



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Далибор Д. Стајић

**УТИЦАЈ ГАЛЕКТИНА-3 У МОДУЛАЦИЈИ
ПОНАШАЊА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**Коментори: проф. др Миодраг Л. Лукић
проф. др Гвозден Росић**

Крагујевац, 2019. године.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Анксиозни поремећаји	2
1.1.1. Фактори одговорни за настанак анксиозних поремећаја	3
1.1.1.1. Улога ГАВАергичког система у контроли степена анксиозности	5
1.1.1.2. Улога BDNF-а у контроли степена анксиозности	6
1.1.2. Бихевиорални тестови за процену степена анксиозности на анималним моделима	7
1.1.2.1. Обрасци понашања у анимални експерименталним моделима	7
1.1.2.2. Тестови за процену степена анксиозности на анималним моделима	8
1.1.2.3. Тест отвореног поља (ОП тест)	8
1.1.2.4. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест).....	9
1.2. Депресивни поремећаји	11
1.2.1. Фактори одговорни за настанак депресивних поремећаја	12
1.2.1.1. Улога ГАВАергичког система у настанку депресивних поремећаја	13
1.2.1.2. Улога BDNF-а у настанку депресивних поремећаја	14
1.2.2. Бихевиорални тестови за процену степена депресивности на анималним моделима	15
1.2.2.1. Тест качења за реп (ТКР тест)	15
1.3. Инфламација	16
1.3.1. Активација рецептора за препознавање образаца у инфламацији	17
1.3.2. Активација инфламацијских путева.....	17
1.3.2.1. Сигнални пут NF-κB.....	18
1.3.2.2. Сигнални пут MAPK	18
1.3.2.3. Сигнални пут JAK-STAT	18
1.3.3. Маркери инфламације	19
1.3.4. Проинфламацијски цитокини	19
1.3.4.1. IL-6- основне карактеристике и улоге	20
1.3.4.2. TNF-α- основне карактеристике и улоге	20
1.3.5. Проинфламацијски протеини и ензими	21
1.3.6. Типови ћелија које учествују у инфламацијским одговорима ...	22
1.3.7. Неуроинфламација	23
1.3.7.1. Улога IL-6 у одржавању хомеостазе нервног ткива и неуроинфламацији	25
1.3.7.2. Улога TNF-α у одржавању хомеостазе нервног система и неуроинфламацији	26
1.3.7.3. Анимални модели неуроинфламације индуковани применом липополисахарида	27
1.3.7.4. Неуроинфламација и поремећаји понашања.....	28
1.4. Лектини	30
1.4.1. Галектини	31
1.4.2. Галектин-3.....	34
1.4.2.1. Идентификација галектина-3.....	34

1.4.2.2. Gal-3 – дистрибуција у ткивима	34
1.4.2.3. Структура молекула Gal-3	35
1.4.2.4. Структура гена за Gal-3.....	36
1.4.2.5. Регулација експресије Gal-3	37
1.4.2.6. Локализација Gal-3	38
1.4.2.7. Секретија Gal-3.....	38
1.4.2.8. Лиганди Gal-3 и различите улоге Gal-3 условљене локализацијом	39
1.4.2.8.1. Екстрацелуларни лиганди Gal-3 и улоге екстрацелуларног Gal-3	39
1.4.2.8.2. Интрацелуларни лиганди Gal-3 и улоге интрацелуларног Gal-3.....	41
1.4.2.9. Улога Gal-3 у имунском систему	42
1.4.2.10. Улога Gal-3 у модулацији имунског одговора.....	44
1.4.2.11. Улога Gal-3 током интеракција патогених микроорганизама и домаћина.....	45
1.4.2.12. Улога Gal-3 у одређеним патофизиолошким процесима.....	45
1.4.2.13. Експресија и улоге Gal-3 у нервном систему	47
1.4.2.13.1. Gal-3 и сигнализација у глијалним ћелијама.....	47
1.4.2.13.2. Gal-3 и неуроинфламација	48
1.4.2.13.3. Експресија и улога галектина-3 код исхемијског оштећења мозга	49
1.4.2.13.4. Експресија и улога Gal-3 код трауматске повреде CNS-а	50
1.4.2.13.5. Експресија и улога Gal-3 код вирусних енцефалитиса и прионских болести.....	51
1.4.2.13.6. Улога Gal-3 у неуродегенеративним болестима	51
1.4.2.14. Gal-3 и понашање	52
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	54
2.1. Циљеве истраживања	55
2.2 Хипотезе истраживања	56
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	57
3.1. Услови под којима су животиње одгајане и чуване током експерименталних протокола.....	58
3.2. Методологија за добијање LGALS3-/- мишева.....	59
3.3. Експерименталне групе и третман.....	61
3.4. Бихевиорална тестирања	62
3.4.1. Тест отвореног поља	62
3.4.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта	64
3.4.3. Тест качења за реп.....	66
3.4.4. Снимање и анализа видео записа	67
3.5. Жртвовање животиња и прикупљање узорака за анализе ...	68
3.7. Хистолошка анализа ткива хипокампуса.....	69
3.7.1. Израда препарата.....	69
3.7.2. Бојење хематоксилином и еозином	69
3.8. Имунохистохемијска анализа.....	71
3.8.1. Израда препарата.....	71

3.8.2. Бојење препарата - детекција BDNF-имунореактивних неурона	71
3.8.3. Бројање BDNF-имунореактивних неурона.....	72
3.9. Одређивање концентрације цитокина у хомогенату ткива хипокампуса ELISA методом.....	74
3.10. Анализа експресије гена у ткиву хипокампуса методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену	76
3.10.1. Изолација RNA из ткива хипокампуса мишева	76
3.10.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA	77
3.10.3. Квантификација експресије гена	77
3.11. Статистичка анализа	79
4. РЕЗУЛТАТИ	80
4.1. Бихевиорални тестови	81
4.1.1. Тест отвореног поља	81
4.1.1.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупни пређени пут	81
4.1.1.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време кретања.....	82
4.1.1.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време проведено у централној зони	83
4.1.1.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број улазака у централну зону	84
4.1.1.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број усправљања.....	85
4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта	86
4.1.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупни пређени пут	86
4.1.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време кретања.....	87
4.1.2.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време проведено у отвореним крацима	88
4.1.2.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број улазака у отворене краке	89
4.1.2.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број епизода укупне експлоративне активности.....	90
4.1.3. Тест качења за реп.....	91
4.1.3.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на време до појаве прве имобилности	91
4.1.3.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број епизода имобилности	92
4.1.3.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време имобилности.....	93
4.1.3.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на просечно трајање епизоде имобилности.....	94
4.2. Имунохистохемијска испитивања – анализа броја и дистрибуције BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу	95

4.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса.....	95
4.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 региону хипокампуса.....	97
4.2.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у DG региону хипокампуса	99
4.2.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупан број BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу ..	101
4.3. Утицај експресије гена за BDNF, GABA-AR2S, GABA-AR5S, TLR4 и цитокина у ткиву хипокампуса (резултати qRT-PCR-а).....	102
4.3.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за BDNF у хипокампусу.....	102
4.3.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за GABA-AR2S у хипокампусу.....	103
4.3.3 Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за GABA-AR5S у хипокампусу.....	104
4.3.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за TLR4 у хипокампусу.....	105
4.3.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за IL-6 у хипокампусу	106
4.3.6. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за TNF- α у хипокампусу	107
4.4. Испитивања концентрације цитокина у ткиву хипокампуса (резултати ELISA теста).....	108
4.4.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на концентрацију IL-6 у хипокампусу	108
4.4.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на концентрацију TNF- α у хипокампусу	109
4.5. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR2S, GABA-AR5S, BDNF и цитокина у хипокампусу и параметара добијених у бихевиоралним тестовима.....	110
4.5.1. Анализа међусобне повезаности експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу	110
4.5.2. Анализа међусобне повезаности експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу.....	112
4.5.3. Анализа међусобне повезаности експресије гена за BDNF и GABA-AR2S у хипокампусу.....	114
4.5.4. Анализа међусобне повезаности експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу.....	116
4.5.5. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног временаведеног у централној зони у тесту отвореног поља.....	118

4.5.6. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима у тесту уздигнутог крстастог лавиринта.....	120
4.5.7. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности у тесту качења за реп.....	122
5. ДИСКУСИЈА	124
5.1. Утицај делеције гена за Gal-3 на понашање у базалним условима.....	127
5.1.1. Утицај делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова за процену степена анксиозности у базалним условима.....	127
5.1.2. Утицај делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова за процену степена депресивности у базалним условима.....	130
5.1.3. Повезаност делеције гена за Gal-3, промена у понашању, цитокина, TLR4, BDNF-а, GABA-AR2S и GABA-AR2S у хипокампусу, у базалним условима.....	131
5.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на понашање	134
5.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на резултате бихевиоралних тестова за процену степена анксиозности.....	134
5.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на резултате бихевиоралних тестова за процену степена депресивности	136
5.2.3. Повезаност делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом са променама у понашању и проинфламацијским цитокинима, TLR4, BDNF-ом, GABA-AR2S и GABA-AR5S у хипокампусу	137
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	140
7. РЕФЕРЕНЦЕ.....	144
СКРАЋЕНИЦЕ	189

1.

УВОД

1.1. Анксиозни поремећаји

Анксиозност је емоционално стање праћено осећањем нелагоде, немира и напетости, антиципацијом могуће опасности, као и бројним променама физиолошких функција. Анксиозност се разликује од страха и представља претерану реакцију на ситуацију која се само субјективно сматра претећом, а често је праћена осећањем забринутости, мишићном напеташћу, узнемиренашћу, умором и проблемима са концентрацијом (1). Анксиозни поремећаји се налазе међу најчешћим здравственим проблемима, 4.5% популације има неки анксиозни поремећај, док се код 5-30% људи ови поремећаји могу јавити током животног века (2). Анксиозни поремећаји су учесталији код жена (5.2%) у односу на мушкарце (2.8%) и углавном се јављају пре 25 године. Најчешће се јављају фобије и социјални анксиозни поремећаји (2-4).

Према Дијагностичком и статистичком приручнику за менталне поремећаје (енгл. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition, DSM-5*), анксиозни поремећаји обухватају сепарацијску анксиозност, селективни мутизам, специфичну фобију, социјалне анксиозне поремећаје (социјалне фобије), панични поремећај, агорафобију, генерализовани анксиозни поремећај, поремећај анксиозности изазван супстанцама или лековима и анксиозне поремећаје који прате неко друго обољење (5). Анксиозне особе често избегавају ситуације које су у прошлости изазвале узнемиреност (6). Егзистенцијална анксиозност се може јавити када се особа суочи са страхом, егзистенцијалном кризом или нихилистичким осећањима. Такође се може јавити соматска анксиозност, страх од јавног наступа или испита. Социјална анксиозност се карактерише узнемиренашћу и нелагодом у ситуацијама када треба да се остваре контакти са другим (непознатим) људима. Хормони стреса који се ослобађају у анксиозном стању имају утицај на функцију дигестивног тракта, при чему се јављају физички симптоми који могу допринети настанку или погоршати синдром иритабилног колона. Анксиозност се често јавља код особа које имају опсесивно компулзивни и панични поремећај. Први корак у лечењу особе са симптомима анксиозности подразумева процену присуства могућег медицинског узрока, чије је препознавање неопходно да би се спровела одговарајућа терапија (7, 8). Симптоми анксиозности могу прикрити органску болест, или се појавити као последица соматског поремећаја (7-10).

Симптоми анксиозности манифестују се на четири главна подручја: емоционалном, когнитивном, бихевиоралном и соматском. Телесне промене су праћене кардиоваскуларним, респираторним, гастроинтестиналним и другим променама проузрокованим активношћу аутономног нервног система, који мобилише тело на суочавање са предстојећим проблемом. Од неуролошких симптома јавља се главобоља, парестезије и вртоглавица, док су најчешћи дигестивни симптоми бол у трбуху, мучнина, дијареја, поремећаји варења и сува уста. Симптоми од стране респираторног тракта се јављају у виду кратког даха, а од симптома кардиоваскуларног тракта присутне су палпитације, тахикардија или бол у грудима. Симптоми од стране мишићног система јављају се као умор, дрхтање или тетанија. Јавља се појачано знојење или свраб коже, а симптоми уrogenиталног тракта испољавају се у виду учесталог мокрења, диспареуније или импотенције (7). Телесни симптоми су доминантни код сепарацијске анксиозности и паничног напада. Субјективни доживљаји су обично праћени физиолошким променама (нпр. осећање нелагоде, слабости и несигурности је праћено мишићном напетостју; страх да ће се изгубити контрола или свест праћено је убрзаним лупањем срца). Телесни симптоми могу бити праћени анксиозношћу која представља интензивни страх да ће телесни симптоми попут лупања срца, дрхтања или болова у трбуху имати негативне социјалне, психолошке или телесне поседице. Од когнитивних поремећаја јавља се интелектуална конфузија, антиципација несреће и забринутост. Код анксиозности се јавља когнитивна дезорганизација, што доприноси још већој узнемирености. Бихевиоралне манифестације праћене су: избегавањем опасности, ослабљеном координацијом и стереотипијама. Понашање у виду избегавања опасности је карактеристично за фобије. Опсесивно-компулзивни поремећаји праћени су стереотипијама. У социјалним анксиозним поремећајима чешће се јавља ослабљена координација у облику неспретности, тремора, или потпуне укочености. Анксиозни поремећаји у суштини представљају веома комплексни психолошки феномен који је праћени спектром различитих промена (11).

1.1.1. Фактори одговорни за настанак анксиозних поремећаја

Захваљујући студијама близанаца установљено је да су за 30-40% анксиозних поремећаја одговорни генетски фактори и да средина такође има велики утицај на појаву анксиозности, нарочито у периоду детињства. Ризик за настанак анксиозних

поремећаја повећавају злоставље у детињству, постојање породичне историје поремећаја менталног здравља и сиромаштво (12). Ови поремећаји су такође повезани са употребом дрога, алкохола, кофеина и бензодиазепина (који се често прописују за лечење анксиозности). Анксиозни поремећаји се често јављају у склопу других поремећаја менталног здравља, нарочито су заступљени код великог депресивног поремећаја, биполарног поремећаја, поремећаја у исхрани или одређених поремећаја личности. Ови поремећаји се такође чешће јављају код особа са одређеним цртама личности као што је неуротицизам (13, 14).

У основи анксиозности налазе се неуроанатомска и неуроендокрина дисфункција, као и поремећаји неуротрансмитера и неуропептида. Битну улогу у настанку анксиозности имају поремећаји структуре и функције одређених региона мозга, попут лимбичког система (15). Хипокампус, као важна структура лимбичког система има значајну улогу у когнитивним процесима, као што је епизодично памћење и просторна оријентација (дорзални део хипокампуса), а такође учествује у регулацији емоција и патогенези поремећаја расположења и анксиозности (вентрални део хипокампуса) (16, 17). Утврђено је да лезије вентралног хипокампуса имају анксиолитички ефекат (18, 19) и да манипулације са аферентним или еферентним неуронским путевима вентралног хипокампуса могу утицати на настанак анксиозности (20-27). Хипокампус се састоји од дентатног гируса (лат. *gyrus dentatus*, DG) и амоновог рога (лат. *cornu ammonis*, CA), који је подељен на регионе CA1, CA2, CA3 и CA4 (28). Хипокампус комуницира са другим субкортикалним структурама у које спадају амигдале и латерални хипоталамус (29-32), који такође имају битну улогу у контроли понашања које је повезано са анксиозношћу (27, 33, 34). Недавна истраживања су потврдила да је вентрални CA1 регион хипокампуса богат ћелијама које се активирају у анксиогеним ситуацијама и током понашања избегавања (27). Доказано је да стрес може утицати на волумен хипокампуса и неурогенезу, а да је редукција волумена хипокампуса повезана са поремећајима расположења и различитим анксиозним поремећајима (27, 35-38).

Истраживања су потврдила и велики значај поремећаја одређених неуротрансмитера и неуропептида у настанку анксиозности. Моноаминска хипотеза истиче да у настанку анксиозности важну улогу има поремећај функције норадренергичког, серотонергичког и допаминергичког система (39). Доказано је да настанку анксиозности доприноси и дисфункција глутаматергичког, холинергичког и ГАВАергичког (енгл. *gamma-amino butyric acid*, GABA) система (40-42). У настанку

овог поремећаја потврђена је и улога кортикотропин-ослобађајућег фактора (енгл. *corticotropin releasing factor*, CRF), хипофизног аденилат циклаза-активирајућег полипептида (енгл. *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, PACAP), холецистокинина, аденозина, мелатонина, супстанце P, као и неуротрофног фактора раста пореклом из мозга (енгл. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) (43-46).

1.1.1.1. Улога ГАВАергичког система у контроли степена анксиозности

ГАВА је веома важан инхибиторни неуротрансмитер, а ГАВАергични систем представља најбитнији инхибиторни механизам у мозгу сисара (47). Доказано је да чак и блага атенуација ГАВАергичног система изазива настанак немира, несанице, узбуђења, анксиозности и претеране реактивности. Велика заступљеност ГАВАергичних неурона је уочена у одређеним регионима мозга, као што су мождана кора, хипокампус, таламус, базалне ганглије, церебелум, хипоталамус и мождано стабло (48). Посебно је важна улога хипокампалног ГАВАергичког система. Хипокампус има две групе неурона: главне неуроне (одговорне за екстрахипокампалне везе) и интернеуроне (одговорне за локалне везе унутар хипокампуса-претежно ГАВАергичке) (49). ГАВА интернеурони имају главну улогу у модулацији локалних норадренергичких, допаминергичких, серотонергичких и глутаматергичних неуронских кола (50). Основни инхибиторни механизам у ГАВАергичком систему подразумева активацију постсинаптичких ГАВА-А рецептора, што узрокује настанак инхибиторних постсинаптичких потенцијала у хипокампусу и смањење ослобађања ексцитаторних трансмитера (51-53). Ову функцију ГАВА остварује помоћу две главне класе ГАВАергичких рецептора, брзих ГАВА-А и спорих ГАВА-В рецептора. Након активације ГАВА-А рецептора настаје брзи инхибиторни постсинаптички потенцијал. ГАВА-А рецептори су пентамери састављени од две α , две β и једне γ субјединице. Ови рецептори имају најмање 16 идентификованих субјединица. ГАВА-А рецептори се примарно налазе у специфичним регионима мозга, као што је хипокампус. ГАВА-А α -2 рецепторска субјединица (енгл. *GABA receptor subunit alpha-2*, GABRA2, ГАВА-AR2S) има анксиолитичку активност и кључну улогу у контроли емоционалних и бихевиоралних функција (54, 55). Истраживања су показала да су осећај страха и анксиозност повезани са смањеним нивоом још једне битне рецепторске субјединице, GABRA5 (ГАВА-AR5S) (56, 57). Хипокампална ГАВАергична дисфункција има битну

улогу у патогенези различитих поремећаја расположења, а нарочито је битана у настанку анксиозности (58-60).

1.1.1.2. Улога BDNF-а у контроли степена анксиозности

BDNF је неуротрофин који утиче на опстанак, раст и диференцијацију неурона централног и периферног нервног система и модификацију синапси (61). Посебно је значајна активност BDNF-а у хипокампусу, кортексу и предњем базалном делу мозга - областима виталним за учење, памћење и размишљање. (62). Недавна истраживања су открила да полиморфизам једног нуклеотида у кодирајућем региону гена за BDNF (*Val66Met*) представља фактор ризика за настанак анксиозних и посттрауматских стресних поремећаја (63, 64). Генетска варијација која узрокује супституцију валина метионином у кодону 66, ограничава интрацелуларни промет и ослобађање хипокампалног BDNF-а. Носиоци овог алела имају смањен волумен хипокампуса, дефиците у меморији зависној од хипокампуса и измењени одговор на емоционалне надражаје (65-72). Од посебног значаја у настанку анксиозности је постојање абнормалног хипокампадног BDNF система. Редукција волумена хипокампуса и дисфункционални хипокампус представљају предиспонирајуће факторе за настанак посттрауматских стресних поремећаја (73, 74). Истраживања су показала да су ниски нивои BDNF-а код људи повезани са мањим волуменом хипокампуса и поремећајима расположења (75, 76). Веза између ниских нивоа BDNF-а и поремећаја расположења (такозвана “хипотеза неуротрофина”) потврђена је повећањем BDNF-сигнализације у хипокампусу након примене антидепресива (77, 78). Истраживања су потврдила да смањење концентрације BDNF-а у посттрауматском стресном поремећају има анксиогени ефекат, јер узрокује редукцију активности GABA-A рецептора и броја хипокампаљних неурона и настанак хипокампаљне атрофије (79, 80). Доказано је да је BDNF важан за нормалну функцију хипокампуса и у анималним моделима. Ниски нивои BDNF-а или смањено ослобађање BDNF-а узроковано присуством *Val66Met* доводи до редукције волумена хипокампуса, настанка понашања повезаног са анксиозношћу и смањења ефикасности антидепресива (61). Епигенетске модификације гена за BDNF су повезане са анксиозношћу и специфичним обрасцима неуронске активности. У истраживању генома такође је утврђена повезаност полиморфизма гена за BDNF рецептор (енгл. *neurotrophic receptor tyrosine kinase 2*, NTRK2) и анксиозности (81, 82).

1.1.2. Бихевиорални тестови за процену степена анксиозности на анималним моделима

1.1.2.1. Обрасци понашања у анимални експерименталним моделима

Анимални модели представљају такву врсту експерименталних модела у којима се животиње користе у различитим научним истраживањима, са циљем бољег разумевања физиолошких и патолошких процеса код човека. Најчешћи анимални модели који се користе у психологији и социологији су анимални модели понашања, а основна сврха њихове употребе је разумевање механизма који контролишу нормално и патолошко понашање. Анимални модели су изузетно важни у анализи узрока одговорних за настанак симптома који су хомологни симптомима пацијената са одређеним обољењима. Анимални модели менталних поремећаја који се примењују у медицинским наукама омогућавају испитивање различитих бихевиоралних и физиолошких промена карактеристичних за одређено емоционално стање, проучавање етиологије болести и испитивање ефеката терапијских интервенција. При раду са анималним моделима за проучавање појединих аспеката људске психопатологије, код животиња се изазива настанак одређених синдрома који су слични синдромима код људи. Откриће бензодиазепина почетком шездесетих година двадесетог века и њихов значајан комерцијални успех у лечењу анксиозности подстакао је развој бројних анималних модела анксиозности (83).

