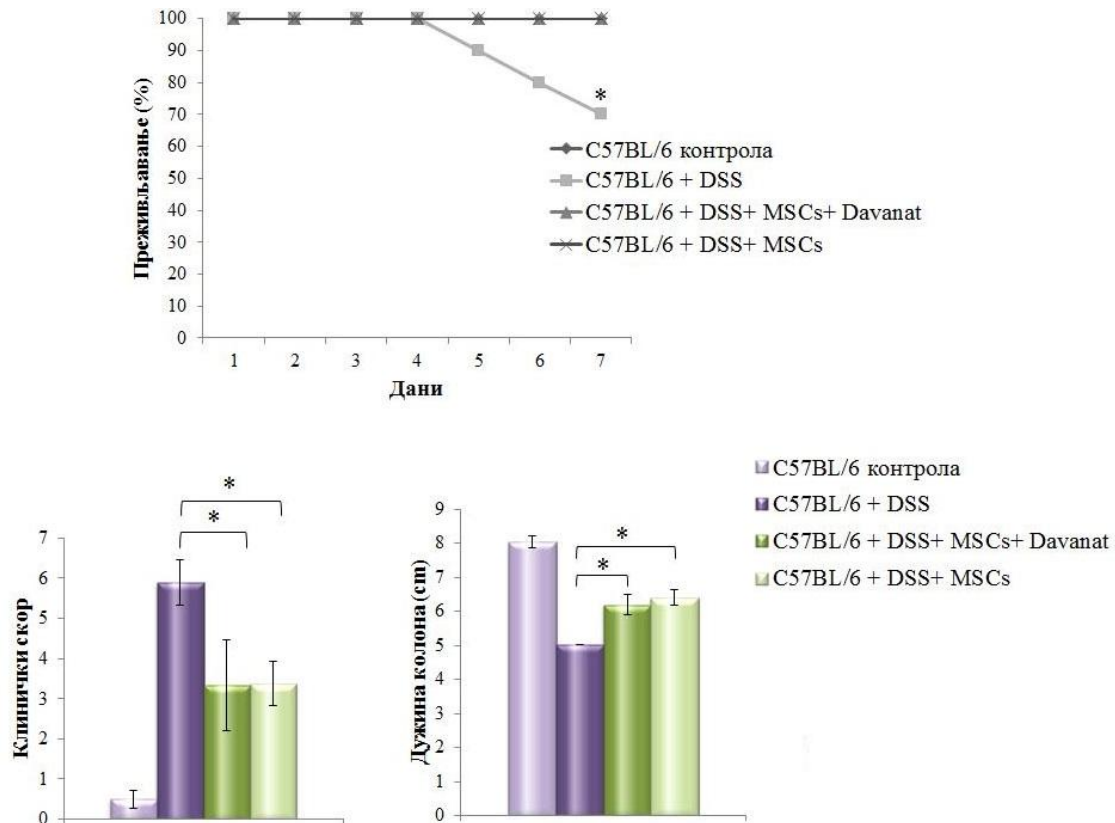
4.9.1. Превентивна примена MSCs значајно смањује колитис мишева третираних DSS-ом

Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs значајно смањује концентрацију Gal-3 у серуму мишева третираних DSS-ом, указујући да MSCs продукују Gal-3 у овом моделу болести (Графикон 6).



Графикон 6. Смањена концентрација Gal-3 у серуму у мишева третираних MSCs и Davanat-ом. У серуму мишева, који су примили MSCs са фармаколошки инхибираним Gal-3, концентрација овог молекула је била значајно смањена. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

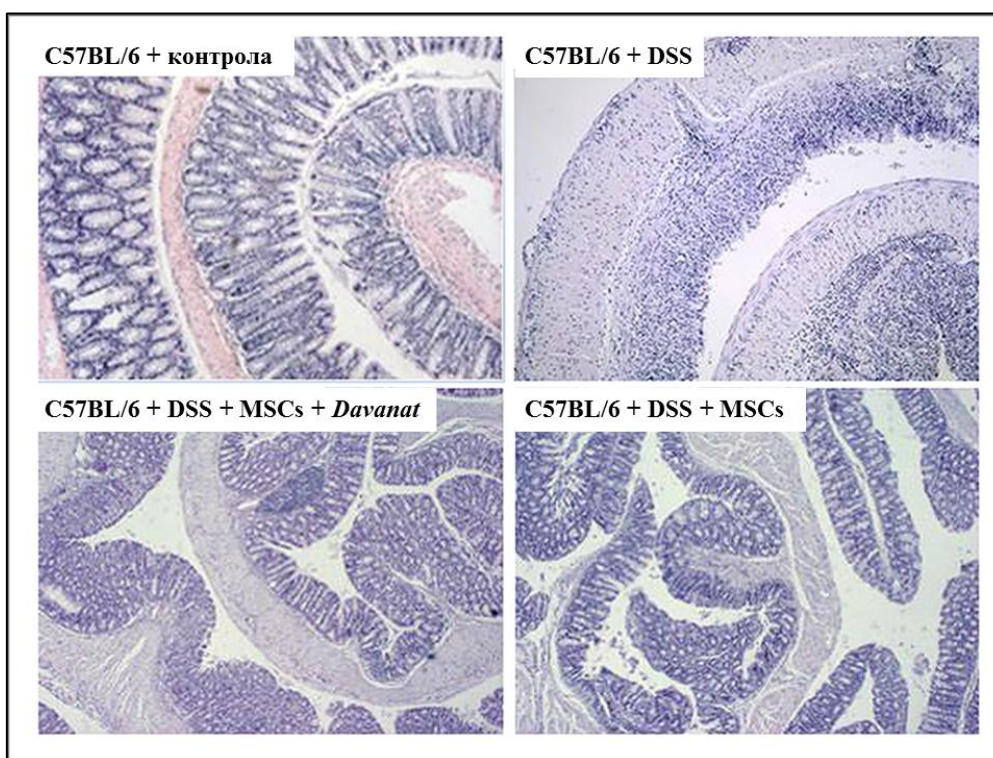
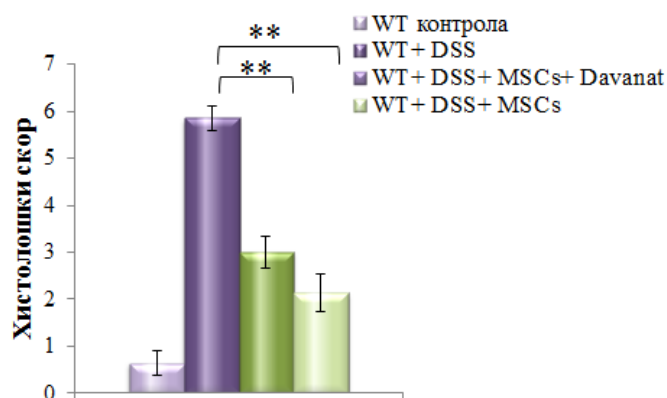
Инхибиција Gal-3 у MSCs није утицала на потенцијал ових ћелија да спрече развој акутног колитиса изазваног DSS-ом. Показатељи као преживљавање, клинички скор и дужина колона нису се значајно разликовали у експерименталним групама које су примиле MSCs у поређењу са мишевима којима су дате MSCs претходно култивисане у медијуму који је садржао и *Davanat* (Фигура 20).



Фигура 20. MSCs смањује клинички ток експерименталног колитиса. Преживљавање, клинички скор и скраћење колона су били значајно мањи после примене MSCs. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Патохистолошка анализа колона је потврдила клиничка запажања о ублажавању болести (Фигура 21). Значајно мање оштећење колона уочено је у експерименталним групама мишева који су превентивно примиле MSCs. У C57BL/6 мишева третираних само DSS-ом током 7 дана, је запажена масовна инфилтрација инфламаторним ћелијама праћена губитком нормалне грађе ткива колона. У мишева третираних са MSCs запажена је значајно смањена

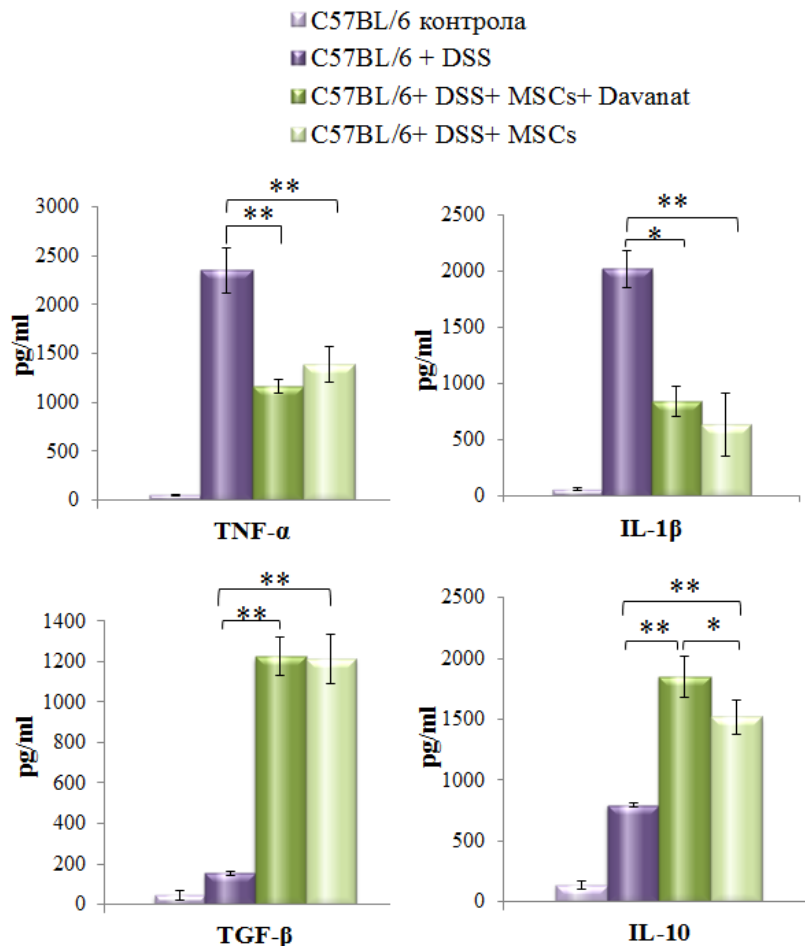
инфилтрисаност инфламаторним ћелијама присутна у зиду и лумену крипти (Фигура 21).



Фигура 21. MSCs смањују оштећење колона у експерименталном колитису. Хистолошки скор потврђује смањено оштећење након превентивне примене само MSCs и MSCs са инхибитором. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.9.2. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом

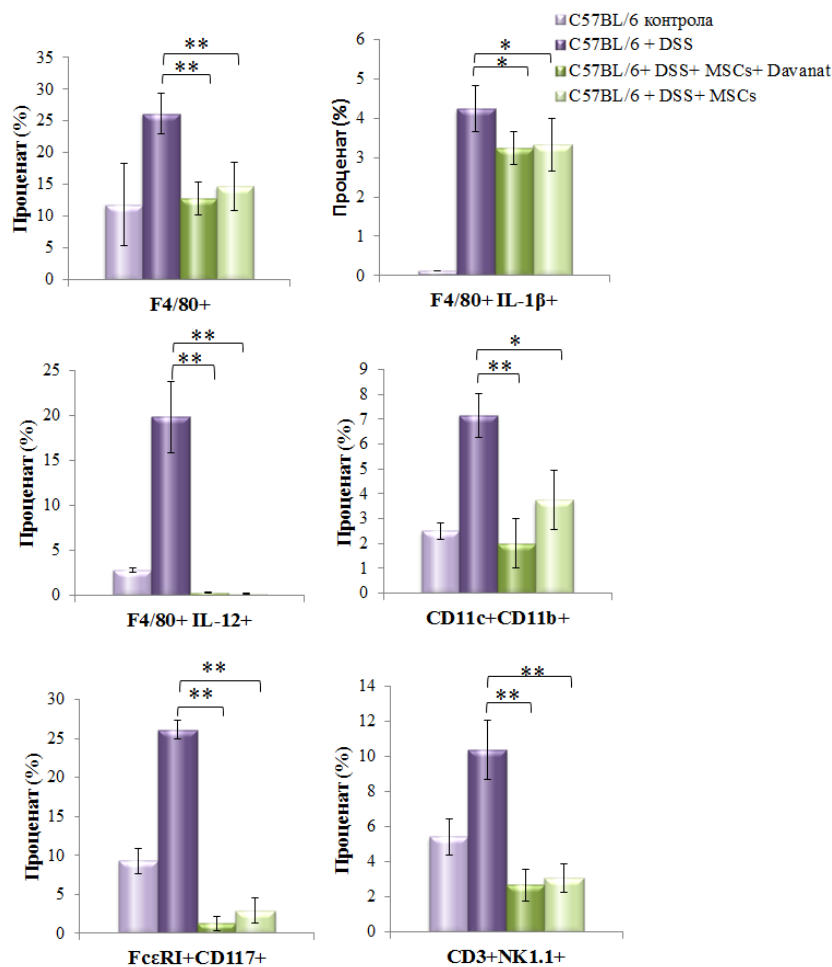
Концентрација TNF- α , IL-1 β и TGF- β била значајно мања у групама мишева, које су примиле MSCs и MSCs култивисане у присуству *Davanat*-а у поређењу са групом која је третирана само DSS-ом (Фигура 22). Уз то, концентрација IL-10 је била статистички значајно већа у групи која је превентивно примила MSCs претходно култивисаних у присуству *Davanat* у поређењу са групом која је превентивно примила само MSCs (Фигура 22). Овакав исход експеримента је указао на улогу Gal-3 у продукцији анти-инфламаторног цитокина IL-10.



Фигура 22. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs значајно повећава концентрацију IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом. Концентрација TNF- α , IL-1 β , TGF- β и IL-10 у серуму мишева третираних DSS-ом. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

4.9.3. Примена MSCs значајно смањује инфилтрацију инфламаторних ћелија у ткиво колона мишева третираних DSS-ом

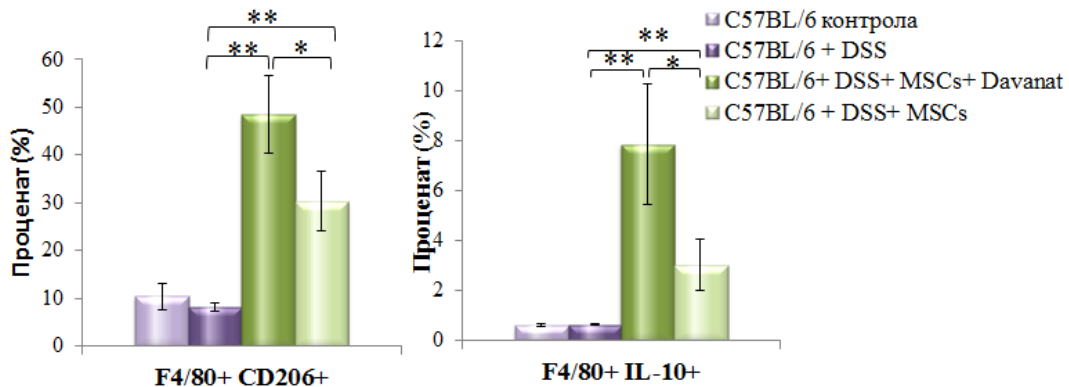
Као што је приказано на Фигури 23 статистички значајно већи проценат F4/80+ макрофага, као и оних макрофага који продукују инфламаторне цитокине: IL-1 β и IL-12 је био у групи мишева који су примили само DSS у поређењу са групама које су примиле комбинацији DSS и MSCs. Такође, уочена је статистички значајно мања процентуална заступљеност инфламаторних дендритских ћелија (CD11c+CD11b+), мастоцита (Fc ϵ RI+CD117+), као и NKT ћелија (CD3+NK1.1+) у групама мишева са колитисом које су примиле MSCs у поређењу са мишевима који су примили само DSS (Фигура 25).



Фигура 23. Процент имунских ћелија у ткиво колона након примене MSCs. Статистички мања процентуална заступљеност F4/80+, F4/80+ IL-1 β , F4/80+ IL-12, CD11c+CD11b+, Fc ϵ RI+CD117+ као и NKT ћелија у групама које су примиле MSCs и MSCs са инхибитором у поређењу са C57BL/6 мишевима након 7 дана примене DSS-а. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01).

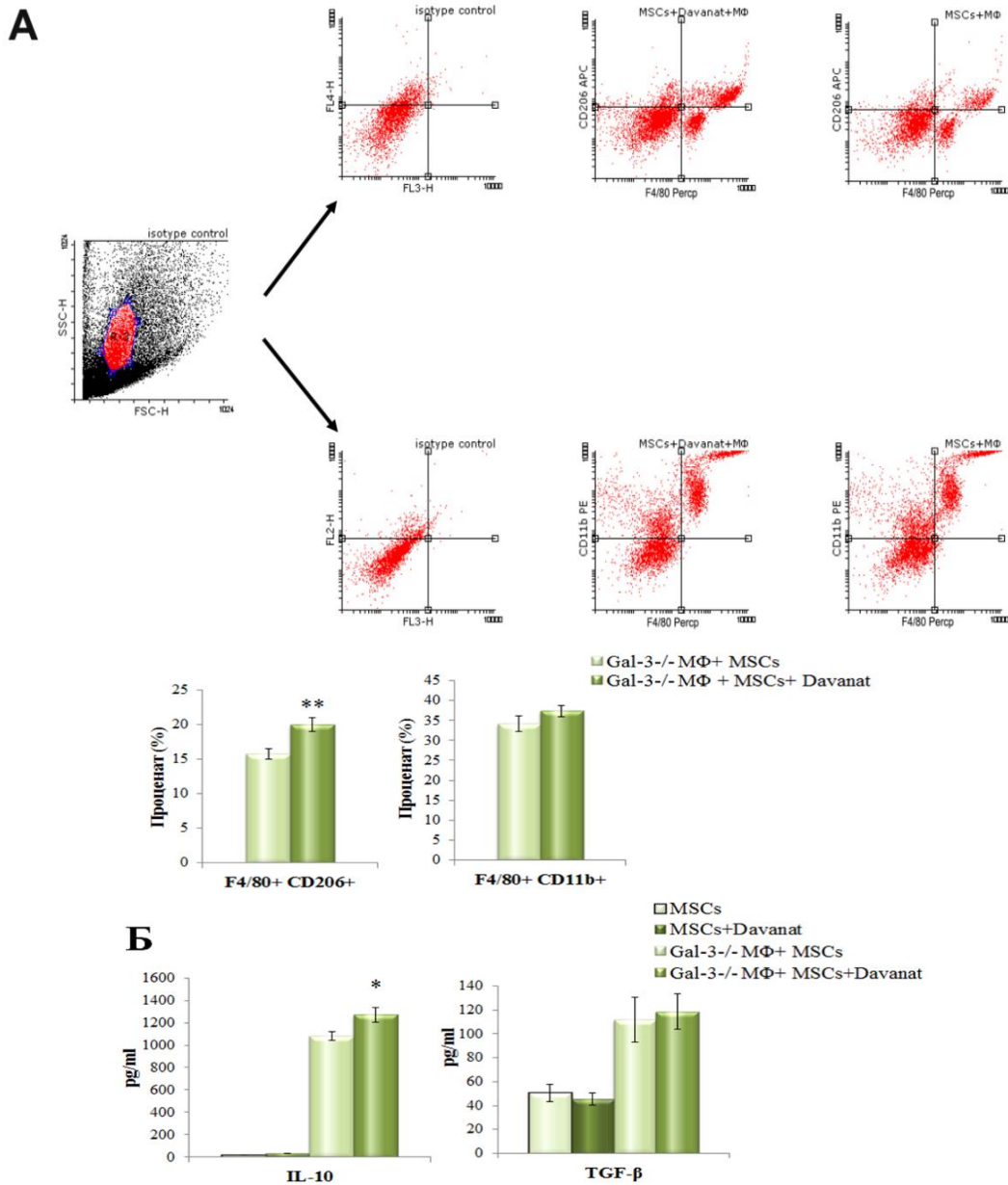
4.9.4. Фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs подстиче алтернативну активацију макрофага

Процент F4/80+ CD206+ алтернативно активираних макрофага, као и макрофага који продукују IL-10 је био значајно већи у ткиву колона мишева који су примили MSCs. У мишева са колитисом који су примили MSCs претходно култивисане у присуству *Davanat*-а, била је статистички значајно већа заступљеност F4/80+CD206+ алтернативно активираних макрофага, као и макрофага који продукују IL-10 у односу на мишеве којима су дате MSCs култивисане у стандардним условима, указујући да инхибиција Gal-3 у MSCs значајно поспешује њихов капацитет да индукују алтернативну активацију макрофага и продукцију имуносупресивног IL-10 у њима. Уочена је значајна разлика у овој ћелијској популацији и између група које су примиле само MSCs и оних које су примиле MSCs третиране са инхибитором (Фигура 24).



Фигура 24. Процент M2 макрофага у ткиву колона након примене MSCs. Статистички већа процентуална заступљеност F4/80+CD206+ и F4/80+ IL-10+ алтернативно активираних макрофага у групама које су примиле MSCs са инхибитором у поређењу са групом мишевима, који су примиле само MSCs. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

У циљу да се додатно потврди значај Gal-3, кога продукују MSCs, за алтернативну активацију макрофага, перитонеални макрофаги изоловани из здравих Gal-3^{-/-} мишева су кокултивисани са MSCs и MSCs претходно гајених у медијуму који садржи *Davanat*.