Анксиозност омогућава препознавање опасности, односно непознате или нејасне унутрашње или спољашње претње. Страх је сличан сигнал упозорења, али се разликује од анксиозности по томе што представља одговор на познату, дефинитивну, неконфликтну претњу. Овај одговор се карактерише физиолошким реакцијама, као и променама у понашању (престанком дотадашњег понашања, осматрањем околине, избегавањем извора опасности итд.). Када је овај одговор претеран или маладаптиван, реч је о "патолошкој" анксиозности (84). Иако анимални модели не могу савршено представити сложену хуману неуропсихопатологију, они имају фундаментални значај у проучавању неуропсихијатријских поремећаја (85, 86). Основне предности анималних модела су могућност лаког набављања, одржавања, руковања, економска исплативост и већа репродукцибилност истраживања у поређењу са клиничким студијама (87, 88). С обзиром на ове предности, развијени су многи анимални модели за испитивање

анксиозних поремећаја који се користе за проучавање промена у понашању животиња након излагања различитим врстама стресора. Модели у којима се користе глодари (пацови и мишеви) су најчешће коришћени модели у неурофизиолошким и психијатријским студијама (89). Истраживање механизма менталних поремећаја на анималним моделима често доводи у питање постојање еквивалентности са људима, међутим постоје многи докази сличности између глодара и човека, који се пре свега заснивају у организацији нервног и ендокриног система (90). Поред тога, еквивалентност постоји и у основним когнитивним процесима и понашању повезаним са анксиозношћу, као што су условно учење, антиципација опасности, избегавање, замрзавање (прекид кретања) и бекство, који уједно представљају и важне механизме преживљавања (91, 92).

1.1.2.2. Тестови за процену степена анксиозности на анималним моделима

Тестови за процену степена анксиозности спроводе се у контролисаним експерименталним условима и омогућавају добијање параметара на основу којих се прецизно може одредити степен анксиозности експерименталних животиња. Тестови се заснивају на изазивању одређених бихевиоралних одговора животиња које се налазе у анксиогеним ситуацијама. У основи одговора се налази постојање конфликта између потребе за испитивањем новог терена и инстинкта да се избегну светле и отворене површине на којима би животиње биле изложене потенцијалним предаторима.

1.1.2.3. Тест отвореног поља (ОП тест)

Тест отвореног поља (енгл. *open field test*, OF) је првобитно описао *Hall* 1934. године, а тест се користио за проучавање емоционалног статуса код пацова. Поступак се састојао од постављања животиње (глодара) у непознато окружење из којег је немогуће бекство (93-95). Тест отвореног поља се користи за иницијалну процену понашања сличног анксиозности код глодара. Овај тест подразумева присилну конфронтацију глодара са новом безизлазном ситуацијом (арена је у виду отворене кутије квадратног облика). Животиња се поставља у центар или близу зидова арене и њено понашање се снима у периоду од 2 до 20 мин (обично 5 мин). Непосредним посматрањем или помоћу камере прате се одређени параметри локомоторне и експлоративне активности који представљају индикаторе анксиозности. Најважнији

директни индикатори анксиозности у овом тесту су број улазака и укупно време проведено у централној зони. Повећање степена анксиозности праћено је смањењем вредности ових параметара. У оваквим ситуацијама, глодари више времена проводе на периферији и крећу се близу зидова арене, а ово понашање је познато као тигмотакса. Узрок анксиозног понашања у отвореном пољу су индивидуално тестирање (животиња је одвојена од своје групе) и урођени страх глодара од отворених и светлих површина (арена је доста већа у односу на услове узгоја животиња или природног окружења и не постоји могућност заштите од потенцијалних предатора). Ова два фактора могу покренути анксиозно понашање код животиња које показују страх од отворених простора. То је управо случај са глодарима који у природном условима живе у друштвеним групама у малим тунелима. За процену степена анксиозности користе се и параметри који изворно служе за процену локомоторне активности као што су укупни пређени пут и укупно време кретања, као и параметри експлоративне активности (број усправљања). Смањење вредности ових параметара такође указује на повећање степена анксиозности, а главни разлог је тај што животиње заузимају природни одбрамбени став са сва четири екстремитета на подлози, како би биле спремне за брзи бег од могуће опасности (94, 96). Понашање животиње у овом тесту зависи и од одређених услова у којима се тест спроводи, услова осветљења, температуре итд. Анксиозни одговор који се примећује код животиње аналоган је оном који се запажа код људи. У тесту отвореног поља, посматра се понашање које се карактерише избегавањем угрожавајућих места. Код глодара, присилна конфронтација са новим окружењем је стресна (97). Стрес изазива анксиозно понашање, што може послужити за проучавање механизма анксиозности који се могу применити и у људској популацији.

1.1.2.4. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ тест)

Уздигнути крстасти лавиринт (енгл. *elevated plus maze*, ЕРМ) је један од најчешће коришћених тестова за процену понашања сличног анксиозности (98, 99). Његова популарност се углавном заснива на могућности брзог испитивања ефеката потенцијалних анксиолитика или генетски модификованих лабораторијских глодара без претходног тренинга и посебних припрема животиња (99). Уздигнути крстасти лавиринт се састоји од два отворена и два затворена крака који се налазе под правим углом. Када се експериментална животиња постави у овај лавиринт прати се њено кретање, боравак и укупан број улазака у одређене кракове лавиринта. Код животиња

се јавља конфликт између потребе за истраживањем новог окружења, одласка у отворене (небезбедне) делове лавиринта и нагона за скривањем у затвореним крацима у којима се животиња осећа сигурно. Овај конфликт је додатно продубљен и урођеним страхом глодара од висине, јер се платформа на којој се тестира животиња налази на висини од 100 cm. Анксиолитици омогућавају превазилажење инхибиције истраживања отворених кракова узроковане страхом животиња од отвореног простора, док анксиогени агенси смањују експлоративну активност у отвореним крацима. Обрасци понашања у уздигнутом крстастом лавиринту могу се разликовати код различитих сојева или врста животиња, или зависити од услова окружења, попут интензитета светлости, нивоа буке итд. (100). У тесту се такође прате параметри локомоторне активности (укупни пређени пут и укупно време кретања животиње). Круцијални индикатори стања анксиозности су укупно време проведено у отвореним крацима и број улазака у отворене краке. Смањење вредности ових параметара указује на повећање степена анксиозности. Како би се приступило што бољој интерпретацији понашања животиња у овом тесту, уведени су нови параметри који указују на степен анксиозности, као што је тимарење, нагињање преко отворених кракова и усправљање на задње шапе. На повећање степена анксиозности указује и смањење експлоративне активности (смањење усправљања животиње и нагињања преко ивице отворених кракова) (101-103).

1.2. Депресивни поремећаји

Депресија је ментални поремећај који се карактерише постојањем нерасположења, ниским самопоштовањем, осећајем кривице, губитком интересовања за уобичајне активности, смањењем енергије, поремећајем концентрације, сна и апетита и болом без јасног узрока, у трајању од најмање две недеље (104). Депресивни периоди могу бити одвојени периодима без симптома, док код одређеног броја оболелих депресивни симптоми могу трајати у континуитету. Депресија може негативно утицати на живот, рад, образовање и опште здравље оболелих (5). Истраживања су показала да између 2 и 8% оболелих од депресије изврши самоубиство (105, 106). Депресија траје дуже од туге, која представља нормалну реакцију након узнемирујућих догађаја или губитка блиске особе (5). Преваљенца депресивних поремећаја током животног века износи 17% на глобалном нивоу, а у 50-60% случајева је удружена са анксиозношћу (107). Ови поремећаји се чешће јављају у развијенијим земљама, најчесталији су у двадесетим и тридесетим годинама живота, а жене имају два пута већи ризик да оболе од мушкараца (5, 108, 109). Депресивни људи су обично преокупирани мислима и осећањима безвредности, кривице или жаљења, беспомоћности, безнађа и мржње према себи. У тешким случајевима, оболели од депресије могу имати симптоме психозе. У симптоме депресије спадају и смањена концентрација и ослабљено памћење (посебно код особа са меланхоличним или психотичним карактеристикама), повлачење из социјалних ситуација и активности, смањен сексуални нагон, раздражљивост и мисли о смрти или самоубиству (110, 111). Несаница је уобичајени симптом код депресивних пацијената. Оболели од депресије се веома рано буде и имају потешкоће да опет заспе, а насупротив овоме, може се јавити хиперсомнија. Неки антидепресиви такође могу изазвати несаницу због њиховог стимулативног ефекта. Оболели од депресије може имати више физичких симптома као што су умор, главобоља или проблеми са дигестивним трактом. Ови симптоми се чешће јављају код оболелих од депресије у земљама у развоју (112). Смањење апетита доводи до губитка тежине код оболелих, мада се повремено може јавити и повећан апетит и гојазност. Оболели од депресије често постају узнемирени или летаргични (113). Старије особе оболеле од депресије могу имати когнитивне симптоме, као што су заборавност и приметно успоравање покрета. Депресија се у овој популацији често јавља заједно са соматским болестима

које су уобичајене за старије особе, као што су малигне болести, дијабетес мелитус тип 2, мождани удар и друге кардиоваскуларне болести (114).

Према петој ревизији DSM класификације менталних поремећаја, депресивни поремећаји издвојени су као посебна група у оквиру које се као најважнији истиче велики депресивни поремећај (појединачна и рекурентна депресивна епизода), дистимија или перзистентни депресивни поремећај, пременструални дисфорични поремећај, депресивни поремећаји узроковани употребом лекова/супстанци, депресивни поремећај узрокован другим медицинским стањем и други депресивни поремећаји (5).

1.2.1. Фактори одговорни за настанак депресивних поремећаја

Сматра се да је за настанак депресије одговорна комбинација генетских, психолошких фактора и фактора средине. У факторе ризика спадају позитивна породична анамнеза, велике животне промене, одређени лекови, хронични здравствени проблеми и злоупотреба одређених супстанци. Око 40% ризика за настанак депресије повезано је са генетиком (5). Генетски утицај је израженији код оболелих од тежих облика депресије и код облика депресије са ранијим почетком (115, 116).

Важну улогу у настанку депресије има поремећај структуре и функције одређених региона церебралног кортекса и лимбичког система (117). Настанку депресије могу допринети и стрес, проинфламацијски цитокини и ендокрини поремећаји. Бројне хипотезе о настанку депресије истичу значај поремећаја функције и концентрације неуротрансмitera или неурорегулатора у можданим центрима одговорним за регулацију расположења.

Новија истраживања указала су на постојање разлике у структури и активности одређених региона мозга код оболелих од депресије у односу на здраве испитанике. (118). Поремећаји на нивоу неокортекса и хипокампуса су значајни за настанак когнитивних поремећаја у депресији, као што су осећај безвредности, аутоакузација и суицидалне мисли, док поремећаји на нивоу стриатума и амигдала узрокују губитак задовољства и мотивације и настанак анксиозности (119, 120).

Изложеност стресу може бити један од веома важних узрока настанка депресивних поремећаја. Стрес изазива поремећај функције осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда (121). Истраживања су показала да полиморфизам гена за кортикотропин-ослобађајући хормонски рецептор 1 (енгл. *corticotropin-releasing*

hormone receptor 1, CRHR1) и повећана секреција кортизола могу бити одговорни за настанак поремећаја расположења (43, 122, 123).

У последње време се истиче значај проинфламацијских цитокина у настанку депресије (124). Повећани нивои проинфламацијских цитокина утичу на рад ендокриног система, метаболизам неуротрансмитера и функционисање можданих синапси, што за последицу може имати настанак промена у понашању (125). Смањење функције штитасте и надбубрежне жлезде може утицати на настанак депресије (123). Нагло смањење нивоа хормона прогестерона и естрадиола изазива промене расположења и сматра се главним узроком постпорођајне депресије (126).

Поремећеји на нивоу одређених неуротрансмитера такође могу узроковати настанак депресије. Серотонин, допамин и норадреналин су моноамински неуротрансмитери у централном нервном систему (енгл. *central nervous system*, CNS) сисара који имају битну улогу у регулацији расположења, емоција и когнитивних функција. Они су такође важни у контроли анксиозности, апетита и либида (127). Код афективних поремећаја установљен је поремећај концентрација ових неуротрнсмитера, као и поремећај осетљивости њихових рецептора у мозгу. Истраживања су показала да у настанку депресивних поремећаја важну улогу имају норадреналин и серотонин, док је за настанак маничних поремећаја битан допамин (123). Према катехоламинској теорији, код оболелих од депресије у урину се детектују снижене вредности метаболита норадреналина, МНPG-а (енгл. *3-metoksi, 4-hidroksi-fenil-etilenglikol*). У депресији се може јавити и поремећај активности ензима тирозин-хидроксилазе, који има важну улогу у синтези норадреналина, као и смањена активност допамина, што узрокује настанак анхедоније (128). У ликвору оболелих од депресије такође се налазе ниже концентрације метаболита серотонина, 5-хидрокси-индол-сирћетне киселине (енгл. *5-hydroxy-indole-acetic acid*, 5-НИАА). Код пацијената са афективним поремећајима редукован је ниво серотонина у мозгу или се може јавити поремећај на нивоу серотонинских рецептора (129).

1.2.1.1. Улога ГАВАергичког система у настанку депресивних поремећаја

Смањење концентрације главног инхибиторног неуротрансмитера у мозгу, ГАВА-е такође може условити настанак депресивних поремећаја (108). Истраживањима спроведеним код пацијената са депресијом, поред смањења концентрације ГАВА-е у мозгу, установљена је и промена у функцији и саставу

субјединица GABA-A рецептора. GABA има веома битну улогу у контроли одговора на стрес, а стрес представља битан фактор за настанак поремећаја расположења. GABAергичка сигнализација је веома важна у хипокампадној неурогенези и матурацији неурона. Недостатак GABAергичке сигнализације код мишева са дефицијенцијом GABA-A рецептора узрокује настанак бихевиоралних, когнитивних, неуроанатомских и неуроендокриних поремећаја (107).

1.2.1.2. Улога BDNF-а у настанку депресивних поремећаја

Неуротрофинска теорија истиче значај смањења нивоа BDNF-а у патофизиологији депресије, као и да се поновно успостављање физиолошких нивоа BDNF-а налази у основи ефикасне терапије антидепресивима. Међутим ова битна улога смањења BDNF-а у настанку депресије се односи углавном на регион хипокампуса, док су резултати истраживања мезолибичког BDNF-а били неконзистентни. Хронични стрес узрокује смањење нивоа неуротрофина, што доводи до редукције неурогенезе и значајне атрофије хипокампуса, региона мозга који има битну улогу у контроли емоција. За одговарајућу неурогенезу је неопходна координација и одговарајућа регулација ћелијске пролиферације, миграције, диференцијације и ћелијске смрти, а сви ови процеси су посредовани неуротрофинима. BDNF подстиче преживљавање неурона у централном нервном систему, везујући се за *TrkB* (енгл. *tyrosine receptor kinase B*) на циљним неуронима, а остварује и неуропротективно дејство. Активација митогенима посредованог протеин-киназног пута повећава експресију антиапоптотског молекула *bcl-2* (енгл. *B-cell lymphoma 2*) и инхибира настанак апоптозе неурона. *Post-mortem* анализама је детектовано смањење експресије BDNF-а и *TrkB* у хипокампусу депресивних и суицидалних пацијената, док су повишени нивои пронађени код пацијената који су пре смрти били на антидепресантној терапији. Истраживања код пацијената са депресијом су такође указала на то да полиморфизма нуклеотида у гену за BDNF може имати битну улогу у патогенези депресије (130).

1.2.2. Бихевиорални тестови за процену степена депресивности на анималним моделима

Анимални модели имају велики значај у испитивању механизма настанка депресивности и увођења одговарајућих третмана. За процену степена депресивности могу се користити одређена стања животиње попут анхедоније, очајања, беспомоћности као и поједине неуровегетативне промене (131). У анималним моделима за утврђивање степена депресивности квантитативно се могу проценити индукована стања којима је животиња доведена у очајање. У овим тестовима се за меру очајања користи имобилност, односно престанак са даљим покушајима за избављење из овог стања, када се код животиње јави резигнација са безизлазном ситуацијом, неугодним положајем у који је доведена. Експерименти који служе за изазивање стреса, истовремено могу проузроковати стање слично анксиозности које се манифестује смањењем експлоративне активности, хипотермијом индукованом стресом, настанком феномена замрзавања, па се симптоми депресије и анксизности у анималном моделу често прожимају. Ова два стања је веома тешко раздвојити, посебно ако се у обзир узме чињеница да примена антидепресива узрокују побољшање симптома у оба случаја (131). Један од најчешће коришћених тестова за процену степена депресивности је тест качења о реп.

1.2.2.1. Тест качења за реп (ТКР тест)

Тест качења за реп (енгл. *tail suspension test*, TST) се спроводи тако што се суспензијом репа о конструкцију апарата животиња доведе у безизлазну ситуацију. Ова суспензија животиња је безболна, јер је непријатно стезање животиње за реп избегнуто применом одговарајуће адхезивне траке. Најпре се животиња бори да се ослободи из неприродног положаја, а затим се јављају периоди имобилности. Анализом периода борбе и имобилности може се квантификовати степен депресивности (132). Параметри који служе за квантификацију имобилности су време до појаве прве имобилности, број епизода имобилности, просечно трајање епизоде имобилности и укупно трајање имобилности, од којих је последњи параметар најзначајнији. Предност теста качења за реп у односу на друге тестове за испитивање депресивности је та што нема потребе за предходним специфичним третманима животиња.

1.3. Инфламација

Инфламација представља одговор имунског система на штетне стимулусе у које спадају патогени организми, оштећене ћелије, токсини, или зрачење. Основни циљ инфламације је уклањање штетних стимулуса и иницирање процеса исцељења (133-135). Током акутне инфламацијске реакције, ћелијски и молекулски процеси и њихове интеракције најчешће ефикасно умањују могуће оштећење ткива или инфекцију. Ови процеси су у већини случајева одговорни за обнову ткива, успостављање хомеостазе и резолуцију акутне инфламације. Међутим, неконтролисана акутна инфламација може постати хронични процес који узрокује развој различитих хроничних инфламацијских болести (136). Процес инфламације се на нивоу ткива карактерише црвенилом, отоком, повишеном температуром, болом и губитком функције, а ове промене настају као резултат локалних имунских, васкуларних и реакција инфламацијских ћелија на инфекцију или повреду (137). Важни догађаји који се одигравају током инфламацијских процеса на нивоу микроциркулације подразумевају промену васкуларне пермеабилности, регрутовање и акумулацију леукоцита и ослобађање инфламацијских медијатора (137, 138).

Различити фактори, као што су инфекција, повреде ткива, или исхемија могу бити одговорни за настанак инфламације проузроковане оштећењем ткива. Етиологија инфламације може бити инфективна или неинфективна. Као одговор на повреду ткива, организам покреће каскаду хемијских сигнала која доводи до исцељења ткива. Ови сигнали активирају хемотаксу леукоцита из циркулације до места оштећења. Активирани леукоцити производе цитокине који индукују настанак инфламацијског одговора (139).

Инфламацијски одговор подразумева координисану активацију сигналних путева који регулишу нивое инфламацијских медијатора у резидентним ћелијама ткива и инфламацијским ћелијама регрутованих из крви (140). Поред тога што се инфламација налази у основи патогенезе многих хроничних болести различитих система органа, попут атеросклерозе, Кронове болести, улцерозног колитиса, мултипле склерозе, дијабетеса, артритиса итд, она може бити одговорна и за настанак рака (141).

Иако инфламацијски одговор зависи од природе иницијалног стимулуса и његове локализације у организму, у основи се налази механизам који се састоји из следећих корака: рецептори на површини ћелије најпре препознају штетне стимулусе,

затим се активирају инфламацијски сигнални путеви, ослобађају се инфламацијски медијатори и регрутују се инфламацијске ћелије.

1.3.1. Активација рецептора за препознавање образаца у инфламацији

Структуре које се налазе на микроорганизмима, познате као молекулски обрасци патогених микроорганизама (енг. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) могу покренути инфламацијску реакцију активацијом рецептора за препознавање образаца (енг. *pattern-recognition receptors*, PRRs) (146, 147). Неки PRRs такође препознају различите ендogene сигнале који настају током оштећења ткива или ћелија који су познати као молекулски обрасци повезани са оштећењем ткива (енг. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs). DAMPs су биомолекули домаћина који могу иницирати и одржавати неинфективне инфламацијске одговоре (147, 148, 149). Једни од најзначајнијих PRRs су *Toll-like* рецептори (енг. *toll-like receptors*, TLRs) (137). TLRs представљају породицу високо конзервираних PRRs, који учествују у активацију инфламацијског одговора код сисара (150, 151). Сигнализација преко TLRs активира интрацелуларну сигналну каскаду, која узрокује нуклеарну транслокацију транскрипционих фактора, активатора протеина-1 (енг. *activator protein-1*, AP-1) и нуклеарног фактора κВ (енг. *nuclear factor κВ*, NF-κВ) или регулаторног фактора интерферона 3 (енг. *interferon regulatory factor 3*, IRF3). PAMPs и DAMPs имају одређене заједничке рецепторе, као што је то случај са TLR4, што указује на сличности између инфективних и неинфективних инфламацијских одговора (152-155).

1.3.2. Активација инфламацијских путева

Инфламацијски путеви имају битну улогу у патогенези бројних хроничних болести. Инфламацијски стимулуси активирају интрацелуларне путеве сигнализације који затим подстичу продукцију инфламацијских медијатора. Примарни инфламацијски стимулус (продукти микроорганизама и бројни цитокини, од којих су посебно важни: IL (енг. *interleukin*)-1β, IL-6 и TNF-α (енг. *tumor necrosis factor-α*), поспешују инфламацију преко интеракције са TLR, рецептором за IL-1 (енг. *IL-1 receptor*, IL-1R), IL-6R и рецептором за TNF (енг. *TNF receptor*, TNFR) (156). Активација рецептора покреће важне интрацелуларне сигналне путеве. У ове сигналне

путеве спадају сигнални путеви митогеном-активирани протеинске киназе (енгл. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK), NF-κB и Janus киназа - сигналног преносиоца и регулатора транскрипције (енгл. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*, JAK-STAT) (157-159).

1.3.2.1. Сигнални пут NF-κB

NF-κB транскрипциони фактор има важну улогу у инфламацијском, имунском одговору, преживљавању и апоптози ћелија (160, 161, 162). NF-κB сигнални пут активирају супстанце које потичу из патогена, интерцелуларни инфламацијски цитокини и многи ензими (163, 164). Након нуклеарне транслокације NF-κB долази до активације транскрипције гена (165). Овај сигнални пут регулише продукцију проинфламацијских цитокина и регрутовање ћелија које учествују у инфламацији, што подстиче инфламацијски одговор.