Фигура 25. *In vitro* кокултивација перитонеалних макрофага и MSCs. **A.** Репрезентативни „дот-плотови“ проточне цитометријске анализе. Први „дот-плот“ показује „gate-оване“ ћелије, другим „дот-плотом“ су приказане одговарајуће изотипске контроле; трећи „дот-плот“ репрезентује проценат F4/80+CD206+ перитонеалне макрофаге кокултивисане са MSCs и инхибитором; четврти „дот-плот“ показује проценат F4/80+CD206+ перитонеалне макрофаге кокултивисане само са MSCs. Статистички значајно већи проценат F4/80+CD206+ перитонеалних макрофага је био у кокултивацији са MSCs и инхибитором. **B.** Повећана концентрација IL-10 у супернатантима перитонеалних макрофага у кокултивацији са MSCs и инхибитором. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Показан је значајно већи проценат F4/80+ CD206+ алтернативно активираних макрофага у популацији перитонеалних макрофага кокултивисаних са MSCs претходно гајених у медијуму који садржи *Davanat* (Фигура 25А). Није постојала статистичка значајност у проценту F4/80+ CD11b+ макрофага између експерименталних група. Такође, показана је значајно већа концентрација IL-10, али не и TGF- β у супернатантима макрофага кокултивисаних са MSCs и инхибитором (Фигура 25Б).

5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује да делеција гена за Gal-3 смањује инфламацију у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом.

5.1. ДЕЛЕЦИЈА Gal-3 ГЕНА РЕДУКУЈЕ ОШТЕЋЕЊЕ ТКИВА КОЛОНА У КОЛИТИСУ ИЗАЗВАНОМ DSS-ОМ.

Галектин-3 је члан фамилије лектина, који се везују за β -галактозид, експримиран на бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације (цитоплазматска, једарна, мембранска или екстраћелијска) испољава своју мултифункционалност у процесима инфламације, апоптозе и канцерогенезе (240).

Иако је галектин 3 експримиран на свим ћелијама имунског система које имају важну улогу у настанку колитиса изазваног DSS-ом (204), до сада није објашњена његова улога у патогенези овог модела акутног колитиса. Ова студија је по први пут показала да делеција Gal-3 гена редукује оштећење ткива колона смањењем продукције про-инфламаторних цитокина, превенцијом масовног инфлуksа инфламаторних ћелија у ткиво колона и смањењем клиничког тока болести.

Клиничке манифестације пацијената са улцерозним колитисом, као и у акутној фази колитиса изазваног DSS-ом су тешка дијареја, ректално крварење и губитак телесне масе (111, 138). Повећање индекса болести (DAI) је још једна карактеристика колитиса изазваног DSS-ом (5). Да би се проценило да ли постоји разлика у степену оштећења ткива колона између експерименталног колитиса у Gal3^{-/-} и WT мишева, одређиван је клинички скор и урађена патохистолошка анализа ткивних препарата колона. Ова студија по први пут показује да Gal-3 делеција значајно смањује оштећење ткива колона изазвано DSS-ом: на 7 дана након третмана DSS-ом, клинички скор Gal-3^{-/-} мишева био је статистички значајно нижи ($p < 0.05$) у поређењу са WT мишевима (Фигура 1). Анализирајући хистолошке препарате колона животиња третираних са DSS-ом уочена је масовна инфилтрација инфламаторним ћелијама у ткиву колона у WT мишева за разлику од Gal-3^{-/-} мишева код којих се видело ограничено присуство

инфламаторних ћелија, што нам је указало да је делеција Gal-3 гена довела до значајно мањег инфлуksа инфламаторних ћелија у ткиво колона. Модел акутног колитиса изазван DSS-ом је повезан и са значајним скраћењем дужине колона и често овај морфолошки параметар представља степен инфламације у ткиву колона (298, 299). У овој студији је показано да Gal-3^{-/-} мишеви третирани DSS-ом су имали дужа црева у односу на WT мишеве третиране DSS-ом. У складу са овим резултатима подаци проточне цитометрије и ELISA-е су потврдили да услед делеције Gal-3 гена значајно се смањује број инфламаторних ћелија у ткиву колона и значајно се смањује концентрација про-инфламаторних цитокина у серуму животиња третираних DSS-ом. Делеција Gal-3 гена инхибирала је секрецију про-инфламаторних цитокина у серуму Gal3^{-/-} мишева третираних DSS-ом у односу на WT мишеве. У овој студији је показано да током прогресије болести расте експресија Gal-3 молекула у ткиву колона, што је директно указивало на агресивну улогу овог молекула у моделу колитиса изазваног DSS-ом. *Mathieu и сар.* (274) су такође показали повећану експресију Gal-3 у ламини проприји и епителу крипти у акутном колитису у C57BL/6 и BALB/c мишева третираних DSS-ом. Постоји неслагање око улоге Gal-3 у инфламаторним болестима. Дефицијенција молекула Gal-3 редукује инфламацију у моделима пнеумококне пнеумоније (300) и атеросклерозе (301). Насупрот томе, аблација Gal-3 гена у мишева код којих је изазвана инфекција плућа паразитом *Toxoplasma gondii* (302) је развила јак инфламаторни одговор, сугеришући да је улога молекула Gal-3 на инфламацију орган специфична и различита од болести до болести.

5.2. Gal-3 ДЕЛЕЦИЈА СМАЊУЈЕ ИНФЛУКС М1 МАКРОФАГА У ТКИВО КОЛОНА У КОЛИТИСУ ИЗАЗВАНОМ DSS-ОМ

У основи, инфламаторну болест црева карактерише хронична инфламација у ткиву колона у којој учествују бројне ћелије имунског система (25, 39, 52, 64).

Анализирајући експресију мембранских маркера на инфламаторним ћелијама у ткиву колона Gal3^{-/-} мишева третираних DSS-ом уочено је да делеција Gal-3 гена смањила инфлуks М1 макрофага. Статистички значајно

мањи број мононуклеарних ћелија у ткиву колона Gal3^{-/-} мишева третираних DSS-ом у поређењу са исто тако третираним WT мишевима је вероватно директна последица утицаја Gal-3 на миграцију леукоцита. Gal-3 индукује хемотаксу моноцита *in vitro* и *in vivo* (255). Естрацелуларни Gal-3 својом олигомеризацијом омогућава унакрсно повезивање леукоцита за ендотелне ћелије и има значајну улогу у екстравазацији и акумулацији леукоцита у инфламираном ткиву (303). Посредством естрацелуларног Gal-3, мононуклеари се везујући за ламинин екстраћелијског матрикса, дуже задржавају у инфламираном ткиву (304). Делеција Gal-3 гена је онемогућила хемотактично дејство Gal-3 и значајно редуковала број мононуклеара у ткиву колона животиња третираних DSS-ом.

Значајан допринос разумевању настанка инфламације изазване DSS-ом у ткиву колона дала су истраживања улоге ћелија урођене имуности у прогресији експерименталног акутног колитиса (137). Тако је иницијално указано на кључни значај инфилтрације и саме функције макрофага у процесу настанка инфламације (138). Подаци из овог истраживања су показали да Gal-3 делеција подстиче алтернативну активацију макрофага у колитису изазваном DSS-ом. Када је уочена значајна разлика у проценту и броју макрофага који продукују IL-10 и оних који експримирају CD206 молекулу у корист Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом у односу на исто тако третиране WT животиње, сматрано је да пораст броја макрофага који продукују IL-10 последица утицаја делеције Gal-3 на алтернативну активацију макрофага. Постоје опречни ставови о улози Gal-3 у алтернативној активацији макрофага. Показано је да експресија Gal-3 индукује алтернативну активацију макрофага у перитонеуму и миокарду (266, 305). Недавно објављени подаци из студије која је проучавала експериментални стеатохепатитис изазван дијетом (306) показали су да је делеција Gal-3 гена супримирала инфламацију у јетри и индуковала алтернативну активацију макрофага. Уз то, инхибиција експресије Gal-3, применом Gal-3INH, је индуковала алтернативну активацију макрофага у Con A хепатитису (272).

Постоје међусобно опречни подаци из студија које су испитивале да ли Gal-3 у макрофагима делује про или анти-инфламаторно (267, 268). Li и сарадници (267) су показали да, под утицајем липополисахарида, макрофаги

Gal-3^{-/-} мишева продукују већу количину про-инфламаторних цитокина IL-6, IL-12 и TNF- α него макрофаги WT мишева што упућује на анти-инфламаторне ефекте Gal-3 у макрофагима. Супротно томе, *Jeon* и сарадници (268) су указали на про-инфламаторну улогу Gal-3 у макрофагима јер је галектин 3 у микроглији индуковао фосфорилацију транскрипционих фактора JAK2, STAT1, STAT3 и STAT5 и активацију бројних JAK/STAT сигналних путева што је довело до масовне продукције про-инфламаторних цитокина TNF- α , IL-6, IL-1 β и IFN- γ . Подаци из ове студије указују да у колитису изазваном DSS-ом Gal-3 у макрофагима делује про-инфламаторно, подстиче продукцију IL-1 β , IL-6 и IL-12, а супримира продукцију IL-10 (Фигура 3 и 5). Gal-3 је присутан у макрофагима и макрофаги секретују Gal-3 (307). Макрофаги масовно секретују Gal-3 под утицајем високе концентрације IFN- γ (267). Висока концентрација про-инфламаторних цитокина IFN- γ и IL-12 утиче на поларизацију макрофага ка M1 типу (307, 308). Показано је *in vitro* да је алтернативна активација макрофага под утицајем IL-4 и IL-13 редукована у Gal-3^{-/-} мишева у односу на WT мишеве, док је класична активација макрофага под утицајем липополисахарида и IFN- γ неизмењена у Gal-3^{-/-} мишевима (266).

Неколико про-инфламаторних цитокина, а пре свих IL-1 β , је укључен у процес настанка инфламације и прогресивне деструкције ткива колона (140, 143). Базирано на овим подацима, клиничка студија (309) су документовале да је повећана концентрација про-инфламаторних цитокина током активне фазе инфламаторне болести црева. Повећана концентрација IL-1 β , IL-6, IL-8 и *granulocyte macrophage-colony stimulating* фактора у активној фази улцерозног колитиса и Кронове болести је корелирала са тежином инфламације (159, 161). Повећана продукција IL-1 β је детектована како у људи са инфламаторном болести црева (310) тако и у колитису изазваном DSS-ом (311, 312).

IL-1 β је про-инфламаторни цитокин кога превасходно продукују активирани моноцити и макрофаги, као и фибробласти, ћелије глатких мишића и ендотелне ћелије (313). Једна студија (314) је јасно показала да продукција IL-1 β се одвија преко активације каспазе 1 у раном стадијуму имунског одговора резултирајући интестиналном инфламацијом карактеристичном за експериментални колитис.

Пасивни трансфер перитонеалних макрофага, изолованих из здравих WT животиња значајно је погоршао клиничке манифестације колитиса и серумску концентрацију IL-1 β у Gal-3^{-/-} мишева (Фигура 9 и Графикон 1). Ови резултати су указивали на чињеницу да перитонеални макрофаги изоловани из Gal-3^{-/-} мишева имају смањену способност продукције IL-1 β и оштећења ткива колона. Деплеција макрофага *in vivo* комплетно је смањила манифестације колитиса између WT и Gal-3^{-/-} мишева, што је јасно указивало на важност Gal-3 у активацији макрофага у моделу акутног колитиса.