1.3.2.2. Сигнални пут MAPK

MAPKs су фамилија серин/треонин киназа које учествују у ћелијским одговорима на различите стимулусе, осмотски стрес, митогене, топлотни шок и инфламацијске цитокине (IL-1, TNF-α, и IL-6). Ове киназе су одговорне за регулацију пролиферације и диференцијације ћелија, преживљавање ћелија и апоптозу (156, 166, 167). MAPKs сисара обухватају киназу која је регулисана екстрацелуларним сигналом (енгл. *extracellular-signal-regulated kinase*, ERK1/2), p38 MAP киназу и c-Jun N-терминалну киназу (енгл. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK) (168, 169). Активација MAPKs (ERK1/2 и JNK) узрокује фосфорилацију и активацију p38 транскрипционог фактора који се налази у цитоплазми или нуклеусу, након чега долази до иницијације инфламацијског одговора (167, 170).

1.3.2.3. Сигнални пут JAK-STAT

JAK-STAT сигнални пут је високо конзервирани сигнални пут кога активирају различити цитокини, фактори раста, интерферони и сродни молекули (лептин и хормон раста). Овај пут представља механизам сигнализације помоћу којег екстрацелуларни фактори могу контролисати експресију гена (171-173). Везивање чланова породице IL-6

за рецепторе ћелијске мембране активира ЈАК-СТАТ протеине. СТАТ протеини се транслоцирају у једро и везују за циљне регионе промоторских гена и на тај начин регулишу транскрипцију гена укључених у инфламацију (174). Дисрегулација активности NF- κ B, MAPK или ЈАК-СТАТ сигналних путева је повезана са инфламацијским, аутоимунским и метаболичким болестима и раком (175).

1.3.3. Маркери инфламације

Биомаркери су супстанце које се користе како би се открило присуство одређеног патолошког процеса у организму и проценио одговор на терапијске интервенције. Инфламацијски маркери могу бити предиктивни маркери за одређене инфламацијске болести. Они могу корелирати са узроцима и последицама инфекција и различитих инфламацијских и хроничних болести (176-183). Проинфламацијски стимулуси активирају инфламацијске ћелије, макрофаге и адипоците и индукују продукцију инфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6, TNF- α), инфламацијских протеина и ензима. Ови молекули потенцијално могу послужити као биомаркери за дијагнозу болести, прогнозу и одређивање одговарајуће терапије (184-188).

1.3.4. Проинфламацијски цитокини

Цитокине углавном продукују имунске ћелије попут моноцита, макрофага и лимфоцита. Проинфламацијски цитокини поспешују, док антиинфламацијски цитокини спречавају или смањују инфламацију. Проинфламацијски цитокини су класификовани као CSF (енгл. *colony stimulating factors*), IFNs (енгл. *interferons*), TNFs, TGFs (енгл. *transforming growth factor*) и хемокини, а циљ њихове продукције је регрутација леукоцита на место инфекције или повреде (189). Цитокини учествују у модулацији имунског одговора током инфекције или инфламације и регулишу инфламацију појединачним дејством или преко комплексне мреже интеракција. Међутим, претерано стварање проинфламацијских цитокина може довести до оштећења ткива, хемодинамских промена, отказивање органа и смртог исхода (190, 191).

1.3.4.1. IL-6 - основне карактеристике и улоге

IL-6 је интерлеукин који своје дејство остварује превасходно као проинфламацијски цитокин, учествује у настанку сепсе, одбрани организма од патогених микроорганизама, регенерацији ткива, а забележена су и битна антиинфламацијска својства. IL-6 стварају имунске ћелије (Т и В лимфоцити, макрофаги и микроглија) и неимунске ћелије (миоцити, адипоцити, фибробласти, ендотелне ћелије и неурони) (192). Овај цитокин је одговоран за отпочињање имунског одговора код трауме, опекотина и других оштећења ткива која могу изазвати инфламацију. Истраживања су утврдила да је IL-6 неопходан у одбрани организма од бактерије *Streptococcus pneumoniae* (193). Антиинфламацијску улогу IL-6 остварује преко инхибиторног ефекта на TNF α и IL-1 и активације IL-1R и IL-10. IL-6 може изазвати синтезу простагландина у хипоталамусу и утицати на промену телесне температуре. IL-6 утиче на диференцијацију моноцита и лимфоцита (192). IL-6 има битну улогу у патогенези одређених болести као што су дијабетес, атеросклероза, лупус, рак простате и реуматоидни артритис (194-198). Код пацијената са метастатским туморима пронађени су повишени нивои IL-6 у крви. Макрофаги продукују IL-6 као одговор на присуство молекула PAMPs. PAMPs молекули се везују за TLR рецепторе присутне на ћелијској површини и интрацелуларним компартманима и на тај начин покрећу интрацелуларне сигналне путеве који доводе до продукције проинфламацијских цитокина. IL-6 се везује за одговарајуће рецепторе на ћелијској површини. Рецептор за IL-6 је тип I цитокин рецепторски комплекс који се састоји од лиганд-везујућег IL-6R α ланца CD (енгл. *cluster of differentiation*)¹²⁶ и компоненте gp130 (CD130) која има улогу у преносу сигнала преко одређених транскрипционих фактора, *Janus* киназа (JAKs) и STAT фактора (199). Поред рецептора који је везан за ћелијску мембрану, IL-6R се може јавити и у виду солубилне форме (енгл. *soluble IL-6R*, sIL-6R).

1.3.4.2. TNF- α - основне карактеристике и улоге

Фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α , кахексин) је цитокин урођеног имунског одговора који има битну улогу у системској инфламацији и стимулацији реакције акутне фазе. Главна улога TNF- α састоји се у регулацији имунских ћелија. TNF- α може да индукује апоптозу и инфламацију, да инхибира развој тумора и репликацију вируса.

Дисрегулација продукције TNF-а се може детектовати код великог броја болести, укључујући и малигне (200). Рекомбинантни TNF- α (*tasonermin*) се користи као имуностимулант (201). TNF- α се најпре налази у форми типа II трансмембранског протеина који формира стабилне хомотримере (202, 203). Из ове форме која је интегрисана у ћелијској мембрани, солубилни хомотримерни цитокин (sTNF- α) се ствара протеолитичким одсецањем. TNF- α своје дејство остварује преко две врсте рецептора, TNF-R1 који се налази у већини ткива и TNF-R2 који се могу наћи само у ћелијама имунског система. Након контакта са лигандом, TNF рецептори формирају тримере, настаје конформациона промена рецептора и дисоцијација инхибиторног протеина SODD (енгл. *silencer of death domains*) са интрацелуларног домена. Након овога се адаптерски протеин TRADD (енгл. *TNFR1-associated death domain protein*) везује за домен смрти, а на овај начин могу бити иницирана три сигнална пута (204, 205). Активацијом NF- κ B сигналног пута, транскрипциони фактор NF- κ B се транслоцира у нуклеус и посредује у транскрипцији великог броја протеина који имају улогу у ћелијском преживљавању и пролиферацији, инфламацијском одговору и спречавању апоптозе. Активација MAPK пута је битна у ћелијској диференцијацији, пролиферацији и има проапоптотску улогу (206).

1.3.5. Проинфламацијски протеини и ензими

Проинфламацијски протеини у крви, у које спадају С-реактивни протеин, хаптоглобин, серумски амилоид А, фибриноген и α 1-кисели гликопротеин, помажу у успостављању хомеостазе и смањењу раста микроорганизама, независно од присуства антитела, током трауме, стреса или инфекције (207, 208). Абнормална активација одређених ензима у које спадају протеини високе мобилности (енгл. *high-mobility group box 1*, HMGB1), супероксид дизмутаза, глутатион пероксидаза, NADPH оксидаза (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase*, NOX), индуцибилна азот оксид синтаза (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) и циклооксигеназа-2 су кључни у развоју болести повезаних са инфламацијом и малигним болестима (209-2012). Екстрацелуларни ефекти HMGB1, могу бити посредовани активацијом TLR4 сигналних путева. Овај процес узрокује ослобађања проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-1 β (213, 214).

1.3.6. Типови ћелија које учествују у инфламацијским одговорима

Инфламацијски одговор је посредован високо координисаном интеракцијом различитих типова ћелија. Активирани макрофаги, моноцити и друге ћелије посредују у локалним реакцијама током оштећења ткива и инфекције. Алтерације имунских ћелија посредоване инфламацијом су повезане са раком и хроничним инфламацијским, аутоимунским и дегенеративним болестима, попут астме, рака, атеросклерозе, дијабетеса итд. На местима оштећења ткива епителне и ендотелне ћелије ослобађају факторе који активирају инфламацијску каскаду заједно са хемокинима и факторима раста, што изазива регрутацију неутрофила и моноцита. Прве ћелије које се регрутују на место оштећења су неутрофили, а они су праћени моноцитима, НК ћелијама (енгл. *natural killer*), Т- и В-лимфоцитима и мастоцитима (215-217). Моноцити се могу диференцирати у макрофаге и дендритске ћелије и регрутовати хемотаксом у оштећена ткива. Неутрофили су кључни посредници инфламацијског одговора, они подстичу антиген-презентујуће ћелије да активирају Т-лимфоците и одговорни су за ослобађање локалних фактора за хемотаксу моноцита и дендритских ћелија (143). Неутрофили који су одговорни за елиминацију микроорганизама могу оштетити ћелије и ткива домаћина (218). Макрофаги су важне компоненте моноклеарног фагоцитног система и одговорни су за иницирање, одржавање и повлачење инфламације (219). Током инфламације, макрофаги презентују антигене, обављају фагоцитозу и модулацију имунског одговора, продукцијом цитокина и фактора раста. Мастоцити који се налазе у везивном ткиву и на епителним ћелијама представљају ефекторске ћелије које иницирају инфламацијски одговор. Активирани мастоцити ослобађају различите медијаторе инфламације: цитокине, хемокине, хистамин, протеазе, простагландине, леукотриене и серглицин протеогликане (220). Након регрутовања инфламацијским стимулусима, имунске ћелије појачавају и одржавају одговоре акутне фазе, ослобађајући локалне инфламацијске медијаторе на месту регрутовања.

1.3.7. Неуроинфламација

Инфламацијски одговори се јављају код многих болести CNS)-а у које спадају епилепсија, аутоимунске и неуродегенеративне болести. Неуроинфламација је посредована продукцијом цитокина, хемокина, реактивних врста кисеоника и секундарних гласника. Ове медијаторе стварају ћелије резидентне глије CNS-а (микроглија и астроцити), ендотелне ћелија и имунске ћелије које потичу са периферије. Неуроинфламацијски одговори су праћени одређеним имунским, физиолошким, биохемијским и бихевиоралним последицама. Степен неуроинфламације зависи од трајања и тока примарног стимулуса или инсулата (221). Неуроинфламација подстиче регрутовање имунских ћелија, едем и оштећење нервног ткива и смрт ћелија. Инфламацијски одговори у мозгу могу утицати на неуронску ексцитабилност, оштетити неуроне и повећати пропустљивост хематоенцефалне баријере за различите молекуле (222-224). У ове инфламацијске процесе укључени су и урођени и стечени имунски одговор, што је случај и код имунског одговора у току системске инфекције. Цитокини и TLR су инфламацијски медијатори који имају битну улогу у транзицији од урођеног до стеченог имунског одговора. Инфламацијски одговор у CNS-у могу покренути и ендогени лиганди које препознају TLRs. Молекули DAMPs, као што су *heat-shock* протеини и екстрацелуларни молекули деградације матрикса, који улазе у мозак кроз оштећену хематоенцефалну баријеру такође могу покренути инфламацијске одговоре. Инфламацијски одговор CNS-а представља снажну реакцију која се јавља након продора инфективних агенаса у CNS и исхемијског, трауматског, или ексцитотоксичног оштећења мозга (223, 225, 226).

Микроглија је од кључне важности у процесу неуроинфламације. Она спада у ћелије урођене имуности, има улогу у имунском надзору и обавља активности сличне макрофагима, попут производње цитокина и хемокина. Ове ћелије су резидентне ћелије CNS-а које се налазе у белој и сивој маси мозга и кичмене мождине и чине 10% популације ћелија CNS-а. Микроглија настаје у раној фази ембриогенезе из мијелоидних прекурсорских ћелија у ембрионалној жуманчаној кеси, одакле мигрира у подручје CNS-а (227). Микроглија има исти прогенитор као и макрофаги дугоживећих ткива (228). Она има битну улогу у функционисању мозга, а посебно значајну улогу има у синаптичком ремоделовању повезаном са учењем и памћењем. Ову функцију остварује ослобађањем неуротрофних фактора као што је BDNF (229). Микроглија такође има велики значај у пропагацији инфламацијских сигнала који потичу са

периферије (124). Инфламацијски стимулуси брзо мењају транскрипциони профил микроглије и узрокују продукцију проинфламацијских цитокина и хемокина, што за последицу има регрутовање леукоцита у мозак (230). Поред тога, ове измене омогућавају микроглији да мигрира на места повреде или инфекције и повећа своју фагоцитну способност (231). Активација и експресија цитокина микроглије примарно имају улогу у заштити CNS-а. Међутим, претерана или хронична активација микроглије може довести до настанка озбиљних патолошких промена и неуробихевиоралних компликација као што су депресија и когнитивни дефицити (232).

Неуроинфламацијски одговори су посредовани са неколико кључних проинфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6 и TNF- α), хемокина CCL2 (енгл. *chemokine ligand 2*, CCL2) и CCL5, секундарних гласника (NO и протагландини) и реактивних врста кисеоника. Многи од ових медијатора се производе у активираним резидентним ћелијама CNS-а, микроглији и астроцитима (233). Поред тога, ендотелне ћелије и периваскуларни макрофаги су такође важни у пропацији ових инфламацијских сигнала унутар CNS-а (234). Активација микроглије и производња цитокина не постоји само у току неуроинфламације, већ је забележена и у раним етапама развоја мозга. Активирани ћелије микроглије помажу у функционисању синапси и имунским активностима унутар CNS-а. Појачана неуроинфламацијска сигнализација између Т-лимфоцита и резидентних ћелија CNS-а је забележена током процеса памћења и учење (235-237).

Високо деструктивни облик неуроинфламације повезан је са активацијом глије и значајном продукцијом цитокина и хемокина, инфилтрацијом периферних имуних ћелија, едемом и повећаном пропустљивошћу хематоенцефалне баријере (238, 239). Обично је присутно примарно механичко или физичко оштећење ткива проузроковано инфекцијом, повредом или исхемијом. Поред тога, могу постојати и васкуларна оклузија, исхемија, смрт ћелија и друге секундарне инфламацијске компоненте које се јављају након настанка инсульта. Овај облик неуроинфламације повезан је са инфекцијом CNS-а, можданим ударом, или бројним другим болестима (240-243). У великом броју случајева ови инсулти могу угрозити живот. Поред тога што је овај облик неуроинфламације праћен примарним и секундарним оштећењем ткива, он може похватити и компоненте хроничне неуроинфламације. Висок степен неуроинфламације је повезан са имунским одговорима у аутоимунским болестима попут мултипле склерозе, што је доказано на анималном моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (енгл. *experimental autoimmune encephalomyelitis*,

ЕАЕ) (242). У овом случају неуроинфламације постоји активација глије CNS-а, продукција цитокина и хемокина, инфилтрација периферних имунских ћелија и присуство аутореактивних Т-лимфоцита (244, 245). Овде постоји значајна аутоимунска реакција на базични протеин мијелина, што узрокује демиелинизацију аксона. Током времена ова неуроинфламација постаје хронична и доводи до губитка аксона (246). Значајан хронични тип неуроинфламације повезан је са Алцхајмеровом болешћу (243, 247). Алцхајмерова болест је праћена погрешним савијањем протеина, активацијом глије, инфилтрацијом периферних имунских ћелија, оштећењем и смрћу неурона и неуронском атрофијом која се повећава током времена (247, 248). Овај облик неуроинфламације је хроничан, прогресиван и све деструктивнији током времена.

Насупрот овом облику неуроинфламације, постоји и пролазна неуроинфламација која је праћена активацијом резидентне глије и продукцијом неколико неуроинфламацијских цитокина IL-1 β , TNF- α и IL-6. Ова индукција неуроинфламацијских цитокина може бити део координисаног одговора CNS-а на инфекције или инсулт који су локализовани на периферији. У овом случају, активација глије и производња цитокина и хемокина узрокује настанак физиолошких и бихевиоралних одговора који су корисни за организам (249). Важно је нагласити да овај пролазни одговор није повезан са значајном инфилтрацијом ћелија стечене имуности у CNS, оштећењем хематоенцефалне баријере или смрћу ћелија. Дејство психолошких стресора такође изазива настанак сличног неуроинфламацијског профила са глијалном активацијом и продукцијом цитокина и хемокина. Пролазне имунске активације представљају начин промовисања имунског условљавања. Истраживања су показала да пролазна активација имунског система, која се одиграла пре повреде или инфекције (енгл. *eupflammation*), може бити повезана са мање израженим инфламацијским профилима и повећаном неуропротекцијом (250). Овај тип неуроинфламације представља вид интеракције имунске и мождане сигнализације који може утицати на понашање.

1.3.7.1. Улога IL-6 у одржавању хомеостазе нервног ткива и неуроинфламацији

IL-6 је цитокин који има битну улогу у одржавању хомеостазе нервног ткива и неуроинфламацији. Иако већина неурона не реагује на стимулацију од стране IL-6, доказано је да солубилни IL-6R утиче на диференцијацију неурона. Овакав тип

сигнализације помоћу солубилног IL-6R назива се трансигнализација и одговорна је за проинфламацијско и неуродегенеративно дејство IL-6, док класична сигнализација преко IL-6R има протективно дејство и омогућава регенерацију мозганог ткива. IL-6R се налази на ћелијама микроглије док је експресија sIL-6R забележена на астроцитима и неуронима. Пошто IL-6 може да подстакне развој неурита и омогући опстанак неурона, он има битну улогу у процесу ремиелинације и регенерацији нерава. IL-6 промовише диференцијацију олигодендроцита и има улогу неуротрофног фактора. Одуство IL-6 доводи до редукције активације ћелија глије након трауматског оштећења мозга и узрокује поремећај спавања. У физиолошким условима присутан је низак ниво IL-6 у мозгу (251). Дрastiчно повећање експресије и секреције IL-6 је детектовано у одређеним неуролошким поремећајима у којима битну улогу има неуроинфламација, као што су Алцхајмерова и Паркинсонова болест, мултипла склероза и исхемија мозга. IL-6 је повезан са одређеним психијатријским болестима. Овај цитокин је повишен код оболелих од депресије. Повишени нивои IL-6 пронађени су у цереброспиналној течности код људи који пате од посттрауматског стресног поремећаја. Истраживања су показала да је IL-6 повезан са шизофренијом и аутизмом (251).

1.3.7.2. Улога TNF- α у одржавању хомеостазе нервног система и неуроинфламацији

TNF- α је проинфламацијски цитокин који остварује хомеостатску и патофизиолошку улогу у CNS-у. У физиолошким условима у CNS-у, TNF- α има регулаторну улогу у кључним процесима као што је пластичност синапси, учење и меморија, спавање и регулација уноса хране и воде. У патолошким стањима микроглија ствара велике количине TNF- α , а овај новостворени TNF- α је битан у неуроинфламацијском одговору који је повезан са одређеним неуролошким поремећајима. TNF- α може потенцирати цитотоксичност посредовану глутаматом преко два комплементарна механизма: индиректно, инхибицијом транспорта глутамата у астроцитима и директно експресијом Ca⁺² пермеабилних-AMPA (енгл. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) и NMDA (енгл. *N-methyl-D-aspartate*) рецептора, што смањује експресију инхибиторних GABA-A рецептора на неуронима. (252). Неуроинфламација и ексцитотоксичност посредоване са TNF- α имају битну улогу у настанку и напредовању неуродегенеративних процеса. Повишени нивои TNF- α су детектовани у трауматском оштећењу мозга, исхемији, Алцхајмеровој и

Паркинсоновој болести, мултиплој склерози и амиотрофичној латералној склерози. (252). Истраживања су показала да су повишени нивои TNF- α повезани са депресијом и анксиозним поремећајима (253).

1.3.7.3. Анимални модели неуроинфламације индуковани применом липополисахарида

Анимални модели су изузетно битни за испитивање неуроинфламације која настаје након примене проинфламацијских супстанци на периферији. У истраживањима се често користе мишеви као анимални модели за индукцију неуроинфламације и неуродегенерације периферном апликацијом липополисахарида (енгл. *lipopolysaccharide*, LPS). LPS, ендотоксин из спољне мембране бактерија је познат као снажан окидач инфламације. Периферна апликација LPS-а код мишева индукује активацију астроцита и микроглије, циклооксигеназе-2 и iNOS и експресију проинфламацијских цитокина у мозгу (254-257).

Након једног или више третмана мишева периферном применом LPS-а јавља се повећање броја F4/80, CD11, CD45 или *Iba-1*-позитивних ћелије као и морфолошке промене карактеристичне за активiranу микроглију (254, 255, 258-260). Истраживања су потврдила да је LPS примењен на периферији изазвао различите централне ефекте посредоване проинфламацијским цитокинима, углавном ослобођених из микроглије. Познато је да цитокини продуковани на периферији не прелазе кроз очувану хематоенцефалну баријеру, али могу преносити сигнале до мозга. Бројне студије на животињама показале су да је LPS примењен на периферији способан да стимулише синтезу проинфламацијских цитокина у мозгу (262-268). Студије су потврдиле изражену експресију IL-1 β , IL-6 и TNF- α mRNA (енгл. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) пролазног карактера у различитим регионима мозга, процењену реверзном транскрипцијом и ланчаном реакцијом полимеризације у реалном времену (енгл. *quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR) (265, 267, 269-272). У истраживањима су коришћени различити сојеви мишева (оба пола): CH3/He, B6C3F1, C57BL/6J и CD-1. Примењивана је интравенска (енгл. *intravenous*, i.v.) или интраперитонеална (енгл. *intraperitoneal*, i.p.) инјекција LPS-а. Утврђено је да су мишеви соја C57BL/6J и FVB/NL нарочито погодни као модел за изазивање неуроинфламације на овај начин. Истраживање спроведено код младих мишева соја C57BL/6J, 4 дана након једнократне i.p. примене LPS-а у дози 1mg/kg показало је

повећање проинфламацијског цитокина IL-1 β у мозгу. У другој студији спроведеној код младих мишева соја C57BL/6J, којима је i.p. апликован LPS у једној дози од 2mg/kg, након 24 часа, доказано је повећање и IL-6 и TNF- α mRNA у ткиву мозга. Примена дозе LPS-а веће од 5mg/kg, i.p. узроковала је повећање TNF- α mRNA у мозгу, које је било детектабилно након 1 сата, 14 и 21 дана, као и након 10 месеци од апликације (254). Истраживања су указала на значај дозе и начина апликације LPS-а, као и експерименталних услова, јер у одређеним случајевима примена LPS-а може условити активацију M2 фенотипа микроглије и деловати неуропротективно (254, 273).