Резултати ове студије указују да макрофаги изоловани из перитонеума здравих Gal-3^{-/-} мишева и активирани *in vitro* липополисахаридом и DSS-ом, су продуковали значајно мање TNF- α и IL-1 β и експримирали знатно мање NLRP3 у поређењу са WT макрофагима. Како DSS узрокује активацију инфламазома (292), која доводи до следствене продукције IL-1 β , претпостављено је да вероватан механизам продукције IL-1 β подразумева активацију NLRP3 инфламазома у колитису изазваном DSS-ом. Све више је података да продукција IL-1 β и IL-18 у макрофагима зависи од аутокаталитичке разградње про-каспазе-1 у ензимски активан хетеродимер каспаза-1 (315- 317). Активна каспаза-1 даље каталитички разграђује молекуле про-IL-1 β и про-IL-18 и индукује ослобађање њихове биоактивне форме (318, 319). За конформациону промену и пуну активацију каспазе-1 неопходна је активација цитоплазматског протеинског комплекса названог инфламазом. NLRP3 инфламазом је један од најбоље проучених чланова фамилије NLR рецептора и састоји се из NLRP3 компоненте, адапторског протеина ASC (енгл. *apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain*; PYCARD) и молекула прокаспаза-1 (320, 321). Документовано је да NLRP3 инфламазом интер-реагује са DAMPs стресорима као што су екстрацелуларни АТФ, уратни кристали, амилоид и др. (322-324). Активација инфламазома је такође повезана са стварањем слободних радикала кисеоника у одговору на различите стимулусе (141, 142), а познато је да декстран натријум сулфат стимулише макрофаге да продукују слободне радикале кисеоника (143, 325). Велики број фагоцита који учествују у патогенези колитиса изазваног DSS-ом представљају извор ROS-а (326). Како су перитонеални макрофаги Gal-3^{-/-} мишева склонији апоптози него перитонеални

макрофаги у Gal-3^{+/+} мишева, експресија галектина 3 на инфламаторним ћелијама, може да утиче на продужену инфламацију (281).

У процесу испитивања могућег механизма настанка инфламације у ткиву колона WT мишева је показана повећана експресија NLRP3 инфлазома и IL-1 β у поређењу са експресијом у ткиву колона Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Такође, потврђена је и повећана експресија гена за NLRP3 и IL-1 β у ткиву колона WT мишева. Добијени резултати су у складу са студијом која је документовала да делеција гена за каспазу-1, NLRP3, ASC, катепсин В и катепсин L супримира настанак инфламације изазване DSS-ом (292).

5.3. ДЕЛЕЦИЈА Gal-3 ГЕНА СМАЊУЈУ ИНФЛУКС ИНФЛАМАТОРНИХ ЋЕЛИЈА У ТКИВО КОЛОНА

Анализирајући експресију мембранских маркера на инфламаторним ћелијама у ткиву колона Gal3^{-/-} мишева третираних DSS-ом уочили смо да је делеција Gal-3 гена смањила инфлукс дендритских ћелија и неутрофила (Фигура 11 и 17).

Галектин 3 има важну улогу у миграцији дендритских ћелија (270, 327). Дендритске ћелије ослобађају про-инфламаторне цитокине и хемокине преко активације TLRs и на тај начин изазивају локалну инфилтрацију полиморфонуклеарима и активацију других ћелија урођене имуности (145, 328). Миграција дендритских ћелија је регулисана помоћу ендогеног Gal-3 локализованог у гликолипопротеинским микродоменима плазма мембране. Ендогени Gal-3 је дифузно расејан у цитоплазми неактивних дендритских ћелија. Стимулација дендритских ћелија доводи до концентрисања Gal-3 у активним ундулирајућим деловима ћелијске мембране што одражава полимеризацију нових микрофиламената актина. Галектин 3 се такође концентрише и у деловима ћелијске мембране укључене у кретање, као што су ламелиподије. Постоје структурне разлике између ундулирајућих делова мембране два фенотипа, јер ундулирајући сегменти дендритских ћелија Gal3^{-/-} су мање сложени од оних у дендритским ћелијама фенотипа WT. Литературни подаци (270) указују да је ендогени галектин-3 нужен за формирање сложенијих ундулирајућих структура и можда је укључен у регулисање миграције

дендритских ћелија. Запажен је ослабљен мотилитет у незрелим дендритским ћелијама Gal3^{-/-} фенотипа и у *in vitro* и *in vivo* условима. Дендритске ћелије, типа Gal3^{-/-} потекле из коштане сржи имају инсуфицијентну хемотаксу у поређењу са ћелијама WT фенотипа. Дендритске Gal3^{-/-} ћелије у кожи су показале смањену миграцију у дренажне лимфне чворове после стимулације хаптенем. Оштећена сигнална функција у Gal3^{-/-} ћелија је такође запажена после активације хемокинских рецептора и ослабљеног развоја контактеног хиперсензитивитета, процеса у коме је кључна миграција дендритских ћелија у лимфне чворове (270).

Gal-3 је важан како за миграцију тако и за продукцију цитокина дендритских ћелија (329). У поређењу са WT мишевима, дендритске ћелије пореклом из коштане сржи Gal3^{-/-} мишева имају ослабљени миграторни одговор на хемокине *in vitro* и редуковану миграцију у лимфне чворове *in vivo* (270). Показано је да интрацелуларни Gal-3 има супресивне ефекте на продукцију IL-12 код дендритских ћелија и на тај начин смањује Th1 имунски одговор (303, 330). Резултати су показали да делеција Gal-3 гена смањује број инфламаторних дендритских ћелија у ткиву колона, а повећава број регулаторних дендритских ћелија (Фигура 13). Недавно објављена студија (331) је показала да делеција Gal-3 гена или селективна инхибиција Gal-3 ублажава прилив инфламаторних дендритских ћелија (CD11c+CD11b+) у ткиву јетре и поспешује толерогени фенотип дендритских ћелија, као и оних које продукују IL-10.

Анти-инфламаторни цитокин IL-10 има кључну улогу у одржавању хомеостазе гастроинтестиналног тракта. Генетске делеције IL-10 или рецептора за IL-10 су повезане са осетљивошћу на развој инфламаторне болести црева. IL-10^{-/-} мишеви спонтано развијају колитис и дефицијенција IL-10 погоршава клинички ток у неколико модела колитиса (332-336). Фармаколошко апликовање IL-10 смањује колитис у мишева, тако што инхибира интестиналну инфламацију и супримира продукцију про- инфламаторних цитокина (337-339).

Дендритске ћелије, макрофаги, Т и В лимфоцити продукују IL-10, који везивањем за свој рецептор смањује продукцију TNF- α преко различитих

механизма, укључујући индукцију SOCS3, као и других анти-инфламаторних протеина (340-342).

Gal-3 индукује ослобађање медијатора код мастоцита, преко активације FcεRI и/или FcεRI-IgE комплекса, а FcεRI и IgE се везују за Gal-3 (240, 343). Мастоцити пореклом из коштане сржи Gal-3^{-/-} мишева имају значајно мањи ниво JNK1 протеина у поређењу са мастоцитима изолованим из коштане сржи Gal-3^{+/+} мишева, што је највероватније узрок мање продукције IL-4 (271). У ламини проприји колона WT и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом није запажена значајна разлика у броју укупних мастоцита.

Показано је да током инфекције мишева са *T. Gondii* Gal-3 позитивно регулише реакцију стварања реактивних кисеоничких врста из перитонеалних неутрофила (344). Повећана активност у акутној фази улцерозног колитиса је повезана са повећаним инфлуксом неутрофила у мукозу и лумен црева, што доводи до формирање криптних абцеса (345). Активирани неутрофили који циркулишу, представљају велики извор про-инфламаторних цитокина и њихова улога је повећана у активној фази улцерозног колитиса. IL-6 и IL-1β, као и слободни радикали кисеоника су потентни активатори неутрофила, тако да повећана продукција ових цитокина може да узрокује тешко оштећење епитела (148). Делација Gal-3 гена је узроковала мањи број укупних неутрофила, као и неутрофила који продукују IL-1β и TNF-α. На основу ових резултата, сматрано је да су дендритске ћелије и неутрофили одговорни за продукцију про-инфламаторних цитокина (TNF-α, IL-6, IL-1β и IL-4), који узрокују оштећење ткива колона у WT мишева третираних DSS-ом.

IL-6 позитивно корелира са активношћу инфламаторне болести црева и његова продукција се смањује када је инфламација у интестиналном тракту неактивна (346–350). Показано је да је продукција IL-6 повећана у колитису изазваном DSS-ом (350–353), што је у складу са подацима из ове студије. Сматра се да IL-6 повећава ниво S100A9 преко активације STAT3 (354). S100A9 је ефекторски молекул који појачава трансдукцију сигнала преко TLRs (355) и може да регрутује гранулоците (356-359). Блокада овог молекула смањује ток болести колитиса изазваног DSS-ом (354). IL-6, такође учествује у регрутовању неутрофила и на тај начин поспешује инфламацију у ткиву колона (360).

TNF- α је један од првих биомаркера у раној фази колитиса изазваног DSS-ом. Поспешује секрецију других про-инфламаторних цитокина и потенцијално смањује улогу IL-10 (361).

Улога NKT ћелија у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом је протективна. Неколико студија (362-367) је показало да NKT ћелије након стимулације продукују значајну количину IL-4 и IFN- γ и повећавају цитолитичку активност ових ћелија. Ово указује на кључну улогу ових ћелија у регулацији имуског одговора и преживљавању. Показано је да NKT ћелије које продукују IL-9 превенирају развој акутног колитиса изазваног DSS-ом тако што супримирају IFN- γ и IL-17A, али повећавају продукцију IL-10 и TGF- β (156). Могућа интеракција између Gal-3 и функције NKT ћелија је и даље непозната. Ретки подаци који се односе на утицај Gal-3 на активацију и функцију NKT ћелија, указују на то да Gal-3 игра важну про-инфламаторну улогу у хепатитису индукованом конканавалином А тако што, између осталог, повећава инфилтрацију и активацију NKT ћелија (272). Активацијом NKT ћелија са α -GalCer-ом је значајно смањено оштећење ткива колоне, што није утицало на разлику између WT и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Насупрот, моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом, модел колитиса изазван са оксазолоном је посредован инфламаторном улогом NKT ћелија, које продукују IL-13 који пак има токсично дејство на епителне ћелије (368) NKT ћелије такође могу да имају директно цитотоксично дејство на епителне ћелије преко везивања за CD1-гликолипидне антигене експримиране на епителним ћелијама.

5.4. УТИЦАЈ И ЗНАЧАЈ МИКРОФЛОРЕ У КОЛИТИСУ ИЗАЗВАНОМ DSS-ОМ.

Показана је улога интестиналне микрофлоре и њених продуката у патогенези инфламаторне болести црева у људи (369-372), као и у неколико модела на животињама (373). Важност интестиналне микрофлоре је поткрепљена студијама на неколико модела, када се колитис није развио у одсуству микрофлоре црева (373). Показано је да микрофлора учествује и у патогенези колитиса изазваног DSS-ом. *Okayasu* и сар. (111) су први изнели ову хипотезу. Уочили су повећан број *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* и

Clostridium spp. у колону мишева третираних са DSS-ом (111). У прилог овоме је и налаз *Hans* и сар. (131), да третман антибиотцима редукује инфилтрацију гранулоцита у мукози и побољшава хистолошку слику у акутној фази колитиса изазваног са DSS-ом (131). Улога коменсалних бактерија и урођене имуности у развоју интестиналне инфламације документовао је и *Hudcovic* са сар. (374). Када су BALB/с и SCID мишеви гајени под *germ-free* условима развили су мале знакове инфламације мукозе након третмана са DSS-ом (374). Ови налази указују да присуство микрофлоре поспешује инфламацију у колитису изазваном DSS-ом. Сличне резултате је објавио *Kitajima* и сар. (132), потврдивши да деструкција мукозе изазвана DSS-ом може да се одигра и без учествовања интестиналне микрофлоре. Указао је такође да интестинална микрофлора игра важну улогу у модификовању осетљивости и сензитивности на оштећење епителних ћелија DSS-ом. Улога интестиналне микрофлоре је испитивана код мишева дефицијентних за TLRs, који служе као сензори за инфекције микроорганизмима и критични су за иницијацију инфламаторног и имунског одговора (375).

У овој студији је показано да примена антибиотика и антимикотика значајно смањила клиничко испољавање колитиса, али није утицала на већ постојећу разлику у испољавању болести између WT и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом. Gal-3 је специфични рецептор за *C.albicans* (376). Недавна студија (377) је потврдила да Gal-3 везује *C.albicans* и да је детектован у ткиву колона висок ниво Gal-3 у људи инфицираних са *C.albicans*. Примена флуконазола у WT и Gal-3^{-/-} мишева третираних DSS-ом је смањила оштећење ткива колона, али је остала уочена разлика између две групе мишева.

5.5. ПРЕВЕНТИВНА ПРИМЕНА Gal-3INH ЈЕ СМАЊИЛА ОШТЕЋЕЊЕ ТКИВА КОЛОНА И ИНФЛАМАЦИЈУ ИЗАЗВАНУ DSS-ОМ

Превентивна примена Gal-3INH је значајно ($p < 0.05$) смањила клинички скор у C57BL/6 мишева третираних DSS-ом. Патохистолошке промене ткива колона су биле у складу са налазима клиничког скорa. Ткиво колона C57BL/6 мишева којима је превентивно дат Gal-3INH био је очуване грађе са местимично

присутним инфламаторним ћелијама. У ткиву колона C57BL/6 мишева третираних само DSS-ом, јасно је била уочљива инфилтрација инфламаторним ћелијама, као и деструкција структура ткива колона. Примена Gal-3INH је значајно смањила продукцију IL-1 β и TNF- α , а самим тим и инфламацију. Примена инхибитора је такође смањила експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона. Фармаколошка инхибиција Gal-3 је значајно смањила болест, редукујући активацију инфлазома и продукцију IL-1 β .

Traber и сар. су показали да *Davanat* значајно смањује експресију Gal-3 на макрофагима у порталном делу јетре и самим тим и редукује фиброзу јетре изазвану са тиоацетамидом (285). У моделу болести неалкохолне масне јетре фармаколошка инхибиција Gal-3 *Davanat*-ом је смањила оштећење хепатоцита, инфламацију и фиброзу, што је било повезано за редукованом експресијом Gal-3 на макрофагима (378).

5.6. ФАРМАКОЛОШКА ИНХИБИЦИЈА Gal-3 У MSCs

ПОСПЕШИЛА ЈЕ АЛТЕРНАТИВНУ АКТИВАЦИЈУ МАКРОФАГА У ТКИВУ КОЛОНА

Имунорегулаторне карактеристике MSCs отварају потпуно нове терапијске могућности. Показано је да MSCs могу да делују инхибиторно не само на ћелије стечене имуности, него и на ћелије урођене имуности (92). Макрофаги представљају једне од кључних ћелија у патогенези акутног улцерозног колитиса у људи, као и у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом (138, 292). Недавно, *Liu* и сар. су показали да апликација MSCs у моделу акутног колитиса изазваног DSS-ом, може да регрутује макрофаге и подстакне њихову продукцију анти-инфламаторних цитокина и на тај начин смањи клинички ток болести (100). Резултати добијени из овог истраживања су показали да клинички ток и оштећење ткива колона је било значајно смањено након апликације MSCs. Такође, серумска концентрација IL-10 је била повећана, као и проценат алтернативно активираних макрофага у ткиву колона након превентивне примене MSCs. *Kim* и *Hematti* (379) су први показали да MSCs изоловане из коштане сржи људи могу да подстакну алтернативну активацију макрофага. Друга студија (380) је показала да моноцити изоловани

из периферне крви повећано експримирају CD206 маркер, смањено експримирају HLA-DR и редукују способност алореактивног одговора Т лимфоцита након кокултивисања са MSCs изолованих из пупчане врпце. Zhang и сар. (381) су показали MSCs изоловане из гингиве људи могу да индукују поларизацију макрофага у M2 фенотип. У овој студији је показано да фармаколошка инхибиција Gal-3 у MSCs за резултат има повећано присуство F4/80+CD206+ алтернативно активираних макрофага и макрофага који продукују IL-10 у ткиву колона животиња третираних DSS-ом. Ово је указивало на важну улогу Gal-3, који продукују MSCs за поларизацију макрофага у M2 фенотип. Gal-3 игра важну улогу у поларизацији макрофага, као и њиховој функцији (267, 268, 272, 382). Показано је да у моделу фулминатног хепатитиса изазваног са конкавалином А генетска делиција Gal-3, као и фармаколошка инхибиција (TD139) овог молекула подстиче алтернативну активацију макрофага и ткиву јетре (272).

Подаци из овог истраживања и литературни подаци указују на важну улогу Gal-3 у изазивању запаљења ткива колона. Претпоставка о механизму патогенезе акутног колитиса изазваног применом DSS-а и улога Gal-3 у овом моделу болести је приказана на Схеми 5.

Мономерни Gal-3 реагује са гликанима из агрегата LPS-а преко C- терминалног домена. Интеракција Gal-3: LPS доводи до олигомеризације Gal-3, која пак поспешује растварање агрегата LPS-а, стабилизацију мономера LPS-а, као и повећану реакцију LPS-а са CD14, што води повећаној активацији фагоцитозе. Током почетне фазе акутног колитиса LPS се ослобађа из бактерија лумена колона, изазивајући олигомеризацију Gal-3, "накупљање" CD14 на макрофагима и повећање активације NLRP3 инфлазома која је зависна од CD14/TLR-4:LPS, доводећи тако до продукције IL-1 β у макрофагима (383).

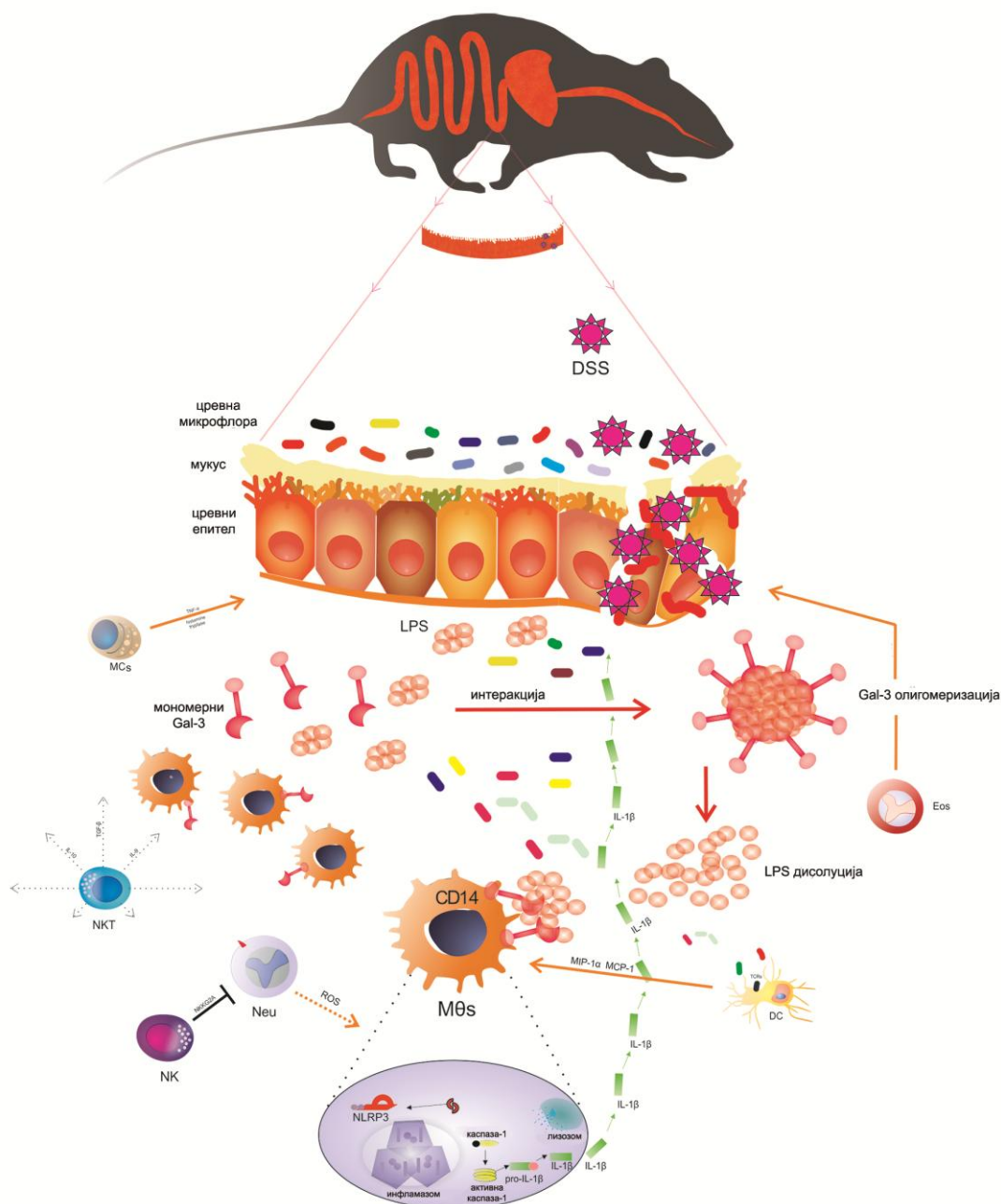


Схема 5 . Улога и значај Gal-3 у патогенези акутног колитиса. Мономерни Gal-3 реагује са гликанима из агрегата LPS-а. Интеракција Gal-3: LPS подстиче процес олигомеризације Gal-3, која пак поспешује растварање агрегата LPS-а, стабилизацију мономера LPS-а, као и повећану реакцију LPS-а са CD14, што води повећаној активацији фагоцитозе. Током почетне фазе акутног колитиса LPS се ослобађа из бактерија лумена колоне, изазивајући олигомеризацију Gal-3, "накупљање" CD14 на макрофагима и повећање активације NLRP3 инфламазома која је зависна од CD14/TLR-4:LPS, узрокујући тако продукцију IL-1 β у макрофагима.

Убрзана и појачана инфламација у ткиву колона у Gal-3^{+/+} мишева указује на важну про-инфламаторну улогу Gal-3 у моделу акутног колитиса, што би могло да има терапијске импликације.