1.3.7.4. Неуроинфламација и поремећаји понашања

Истраживања су показала да примена LPS-а може изазвати анхедонију, анорексију, апатију и неуроинфламацију повезану са анксиозношћу и депресијом. LPS може проузроковати симптоме депресије код људи и понашање слично анксиозности и депресивности код експерименталних животиња (274). Доказано је да примена LPS-а узрокује повећање проинфламацијских цитокина. Истраживања су показала да су нивои IL-6, TNF- α и осталих инфламацијских маркера повећани код оболелих од депресије, што указује на постојање имунске дисрегулације код овог поремећаја (275, 276). Депресија може пореметити осовину хипофиза-хипоталамус-надбубрежна жлезда и функционисање аутономног нервног система, што може стимулисати продукцију цитокина (277, 278). Утврђено је да примена проинфламацијских цитокина (за лечење канцера и хепатитиса C) индукује настанак депресивних симптома код трећине пацијената на овој терапији (279). Депресија се често јавља удружено са анксиозним поремећајима, што указује на постојање сличних етиолошких фактора у настанку ових поремећаја (280). Недавна истраживања су указала на чињеницу да је имунска дисрегулација детектована код анксиозних поремећаја и да су одређени соматски симптоми депресије и анксиозности повезани са неуроинфламацијом (281-283). Повишени нивои неуроинфламације детектовани су у атипичној, али не у депресији праћеној меланхолијом (284). Симптоми слични депресији, попут умора, проблема са спавањем, моторне успорености и анорексије могу настати услед повећања нивоа инфламације (124). На ниво базалне неуроинфламације утичу навике, животни стилови, хроничне болести и медикаментозна терапија. Истраживање је показало да повезаност базалне инфламације и инфламације стимулисане LPS-ом са депресијом и анксиозношћу у већини случајева нестаје када се узму у обзир ови фактори. Такође је

потврђено да употреба антидепресантне терапије може утицати на ниво базалне инфламације, док има мањи утицај на ниво инфламације индуковане применом LPS-a (185, 285, 286). Утврђено је да капацитет продукције цитокина има битан значај у настанку анксиозности. С друге стране, базална инфламација има важну улогу у настанку таквих облика анксиозности и депресије код којих соматски симптоми имају главну улогу (253).

1.4. Лектини

Анимални лектини су протеини који препознају ендogene угљене хидрате и угљене хидрате који се налазе на површини микроорганизама. Иако се грађа лектина значајно разликује, својство везивања угљених хидрата се често може приписати одређеном делу ових протеинских молекула. Овај активни сегмент се означава као домен за препознавање угљених хидрата (енгл. *carbohydrate-recognition domain*, CRD). CRD у одређеној групи лектина има исти састав непроменљивих и високо конзервираних аминокиселинских остатака са карактеристичним распоредом. Лектински домен се комбинује са различитим доменима у молекулима лектина, што им омогућава постојање бројних биолошких функција. Лектини имају битну улогу у међућелијском транспорту гликокоњугата, међућелијској интеракцији и фагоцитози. Лектини се могу поделити на класе на основу природе угљенохидратног лиганда, биолошких процеса у којима учествују, субцелуларне локализације и зависности од двовалентних катјона (287). Постоји више класа лектинских молекула:

- лектини С-типа који су добили своје име на основу чињенице да за активацију захтевају калцијумове јоне; налазе се екстрацелуларно и везују се за различите врсте угљених хидрата;

- лектини I-типа који имају CRD сличан имуноглобулинима, док су лектини из групе пентраксина организовани као пентамер;

- лектини Р-типа који имају CRD чији је примарни лиганд маноза 6-фосфат;

- лектини S-типа, галектини (енгл. *galectin*, Gal) који могу бити и интра и екстрацелуларно локализовани, њихова потпуна активација зависи од присуства редукционих средстава (тиола) и имају способност да се везују за β 3-галактозиде (287, 288).

1.4.1. Галектини

Галектини су фамилија протеина која су први пут идентификовани у екстрактима ткива кичмењака, као лектини који се везују за галактозиде (289). Присуство галектина у живим организмима који се налазе на различитом ступњу еволуције указује на чињеницу да они учествују у основним ћелијским функцијама. С друге стране, постојање више различитих галектина унутар једне врсте сугерише на то да галектини у организму обављају и одређене специфичне функције.

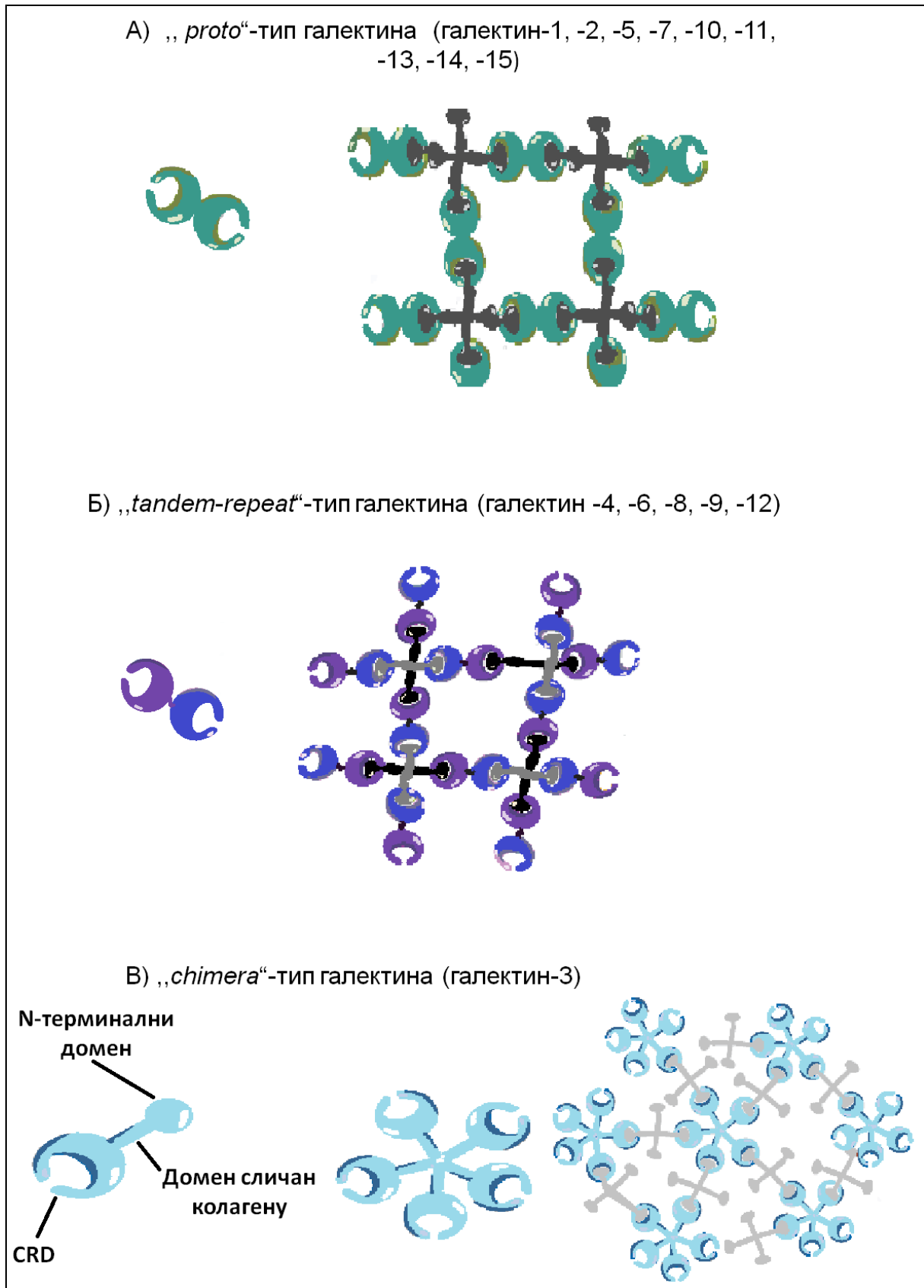
Поједини галектини се експримирају у готово свим ткивима (Gal-1 и Gal-3), док је дистрибуција већине чланова ове фамилије специфична за одређене врсте ткива (290-292). Биолошке функције галектина могу се разликовати у зависности од њихове локализације. Ембриогенеза и различити процеси диференцијације ћелија, као и одређени патолошки процеси који се одвијају у организму су праћени променама у експресији молекула галектина (293). На основу истраживања улоге ових молекула у различитим процесима развоја и диференцијација ћелија утврђено је да код глодара поједини галектини, попут Gal-1 и Gal-3 имају важну улогу током формирања нотохорде, мозга, кичмене мождине и мишићног ткива (294-297). Такође је доказано да су галектини битни у функционисању имунског одговора и одбрани од патогена, као и да се налазе углавном у свим ћелијама урођене и стечене имуности (298-301). Неки од чланова ове фамилије могу изазвати апоптозу активираних Т-лимфоцита, везивањем за површинске олигосахариде ћелије, активирати неутрофиле или имати улогу у хемотакси еозинофила (302).

Галектини се везују за олигосахариде који у свом саставу имају галактозу и могу истовремено остварити интеракцију са два или више молекула гликопротеина, при чему процесом олигомеризације граде мреже гликокоњулата (303, 304). Галектини се високим афинитетом везују за N-ацетиллактозаминске и полилактозаминске ланце ((Gal β 1, 4GlcNAc) $_n$) који се налазе у саставу муцина, ламинина и фибронектина (306-310). Везивањем за молекуле гликана, галектини учествују у ћелијској адхезији, миграцији, хемотакси, пролиферацији, апоптози и елонгацији неурита. Међусобним везивањем галектина преко молекула гликана, могу се формирати димери ових молекула, док везивањем за протеине који се налазе на ћелијској мембрани могу отпочети процеси трансдукције сигнала у ћелијама и на тај начин покренути бројни ћелијски процеси, попут стварања цитокина, ћелијске диференцијације и пролиферације (311, 312).

Галектини могу бити интрацелуларно локализовани и наћи се у једру, цитоплазми и митохондријама. Они такође могу бити екстрацелуларно локализовани и експримирати се на ћелијској мембрани или се могу наћи у ткивним течностима (305). Синтеза молекула галектина се обавља на рибозомима, а синтетисани молекули могу остварити своје функције и интрацелуларно кроз директну интеракцију са цитоплазматским протеинима. На овај начин галектини учествују у сигналним путевима и регулацији одређених интрацелуларних процеса. Интрацелуларно локализован Gal-3 може спречити апоптозу блокањем изласка цитохрома C из митохондрија и може учествовати у модулацији *Wnt* сигнализације везивањем за β -катенин који се налази у цитоплазми (300, 313-316). Да би екстрацелуларни галектини остварили своје функције интеракцијом са гликокоњугатима, неопходно је учешће ензима гликозилтрансферазе. Овај ензим омогућава експресију гликокоњугата на мембрани ћелија, што је основни предуслов за везивање молекула галектина за површину ћелије и отпочињање каскаде сигналних путева, процеса адхезије и осталих функција које обављају екстрацелуларно локализовани молекули галектина (300, 313-318).

Галектини су протеински молекули који поседују N-терминални и CRD домен. CRD домен галектина дужине је око 130 аминокиселина и високим афинитетом се везује за β -галактозиде. Фамилија галектина има 15 познатих чланова (319). Галектини су подељени у три подгрупе на основу структуре, броја и организације CRD домена (311):

- „*proto*“-тип галектина који поседује по један CRD регион (галектин-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15) и који се јавља у виду мономера или димера;
- „*tandem-repeat*“-тип галектина који садржи два различита CRD региона повезана пептидним ланцем (галектин -4, -6, -8, -9, -12);
- „*chimera*“-тип галектина се састоји од једног CRD региона који је спојен са нелектинским аминокиселинским ланцем дужине од око 120 аминокиселина који је богат пролином, глицином и тирозином. Gal-3 је једини представник ове групе. Он може наградити пентамерну форму у присуству мултивалентних угљених хидрата (311, 312) (слика 1.1.).



Слика1.1. Класификација галектина на основу броја и организације CRD региона.

1.4.2. Галектин-3

1.4.2.1. Идентификација галектина-3

Структурно и функционално јединствен лектин Gal-3 је први пут откривен 1982. године као специфичан маркер перитонеалних макрофага, назван *Mac-2* (313). Касније је код фибробласта мишева описан структурно сличан протеин који се везује за угљене хидрате СВР-35 (енгл. *carbohydrate-binding protein*) молекулске масе 35-kDa (320). Након тога, структурно слични лектини су детектовани у бројним типовима туморских ткива, ћелијама леукемије, хуманим и мишијим туморским ћелијама, интестиналном тракту пацова, људским плућима и људским HeLa ћелијама (321-327). Откривен је и протеин који се везује за IgE (енгл. *immunoglobulin E*), лектин L-29, L-34, лектин-3 специфичан за галактозу, протеин који се везује за ламинин, 35 kDa лектин, GALBP (енгл. *galactoside-binding protein*) (322, 328-331). Након анализе гена и секвенци аминокиселина ових молекула утврђено је да се ради о молекулима са високим степеном хомологије, па је према номенклатури из 1994 назив Gal-3 усвојен као јединствен назив ових молекула (317).

1.4.2.2. Gal-3 – дистрибуција у ткивима

Gal-3 је убиквитарни молекул у адултном организму, док су експерименти изведени на мишевима показали да се током ембриогенезе његова експресија разликује у зависности од врсте ткива и фазе ембрионалног развоја. Gal-3 може бити интрацелуларно локализован, а може се наћи и у цитоплазми, једру и митохондријама. Нуклеарна локализација Gal-3 је изузетно важана у процесу обраде примарног транскрипта рибонуклеинске киселине (332). Екстрацелуларно локализован Gal-3 се обично налази везан за гликопротеине на површини ћелије и битан је за међућелијску адхезију и остваривање интеракције ћелија и екстрацелуларног матрикса у њиховом окружењу (333, 334). Овај молекул је детектован код различитих врста епителних ћелија попут ћелија епитела дигестивног тракта, рожњаче, коњуктива, олфакторног епитела, епитела бубрега, плућа, тимуса, дојке и простате. Такође је откривен у дукталним ћелијама пљувачних жлезда, панкреаса, бубрега, ока, у интрахепатичним жучним каналима, у фибробластима, хондроцитима, остеобластима, остеокластима, кератиноцитима, Швановим ћелијама, као и у ендотелијалним ћелијама различитих

ткива и органа (335). Осим тога, постоје бројни подаци о експресији Gal-3 у ћелијама укљученим у имунски одговор, као што су неутрофили, еозинофили, базофили и мастоцити, Лангерхансове ћелије, дендритске ћелије, моноцити и макрофаги. Код неких других типова ћелија, попут лимфоцита, Gal-3 се експримира тек под дејством одређених стимулуса (336, 337). Gal-3 се експримира у многим туморима, попут тумора панкреаса, јетре, дебелог црева, дојке, плућа, простате, главе и врата, нервног система и штитасте жлезде (335, 338, 339).

1.4.2.3. Структура молекула Gal-3

Gal-3 је једини члан фамилије галектина типа *chimera* (молекулске масе 29-35-kD) (313, 340). Gal-3 се у раствору налази као мономер са два функционална домена. Gal-3 је јединствен у породици галектина по томе што има изузетно дуг и флексибилан N-терминални домен који се састоји од 100-150 аминокиселинских остатака (336, 341-344). У N-терминалном домену налази се циљно место за које се везују ензими колагеназа и металопротеиназа и на тај начин остварују инактивацију или разградњу молекула Gal-3 (345). N-терминални домен заједно са CRD доменом учествује у везивању гликана и одговоран је за процес олигомеризације молекула Gal-3 (346-348). Иако је утврђено да сви моно-CRD галектини формирају димере и олигомере, Gal-3 је посебно занимљив у том погледу, јер је његова олигомеризација резултат кооперативног везивања молекула Gal-3 за лиганд и независна је од структурних својстава лиганда (349). Кооперативно везивање молекула Gal-3 може бити инхибирано лактозом, што указује на чињеницу да се олигомеризација остварује преко N-терминалног домена. Релевантан пример кооперације молекула Gal-3 је модулација имунског одговора. Олигомеризација Gal-3 везаног за T ћелијски рецептор (енгл, *T cell receptor*, TCR) резултује формирањем мреже галектин-гликопротеин која ограничава регрутовање T-лимфоцита посредством TCR-а на место презентовања антигена. Насупрот овоме, када Gal-3 није у стању да индукује формирање мреже, T-лимфоцити могу постати превише реактивни под дејством сигнала TCR-а, повећавајући на тај начин могућност настанка аутоимунских болести (350, 351).

Поред тога што омогућује олигомеризацију, N-терминални домен Gal-3 има још две битне функције. Он управља секрецијом Gal-3, интерагујући са бројним цитоплазматским или мембранским протеинима током секреторног пута. N-терминални домен олакшава и агрегацију Gal-3 на цитоплазматској страни ћелијске мембране

током секреције овог молекула (352-354). N-терминални домен је такође одговоран за директна анти-апоптотска својства молекула Gal-3, која се остварују помоћу фосфорилације Ser6 (355). Анти-апоптотски ефекат Gal-3 је такође повезан са његовим непроменљивим мотивом 180NWGR183 који се налази у склопу C-терминалног домена. Истраживањима је утврђено да мутација на позицији 182 (G182A) онемогућава анти-апоптотску активност молекула Gal-3. Потврђено је да је непроменљива секвенца NWGR Gal-3 хомолога са BH1 (енгл. *Bcl-2 homology 1*) доменом анти-апоптотског протеина *Bcl-2* (355, 356). На основу ових чињеница евидентно је да N-терминални и CRD домен омогућавају потпуну анти-апоптотску функцију Gal-3, везивање овог молекула за гликане и процес олигомеризације. C-терминални домен Gal-3 садржи CRD који се састоји од две анти-паралелне β -плоче које формирају удубљење за везивање гликана (306, 357). CRD домени су флексибилни и могу се реорганизовати како би препознали лиганд. У одсуству лиганда молекули воде испуњавају удубљење и добијају облик лиганда CRD-а (358, 359). Осим што је важна за везивање лиганда, вода може да формира адхезивну мрежу посредством водоничних веза између хидрофилних протеинских површина, чиме се омогућава асоцијација протеина и кооперативно везивање (360, 361). На овај начин вода може допринети удруживању молекула Gal-3 преко његових CRD домена, пошто удубљења за везивање лиганда углавном садрже хидрофилне аминокиселине. Молекули Gal-3 се удружују преко CRD домена који су окренути један према другом, док везивње лиганда за CRD спречава удруживање CRD домена. Када дође до кидања везе између аминокиселине аланина који се налази на позицији 62 и аминокиселине тирозин на позицији 63, повећава се афинитет CRD домена за лиганде, али се истовремено онемогућава процес олигомеризације Gal-3 (362).

1.4.2.4. Структура гена за Gal-3

Ген LGALS3, који се код људи налази на хромозому 14, кодира полипептидни ланац молекула Gal-3. Људски и мишији ген LGALS3 се састоји од шест егзона и пет интрона (код људи је то генски локус 14k21-22). Егзон I кодира већи део молекула од 50I секвенце mRNA. Егзон II кодира преостали део 50I секвенце, место иницијације транслације протеина и првих шест аминокиселина заједно са иницијалним метионином. Репетитивне секвенце у N-терминалној половини генског продукта кодира егзон III. Егзони IV, V и VI кодирају C-терминални домен протеина Gal-3 код

мишева, док се код људи секвенца која кодира CRD домен налази у склопу егзона V (363).

1.4.2.5. Регулација експресије Gal-3

Регулација експресије Gal-3 је комплексан процес у коме учествују бројни транскрипциони фактори и сигнални путеви, а који зависи од типа ћелије, спољашњих стимулуса и услова околине. Експресија Gal-3 се на нивоу транскрипције и транслације налази под утицајем различитих стимулуса. Нивои протеина Gal-3 и mRNA су повећани у пролиферујућим фибробластима у поређењу са ћелијама у фази мировања (364, 365). Gal-3 се може сматрати маркером диференцијације јер се повећана експресија Gal-3 јавља када се моноцити диференцирају у макрофаге, док се његова експресија смањује када се макрофаги диференцирају у дендритске ћелије (366). Gal-3 се такође сматра маркером активације макрофага због чињенице да се експресија овог молекула повећава активацијом моноцитне THP-1 ћелијске линије помоћу форбол естра (367). Експресија Gal-3 се такође повећава и у макрофагима изложеним гранулоцитно-макрофагом фактору стимулације колоније (енгл. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) (368).

И поред великог броја података који се односе на експресију Gal-3, механизми регулације експресије Gal-3 још увек нису довољно разјашњени. Ни људски, ни мишији LGALS3 промотор не садрже ТАТА-кутију усходно од места почетка транскрипције. Међутим, постоје многобројни мотиви GC-кутије за везивање убиквитарно експримираног Sp1 транскрипционог фактора, што представља заједничко својство конститутивно експримираних, или такозваних *housekeeping* гена (363).

Поред пет места за везивање Sp1, промоторски регион хуманог LGALS3 гена садржи неколико регулаторних елемената: пет cAMP-зависних елемената одговора (енгл. *cAMP-dependent response elements*, CRE), четири AP-1-like и једно AP-4-like место, две NF-κB-like локације, један sis-индуцибилни елемент (енгл. *sis-inducible element*, SIE) и секвенцу хеликс-петља-хеликс (енгл. *basic helix-loop-helix*, bHLH). SIE је важан за транскрипциону активацију гена који се брзо активирају под дејством фактора раста и постоји могућност да управо SIE има улогу у активацији експресије LGALS3 гена (368).

Присуство CRE и NF-κB-like места у региону промотора указује на чињеницу да се активација експресије Gal-3 може регулисати путем сигналних путева који укључују

CREB (енгл. *cAMP-response element-binding protein*) или NF- κ B фактор транскрипције. Утврђено је да у регулацији експресије Gal-3 учествује и *Jun* протеин, компонента AP-1 транскрипционог фактора (369).

1.4.2.6. Локализација Gal-3

Иако је Gal-3 претежно локализован у цитоплазми, он се такође налази и у једру, на површини ћелије и у екстрацелуларној средини, што указује на мултифункционалност овог молекула. Екстрацелуларни Gal-3 учествује у важним интеракцијама између ћелија и екстрацелуларног матрикса. Насупрот томе, Gal-3 који је интрацелуларно локализован има битну улогу у преживљавању ћелија захваљујући способности да блокира унутрашњи пут апоптозе (371, 372). Показано је да је цитоплазматски Gal-3 у ћелијама рака обично повезан са агресивним фенотипом рака, док су другачији резултати добијени када је Gal-3 био локализован у једру (373). Локализација Gal-3 у једру је први пут описана у фибробластима који имају способност пролиферације у *in vitro* условима (364, 365, 374), али не и у фибробластима са неадекватном репликацијом (375). Gal-3 је у једру локализован углавном у интерхроматинским просторима, на граници кондензованог хроматина, на густој фибриларној компоненти и на периферији фибриларних центара нуклеолуса (376).

1.4.2.7. Секретија Gal-3

Gal-3 се синтетише на слободним рибозомима у цитоплазми и нема сигналне секвенце за транслокацију у ендоплазматски ретикулум. Иако не пролази кроз мрежу ендоплазматског ретикулума и Голџијевог апарата, постоји мноштво доказа да се Gal-3 налази екстрацелуларно. Утврђено је се да се овај протеин излучује из ћелија новим, још увек недовољно разјашњеним механизмом, познатим као ектоцитоза. Овај транспорт је независан од класичног секреторног пута кроз ендоплазматски ретикулум и Голџијев апарат (336, 377-379). Gal-3 може остварити непосредну интеракцију са липидима ћелијске мембране и проћи кроз липидни двослој липозома, а за овај процес није потребан утросак енергије (380). Кратки сегмент N-терминалне секвенце Gal-3 који садржи остатке 89-96 (*Tyr-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Tir*) има кључну улогу у секретацији Gal-3. Међутим, ова секвенца сама по себи није довољна да изазове директну секретацију CAT (енгл. *chloramphenicol acetyltransferase*) фузионог протеина, неопходно

је да се она налази у склопу велике N-терминалне секвенце Gal-3. Имунохистохемијске студије су показале да први корак у секрецији Gal-3 представља његова акумулација на цитоплазматској страни ћелијске мембране (354, 377, 378, 381).

1.4.2.8. Лиганди Gal-3 и различите улоге Gal-3 условљене локализацијом

Истраживања су показала да постоји већи број лиганда за Gal-3. Ови лиганди се према локализацији могу поделити на екстрацелуларне, интрацелуларне и нуклеарне лиганде.

1.4.2.8.1. Екстрацелуларни лиганди Gal-3 и улоге екстрацелуларног Gal-3

Gal-3, као и већина чланова породице галектина, функционише као рецептор за лиганде који садрже поли-N-ацетиллактозаминске секвенце састављене од великог броја јединица дисахарида. Молекули галектина се везују за тип I Gal β 1,3 GlcNAc или тип II Gal β 1,4 GlcNAc јединице, са већим афинитетом за полилактозаминске ланце, односно за комплексније олигосахариде (303, 333, 336, 382). Експресија ових гликанских структура зависи од активности гликозилтрансфераза које омогућавају додавање N-ациллактозамина на N-гликане, чиме се стварају одговарајући лиганди за Gal-3 (335). Сматра се да је већина екстрацелуларних функција и улога у трансдукцији сигнала Gal-3 последица везивања CRD домена за Mg-5-модификоване N-гликане који се налазе на различитим рецепторима на површини ћелија. Ово је праћено настанком олигомера које овај галектин формира посредством N-терминалног домена, тако да функционише као биолошки унакрсни линкер између више гликопротеина. Истраживања су показала да је скраћени облик Gal-3 који нема N-терминални домен још увек у стању да везује лиганде, али не може обавити своје функције (383-385).

Gal-3 се везује за гликозилиране компоненте екстрацелуларног матрикса, у које спада ламинин, фибронектин, тенасцин, хондроитин сулфат, *Mac-2* везујући протеин, витронектин хенсин, еластин и колаген, као и α 1 β 1 интегрини и α субјединица интегрин α M β 1 (CD11b/18, *Mac-1* антиген) која је присутна на макрофагима (386-394). Gal-3 се такође везује за тешки ланац CD98, промовишући његову димеризацију и последичну активацију адхезије посредовану интегринима (333).

Поједини високо гликозилирани адхезивни протеински молекули на површини ћелије, као што су интегрини, такође представљају лиганде за Gal-3. Везивање Gal-3 за

екстрацелуларни домен једне или обе субјединице интегрин узрокује позитивну или негативну модулацију активације интегрин и такође остварује утицај на њихово везивање са другим екстрацелуларним лигандима (395). Главни лиганд за Gal-3 на макрофагима миша је α -субјединица интегрин α M β 2, позната као CD11b/8 (333, 394). Gal-3 такође ступа у интеракцију са интегрином A11 преко својих CRD домена на лактоза-зависан начин (396). Gal-3 се везује за α 3P1 интегрин на површини ендотелних ћелија. На овај начин се формира комплекс између интегрин, Gal-3 и NG2 протеогликана који може потенцирати трансмембранску сигнализацију одговорну за покретљивост и морфогенезу ендотелних ћелија (397). Ова интеракција је важна у ангиогенези и васкуларизацији тумора.

Везивање Gal-3 за Mg-5-модификоване N-гликане епидермалног фактора раста (енгл. *epidermal growth factor*, EGF) и рецептора трансформишућег фактора раста (енгл. *transforming growth factor*, TGF- β) одлаже уклањање рецептора конститутивном ендцитозом. Мрежа коју формирају молекули Gal-3 обезбеђује повећање експресије површинских рецептора и повећану осетљивост на факторе раста. На пример, мишеви са недостатком *Mgat5* показују губитак осетљивости према цитокинима, што узрокује губитак фосфорилације и транслокације нуклеарног ERK и редукцију *Cmad2/3* фосфорилације (398). Gal-3 регулише цитокинске рецепторе, управо захваљујући способности да се веже за Mg-5-модификоване N-гликане на површинским гликопротеинима.

Ламинин, протеин екстрацелуларног матрикса, је хетеротример за који се Gal-3 везује са високим афинитетом. Ова интеракција је веома важна у процесу ћелијске адхезије (349). Пошто је поремећена адхезија ћелија важна карактеристика свих врста рака, интеракција између Gal-3 и ламинина може бити важан фактор у прогресији рака (399). Gal-3 промовише адхезију неутрофила на ламинин, што омогућава неутрофилима да пређу кроз базалне мембране како би дошли до места инфламације (383). У већини случајева Gal-3 позитивно регулише ћелијску адхезију, међутим, показано је да Gal-3 може инхибирати адхезију ћелија код одређених врста рака. Gal-3 инхибира адхезију ћелија рака за ламинин код меланома, рака дојке, фибросаркома и рака простате, чиме се повећава могућност метастазирања карцинома (396). Ове разлике се заснивају на протеинима укљученим у ћелијску адхезију и концентрацији присутног растворљивог молекула Gal-3.

1.4.2.8.2. Интрацелуларни лиганди Gal-3 и улоге интрацелуларног Gal-3

Gal-3 који је локализован унутар ћелије интерагује са неколико интрацелуларних протеина, као што су: цитокератини, CBP70, *Chrp* (енгл. *cystidine/histidine-rich protein*), Гемин4, *Alix/AIP-1* (енгл. *actin-interacting protein*, AIP1), *Bcl-2* и β -катенин (317, 400-403). Посебно је битна чињеница да скоро сви ови интрацелуларни лиганди у већини случајева са Gal-3 остварују интеракције типа протеин-протеин. Једини изузетак од овог правила су цитокератини. Потврђено је да цитокератини MCF7, као и они пореклом из других људских ћелија имају посттранслационе модификације, односно гликан је терминалом α везом повезан са GalNAc. Ове резидеуе у *in vitro* условима могу препознати молекули Gal-3 сисара (400).

Bcl-2, члан *Bcl-2* породице протеина који регулишу ћелијску смрт (апоптозу) је био први откривени цитоплазматски лиганд Gal-3. Истраживања су показала да интеракција између CRD домена Gal-3 и *Bcl-2* може бити инхибирана лактозом. Везивање лактозе за Gal-3 изазива конформациону промену у региону молекула Gal-3 који интерагује са *Bcl-2*. На овај начин Gal-3 остварује битну улогу у ћелијском расту и апоптози. Gal-3 који је локализован у једру подстиче апоптозу, док Gal-3 који је локализован у цитоплазми своју антиапоптотску улогу остварује стабилизацијом мембране митохондрија (356, 373, 404). Недавно су идентификовани још неки лиганди Gal-3 који су укључени у апоптотску сигнализацију: CD95 (APO-1/*Fas*) - члан породице рецептора смрти, *nucling* и *Alix/AIP1*. *Alix/AIP1* садржи секвенцу богату тирозином у С-терминалном региону, која је хомолога са тандемски понављајућим секвенца у N-терминалном делу молекула Gal-3 (317, 405, 406).

Gal-3 повећава ниво протеин киназе B (енгл. *protein kinase B*, PKB) укључене у регулисање инхибиције апоптозе и стимулацији пролиферације ћелија, што потврђује улогу молекула Gal-3 у прогресији рака (407). *Ras* протеини су важне GTPазе, које имају улогу у ћелијској пролиферацији, диференцијацији, преживљавању и смрти. Gal-3 се везује за активирани *K-Ras*, што подстиче активацију фосфатидилинозитол 3-киназе (енгл. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3-K) и *Raf-1* и повећава активацију екстрацелуларне киназе регулисане сигнаlima ERK (408). *K-Ras* је најважнији *Ras* онкопротеин за настанак тумора код људи, а како се нивои Gal-1 и Gal-3 разликују код нормалних и туморских ћелија, може се закључити да равнотежа ових галектина дефинише исход онкогене *K-Ras* трансформације.

Gal-3 је важан регулатор *Vnt*/β-катенин сигнализације. Gal-3 је структурно сличан β-катенину и са овим молекулом остварује интеракцију. β-катенин је нисходна компонента *Wnt* сигналног пута. Фосфорилација β-катенина киназом I (енгл. *casein kinase I*, CKI) и GСК-3β (енгл. *glycogen synthase kinase-3β*) киназом је неопходна за иницијацију сигнала. Gal-3 се такође може фосфорилисати овим дуалним системом киназа (409, 410). Сигнализација помоћу β-катенина регулише прелаз епителних ћелија у мезенхимске ћелије, који је посредован са TGF-β. Овај процес узрокује настанак миофибробласта и доприноси прогресији фиброзе. Појачана сигнализација помоћу *Wnt4* у мишићим моделима бубрежне тубулоинтерстицијалне болести корелира са појавом фиброзних лезија, што указује на значај ових протеина као медијатора фиброзе бубрега (411).

Gal-3 који је локализован у једру може да ступа у интеракцију са гемин-4, компонентом комплекса макромолекула која се састоји од приближно 15 полипептида, а међу њима се налазе: протеин одговоран за преживљавање моторног неурона SMN (енгл. *survival of motor neuron*), гемин-2, гемин-3, нуклеарни протеини *cnRNP* и други још неидентификовани протеини. Ови комплекси су укључени у процесе који су директно или индиректно повезани са пре-mRNA сплајсингом. Идентификација гемина-4 као партнера у интеракцији са Gal-3 пружа чврсте доказе да овај галектин има битну улогу у настанку сплајсеозома *in vivo* (317, 403). Скрининг cDNA (енгл. *complementary deoxyribonucleic acid*) *Jurkat* ћелија двохибридном методом која је користила Gal-3 као мамац, омогућила је идентификацију новог протеина који се везује за Gal-3. У питању је био хумани хомолог ALG-2 (енгл. *alpha-1,3-mannosyltransferase*) везујућег протеина X (енгл. *ALG-2-interacting protein X*, *Alix*), односно AIP-1 (317). Овај протеин интерагује са ALG-2, калцијум-везујућим протеином који је неопходан за изазивање ћелијске смрти подстакнуте различитим стимулусима. (412).

1.4.2.9. Улога Gal-3 у имунском систему

Околности под којима је Gal-3 откривен (као маркер макрофага, *Mac-2* и протеин који се везује за *IgE*) одмах су указале на чињеницу да овај молекул има битну улогу у функционисању имунског система. Утврђено је да везивање лиганда утиче на модификацију функције галектина. Пошто остаци β-галактозида нису могли да се нађу у цитоплазми, најпре се претпостављало да су галектини ускладиштени у цитоплазми, али да своју улогу остварују на другој локацији (388). Након изласка из ћелије Gal-3 се

може везати за протеине екстрацелуларног матрикса, нпр. ламинин, и подстаћи адхезију и миграцију ћелија имунског система дуж базалне мембране (383). На основу досадашњих научних сазнања о овом молекулу, Gal-3 се не може сматрати само маркером активације макрофага као што је био случај када је првобитно откривен, пошто је установљено да се он експримира у различитим ћелијама и ткивима (413). Gal-3 је пронађен у скоро свим ћелијама имунског система, у неутрофилима, еозинофилима, базофилима и мастоцитима, Лангерхансовим ћелијама и дендритским ћелијама (366, 414-418). Ипак, макрофаги превазилазе било који други тип ћелије када је у питању количина произведеног Gal-3. Gal-3 је пети по реду експримовани протеин у макрофагима, када се узме у обзир њихова целокупна експресија протеина. Чак и ако није специфичан само за макрофаге, његова улога у функцији макрофага је изузетно битна. Gal-3 има изузетно важну улогу у фагоцитози апоптотских ћелија и IgG-опсонизованог материјала од стране макрофага (419). Gal-3 локализован у цитоплазми учествује у формирању фагозома. Gal-3 код макрофага функционише и као рецептор за препознавање молекулских образаца. Ова улога је најпре уочена првенствено код екстрацелуларно локализованог Gal-3, који се посредством својих CRD домена везује за гликанске остатке на патогеним микроорганизмима. Препознавање и везивање за патогене микроорганизме представљају почетни корак у њиховој елиминацији путем фагоцитозе (420). Сличну улогу ови молекули остварују и кад су у питању ксенопротеини или друге структуре патогена, а могу служити као сензор за неке молекуле, као што је липопротеин ниске густине (енгл. *low density lipoprotein*, LDL.) или крајњи продукти гликације (енгл. *advanced glycation end products*, AGEs). Интеракција Gal-3 са липопротеинима или ендодуктима гликације или липоксидације одговорна је за њихово уклањање или настанак сигнала за функционалну промену фенотипа макрофага (370, 421, 422). Gal-3 којег стварају макрофаги такође може да има функције сличне функцијама цитокина. Gal-3 може да оствари улогу у регулацији имунског одговора инхибицијом IL-12 и експресије других Th1 (енгл. *T helper type 1*) цитокина (423). Gal-3 индукује активацију миофибробласта и производњу колагена у фибробластима (424). На овај начин, Gal-3 може да поспеши фиброзу у плућима, јетри, бубрегу, срцу и другим органима (425-428). Gal-3 такође промовише интеракције између моноцита, што узрокује формирања поликариона (мултиједарне циновске ћелије) у хроничним инфламацијским болестима и болестима праћеним фиброзом (429). Gal-3 утиче на смањење продукције IL-5 у еозинофилима. Овај молекул промовише преживљавање В-лимфоцита блокарањем њихове коначне

диференцијације у плазмоците и на тај начин омогућава повећање броја меморијских В-лимфоцита (431).

Gal-3 може активирати оксидативни прасак неутрофила код људи, а за ову улогу битни су и CRD и N-терминални домен Gal-3. Оба домена су такође неопходна за специфичан хемотактички капацитет Gal-3 за моноците и макрофаге (432-435).

1.4.2.10. Улога Gal-3 у модулацији имунског одговора

Галектини имају битну улогу у модулацији функције ћелија имунског система. Ову улогу остварују захваљујући способности да изазову функционалне промене и подстицање или спречавање апоптозе одређених субпопулација имунских ћелија. Својство Gal-3 да формира мрежасте структуре може узроковати активирање мастоцита. Gal-3 се осим за IgE молекула, може везати и за IgE рецептор, тако да је могуће да се Gal-3 веже за IgE који је већ везан за рецептор, сам рецептор или за обоје (436). Узимајући у обзир да се неки галектини могу коекспримирају у одређеном микроокружењу, изузетно је битна њихова унакрсна повезаност и комуникација. Утврђено је да Gal-1 шаље костимулативни сигнал наивним и антиген-специфичним Т-лимфоцитима, док Gal-8 овај ефекат остварује преко гликозилираног муцина CD45 на ћелијској површини (437-439). Доказано је да Gal-3 спречава костимулацију Т-лимфоцита од стране Gal-1 и Gal-8, преко негативне регулације TCR-а (437). Након везивања за TCR, молекули Gal-3 олигомеризују и након формирања мреже спречавају латералну мобилност молекула TCR-а (351). Инхибиција Gal-3 смањује интеракцију између наивних Т-лимфоцита и дендритских ћелија, што представља кључни процес у покретању имунског одговора (440).

Gal-3 се експримира само у активираним Т-лимфоцитима. У овим Т-лимфоцитима Gal-3 индукује излагање фосфатидилсерина, што представља иницијални догађај у апоптози (304). Индукција апоптозе се одиграва неселективно и код *Th1* и *Th2* лимфоцита (441). Gal-3 може индиректно подстаћи раст канцера индуковањем апоптозе тумор-реактивних Т-лимфоцита, или онемогућавати њихову функцију спречавањем колокализације TCR и CD4/CD8 молекула (442, 443). Локација Gal-3 је важна у остваривању његових функција у одређеним процесима у организму. Екстрацелуларно локализован Gal-3 индукује ћелијску смрт и излагање фосфатидилсерина, док ектопична локализација овог молекула у људским Т-лимфоцитима спречава апоптозу индуковану стауроспорином и анти-*Fas* рецептор антителима (399, 404).

1.4.2.11. Улога Gal-3 током интеракција патогених микроорганизама и домаћина

У основи патогенезе многих инфекција налази се интеракција лектина домаћина и гликана на површини патогена. Галектини се везују за гликане који се налазе на површини вируса, бактерија, протозоа и гљивица, функционишући као обрасци за препознавање рецептора (299). Показано је да Gal-3 има способност да се веже за одређене компоненте бактерија, нпр. LPS. Gal-3 се својим CRD доменом везује за лактозил групе LPS-а, док се N-терминалним доменом везује за липид А, који представља део молекула LPS-а (444). У истраживању Li-а из 2008. Gal-3 дефицијентни мишеви су након примене LPS-а развили шок који је био повезан са прекомерном индукцијом инфламацијских цитокина, јер молекули Gal-3 нису били доступни за везивање и секвестрирање овог ендотоксина (445). Новија истраживања сугеришу на чињеницу да везивање LPS-а може индуковати Gal-3 олигомеризацију преко N-терминалног домена, што узрокује смањење концентрације LPS-а и прага неопходног за активацију неутрофила и до десет пута (446). Изузетно је важно да се током инфламације што пре активирају неутрофили, јер се на тај начин повећава шанса за брзу и успешну ерадикацију патогена. На основу ових чињеница потврђена је дуална улога Gal-3, јер овај молекул у случају инвазије патогених микроорганизама обложених шећером промовише инфекцију, док на супрот овоме, Gal-3 може учествовати у ерадикацији патогена индуковањем имунског одговора домаћина. Gal-3 може функционисати и као опсонин, унакрсно повезујући две или више ћелија, након везивања за њихове површинске угљене хидрате. Ова интеракција је веома важна за фагоцитозу бактерија на местима где су типични опсонини, као антитела и комплемент мање заступљени, нпр. у уринарном тракту (447). Gal-3 може везати липоолигосахариде одређених грам негативних бактерија (*N.gonorrhoeae*, *H. influenzae*) и повезати их са неутрофилима, чиме поспешује њихову елиминацију (448).

1.4.2.12. Улога Gal-3 у одређеним патофизиолошким процесима

Gal-3 показује и про- и анти-инфламацијске улоге у различитим патофизиолошким процесима. Његова улога у овим процесима зависи од типа циљне ћелије и локализације. Одређене студије су показале његову протективну улогу у инфламацији изазваној гојазношћу која настаје услед акумулације метаболичких стресора, као што су AGEs. Gal-3 функционише као рецептор чистач за AGEs, за које се везује са високим афинитетом и спречава AGEs-индуковано оштећење ткива (449, 450). Делација гена за Gal-3 повећава висцералну гојазност, хипергликемију и инсулинску резистенцију. Gal-3 има улогу у развоју типа 2 дијабетеса изазваног исхраном богатом мастима (енгл. *high fat diet*, HFD) (451, 452).

Проинфламацијска улога Gal-3 експериментално је доказана у случају фулманантног хепатитиса изазваног конкавалином А (453). Установљено је да недостатак Gal-3 смањује оштећење јетре преко смањења броја ефекторских ћелија и промовисањем M2-поларизације макрофага. Стога, Gal-3 има заштитну улогу код настанка стеатозе, али доприноси оштећењу јетре, настанку инфламације и фиброзе.

Улога Gal-3 у примарном билијарном холангитису испитивана је помоћу мишијег модела аутоимунског холангитиса (454). Резултати ових истраживања указују да делација гена за Gal-3 доводи до побољшања код примарног билијарног холангитиса, захваљујући чињеници да интрацелуларни Gal-3 одржава интегритет митохондријске мембране и штити од апоптозе. Због тога, недостатак Gal-3 олакшава апоптозу епителних билијарних ћелија и узрокује ослобађање аутоантигена који појачавају имунски одговор, доприносећи оштећењу жучних канала и фибрози јетре.

Gal-3 има битну улогу у прогресији срчане инсуфицијенције, будући да подстиче процес ремоделовања и фиброзу миокарда (455). Gal-3 је показао позитивне ефекте у мишијем моделу астме. Интраназална примена Gal-3 cDNK је смањила упалу дисајних путева након излагања антигену (456, 457). У другој студији, Gal-3 дефицијентни мишеви су испољили слабију инфламацију и хиперреакцију дисајних путева у поређењу са мишевима дивљег соја, чиме је поново потврђено да локација Gal-3 битно утиче на његове биолошке функције (458). Gal-3 такође може допринети процесу атеросклерозе одржавајући упалу у атеросклеротичном плаку (459).

Пошто је доказан имуно-регулаторни потенцијал Gal-3 у различитим инфламацијским процесима посредованим Т-лимфоцитима, аутоимунским болестима и прогресији тумора, постоји континуирана потрага за терапијом заснованом на инхибиторима специфичним за Gal-3. У истраживањима су се често користили биљни производи који су безбедни и лако доступни. На основу резултата истраживања, разни

биолошки активни пектински препарати и галактоманани из биљака су предложени као потенцијална терапија у спречавању настанка и напредовања метастаза рака и инфламације, што се постиже инхибирањем молекула Gal-3 (435, 460).