6. ЗАКЉУЧАК

Делеција Gal-3 гена и превентивна примена *Davanat*-а смањује клиничке симптоме и редукују оштећење ткива колона у мишјем моделу акутног колитиса изазваног декстран натријум сулфатом. Делеција гена за Gal-3 значајно смањује активацију NLRP3 инфлазома и продукцију IL-1 β у макрофагима у иницијалној фази колитиса. Макрофаги Gal-3 дефицијентних мишева продукују мање инфламаторних цитокина што узрокује мањи инфлукс инфламаторних дендритских ћелија и неутрофила у колон, односно манифестује се значајно слабијим колитисом.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Gal-3 дефицијентни мишеви третирани декстран натријум сулфатом спорије развијају клинички ток болести, што се манифестује мањим клиничким скором и мањим губитком телесне масе
2. Gal-3 дефицијентни мишеви третирани декстран натријум сулфатом имају мању инфламацију у ткиву колона, што се огледа у значајном мањем скраћењу дужине колона и редукованом оштећењу ткива колона
3. Делеција Gal-3 гена инхибира секрецију про-инфламаторних цитокина и смањују инфлукс инфламаторних ћелија у ламину проприју ткива колона
4. Смањена системска инфламација у Gal-3 дефицијентних мишева третираних декстран натријум сулфатом је генерисана у ткиву колона које смањено инфилтришу про-инфламаторни M1 макрофаги, инфламаторне дендритске ћелије, неутрофили и мастоцити, док се значајно повећава заступљеност анти-инфламаторних M2 макрофага и регулаторних дендритских ћелија.
5. У одсуству Gal-3 је смањено је депоновање NALP-а и IL-1 β у ткиву колона мишева третираних декстран натријум сулфатом
6. Делеција гена за Gal-3 утиче на смањену активацију NLRP3 инфлазома и следствену каспаза-1 зависну продукцију IL-1 β у F4/80+ макрофагима у перитонеуму и ткиву мишева третираних декстран натријум сулфатом

7. Перитонеални макрофаги Gal3^{-/-} мишева у одговору на стимулацију LPS-ом и DSS-ом имају мању експресију NLRP3 инфлазома и смањену продукцију IL-1 β
8. Превентивна применена Davanat-а ублажава клиничку слику акутног колитиса и оштећење колона.
9. Превентивна примена Davanat-а секретацију про-инфламаторних цитокина и експресију NALP-а и IL-1 β у ткиву колона мишева.

СКРАЋЕНИЦЕ

IL	интерлеукин (interleukin)
ROS	реактивни медијатори кисеоника (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCID	озбиљна комбинована имунодефицијенција (<i>severe combined immunodeficient</i>)
RNA	рибонуклеинска киселина (<i>ribonucleic acid</i>)
LTB4	<i>lipid-derived mediators leukotriene B4</i>
PAF	фактор активације тромбоцита (<i>platelet-activating factor</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
IFN- γ	интерферон- γ (<i>interferon-γ</i>)
NKG2A	инхибиторни рецептор урођено убилачких ћелија (<i>The inhibitory NK cell receptor</i>)
NKT ћелије	урођено убилачке Т ћелије (<i>natural killer T cells</i>)
NK ћелије	урођено убилачке ћелије (<i>natural killer cells</i>)
TLR	рецептор сличан Toll-у (<i>Toll-like receptor</i>)
MDC8	маркер за хумане леукоците
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
MHC	молекула II класе главни комплекс ткивне подударности (<i>major histocompatibility complex</i>)
CX3CR1	хемокински рецептор 1
NF κ B	транскрипциони фактор (<i>nuclear factor κB</i>)
5-ASA	(<i>5-aminosalicylic acid</i>)
DSS	декстран натријум сулфат (<i>Dextran Sulphate Sodium</i>)
TNBS	тринитро бензен сулфонска киселина (<i>2,4,6 Trinitrobenzene sulfonic acid</i>)
DNBS	динитро бензен сулфонска киселина (<i>Dinitrobenzene sulfonic acid</i>)
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein</i>
CXCL1/	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>

КС	
CCL11	хемокин 11 (<i>chemokine 11</i>)
α -GalCer	α -галактоцерамид
NLRP3	<i>NOD-like receptor family; pyrin-containing domain 3</i>
NLRs	рецептори слични NOD-у (<i>nucleotide binding and oligomerization domain, NOD-like receptors</i>)
NO	азот монооксида
iNOS	азот монооксид синтазе
Gal-3	галектина 3
CDRs	домен за препознавање угљених хидрата (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
MMPs	матриксна металопроотеиназа (<i>matrix metalloproteinase</i>)
Lamp	<i>the lysosomal associated membrane proteins</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
WT	<i>wild type</i>
Gal-3 ^{-/-}	<i>galectin 3 knockout</i>
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
Gal-	синтетски инхибитор галектина 3
3INH	
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EDTA	етилен диамин тетра сирћетна киселина (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HRP	<i>Streptavidin HorseRadish Peroxidase</i>
SE	стандардна грешка (<i>Standard Error</i>)

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:521-533.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-429.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448:427-434.
4. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143:895-904.
5. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.
6. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-536.
7. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3:394-400.
8. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:321-335.
9. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; 234:29-40.
10. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126:1620-1633.
11. Loftus Ev Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504–1517.
12. Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14:1553–1559.

13. Burisch J. Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population-based inception cohort. *Dan Med J* 2014; 61:B4778.
14. Folwaczny C, Noehl N, Tschop K, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 1997; 113:101–106.
15. Khoo UY, Bjarnason I, Donaghy A, Williams R, Macpherson A. Antibodies to colonic epithelial cells from the serum and colonic mucosal washings in ulcerative colitis. *Gut* 1995; 37:63–70.
16. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51:2–9.
17. Onuma EK, Amenta PS, Ramaswamy K, Lin JJ, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): a predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:466–471.
18. Das KM. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease: new insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1–13.
19. Merger M, Croitoru K. Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 1998; 10:69–78.
20. Olives JP, Breton A, Hugot JP, Oksman F, Johannet C, Ghisolfi J, Navarro J, Cezard JP. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25:142–148.
21. Roozendaal C, Pogany K, Hummel EJ, Horst G, Dijkstra G, Nelis GF, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg CG. Titres of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease are not related to disease activity. *Q J Med* 1999; 92:651–658.
22. Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, Sato Y, Kasuga N, Nakamura T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1438-1443.

23. Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992; 103:1587-1595.
24. Anezaki K, Asakura H, Honma T, Ishizuka K, Funakoshi K, Tsukada Y, Narisawa R. Correlations between interleukin-8, and myeloperoxidase or luminol-dependent chemiluminescence in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Intern Med* 1998; 37:253-258.
25. Nixon JB, Riddell RH. Histopathology of ulcerative colitis. In: Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Hawkins CF, eds. *Inflammatory bowel diseases*, 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990; 247-262.
26. Thompson H. Histopathology of Crohn's disease. In: Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Hawkins CF, eds. *Inflammatory bowel diseases*, 2nd edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990; 263-285.
27. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980; 286:264-265.
28. Snyder F, Lee TC, Blank ML. Platelet-activating factor and related ether lipid mediators. Biological activities, metabolism, and regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 568:35-43.
29. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, Hugli TE. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol* 1978; 120:109-115.
30. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9233-9237.
31. Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 1987; 139:3474-3483.
32. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ. Molecular cloning of a human

- monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988; 167:1883-1893.
33. Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M. Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol* 1991; 96:690-694.
 34. Thomsen MK, Larsen CG, Thomsen HK, Kirstein D, Skak-Nielsen T, Ahnfelt-Rønne I, Thestrup-Pedersen K. Recombinant human interleukin-8 is a potent activator of canine neutrophil aggregation, migration, and leukotriene B4 biosynthesis. *J Invest Dermatol* 1991; 96:260-266.
 35. Lampinen M, Rönnblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Säfsten B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54:1714-1720.
 36. Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998; 42:470-476.
 37. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 2001; 159:2001-2009.
 38. Raithel M, Winterkamp S, Pacurar A, Ulrich P, Hochberger J, Hahn EG. Release of mast cell tryptase from human colorectal mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:174-179.
 39. Stasikowska-Kanicka O1, Danilewicz M, Głowacka A, Wągrowaska-Danilewicz M. Mast cells and eosinophils are involved in activation of ulcerative colitis. *Adv Med Sci* 2012; 57:230-236.
 40. Woodruff SA, Masterson JC, Fillon S, Robinson ZD, Furuta GT. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52:650-661.

41. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* 2009; 21:1303-1309.
42. Peterson CG, Eklund E, Taha Y, Raab Y, Carlson M. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1755-1762.
43. Xue FM, Zhang HP, Hao HJ, Shi ZY, Zhou C, Feng B, Yang PC. CD98 positive eosinophils contribute to T helper 1 pattern inflammation. *PLoS One* 2012; 7:e51830.
44. Yan Y, Vasudevan S, Nguyen HT, Merlin D. Intestinal epithelial CD98: an oligomeric and multifunctional protein. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:1087-1092.
45. Katsurada T, Kobayashi W, Tomaru U, Baba T, Furukawa S, Ishizu A, Takeda K, Sakamoto N, Asaka M, Takeda H, Kasahara M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2012; 7:e44113.
46. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113:1490-1497.
47. Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:115-126.
48. Shimamoto M, Ueno Y, Tanaka S, Onitake T, Hanaoka R, Yoshioka K, Hatakeyama T, Chayama K. Selective decrease in colonic CD56(+) T and CD161(+) T cells in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:5995-6002.
49. Manzano L, Alvarez-Mon M, Abreu L, Antonio Vargas J, de la Morena E, Corugedo F, Duràntez A. Functional impairment of natural killer cells in active ulcerative colitis: reversion of the defective natural killer activity by interleukin 2. *Gut* 1992; 33:246-251.

50. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129:50–65.
51. Verstege MI, ten Kate FJ, Reinartz SM, van Drunen CM, Slors FJ, Bemelman WA, Vyth-Dreese FA, te Velde AA. Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2008; 56:233–241.
52. Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005; 206:132–148.
53. de Baey A, Mende I, Riethmueller G, Baeuerle PA. Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31:1646-1655.
54. de Baey A, Mende I, Baretton G, Greiner A, Hartl WH, Baeuerle PA, Diepolder HM. A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J Immunol* 2003; 170:5089-5094.
55. Ikeda Y, Akbar F, Matsui H, Onji M. Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:841-850.
56. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigenpresenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:504-510.
57. Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut* 2000; 47:215-227.
58. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1: S53-S60.
59. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:1-22.

60. Voedisch S, Koenecke C, David S, Herbrand H, Förster R, Rhen M, Pabst O. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* 2009; 77:3170-3180.
61. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303:1662-1665.
62. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006; 203:519-527.
63. Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 2008; 119:22-31.
64. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011; 34:237-246.
65. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Williams M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 2013; 6:498-510.
66. Rugtveit J, Haraldsen G, Høg asen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, Scott H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995; 37:367-373.
67. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112:1493-1505.
68. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16:144-150.

69. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56:72-77.
70. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153:80-82.
71. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1994; 179:1895-1902.
72. Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Toda* 1997; 3:502-507.
73. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001; 31:337-343.
74. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115:357-369.
75. Jobin C, Sartor RB. The IkappaB/NF-kappaB system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C451-462.
76. Kirsner JB (Ed): *Inflammatory bowel disease*, 5th ed. Philadelphia, WB Saunders; 2000.
77. Jess T, Loftus EV Jr, Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Schleck CD, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Munkholm P, Sandborn WJ. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2006; 130:1039-1046.
78. Vucelić B i saradnici. *Gastroenterologija i hepatologija*. I edicija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
79. Jung SA. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: what is the role of colonoscopy? *Clin Endosc* 2012; 45:254-62.