1.4.2.13. Експресија и улоге Gal-3 у нервном систему

Експресија Gal-3 у мозгу у базалним условима (у одсуству инфламацијских и неуродегенеративних процеса) није још увек детаљно истражена (461). Постоји мало података о експресији Gal-3 у неуронима CNS-а. Установљено је да се Gal-3 експримира у субпопулацији ганглијских неурона дорзалног корена кичмене мождине (енгл. *dorsal root ganglion*, DRG) и током развоја и у одраслој доби (462). Истраживања спроведена у *in vitro* условима су потврдила експресију Gal-3 у ћелијама микроглије (463, 464). Осим код микроглије, доказана је експресија Gal-3 и код других потпорних ћелија нервног система, ћелијама макроглије, у које спадају астроцити и олигодендроцити (464, 465). Gal-3 пореклом из глијалних ћелија CNS-а учествује у диференцијацији олигодендроцита и очувању интегритета мијелина. Потврђено је значајно смањење мијелинизације аксона у *corpus callosum*-у код Gal-3 дефицијентних мишева у односу на дивљи сој (464). Gal-3 се конститутивно експримира у одређеним врстама ћелија у субвентрикуларној зони код мишева и помаже епендимским ћелијама у успостављању хемотактичког градијента и астроцитима у формирању глијалних канала, битних формација у миграцији неуробласта током развоја CNS-а. На овај начин Gal-3 утиче на покретљивост ћелија у ростралном миграторном путу (465). Недавна студија је потврдила да се Gal-3 експримира у CA1 региону хипокампуса код мишева и одређеним регијама мозга пацова. Gal-3 учествује у негативној регулацији формирања меморије у хипокампусу, инхибицијом сигнализације интегрина (466). Gal-3 такође стимулише адхезију неурона и раст неурита и има важну улогу у модулацији екстрацелуларног матрикса у нервном ткиву (467). Претходне студије су показале да измењена експресија LGALS3 гена има улогу у синаптичким променама које су повезане са губитком функције током старења (468).

1.4.2.13.1. Gal-3 и сигнализација у глијалним ћелијама

Gal-3, без обзира да ли је интрацелуларно или екстрацелуларно локализован, стимулише сигналне путеве у микроглијалним ћелијама и остварује вишеструке улоге у зависности од типа ћелије. Микроглија је самоодржива популација имунских/мијелоидних ћелија лоцираних у CNS-у. Ове ћелије су под нормалним условима у стању мировања, али се у случају повреде или различитих болести активирају (469). Микроглија има кључну улогу у имунском одговору CNS-а. Под дејством проинфламацијских стимулуса микроглија секретује Gal-3 који делује као ендогени лиганд за TLR4. На овај начин Gal-3 учествује у активацији проинфламацијског M1 фенотипа микроглијалних ћелија и промовише неуроинфламацију (470). Gal-3 стимулише продукцију проинфламацијских медијатора у микроглијалним ћелијама, помоћу фосфорилације тирозина *Janus* киназе 2 и сигналних трансдуктора и активатора транскрипције: STAT1, STAT3 и STAT5 (471). Gal-3 у микроглији активира фагоцитозу регулацијом и продужавањем активности *KRas*-GTP-зависне фосфатидилинозитол 3-киназе (469).

1.4.2.13.2. Gal-3 и неуроинфламација

Gal-3 је јединствени маркер активираних микроглијалних ћелија и макрофага који поседују способност фагоцитозе мијелина (469). У експерименталном аутоимунском енцефалитису код мишева, у којем преовлађују аутоимунски Т-лимфоцити и макрофаги, Gal-3 је локализован у активираним ћелијама микроглије и макрофагима у демиелинизирајућим лезијама кичмене мождине захваћене ЕАЕ-ом (472). На основу резултата истраживања у коме је Gal-3 детектован у активираним ћелијама микроглије и макрофагима који су фагоцитовали мијелин, овај молекул је проглашен проинфламацијским “опасним” молекулом у моделу ЕАЕ (473). Насупрот томе, фагоцитоза мијелинског дебрија током оштећења CNS-а је корисна за регенерацију неурона због тога што мијелин инхибира диференцијацију олигодендроцита и регенерацију оштећених аксона (474, 475). И поред тога што је Gal-3 битан за клиренс мијелинског дебрија у ЕАЕ-у, он има улогу у превенцији апоптозе, повећању синтезе IL-17 и IFN- γ и смањењу продукције IL-10, доприносећи развоју болести (473, 476).

У зависности од локализације Gal-3 у моделу ЕАЕ остварује различиту улогу. Истраживања су показала да екстрацелуларни Gal-3 индукује апоптозу Т-лимфоцита у CNS-у, док интрацелуларни Gal-3 инхибира апоптозу, подстиче ћелијски раст и

регулише сигнализацију преко TCR-а, стимулишући експанзију Т-лимфоцита (351, 477).

1.4.2.13.3. Експресија и улога галектина-3 код исхемијског оштећења мозга

Након исхемије мозга у насталим лезијама долази до активације микроглије. (478-480). Иако је добро познато да се на експерименталним моделима код пацова ћелије микроглије активирају након исхемије мозга, и даље се истражује да ли је улога активираних микроглијалних ћелија у исхемији мозга штетна или корисна (481-483).

Gal-3 се током исхемије мозга експримира код већине активираних ћелија микроглије (478-480). Дефектна активација и смањење броја ћелија микроглије у исхемијским лезијама је потврђена код Gal-3 дефицијентних мишева, што указује на чињеницу да Gal-3 има битну улогу у активацији и пролиферацији ћелија микроглије које секретују проинфламацијске медијаторе у одговору непосредно након оштећења možданог ткива (480).

Истраживања су потврдила улогу Gal-3 у стимулацији ендотелних ћелија и неуропрогенитора у исхемијско-реперфузијским оштећењима možданог ткива код глодара у *in vitro* условима. Такође је потврђен његов значај у ремоделовању ткива и подстицању раста неурита и неурогенези после исхемије (467, 484). Gal-3 пореклом из активираних ћелија глије и макрофага у исхемијским лезијама мозга остварује свој ефекат индукцијом секреције проинфламацијских медијатора током ране фазе инфламације, а затим индукује ангиогенезу, неурогенезу и модулацију фенотипа макрофага. На анималном моделу је утврђена повећана експресија Gal-3 код активираних ћелија микроглије у СА1 региону хипокампуса након пролазне možдане исхемије (479). Експресија Gal-3 у СА2 региону хипокампуса након пролазне исхемије може имати битну улогу у спречавању настанка смрти неурона (485). Истраживања су открила коекспресију Gal-3 и фактора раста сличног инсулину 1 (енгл. *insulin-like growth factor-1*, IGF-1) у активираним микроглијалним ћелијама након možданог удара. На сигнализацију IGF-1 рецептора (енгл. *IGF-1 receptor*, IGF-R1) утиче интеракција Gal-3 са N-везаним гликанима овог рецептора. Недостатак Gal-3 узрокује дефект у активацији микроглије, IGF-R1 сигнализације и митогеног одговора ћелија микроглије, што за последицу има прекомерну компензаторну експресију IL-6. Сходно томе, може доћи до прекомерне активације *Janus* киназе, активатора транскрипције (JAK/STAT) и повећања регулације супресора сигнализације цитокина 3 (енгл. *suppressor of cytokine*

signaling 3, SOCS3). Повећана активација SOCS3 инхибира ефекте IGF-1 који доприноси преживљавању ћелија у нервном систему и негативној регулацији пролиферације ћелија микроглије посредоване IGF-1 (480).

1.4.2.13.4. Експресија и улога Gal-3 код трауматске повреде CNS-а

Трауматска повреда CNS-а је праћена оштећењем аксона, разарањем мијелина, инфилтрацијом имунских ћелија (макрофага), активацијом ћелија микроглије, реактивном астроглиозом и регенерацијом неурона (486-488). После раног акутног инфламацијског одговора CNS-а у зонама лезија следи процес ремоделовања ткива са заменом ћелија глије и неурона. Gal-3 који се ослобађа из микроглије као одговор на трауматску повреду можданог ткива делује као алармин који регулише имунски одговор мозга. Gal-3 подстиче инфламацију преко TLR4, а такође узрокује повећање губитка неурона и поспешује неуродегенерацију. Уочена је повећана експресија Gal-3 у микроглији и установљена битна улога у модулацији фагоцитозе у активираним ћелијама микроглије и макрофагима у слоју хипокампуса са пирамидалним ћелијама који је веома осетљив на трауму мозга (489). У истраживању спроведеном код адултних мишева број Gal-3-позитивних ћелија значајно је повишен након повреде мозга, а већина Gal-3 позитивних ћелија микроглије у *corpus callosum*-у је показивала и имунореактивност на фактор раста неурона (490). У експерименталним моделима који су обухватили и повреду кичмене мождине Gal-3 је имао битну улогу у секундарном оштећењу нервном ткиву, јер је забележен изразити пораст експресије Gal-3 након 7 дана, који је трајао до 28. дана од повреде (491). Gal-3 посредује у патогенези дифузне аксоналне повреде и делује неуропротективно стимулишући ослобађање фактора раста неурона и изазивајући фенотипске промене у макрофагима (490). Код проучавања аксотомије и Валеријанове дегенерације је установљено да Gal-3 помаже макрофагима у фагоцитози дегенерисаног мијелина након оштећења периферног нервном система или CNS-а (492). Међутим, експерименти су показали да Gal-3 инхибира пролиферацију Шванових ћелија у културама исхијадичног нерва (493). Проучавање регенерације исхијадичног нерва код Gal-3 дефицијентних мишева показало је повећани број макрофага и Шванових ћелија, убрзану регенерацију нерава и бржи опоравак локомоторне функције у односу на мишеве дивљег соја (494).

1.4.2.13.5. Експресија и улога Gal-3 код вирусних енцефалитиса и прионских болести

Плејотропни ефекти Gal-3 испољавају се и код енцефалитиса изазваног вирусом. Gal-3 се експримира у активираним микроглијалним ћелијама и макрофагима и показује паракрине и аутокрне ефекте, стимулише секрецију проинфламацијских медијатора и промену фенотипа макрофага у алтернативно активираним M2 макрофаге, што је уочено у *in vitro* условима (495). Истраживањима је доказана експресија Gal-3 у ћелијама микроглије малог мозга након инокулације вируса енцефаломиокардитиса (496).

Gal-3 има битну улогу и у другим инфективним болестима CNS-а, као што је то случај са прионским болестима. Gal-3 је детектован у активираној микроглији и његова експресија је била повезана са абнормалним накупљањем приона, што је узроковало смрт неурона (497, 498). Експерименти са Gal-3 дефицијентним мишевима показали су продужено време преживљавања код интрацеребралних прионских инфекција, потврђујући улогу Gal-3 у развоју прионских болести (498). Узимајући у обзир ове улоге Gal-3 у CNS-у, посебно се истиче његова функција проинфламацијског медијатора, улога у ћелијској активацији и адхезији у раном стадијуму инфламације и пролонгирању инфламације CNS-а, а његове специфичне улоге умногоме зависе од типа инфламације.

1.4.2.13.6. Улога Gal-3 у неуродегенеративним болестима

Gal-3 кога ствара микроглија промовише фагоцитозу патогених микроорганизама, ткивних остатака (нпр. дегенерисаног мијелина код повреда аксона и мултипле склерозе) и одређених неуротоксичних фактора (β -амилоид код Алцхајмерове болести и α -синуклеин и неуромеланин код Паркинсонове болести). Међутим, прекомерно активирани дисфункционална микроглија продукује неуротоксичне проинфламацијске молекуле (TNF α и NO). Одређени продукти неуродегенерације (B-амилоид, α -синуклеин, неуромеланин и глутамат) могу и сами проузроковати прекомерну активацију микроглије. Уклањање дегенерисаног мијелина помоћу микроглије је важно за поправку као и за смањење оштећења аксона и мијелина у мултиплој склерози (469). Gal-3 има битну улогу у побољшању инфламацијских демиелинизацијских поремећаја (464, 493). Истраживања код Паркинсонове болести

потврдила су да Gal-3 има важну улогу у активацији микроглије индуковане α -синуклеином и прогресији болести. Gal-3 је у овој болести укључен у проинфламацијску активацију специфичних инфламацијских путева преко повећаног стварања IL-1 β и IL-12 (499). С друге стране, Gal-3 има заштитни, анти-инфламацијски ефекат код амиотрофичне латералне склерозе. Потврђено је да делеција гена за Gal-3 узрокује егзарцебацију активације микроглије и убрзање прогресије болести код SOD1G93A мишева у моделу амиотрофичне латералне склерозе (500).

Повећање нивоа Gal-3 током прогресије деменције која је праћена појавом Левијевих телашаца и амиотрофичне латералне склерозе, може послужити као ефикасан индикатор имунског одговора праћеног неуродегенерацијом (501-503). Почетак ремиелинације је подстакнут експресијом Gal-3 пореклом из микроглије, преко директног утицаја на диференцијацију олигодендроцита или преко M2 ћелијске поларизације (504-505). Повишени нивои Gal-3 су уочени у ликвору пацијената са амиотрофичном латералном склерозом и новорођенчади након перинаталне асфиксије (489, 507, 508). Повишени нивои Gal-3 у испитиваним узорцима серума и ликвора код пацијената са Алцхајмеровом болешћу и амиотрофичном латералном склерозом повезани су са активацијом инфламације и апоптозом, али и редукцијом неуродегенеративних промена. Студија *Achraf* и сарадника је показала повезаност између нивоа Gal-3 у серуму и ликвору и когнитивног статуса код пацијената са овим болестима. Могућност секреције и детектовања Gal-3 у серуму и ликвору чине овај молекул потенцијалним биомаркером за Алцхајмерову болест, амиотрофичну латералну склерозу и друге неуродегенеративне болести (509, 510)

1.4.2.14. Gal-3 и понашање

Поједина истраживања указују на везу између анксиозности и делеције гена за Gal-3. Утврђена је повезаност између Gal-3 и одређених неуротрансмитера и неуротрофичких фактора који могу утицати на настанак анксиозности. Истраживањима је утврђено постојање корелацију између неуротрофног фактора пореклом из мозга (BDNF-a) и Gal-3. BDNF је неуротрофин који доприноси синаптичкој пластичности и преживљавању неурона и стимулише пролиферацију и диференцијацију неурона. Неколико студија је потврдило да су смањени нивои BDNF-a повезани са анксиозним поремећајима (46, 511, 512). Осим тога, инхибиција сигнализације од стране BDNF-a узрокује настанак депресивних поремећаја. Студије које су спроведене код испитаника

са депресијом показале су да смањени нивои BDNF-а у мозгу могу утицати на настанак атрофије и губитка ћелија у хипокампусу и префронталном кортексу (513, 514). Експерименти у *in vitro* условима су показали да присуство BDNF-а повећава експресију Gal-3 у DRG неуронима (462).

Промене у структури мијелина код Gal-3^{-/-} мишева изазивају одређене поремећаје у понашању. Ова претпоставка је потврђена резултатима бихевиоралне студије спроведене коришћењем Gal-3^{-/-} и мишева дивљег соја (енгл. *wild-type*, WT) старости 9-13 недеља (464). У студији су коришћени тестови: крстасти лавиринт, *hole-board*, *inverted screen* тест и тестове за процену локомоторне активности. Gal-3^{-/-} мишеви су показали мању анксиозност у односу на одговарајуће WT мишеве, потврђујући улогу Gal-3 на понашање. Међутим, тестови нису показали значајне разлике у локомоторној активности или моторичкој координацији. У другој студији, коју су спровели *Hooyos* и сарадници, Gal-3^{-/-} и WT мишеви старости 8 недеља су третирани купризоном током две недеље да би се индуковала демиелинација (493). Резултати бихевиоралних тестова су показали да мишеви третирани купризоном имају ниже нивое анксиозности у поређењу са одговарајућим наивним мишевима. Осим тога, само Gal-3^{-/-} мишеви су показали смањену локомоторну активност. Смањење локомоторне активности индиректно указује на повећање степена анксиозности. Значај Gal-3 у настанку анксиозности може се објаснити и улогама које Gal-3 има у развоју и функционисању неурона као и повезаности галектина и фактора раста, као што су VEGF (енгл. *vascular endothelial growth factor*), bFGF (енгл. *basic fibroblast growth factor*) и IGF-1 (480, 515). Такође је доказно смањење локомоторне активности Gal-3 дефицијентних мишева у кавезима, што индиректно указује на повећање степена анксиозности (96, 464, 493, 516).

Досадашњим истраживањима указно је на могућу улогу Gal-3 у одређеним старосним групама, одређеним тестовима понашања и током боравака у кавезу. С обзиром да је истраживањима потврђен значај овог молекула у развоју и функционисању CNS-а, била су потребна истраживања која би коришћењем стандардизованих тестова понашања и одређених хипокампаљних параметра анксиозности и депресије прецизније испитала улогу коју овај молекул има у понашању.

2.

ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

На основу претходно изнетих података, резултата досадашњих и наших прелиминарних истраживања, постављени су следећи циљеви овог истраживања:

- 1.** Испитивање утицаја делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова WT и Gal-3^{-/-} мишева соја C57BL/6, мушког пола, старости 20 недеља, у базалним условима.
- 2.** Утврђивање ефекта неуроинфламације и делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова WT и Gal-3^{-/-} мишева соја C57BL/6, мушког пола, старости 20 недеља, 24h након апликације LPS-а.
- 3.** Одређивање повезности бихевиоралних промена са релевантним параметрима неуроинфламације и хипокампаалним факторима који учествују у регулацији понашања.

2.2 Хипотезе истраживања

Основне хипотезе нашег истраживања су:

1. Делација гена за Gal-3 у базалним условима утиче на настанак промена у понашању.

2. Делација гена за Gal-3 атенуира неуроинфламацију и последичне промене у понашању.

3. Бихевиоралне промене су повезане са променама експресије гена за GABA-A рецепторске субјединице и BDNF, као и експресије и концентрације проинфламацијских цитокина (TNF- α и IL-6) у хипокампусу.

3.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Услови под којима су животиње одгајане и чуване током експерименталних протокола

Истраживање је осмишљено као експериментална студија на животињама *in vivo* и на узоркованом материјалу *in vitro*. У овом истраживању су коришћени WT мишеви дивљег соја C57BL/6 и мишеви са циљаном делецијом гена за Gal-3 (Gal-3^{-/-}, LGALS3^{-/-}) соја C57BL/6, мушког пола, старости 20 недеља, приближно исте телесне масе. Gal-3^{-/-} мишеви су добијени захваљујући проф. др Hsu (Daniel K Hsu, Department of Dermatology, University of California, Davis, School of Medicine, Sacramento, CA, USA). WT и Gal-3^{-/-} мишеви који су се користили у експерименту одгајани су у стандардним условима, у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Експерименталне животиње су чуване у стандардним транспарентним кавезима од плексигласа, при чему је било максимално 4 животиње у кавезу. Животиње су имале неограничен приступ храни и води (*ad libitum*). У виваријуму су одржавани константни услови, температура је износила 23±1 °C, влажност ваздуха је била 55±5%, а циклус светлост/тама је био подешен на 12 сати (светла фаза је почињала у 8:00). Светлосни интензитет у виваријуму је био 120 лукса. Третман и експерименти су спровођени за време трајања светле фазе, у условима без звучних, механичких и светлосних сензација које би могле неповољно утицати на резултате тестова понашања животиња.

Студија је спроведена према принципима Добре лабораторијске праксе, одговарајуће директиве Европске Уније (2010/63/EU) и ARRIVE смерницама, уз сагласност надлежног Етичког одбора. Спроведено истраживање је одобрила Етичка комисија за експерименталне животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број 01-6573/1 од 24. 05. 2017. године.

3.2. Методологија за добијање LGALS3-/- мишева

Метода хомологе рекомбинације омогућава добијање *knock-out* експерименталних животиња са једним или више нефункционалних гена. Хомологом рекомбинацијом замењују се секвенце гена између два слична или истоветна молекула DNA (517). На овај начин обавља се замена и потпуна елиминација функционалог гена некодирајућим геном. Овај поступак се користио за добијање мишева са делецијом гена за Gal-3.

За добијање експерименталних животиња са делецијом одређених гена неопходно је да се обави одабир ћелија у којима се одиграла хомолога рекомбинација. Фрагмент DNA са мутираним или искљученим геном се инкорпорира у вектор који поседује гене којима се контролише рекомбинација. Ови додатни гени на вектору су гени који омогућавају постојање резистенције на неомицин (*Neo* ген) и ген за тимидин киназу (ТК ген) (517, 518). За време хомологе рекомбинације *Neo* ген се увек уграђује у DNA хромозома, док се ТК ген губи. Вектор се смешта у ћелијску културу у чијем се медијуму налазе неомицин и ганцикловир или FIAU (енгл. 1-(29-deoxy29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil) који се под дејством тимидин киназе трансформише у летални продукт. Ћелије у чији се геном случајно инкорпорира вектор отпорне су на неомицин, али не и на присуство ганцикловира или FIAU. Насупрот овоме, ћелије у којима је обављена хомолога рекомбинација резистентне су на све три супстанце, јер се ТК ген није уградио у њихов геном. На овај начин се селекују само преживеле ћелије са хомологим рекомбинацијама (517, 518).

Како би се добили мишеви са делецијом гена за Gal-3 у лабораторији проф. др *Hsu-a* (*Univercity of California*) изведена је делеција гена за Gal-3 код ембрионалних матичних ћелија (519). Вектор је направљен тако да поседује фрагмент клониране DNA за Gal-3. Најпре је обављен прекид секвенце гена која кодира домен за препознавање угљених хидрата. Сегмент интрон-4-егзон-5 супституисан је геном за резистенцију на неомицин. Сегмент од егзона-4 до егзона-5 је смештен у *Poly(A)* вектор (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*) непосредно до промотера за тимидин киназу-*Neo* касете. Затим је део од егзона-5 до егзона-6 инкорпорисан нисходно од *Neo* касете, док је *Neo* геном извршен прекид сегмента на споју интрона-4 и егзона-5 (519). Када је у матичне ембрионалне ћелије мишева (B3) инкорпориран циљни вектор, уз помоћ PCR-а и *Southern blot*-а је потврђена хомолога рекомбинација у ћелијама са којима је обављен

трансфер и које су биле отпорне на аминогликозид и генетицин. Фаворизовани су клонови са хомологом рекомбинацијом, а ћелије су убачене у бластоцисте C57BL/6 мишева. Затим је обављена имплантација ових бластоцисти у сурогат женке соја CD1.

Овим поступком су настали химерични мужјаци. Ови мужјаци су укрштани са женкама соја C57BL/6. На овај начин су добијени хетерозиготни LGALS3-/+ потомци. Укрштањем ових мишева у сродству, после 9 генерација добијени су хомозиготни мишеви код којих није постојала експресија гена за Gal-3 (519).

Испитивањем различитих ткива мишева добијених на овај начин, потврђено је да код LGALS3-/- мишева не постоји експресија Gal-3 и нису уочене разлике у телесној маси и грађи ткива и органа између ових мишева и мишева дивљег соја. Такође, код LGALS3-/- мишева није детектована разлика у броју ћелија у периферној крви и биохемијском профилу у односу на LGALS3+/+ мишеве (519).

3.3. Експерименталне групе и третман

Експерименталне групе

У истраживању је учествовало укупно 32 миша (16 WT и 16 Gal-3^{-/-}) соја C57BL/6, мушког пола, старости 20 недеља. Код ових мишева спроводили су се тестови понашања у базалним условима и у акутној инфламацији 24 часа након апликације LPS-а. Потом су се животиње жртвовале ради издвајања ткива хипокампуса.

Животиње су се методом случајног узорка одвајале у кавезе по групама, тако да су биле формиране 4 групе животиња (по 8 мишева), мушког пола (старости 20 недеља):

1. WT C57BL/6 – једнократно се апликовао физиолошки раствор у одговарајућој запремини;
2. Gal-3^{-/-} C57BL/6 – једнократно се апликовао физиолошки раствор у одговарајућој запремини;
3. WT C57BL/6 – једнократно се апликовао LPS у одговарајућој запремини (акутна инфламација);
4. Gal-3^{-/-} C57BL/6 – једнократно се апликовао LPS у одговарајућој запремини (акутна инфламација).

Третман

Према подацима из литературе системска инфламација и неуроинфламација могу се индуковати интраперитонеалном применом LPS-а. У претходним истраживањима у ове сврхе примењиване су различите дозе LPS-а једнократно или је он апликован више пута у одређеним временским размацима. У овом истраживању неуроинфламација је индукована применом LPS-а (*E. coli* 055:B5; L2880, *Sigma-Aldrich*) интраперитонеално, у једној дози од 5 mg/kg (0.5 ml), док се у осталим групама апликовала иста количина физиолошког раствора интраперитонеално (за испитивања у базалним условима) (520). На овај начин избегнуте су потенцијалне разлике у резултатима експеримента које могу настати услед стресогеног ефекта интраперитонеалне администрације LPS-а.

3.4. Бихевиорална тестирања

Бихевиорална тестирања су се спроводила 24 сата након третмана. Тестирања су се обављала у 8 сати ујутру, док је храна уклањана увече, 12 сати пре почетка тестова понашања. Овај поступак се примењивао у складу са стандардним процедурама које се спроводе како би се одржао мотивациони статус животиња за спровођење бихевиоралних тестова (521). У циљу аклиматизације на нове услове, животиње су два сата пре почетка тестирања, премештане из виваријума у просторију у којој су се изводили бихевиорални тестови.

3.4.1. Тест отвореног поља

Тест отвореног поља је један од најчешће коришћених тестова за процену опште моторичке и експлоративне активности на анималним моделима. Овај тест такође служи за квантификацију понашања сличног анксиозности код глодара (94, 96, 522). Апаратура теста отвореног поља се састојала од сивог квадрата ($40 \times 40 \times 15$ cm). Арена овог теста је била виртуелно подељена на две зоне, централну и периферну зону (слика 3.1.). На почетку теста свака експериментална животиња је постављена у центар арене. Образац кретања животиње у арени је омогућавао добијање информације о стању сличном анксиозности. Овај тест је спроведен у условима одговарајућег осветљења и тишине. Након постављања експерименталне животиње у центар арене, експериментатор је напуштао просторију у којој се спроводило тестирање. Активност мишева снимана је у трајању од 5 минута помоћу видео камере која се налазила на 150 cm изнад арене, а затим су видео записи анализирани коришћењем одговарајућег софтвера. По завршетку сваког снимања арена је чишћена водом и дезинфикована 70% етил-алкохолем како би се уклонили трагови мириса тестираних експерименталних животиња, који би могли да утичу на понашање животиња при наредном тестирању. Након тестирања су експерименталне животиње враћане у своје кавезе.

Праћени су следећи параметри теста отвореног поља:

- укупни пређени пут – изражен у cm;
- укупно време кретања – изражено у s;

- укупно време проведено у централној зони – изражено у s;
- број улазака у централну зону;
- број усправљања животиње на задње шапе.



Слика 3.1. Тест отвореног поља. А – лавиринт; Б – виртуелна подела лавиринта на зоне; В – путања којом се животиња кретала за време теста добијена обрадом снимка помоћу програма *EthoVision XT12*, Noldus Information Technology, the Netherlands.

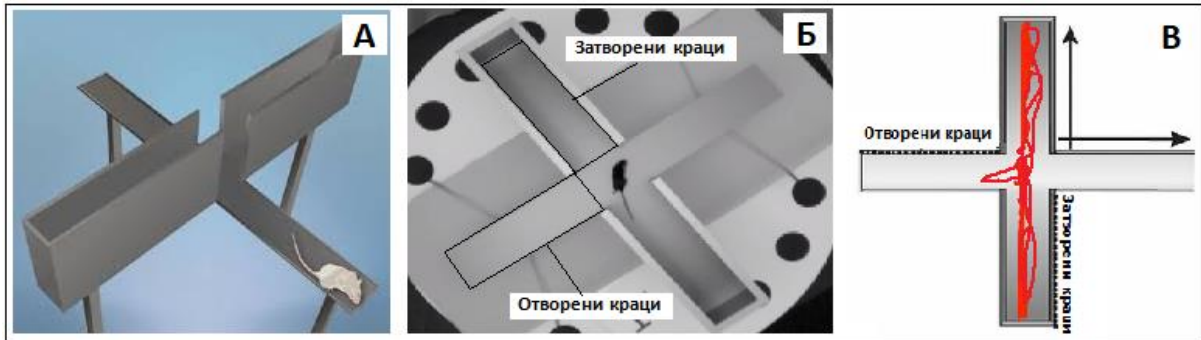
Посматрањем понашања животиња у арени можемо одредити њихов анксиозни статус. Број улазака у централну зону и укупно време проведено у централној зони представљају директне индикаторе анксиозности (523). Мањи степен анксиозности имају животиње које се слободно крећу у свим зонама арене, а посебно је важно да животиње слободно улазе и да се извесно време задржавају у централној зони, што се карактерише повећањем вредности параметара укупног времена проведеног у централној зони и броја улазака у централну зону. Насупрот томе, уколико животиње време претежно проведу у периферној зони, може се закључити да такве животиње имају повећан степен анксиозности. Индиректни индикатори анксиозности су параметри локомоторне активности (укупни пређени пут и укупно време кретања) (96). Смањење вредности ових параметара карактеристично је за нижи ниво локомоторне активности животиње, што индиректно указује на повећање степена анксиозности. Број усправљања представља важан параметар експлоративне активности, а будући да је експлоративна активност у негативној корелацији са страхом од непознатог, тј. анксиозношћу, овај параметар такође представља индиректни индикатор степена анксиозности (524, 525). Смањење експлоративне активности (броја усправљања) указује на повећање степена анксиозности.

3.4.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта

Тест уздигнутог крстастог лавиринта служи за селективније испитивање степена анксиозности и један је од тестова који се најчешће користи за ту сврху. Апаратура овог теста, за мишеве као експерименталне животиње, састојала се од два отворена (33×10 cm) и два затворена крака ($33 \times 10 \times 15$ cm) који су се међусобно налазили под правим углом, а лавиринт је био подигнут 80 cm од пода (слика 3.2.). Свака животиња је на почетку тестирања постављена у центар лавиринта, са главом према отвореним крацима. Експерименталним животињама је било дозвољено да 5 минута слободно истражују лавиринт. Овај тест омогућава процену понашања животиња захваљујући постојању могућности боравка у сигурним делова лавиринта (2 затворена крака) и аверзивним деловима лавиринта (2 отворена крака). Након постављања животиње у центар арене, експериментатор је напуштао просторију у којој се спроводио експеримент. Експерименталне животиње су тестиране у условима одговарајуће осветљености и одсуства звучних стимулуса. Понашање животиње је забележено дигиталном видео камером која се налазила 250 cm изнад лавиринта. Након завршеног тестирања, експерименталне животиње су смештане у своје кавезе. После сваког завршеног тестирања лавиринт је чишћен употребом воде и 70% етил-алкохола како би се уклонили мириси који су могли утицати на понашање животиња при наредном тестирању.

Праћени су следећи параметри теста уздигнутог крстастог лавиринта:

- укупно време проведено у отвореним крацима – изражено у s;
- број улазака у отворене краке;
- укупни пређени пут – изражен у cm;
- укупно време кретања – изражено у s;
- број усправљања на задње шапе;
- број нагињања – број савијања главе испод нивоа отворених кракова лавиринта;
- број епизода укупне експлоративне активности – збир броја усправљања (који се углавном бележи у затвореним крацима) и броја нагињања (који се може запазити само у отвореним крацима) (526);



Слика 3.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта. А – лавиринт; Б – виртуелна подела лавиринта; В – путања кретања животиње за време трајања теста добијена обрадом снимка помоћу програма *EthoVision XT12*, Noldus Information Technology, the Netherlands.

Број улазака и укупно време проведено у отвореним крацима сматрају се директним индикаторима анксиозности (527, 528). Животиње са већим степеном анксиозности су дуже боравиле у затвореним крацима, што је било праћено смањењем укупног времена проведеног у отвореним крацима и бројем улазака у отворене краке. Повећање степена анксиозности је било праћено смањењем експлоративне активности, што се детектовало преко смањења вредности следећих параметара: броја усправљања, броја нагињања и броја епизода укупне експлоративне активности, који су уједно били и индиректни показатељи степена анксиозности. На повећање степена анксиозности индиректно је указивало и смањење локомоторне активности, које се манифестовало смањењем вредности параметара укупног пређеног пута и укупног времена кретања.

3.4.3. Тест качења за реп

Тест качења за реп се користи за утврђивање степена депресивности (529) Апарат теста качења за реп чинио је метални оквир (60x60 cm) и део за фиксирање животиње (адхезивна трака) који се налазио у центру. Да би се избегло пењање животиње уз реп, постављена је пластична кружна баријера (диск пречника 25 cm) на 1 cm од места качења репа, која је у централном делу имала рупу пречника 1.5 cm кроз коју се провлачио реп (слика 3.3.). За време обављања овог теста експериментална животиња је висила окачена о реп помоћу адхезивне траке. Тест је трајао 6 минута, а понашање животиње је снимано дигиталном видео камером. У основи теста се налази чињеница да ће животиња која је доведена у безизлазну ситуацију (фиксирана да висе окачена за реп са главом окренутом на доле), покушати да се ослободи из неприродног положаја, али и да ће након извесног времена упасти у стање резигнације, праћено појавом имобилности. Под имобилношћу се подразумевало стање у којем је животиња најмање 5 секунди без уочљивих вољних покрета (обим покрета <1 cm) тела или одређених делова тела, т.ј. главе или екстремитета. Под имобилношћу се подразумевало и невољно љуљање животиња. За време извођења овог теста, експерименталне животиње су имале периоде моторне активности и имобилности. Тестирање је обављено у условима одговарајуће осветљености и одсуства звучних стимулуса. По завршетку сваког теста, апарат је чишћен помоћу воде и 70% етил-алкохола, како би се уклонили мириси који су могли да утичу на понашање. После завршеног експеримента животиње су премештане натраг у своје кавезе.

Праћени су следећи параметри теста качења за реп:

- време до појаве прве имобилности – изражено у s;
- број епизода имобилности – укупан број периода одсуства активног супростављања положају који је непријатан;
- укупно време имобилности – укупно време пасивних реакција животиње на постојеће околности, изражено у s;
- просечно трајање епизоде имобилности животиње – изражено у s.

Ови параметри представљају индикаторе депресивности. Скраћење времена до појаве прве имобилности и повећање вредности броја епизода имобилности, укупног

времена имобилности и просечног трајања епизоде имобилности животиње су указивали на повећан степен депресивности.



Слика 3.3. Тест качења за реп.

3.4.4. Снимање и анализа видео записа

Извођење бихевиоралних тестова је забележено дигиталном видео камером. За анализу видео записа користио се одговарајући програм (*EthoVision XT12*, *Noldus Information Technology, the Netherlands*). Овај програм је омогућио добијање нумеричких параметара, неопходних за квантификацију бихевиоралних манифестација.

3.5. Жртвовање животиња и прикупљање узорака за анализе

Након обављених тестова понашања, животиње су жртвоване како би се узели узорци ткива хипокампуса за потребне анализе. Животиње су жртвоване у атмосфери засићеној диетилетром (ВЕТАНЕМ, Београд, Србија). Животиње су декапитоване како би се издвојио мозак, а затим изоловао хипокампус. Након издвајања ткива хипокампуса, узорци су складиштени на одговарајући начин (формалин за имунохистохемијске анализе, дубоко замрзавање за остале врсте анализа).

3.7. Хистолошка анализа ткива хипокампуса

Исечци ткива хипокампуса који су се користили за хистолошку анализу су били фиксирани формалином и укалупљени парафином (енгл. *formalin-fixed and paraffin-embedded*, FFPE). Након добијања парафинских калупа, помоћу микротома су направљени коронарни пресеци можданог ткива дебљине ~5 μm . Парафински исечци су бојени хематоксилином и еозином како би се проценом инфилтрације инфламацијских ћелија у хипокампусу детектовала акутна неуроинфламација.

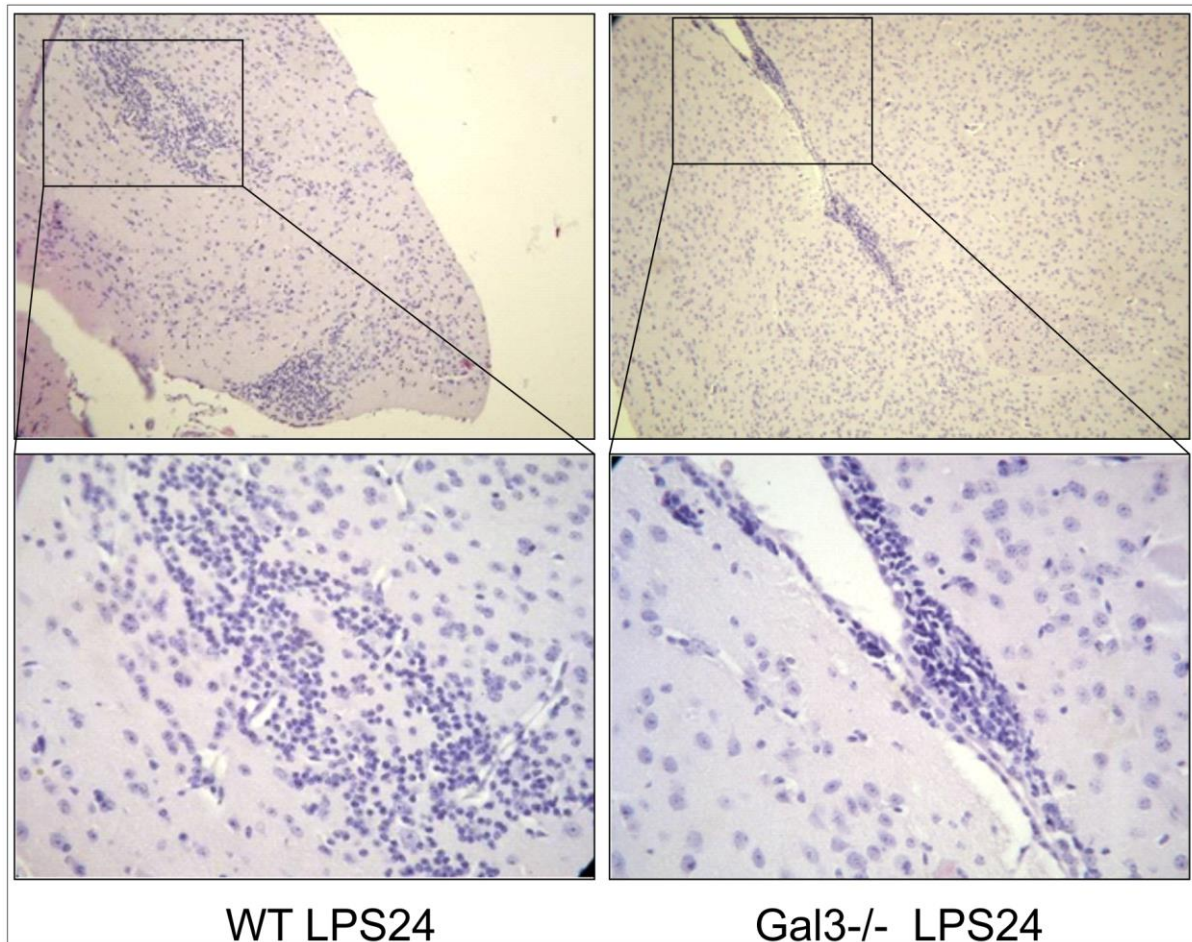
3.7.1. Израда препарата

Након декапитације и брзе екстракције из лобање, мозак мишева је третиран према следећој процедури: фиксација у 10% формалдехиду (неутрални рН), дехидратација и калупљење. Ткиво је фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури, при чему је његова запремина била десет пута већа од запремине ткива. Након тога је обављена дехидратација, испирање и импрегнација ткива употребом ткивног процесора. Ткиво је затим било укалупљено у парафинске блокове. Помоћу микротома су исечени резови дебљине 5 μm (приближно 1.7 mm од брегме). Добијени пресеци су стављани на предметна стакла, након чега је уследило бојење одговарајућом техником.

3.7.2. Бојење хематоксилином и еозином

Парафински исечци су најпре били загрејани у термостату на +56⁰С у трајању од 45 минута. Депарафинизација се обављала у ксилолу. Поступак рехидратације ткива је био следећи: најпре је примењено испирање у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, затим 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Бојење препарата је обављено Mayer-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у трајању од 10 минута, а затим је следило испирање дестилованом и текућом водом у трајању од 5 минута. Након тога препарати су бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich*) у трајању од 2 минута. Затим је ткиво дехидратисано и просветљено у ксилолу. Дехидратација је обављена помоћу растућих концентрација

алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након ових поступака, препарати су просветљени потапањем у мешавину ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, у трајању од 1 минута, а затим 2 пута по 1 минут у ксилолу. На крају су ткивни исечци прекривени *Canada balsam*-ом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Сушење препарата је трајало 24 сата, након чега је обављена анализа добијених препарата и њихово фотомикрографисање на светлосном микроскопу (*BX51, Olympus, Japan*).



Слика 3.4. Приказ инфламацијског инфилтрата на коронарном пресеку мозга мишева. Горњи панел - бојење хематоксилином и еозином, $\times 10$, доњи панел - бојење хематоксилином и еозином, $\times 40$. Патолошко потврда неуроинфламације 24h од апликације LPS-а. На слици се види периваскуларни инфламацијски инфилтрат код Gal-3^{-/-} и израженији инфилтрат код WT мишева.

3.8. Имунохистохемијска анализа

Имунохистохемијско бојење парафинских исечака ткива мозга је било изведено коришћењем примарног зечјег анти-BDNF антитела (*ab108319, Abcam, Cambridge, UK*) за бојење BDNF-а по одговарајућем протоколу. Бојење је визуализовано коришћењем *Expose mouse and rabbit specific HRP/DAB detection IHC Kit-a (ab80436, Abcam, Cambridge, UK)*.

3.8.1. Израда препарата

Парафински исечци ткива мозга дебљине 5 μm су најпре депарафинисани и рехидратисани. Парафински исечци су загрејани у термостату на $+56^{\circ}\text{C}$ у трајању од 45 минута, а затим су депарафинисани потапањем у ксилол 3 пута по 5 минута. У току поступка рехидратације ткива било је примењено испирање исечака у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, затим 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Након ових поступака препарати су кувани 21 минут у 10 mM Na-цитрата (pH 6.0) у микроталасној пећи, како би се омогућило отварање епитопа. После хлађења, препарати су три пута интензивно испрани у PBS-у (енгл. *phosphate buffered saline*) (pH=7.2). Активност ендogene пероксидазе у ткивним исечцима је блокирана додавањем 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block-a*. После инкубације у трајању од 10 минута на собној температури, препарати су два пута испрани PBS-ом. После тога је на препарате додато 2-3 капи *Protein Block-a* и након инкубације од 10 минута уследило је још једно испирање у PBS-у.