80. Yang SK, Byeon JS. *Diagnosis and Treatment of Colonoscopy*. Seoul: Koonja; 2009.
81. Choi KY. Endoscopic manifestation of inflammatory bowel disease: ulcerative colitis. In: *Proceedings of the 19th Seminar of Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy*; 1998 Aug 30-Sep 3; Seoul, Korea. Seoul: Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy; 1998. p. 47-54.
82. Yang SK. Endoscopic diagnosis of ulcerative colitis. In: *Proceedings of the 22nd Seminar of Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy*; 2003 Mar 26; Seoul, Korea. Seoul: Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy; 2000. p. 201-218.
83. Kim YH. Common errors in the diagnosis process. *Intest Res* 2003; 1:106-110.
84. Tedesco FJ, Hardin RD, Harper RN, Edwards BH. Infectious colitis endoscopically simulating inflammatory bowel disease: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc* 1983; 29:195-197.
85. Fochios SE, Korelitz BI. The role of sigmoidoscopy and rectal biopsy in diagnosis and management of inflammatory bowel disease: personal experience. *Am J Gastroenterol* 1988; 83:114–119.
86. Matsumoto T, Iida M, Kimura Y, Fujishima M. Culture of colonoscopically obtained biopsy specimens in acute infectious colitis. *Gastrointest Endosc* 1994; 40:184–187.
87. Surawicz CM, Belic L. Rectal biopsy helps to distinguish acute self-limited colitis from idiopathic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86:104–113.
88. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005; 201:1205-15.
89. Bryant RV, Brain O, Travis SP. Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50:90-112.
90. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83–92.

91. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143–147.
92. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity* 2010; 43:255–263.
93. Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Nakamura T, Eguchi H, Kawano S. The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. *Pharmacology* 2007; 80:193-199.
94. Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *J Gastroenterol* 2011; 46:143-152.
95. Tanaka F, Tominaga K, Ochi M, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Ohta K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci* 2008; 83:771-779.
96. Wang C, Chen J, Sun L, Liu Y. Tgf-beta signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation. *Mol Biol Rep* 2014; 41:4977-4983.
97. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 2013; 62:1131-1341.
98. Abdel Salam AG, Ata HM, Salman TM, Rashed LA, Sabry D, Schaalán MF. Potential therapeutic utility of mesenchymal stem cells in inflammatory bowel disease in mice. *Int Immunopharmacol* 2014; 22:515-521.
99. He XW, He XS, Lian L, Wu XJ, Lan P. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2012; 57:3136-3144.

100. Liu W, Zhang S, Gu S, Sang L, Dai C. Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF β 1. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35:858-865.
101. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scan J Immunol* 2010; 71:267–274.
102. Liu GY, Xu Y, Li Y, Wang LH, Liu YJ, Zhu D. Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2013; 15:1208-1017.
103. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000; 19:51-62.
104. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:1073-1083.
105. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007; 2:541-546.
106. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology* 2014; 22:219-233.
107. Bailey RW, Bourne EJ. Intracellular glycosidases of dextran-producing bacteria. *Nature* 1961; 191:277-278.
108. Marcus R, Watt J. Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. *Lancet* 1969; 2:489-490.
109. Marcus R, Watt J. Colonic ulceration in young rats fed degraded carrageenan. *Lancet* 1971; 2:765-766.
110. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1985; 82:1327-1336.
111. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702.
112. Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 1992; 33:1521-1527.

113. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci* 1999; 61:67-70.
114. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 2000; 49:9-15.
115. Hirono I, Kuhara K, Yamaji T, Hosaka S, Golberg L. Carcinogenicity of dextran sulfate sodium in relation to its molecular weight. *Cancer Lett* 1983; 18:29-34.
116. Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. *J Gastroenterol* 1994; 29:430-438.
117. Breider MA, Eppinger M, Gough A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Vet Pathol* 1997; 34:598-604.
118. Mallon PT, Mckenna M, Kirk SJ, Gardiner KR (2006) Dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis reduces mucosal barrier function in Sprague-Dawley rats. *Canadian Digestive Diseases Week (CDDW)*, 2006 ed. Banff, Alberta, Canadian Association of Gastroenterology.
119. Chiba T. Cell kinetics of carcinoma originating from rat colitis induced by dextran sulphate sodium. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1993; 90:774–781.
120. Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1458-1475.
121. Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000; 21:757-768.
122. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69:238-249.

123. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:G1328-1338.
124. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:253048.
125. Laprise P. Emerging role for epithelial polarity proteins of the Crumbs family as potential tumor suppressors. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:868217.
126. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* 2007; 140:12-19.
127. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* 2009; 4:e6073.
128. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* 1999; 48:137-143.
129. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39:234-241.
130. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14338-14343.
131. Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:267-273.
132. Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Exp Anim* 2001; 50:387-395.
133. Verdù EF, Bercik P, Cukrowska B, Farre-Castany MA, Bouzourene H, Saraga E, Blum AL, Corthésy-Theulaz I, Tlaskalova-Hogenova H, Michetti P. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the

- severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:46-50.
134. Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol* 2001; 1:3.
135. Axelsson LG, Landström E, Goldschmidt TJ, Grönberg A, Bylund-Fellenius AC. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res* 1996; 45:181-191.
136. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107:1643-1652.
137. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:718617.
138. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:495-549.
139. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13249-13254.
140. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337:647-654.
141. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009; 30:556-565.
142. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320:674-677.

143. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A. Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages. *Life Sci* 2007; 81:362-371.
144. Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194:1207-1218.
145. Nolan KF, Strong V, Soler D et al. IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol* 2004; 172:2201-2209.
146. Berndt BE, Zhang M, Chen GH, Huffnagle GB, Kao JY. The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J Immunol* 2007; 179:6255-6262.
147. Boxer LA. Role of neutrophils in genetic disorders of phagocyte function leading to IBD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46 Suppl 1:E17.
148. D'Odorico, A., D'Inca, R., Mestriner, C., Di Leo, V., Ferronato, A. & Sturniolo, G.C. Influence of disease site and activity on peripheral neutrophil function in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45:1594–1600.
149. Steinbeck MJ, Roth JA, Kaeberle ML. Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon-gamma. *Cell Immunol* 1986; 98:137–144.
150. Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, Melgar S. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol* 2013; 6:1016-1026.
151. Iba Y, Sugimoto Y, Kamei C. Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24:15-18.
152. Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* 2009; 31:185-205.

153. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP: Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 2004; 172:5664–5675.
154. Shichijo K, Makiyama K, Wen CY, Matsuo M, Nakayama T, Nakashima M, Ihara M, Sekine I: Antibody to eosinophil cationic protein suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4505–4510.
155. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 2000; 119:119-128.
156. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol* 2013; 6:347-357.
157. Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:385-391.
158. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inghin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62:240-248.
159. Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999; 34:66-74.
160. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzi F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163:143-147.
161. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106:533-539.
162. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA, Chiriva-Internati M. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med* 2014; 2:88.

163. Uchimura K, Rosen SD. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:559-565.
164. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 2007; 26:605-616.
165. Cunningham AL, Harman AN, Donaghy H. DC-SIGN 'AIDS' HIV immune evasion and infection. *Nat Immunol* 2007; 8:556-558.
166. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, Simmons A. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 2007; 8:569-577.
167. van Vliet SJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol* 2006; 7:1200-1208.
168. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995; 378:736-739.
169. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; 409:733-739.
170. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6:1245-1252.
171. Toscano MA, Bianco GA, Parregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8:825-834.
172. van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008; 9:593-601.
173. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:255-266.

174. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9:979–984.
175. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269:20807–20810.
176. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19:433–440.
177. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem* 1993; 268:27034–27038.
178. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* 1995; 3:1379–1393.
179. 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.
180. Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P, Acharya KR. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 1998; 37:13930–13940.
181. Varela PF, Solis D, Diaz-Maurino T, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. The 2.15 Å crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *J Mol Biol* 1999; 294:537–549.
182. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29–41.
183. 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.
184. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1679–1700.

185. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e17.
186. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 2008; 180:3091-3102.
187. Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai K, Wada Y, Futai M. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361:195-201.
188. Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 1998; 63:159-168.
189. 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.
190. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem* 2008; 283:10109-10123.
191. Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9:578–584.
192. 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.
193. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:263-273.
194. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing “danger”: Galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 2004; 19:583-591.
195. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside - binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262:7383-7390.

196. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a ga-lactoside –binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269:4424-4430.
197. Ahmed H, Bianchet MA, Amzel LM, Hirabayashi J, Kasai KI, Giga-Hama Y, Tohda H, Vasta GR. Novel carbohydrate specificity of the 16-kDa galectin from *Caenorhabditis elegans*: binding to blood group precursor oligosaccharides (type 1, type 2, Talpha, and Tbeta) and gangliosides. *Glycobiology* 2002; 12:451-461.
198. Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Nakamura T. Characterization of the *Xenopus* ga-lectin family. Three structurally different types as in mammals and regulated expression during embryogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278:12285-12293.
199. Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 281:27-35.
200. Fang R, Mantle M, Ceri H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J* 1993; 293:867-872.
201. Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside -binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:1428-1432.
202. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2002; 19:441–449.
203. Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* 1991; 115:1437-1448.
204. Watt DJ, Jones GE, Goldring K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J* 2004; 19:615-619.
205. Georgiadis V, Stewart HJS, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, Deltour L, Goldring K, Poirier F, Lawrence-Watt DJ. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236:1014-1024.
206. Fowlis D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn* 1995; 203:241-251.

207. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:424-438.
208. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:274-284.
209. van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* 2010; 20:2-12.
210. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32.000 Mr mouse macrofage subpopulation-specific antigen defined BZ monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128:1221-1228.
211. Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol* 2004; 21:1177-1187.
212. Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2000; 255:278-290.
213. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 212:233-239.
214. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; 20:455-460.
215. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydratebinding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:172-185.
216. Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res* 1993; 207:8-18.
217. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 2003; 270:2109-2119.
218. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1031-1036.

219. Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 2006; 16:408–414.
220. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Transact* 1997; 25:1194–1198.
221. Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology* 1994; 4:5–12.
222. Jia S, Wang JL. Carbohydrate binding protein 35. Complementary DNA sequence reveals homology with proteins of the heterogeneous nuclear RNP. *J Biol Chem* 1988; 263:6009–6011.
223. Wang JL, Laing JG, Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* 1991; 3:243–252.
224. Birdsall B, Feeney J, Burdett IDJ, Bawumia S, Barboni EAM, Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry* 2001; 40:4859–4866.
225. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem* 1993; 268:26712–26718.
226. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the β -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 2000; 275:36311–36315.
227. Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum–Golgi complex. *Eur J Biochem* 1999; 264:569–576.
228. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K. Galectins: a family of animal beta-galactosidebinding lectins. *Cell* 1994; 76:597–598.
229. 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.
230. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, Raz A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentization and functions in cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59:6239-6245.
231. 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 Cterminalvcarbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 2000; 10:1201-1208.
232. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19:527-535.
233. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19:575-581.
234. Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379:97-106.
235. 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.
236. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:198–208.
237. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6737-6742.
238. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Letters* 2004; 9:305-328.
239. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* 1990; 265:7097-7099.
240. Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616-635.

241. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosilated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem* 1992; 267:6983-6990.
242. Hughes, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
243. Sarafian V, Jadot M, Foidart JM, Letesson JJ, Van den Brule F, Castronovo V, Wattiaux R, Coninck SW. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer* 1998; 75:105–111.
244. Laing JG, Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry* 1988; 27:5329-5334.
245. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucl Acids Res* 2001; 29:3595-3602.
246. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21:8001–8010.
247. Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells. *Cancer Res* 1999; 59:4148–4154.
248. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res* 2004; 64:6363-6367.
249. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in premRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1213–1217.
250. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:7292-7300.
251. 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.

252. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications during *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* 2004; 172:493-502.
253. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasić R, Vuk-Pavlović S. Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Studied by Microarray Hybridization. *Bioch Biophys Res Commun* 2000; 275:731-738.
254. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002; 277:15819-15827.
255. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165:2156-2164.
256. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 2002; 32:1434-1444.
257. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156:899-909.
258. 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.
259. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1183:158-182.
260. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD, Rabinovich GA. Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *J Clin Immunol* 2011; 31:10-21.
261. van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, Deelder AM, Cummings RD, Hokke CH, van Die I. LacdiNAc-glycans

- constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *J Immunol* 2004; 173:1902-1907.
262. John CM, Jarvis GA, Swanson KV, Leffler H, Cooper MD, Huflejt ME, Griffiss JM. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cell Microbiol* 2002; 4:649-662.
263. Pelletier I, Sato S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem* 2002; 277:17663–17670.
264. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2007; 170:546–556.
265. 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.
266. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson 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.
267. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, Xu D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181:2781–2789.
268. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokinelike regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010; 185:7037-7046.
269. Volarevic V, Lukic ML. Chapter 21. Autoimmune Disorders in Galectin-3 Deficient Mice. In Klyosov A, Traber P. Galectins and Disease implications in Targeted therapeutics. 2012. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC. pp 359–376.

270. 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.
271. Chen HY, Sharma BB, Yu L, Zuberi R, Weng IC, Kawakami Y, Kawakami T, Hsu DK, Liu FT. Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression. *J Immunol* 2006; 177:4991-4997.
272. 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.
273. 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.
274. Mathieu A, Nagy N, Decaestecker C, Ferdinande L, Vandenbroucke K, Rottiers P, Cuvelier CA, Salmon I, Demetter P. Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice. *Int J Exp Pathol* 2008; 89:438-446.
275. Frol'ová L, Smetana K Jr, Borovská D, Kitanovicová A, Klimesová K, Janatková I, Malícková K, Lukás M, Drastich P, Benes Z, Tucková L, Manning JC, André S, Gabius HJ, Tlaskalová-Hogenová H. Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD? *Inflamm Res* 2009; 58:503-512.
276. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; pp263-328.
277. Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; pp501-578.
278. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14(15):32.
279. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.

280. 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.
281. Hsu DK, Yang RY, Pan Z. et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073–1083.
282. Caitlyn G. Whitttem, Amanda D. Williams, and Christopher S. Williams. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium. *J Vis Exp* 2010; (35): 1652.
283. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:238-245.
284. Platt D, Klyosov AA, Zomer E. In: *Carbohydrate Drug Design*. Klyosov AA, Witczak ZJ, Platt D, editors. 2006. ACS Symposium Series 932. American Chemical Society, Washington, DC. p. 49–66.
285. Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI, Friedman SL. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liverdisease. *PLoS One* 2013; 8:e75361.
286. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, Bosse T, Vos AC, de Jonge-Muller ES, Roelofs H, van der Weerd L, Verspaget HW, Fibbe WE, te Velde AA, van den Brink GR, Hommes DW. Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells* 2011; 29:1549-58.
287. Demotte N, Bigirimana R, Wieërs G, Stroobant V, Squifflet JL, Carrasco J, Thielemans K, Baurain JF, Van Der Smissen P, Courtoy PJ, van der Bruggen P. A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2014; 20:1823-1833.
288. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, Jouault T, Mordon S, Sendid B, Desreumaux P, Poulain D Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008; 197:972-980.

289. Troke PF, Andrews RJ, Brammer KW, Marriott MS, Richardson K. Efficacy of UK-49,858 (fluconazole) against *Candida albicans* experimental infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:815-818.
290. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology* 2002; 49:15.19:15.19.1–15.19.14.
291. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243:107-124.
292. Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, Tschopp J, Endres S, Latz E, Schnurr M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010; 59:1192-1199.
293. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, Denning TL. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:4787-4795.
294. Weisser SB, van Rooijen N, Sly LM. Depletion and reconstitution of macrophages in mice. *J Vis Exp* 2012; (66):4105.
295. Call DR, Nemzek JA, Ebong SJ, Bolgos GL, Newcomb DE, Remick DG. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *Am J Pathol* 2001; 158:715-721.
296. Zindl CL, Lai JF, Lee YK, Maynard CL, Harbour SN, Ouyang W, Chaplin DD, Weaver CT. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:12768-12773.
297. Abe K, Nguyen KP, Fine SD, Mo JH, Shen C, Shenouda S, Corr M, Jung S, Lee J, Eckmann L, Raz E. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 23; 104:17022-17027.
298. Araki Y, Sugihara H, Hattori T. The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 2006; 17:331–334.

299. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:79–94.
300. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2008; 180:2466-2473.
301. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008; 172:247-255.
302. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, et al. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006; 168:1910-1920.
303. 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.
304. Kuwabara I. and Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156:3939–3944.
305. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; 230:160–171.
306. 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.
307. Hölscher C, Atkinson RA, Arendse B, Brown N, Myburgh E, Alber G, Brombacher F. A protective and agonistic function of IL-12 p40 in mycobacterial infection. *J Immunol* 2001; 167:6957–6966.
308. Louis J, Himmelrich H, Parra-Lopez C, Tacchini-Cottier F, Launois P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:459–464.
309. Brynskov J, Nielsen OH, Ahnfelt-Ronne I, Bendtzen K. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27:897–906.

310. Cappello M, Keshav S, Prince C, Jewell DP, Gordon S. Detection of mRNAs for macrophage products in inflammatory bowel disease by in situ hybridisation. *Gut* 1992; 33:1214–1219.
311. Savendahl L, Underwood LE, Haldeman KM, Ulshen MH, Lund PK. Fasting prevents experimental murine colitis produced by dextran sulfate sodium and decreases interleukin-1 beta and insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1997; 138:734–740.
312. Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology* 2003; 125:775–785.
313. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt GVP, Gillis S. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; 315:641–647.
314. Cominelli F, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis of and protection from inflammatory bowel disease. *Biotherapy* 1989; 1:369–375.
315. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:519–550.
316. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjoco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 β convertase activity. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:5227–5231.
317. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995; 267:2000–2003.
318. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227:95–105.
319. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10:241–247.
320. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:372–379.
321. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140:821–832.

322. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440:228–232.
323. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NLRP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid β . *Nat Immunol* 2008; 9:857–865.
324. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NLRP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440:237–241.
325. Korkina, L., Suprun, M., Petrova, A., Mikhal'chik, E., Luci, A., De Luca, C. The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and Aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *Biofactors* 2003; 18:255–264.
326. Moslen, M.T. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1994; 366:17–27.
327. Vray B, Camby I, Vercruyssen 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.
328. Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol* 2004; 25:650–654.
329. Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci* 2011; 64:85–91.
330. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Gosset 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; 75:5148–57.
331. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the

- capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45:531-543.
332. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1246:102–107.
333. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361:2033–2045.
334. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263–274.
335. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:571–578.
336. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16:219–230.
337. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994; 1:553–562.
338. Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, Toyonaga A, Tanikawa K. Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:435–440.
339. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:71–109.
340. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin 10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.

341. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226:205–218.
342. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:170–181.
343. Frigeri L, Zuberi R, 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.
344. Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM, Roque-Barreira MC, Mineo JR. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 2013;140:210-219.
345. Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, Sato Y, Kasuga N, Nakamura T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1438-1443.
346. Suzuki Y, Saito H, Kasanuki J, Kishimoto T, Tamura Y, Yoshida S. Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci* 1990; 47:2193–2197.
347. Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13:1016–1023.
348. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94:174–181.
349. Umehara Y, Kudo M, Nakaoka R, Kawasaki T, Shiomi M. Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 2006; 53:879–882.
350. Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, Yamamoto M, Tsuruta O, Sata M, Scheller J, Rose-John S, Kado S, Takada T. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor

- derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol* 2010; 184:1543–1551.
351. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, Laghi L, Barberis MC, Sessa F, Noonan DM, Albini A. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med* 2010; 8:112.
352. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6:583–588.
353. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15:103–113.
354. Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, Lee KH, Cho IH, Chung MH, Kim HR, Ye SK. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. *PLoS One*. 2012; 7:e38801.
355. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; 13:1042–1049.
356. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81:28–37.
357. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 2009; 58:859–868.

358. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170:3233–3242.
359. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112:935–945.
360. Fang Y, Shen J, Yao M, Beagley KW, Hambly BD, Bao S. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor enhances wound healing in diabetes via upregulation of proinflammatory cytokines. *Br J Dermatol* 2010; 162:478–486.
361. Dharmani P, Leung P, Chadee K. Tumor necrosis factor-alpha and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One* 2011; 6:e25058.
362. Smiley ST, Kaplan MH, Grusby MJ. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* 1997; 275:977–979.
363. Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, Van Kaer L. CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997; 6:469–477.
364. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1 T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995; 270:1845–1847.
365. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M. CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998; 188:1521–1528.
366. Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1 CD41 T cells produce large amounts of IL-4 and IFN- γ upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997; 159:2240–2249.
367. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Taura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for Va14 NK T cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278:1623–1626.

368. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a TH2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17:629–638.
369. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134:577–594.
370. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* 2004; 93:97–108.
371. Tlaskalová-Hogenová H, Tucková L, Stepánková R, Hudcovic T, Palová-Jelínková L, Kozáková H, Rossmann P, Sanchez D, Cinová J, Hrnčíř T, Kverka M, Frolová L, Uhlig H, Powrie F, Bland P. Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1051:787–798.
372. Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011:981214.
373. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8:564–577.
374. Hudcovic T, Stěpánková R, Cebra J, Tlaskalová-Hogenová H. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiologica* 2001; 46:565–572.
375. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118:229–241.
376. Fradin C, Poulain D, Jouault T. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* 2000; 68:4391–4398.

377. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 2006; 177:4718–4726.
378. Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS One*. 2013 18;8:e83481.
379. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009; 37:1445-1453.
380. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol* 2010; 185:6617-6623.
381. Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW, Le AD. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells* 2010; 28:1856-1868.
382. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005; 175:342-349.
383. Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, Roque-Barreira MC, Pereira-da-Silva G, Bernardes ES, Halbwachs-Mecarelli L. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS One*. 2011; 6:e26004.