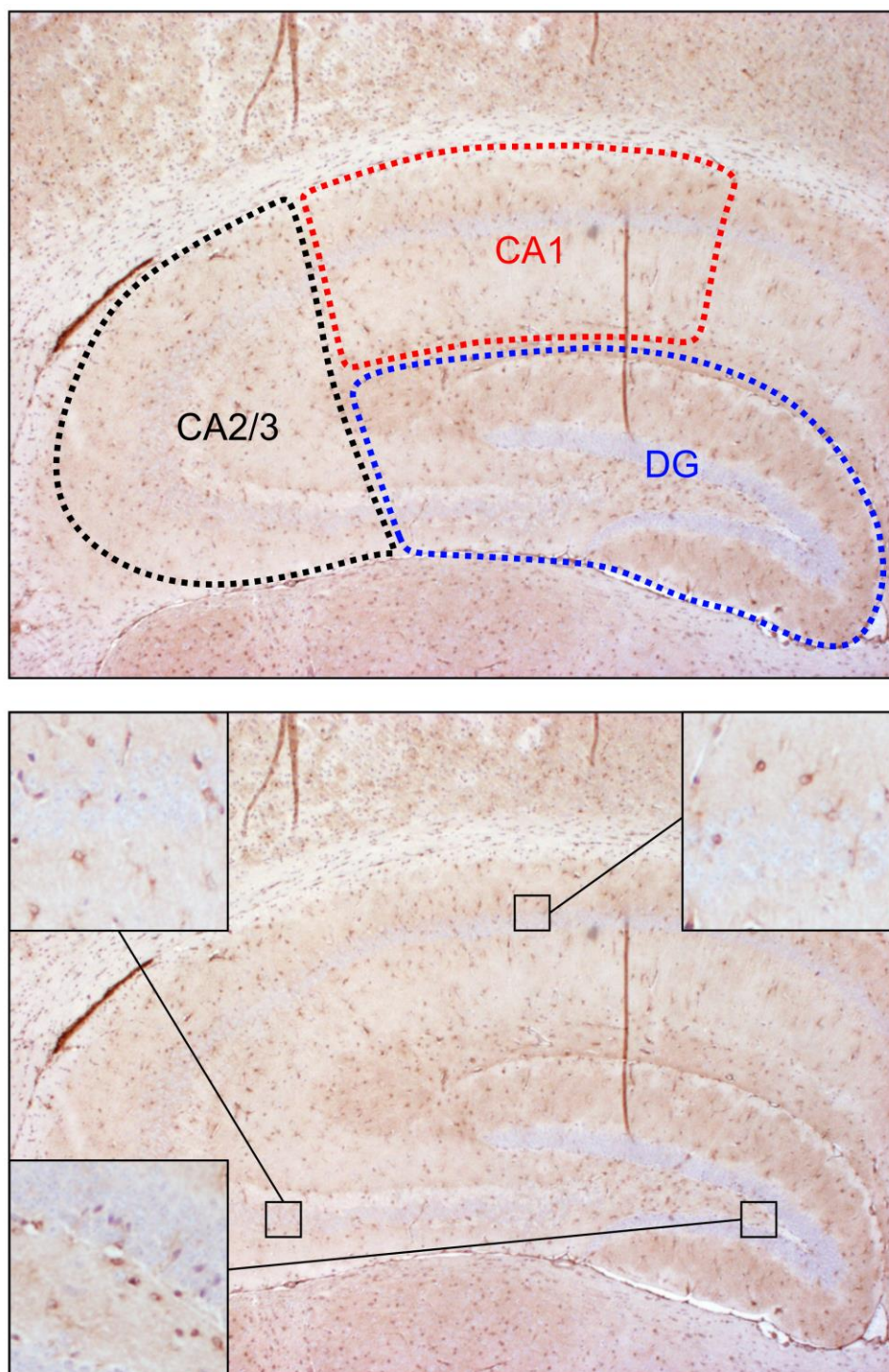
3.8.2. Бојење препарата - детекција BDNF-имунореактивних неурона

Након претходно описаног поступка, на ткивне исечке мозга је додато по 100 μl (1:100) примарног зечјег анти-BDNF антитела (*ab108319, Abcam, Cambridge, UK*). Примарна антитела су растворена у PBS-у са 1% BSA (енгл. *bovine serum albumin*). Инкубација са примарним антителима је обављена током ноћи, у влажној комори, на собној температури. После инкубације препарати су били испрани 3 пута по 5 минута у PBS-у. Након тога је додат HRP (енгл. *horseradish peroxidase*) коњугат са

секундарним антителом и препарати су инкубирани 15 минута на собној температури. Након инкубације, препарати су опрани 4 пута по 5 минута у PBS-у. Затим је на ткивне исечке апликовано 2-3 капи DAB реагенса који је претходно добијен додавањем 30 μ l DAB *Chromogen*-а у 1.5 ml DAB *Substrate*-а. Развијање реакције DAB хромагена и пероксидазе је контролисано употребом микроскопа. Овај поступак је трајао од 1 до 10 минута. Ензимска реакција је прекинута након 4 испирања препарата у PBS-у. После завршног испирања у дестилованој води које је трајало 1 минут, ткивни исечци су 2 минута бојени хематоксилином по *Mayer*-у, како би се постигло контрастирање. Након бојења исечци су интензивно испрани млаком текућом водом у трајању од 10 минута. Након тога, уследио је поступак дехидратације. За процес дехидратације су коришћене растуће концентрације алкохола и то: третирање исечака 2 пута по 5 минута у 96% алкохолу и 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем у ксилол 2 пута по 5 минута. На препарате је стављен *Canada balsam*, медијум за покривање и покровно стакло. Затим је следило сушење препарата 24 сата на собној температури.

3.8.3. Бројање BDNF-имунореактивних неурона

Бројање BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу (3.8 mm од брегме) је реализовано употребом светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*) на $\times 60$ увеличању (слика 3.4.). Направљене су фотомикрографије за сва три циљана региона хипокампуса (CA1, CA2/3 и DG). Резултати су представљени као средњи број позитивно обојених ћелија по mm^2 у сва три региона хипокампуса (CA1, CA2/3 и DG), као и у пресецима ткива целог хипокампуса уз коришћење програма *ImageJ* (530).



Слика 3.5. Имунохистохемијска експресија BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу мишева. На горњем делу слике су представљени региони хипокампуса у којима је одређиван број BDNF-позитивних неурона (CA1, CA2/3, DG). На доњем делу слике су представљени појединачни BDNF-позитивни неурони из различитих региона хипокампуса (са одговарајућим увеличањем).

3.9. Одређивање концентрације цитокина у хомогенату ткива хипокампуса ELISA методом

Ткиво мишијих хипокампуса је било хомогенизовано у 200 μ l PBS-а и коктела за инхибицију протеаза (P8340, *Sigma Aldrich*, USA), помоћу стакленог хомогенизатора на леду. Суспензија је била подвргнута ултрасонификацији и након тога хомогенати су центрифугирани 15 минута на 1500 \times g. Узети супернатанти су се чували на -80°C . Концентрација IL-6 и TNF- α у хомогенату хипокампуса се одређивала комерцијалним сетовима за имуноензимску реакцију (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) произвођача (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Реакција се спроводила према препорукама произвођача. Растварање стандарда је обављено помоћу PBS-а, тако да је почетна концентрација за IL-6 била 1000 pg/ml, док је за TNF- α износила 2000 pg/ml. Затим су од стандарда са највећим концентрацијама добијена серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *reagent diluent*, PBS са 1%-тним BSA). На основу вредности стандарда је добијена стандардна крива и једначина праве, помоћу које је обављено одређивање концентрације IL-6 и TNF- α .

Радне концентрације везујућег антитела (енгл. *capture antibody*) у волумену од 100 μ l додате су у микротитар плочу (енгл. *microtiter plate*) која је имала 96 бунарчића са равним дном (*Sarsted, Germany*). По завршетку овог поступка преко микротитар плоче је постављена адхезивна фолија (енгл. *ELISA Plate Sealers*), а микротитар плоча је остављена током ноћи на собној температури. Наредни поступак се састојао у испирању бунарчића одговарајућим пуфером (енгл. *wash buffer*). Након овога је следило додавање блокирајућег пуфера (енгл. *block buffer*, PBS са 1%-тним BSA) запремине 300 μ l, затим су плоче стајале на собној температури током једног сата, после чега су третиране пуфером за испирање.

Употребом дејонизоване воде узорци су разблажени 10 пута, после овог поступка су узорци и припремљени стандарди смештени у микротитар плочу и прекривени адхезивном фолијом. Тако припремљене микротитар плоче су инкубиране на собној температури у трајању од два сата. После обављеног испирања микротитар плоча, у бунарчиће је стављено по 100 μ l радне концентрације антитела која служе за детекцију (енгл. *detection antibody*). Затим је уследила двочасовна инкубација микротитар плоча прекривених адхезивном фолијом на собној температури. После инкубације и испирања микротитар плоча, у бунарчиће је додато 100 μ l радне

концентрације *Streptavidin*-HRP. Микротитар плоче су затим заштићене од сунчеве светлости и инкубиране у трајању од 20 минута на собној температури. После овог поступка микротитар плоче су испране. У бунарчиће микротитар плоче је затим сипано 100 μl раствореног супстрата (енгл. *substrate solution: color reagent A + color reagent B*) у размери 1:1. По истеку 20 минута, додато је 50 μl стоп раствора (енгл. *stop solution: 2N H₂SO₄*), након чега је следило читавање оптичке густине на 450 nm, помоћу *Microplate reader*-а (*Zenyth 3100 Multi-Mode-Detektor, Anthos, Austria*).

Вредности добијене читавањем су пре извођења анализе кориговане за вредности абсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). За добијање вредности за сваки узорак понаособ конструисана је стандардна крива према измереним вредностима стандарда.

3.10. Анализа експресије гена у ткиву хипокампуса методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену

3.10.1. Изолација RNA из ткива хипокампуса мишева

За поступак издвајања укупне рибонуклеопротеинске киселине из ткива хипокампуса коришћен је тризол реагенс (раствор фенола и гуанидин изотиоцианата) (*Invitrogen TRIzol™ Reagent, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*) на 100 mg ткива и ручни стаклени хомогенизатор на леду. Хомогенат је затим смештен у епрувете од 1.5 ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) и центрифугиран 5 минута на $12000 \times g$ на $+4^\circ\text{C}$. Чист супернатант је пребачен у нове епрувете и инкубиран 5 минута како би се обавила дисоцијација нуклеопротеинског комплекса. У супернатант је додато 0.2 ml хлороформа на 1 ml *TRIzol™ Reagent*-а за лизирање и пажљиво су затворене епрувете. Узорци су добро промешани, инкубирани 2-3 минута на собној температури, а потом центрифугирани 15 минута на $12000 \times g$ на $+4^\circ\text{C}$. Након центрифугирања раздвојила су се три слоја, доњи црвени (фенол-хлороформ), интерфаза и безбојна горња водена фаза. Затим је из епрувете нагнуте под углом од 45° пипетирана горња водена фаза која је садржала RNA и пренета у нову епрувету.

Садржај овог слоја је пребачен у нове епрувете у које је додато 0.5 mL расхлађеног изопропанола да би се обавио процес преципитације RNA. Узорци су лагано промешани, инкубирани 10 минута на собној температури и потом центрифугирани 10 минута на $12000 \times g$ на $+4^\circ\text{C}$, а затим се пипетирањем одбацио супернатант.

Талог из епрувета је ресуспендован помоћу 1 mL 75% етанола на 1 mL *TRIzol™*, затим је вортексован и центрифугиран 5 минута на $7500 \times g$ на $+4^\circ\text{C}$. Након тога је помоћу пипете уклоњен супернатант, а потом је преостали талог сушен 5 до 10 минута на собној температури. Суви талог који је садржао RNA је ресуспендован у 20-50 μL воде која не садржи нуклеазе (*Nuclease free water, Applied Biosystems*). Затим су узорци инкубирани у воденом купатилу на температури $55-60^\circ\text{C}$ 10-15 минута. Подаци о концентрацији и пречишћености RNA добијени су методом спектрофотометрије, мерењем апсорбанце на 260/280 nm помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*).

3.10.2. Реверзна транскрипција RNA у комплементарну DNA

Реверзна транскрипција подразумева превођење једноланчане RNA у комплементарну DNA (енгл. *complementary DNA*, cDNA). Реверзна транскрипција изведена је употребом *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a* (*Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), према протоколу произвођача. Транскрипција је изведена на следећи начин: 10 μl узорка који садржи 2 μg укупне RNA изоловане из хипокампуса, инкубирано је са 10 μl главне мешавине (енгл. *Master mix*). Мастер микс је направљен на леду и састојао се из: 2 μl пуфера (*RT Buffer*), 0.8 μl dNTP *Mix-a*, 2 μl хексамера (*Random Hexamer Primer*), 1 μl реверзне транскриптазе (*Multi ScribeTM Reverse Transcriptase*) и 4.2 μl воде без нуклеазе (*Nuclease-free H₂O*). Мастер микс је додат у епрувете у којима се налазила RNA. Садржај епрувете је лагано промешан и остављен да се инкубира 10 минута на 25°C, а онда 120 минута на 37 °C. Реакција је прекинута загревањем 5 минута на 85°C, након чега су узорци охлађени на +4°C. У ову сврху коришћен је *Mastercycler® ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). На овај начин издвојена је cDNA која се користила за квантификацију експресије гена. Сви поступци током процеса издвајања RNA и превођења у cDNA обављени су на леду.

3.10.3. Квантификација експресије гена

Експресија гена од интереса је процењена методом qRT-PCR. Реакција qRT-PCR је обављена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), помоћу микротитар плоча које су имале 96 места (*Twin.tec. real time PCR plates 96, Eppendorf*). Реакциона смеша је имала волумен од 20 μl по комори, а у њен састав је улазило: 2 μl узорка cDNA, 10 μl *Master mix-a* (*Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (2 \times), Applied Biosystems, Foster City, California, USA*), 1.2 μl смеше парова прајмера за ген од интереса („*forward*“ и „*reverse*“) и 6.8 μl воде без нуклеазе. Након тога је на плоче залепљена оптичка адхезивна фолија (*Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf*), и обављено је центрифугирање у трајању од 1 минута на 3000 \times g, након чега су плоче пребачене у qRT-PCR апарат (*Mastercycler® ep realplex*). Реакције qRT-PCR је обављена у складу са одређеном температурном шемом: 4 минута на 95°C, 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по 1 минут на 62°C. За процену специфичности PCR продукта постављени су одговарајући услови за извођење криве

топљења (енгл. *melting curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и затим 95°C. За процес амплификације одређених генских секвенци коришћене су mRNA специфичних прајмера за IL-6, TNF- α , TLR4, GABA-A рецепторску субјединицу $\alpha 2/Gabra2$, GABA-A рецепторску субјединицу $\alpha 5/Gabra5$, BDNF и β -actin као *housekeeping* ген (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*) (Табела 1).

Табела 1. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.

	<i>Forward primer (cense) (5'→3')</i>	<i>Reverse primer (antiense) (5'→3')</i>
BDNF	AGCTGAGCGTGTGTGACAGT	ACCCATGGGATTACACTTGG
GABA-A$\alpha 2/Gabra2$	TTGGGACGGGAAGAGTGTAG	CATCCTGTTCGATTTTGCTGA
GABA-A$\alpha 5/Gabra5$	GCCCTGGAAGCAGCTAAAAT	CGGGACATTTTGTTCGATCTT
TLR4	CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG	ACACTACCACAATAACCTTCCGGCTC
IL-6	TCCATCCAGTTGCCTTCTTG	TTCCACGATTTCCCAGAGAAC
TNF-α	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
β-actin	AGCTGCGTTTTACACCSTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT

Компаративна C_T (енгл. *Cycle trechold*, C_T) метода ($\Delta\Delta C_T$) коришћена је за процену релативне квантификације експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле. Ниво експресије анализираних гена нормализован је у односу на ниво експресије гена за β -актин који је представљао референтни ген детектован у идентичном узорку. Узорак из контролне групе који је имао вредност која је била приближна средњој вредности свих узорака из контролне групе, изабран је за функцију калибратора. Завршни резултат је био израчунат у релативним јединицама као N-пута (енгл. *fold change*) у односу на калибратор помоћу одговарајуће једначине:

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

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

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

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

Анализа података и израчунавање релативне генске експресије се обавила према *Livak*-у и *Schmittgen*-у (531).

3.11. Статистичка анализа

Подаци који су добијени у истраживању обрађивани су на следећи начин:

1. Узимајући у обзир природу података за њихово приказивање употребљени су: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, стандардна девијација, стандардна грешка и 95% интервали поверења.
2. За процену нормалности расподеле користио се *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro-Wilk*-ов тест и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
3. За утврђивање разлика између група, за испитиване параметре коришћена је анализа варијансе (ANOVA) са одговарајућом *post hoc* анализом.
4. Модел једноставане линеарнае регресије и *Pearson*-ов коефицијент корелације користио се за анализу повезаности између параметара.
6. Сви подаци из истраживања су обрађени помоћу статистичког пакета *SPSS* (енгл. *Statistical package for the social sciences*) 20.0 за *Windows*.

4.

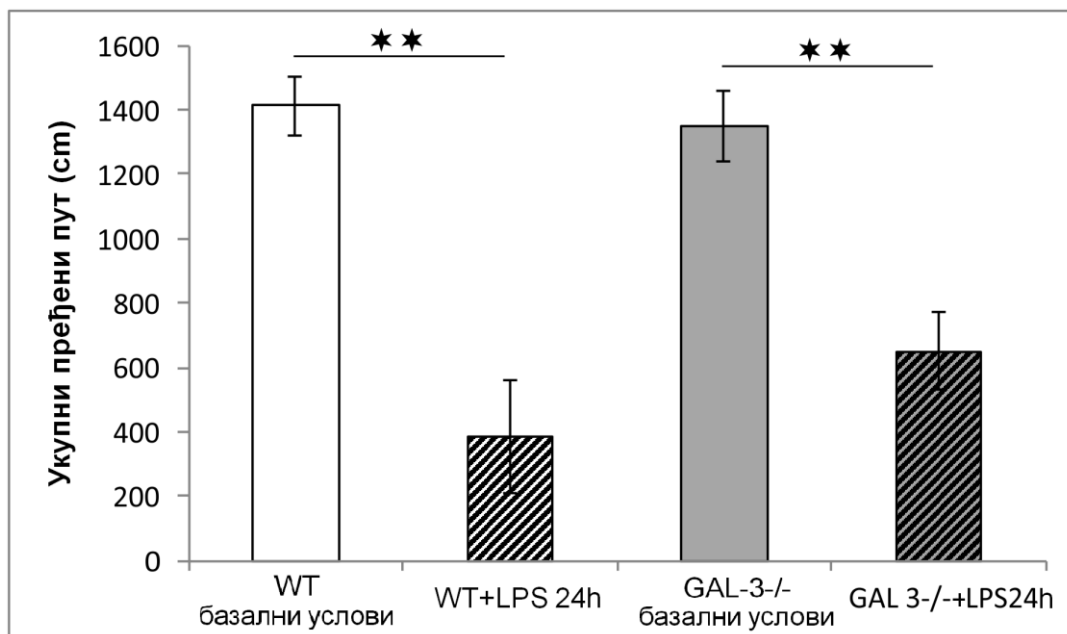
РЕЗУЛТАТИ

4.1. Бихевиорални тестови

4.1.1. Тест отвореног поља

4.1.1.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупни пређени пут

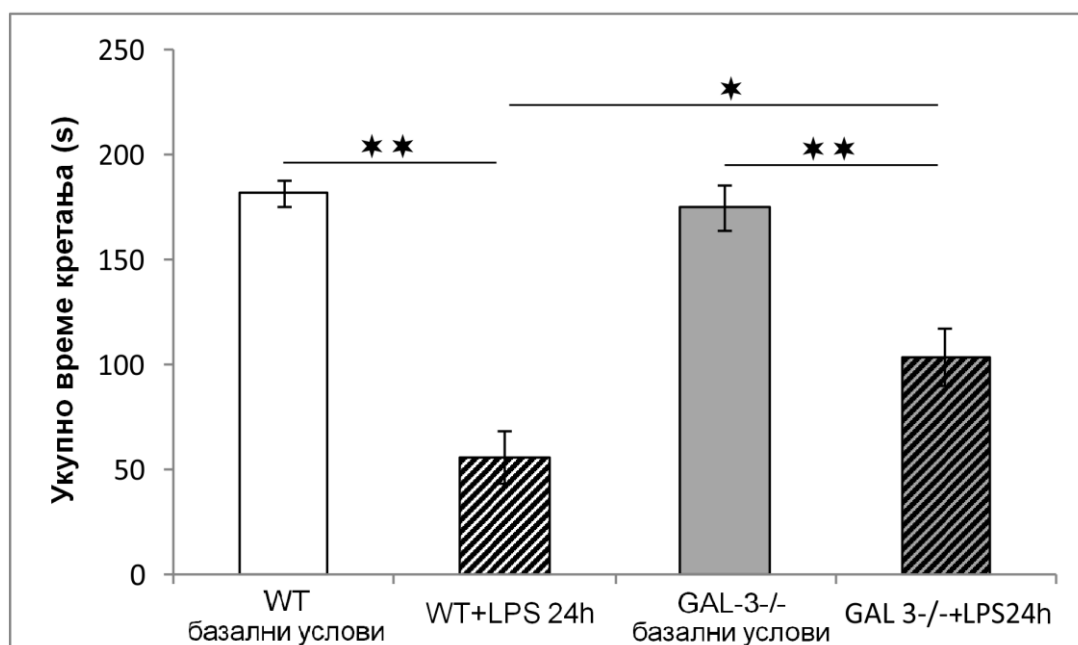
На слици 4.1. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупни пређени пут (cm) у тесту отвореног поља. У базалним условима није било статистички значајне разлике у вредности овог параметра локомоторне активности између WT и Gal-3-дефицијентних животиња. Ови резултати су указали на чињеницу да делеција гена за Gal-3 није имала битног утицаја на вредности укупног пређеног пута у базалним условима. Након примене LPS-а дошло је до статистички значајне редукције вредности овог параметра локомоторне активности у обе експерименталне групе (WT и Gal-3-/-) у односу на вредности у базалним условима ($F=16.135$, $df=3$, $p < 0.01$).



Слика 4.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупни пређени пут (cm) у тесту отвореног поља. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.1.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време кретања

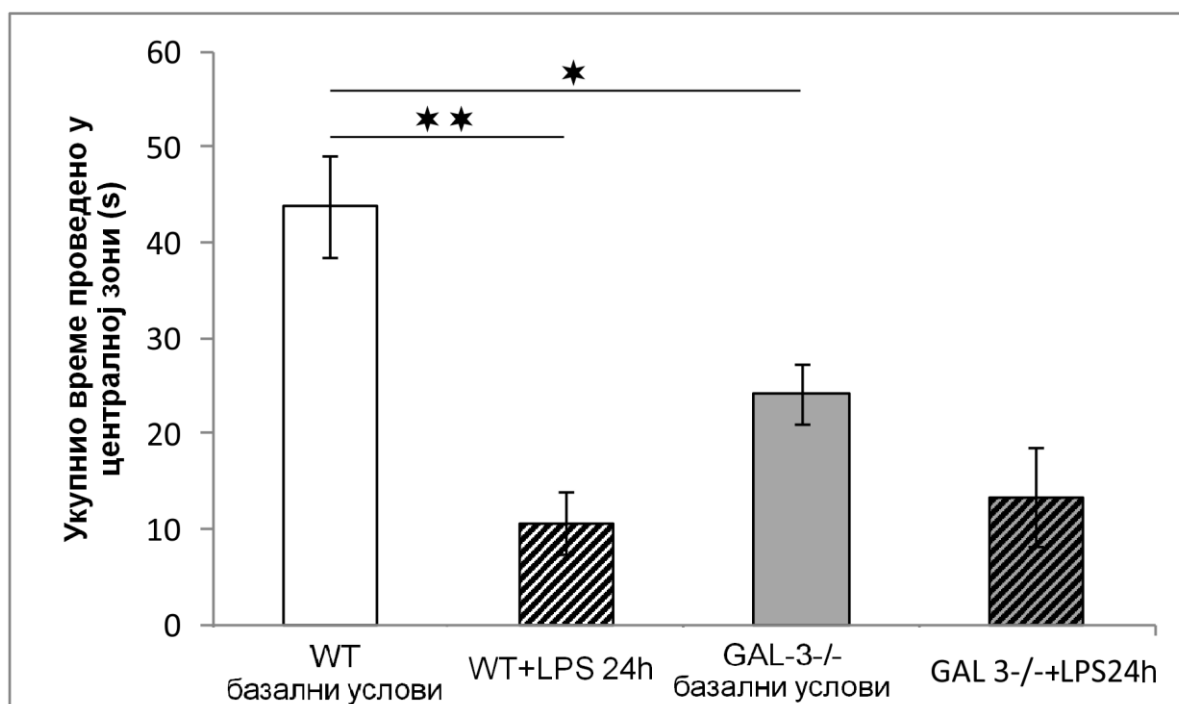
На слици 4.2. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време кретања (s) у тесту отвореног поља. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=28.284$, $df=3$). Делеција гена за Gal-3 није значајно утицала на вредности овог параметра у базалним условима, односно није било статистички значајне разлике у вредности укупног времена кретања између WT и Gal-3-дефицијентних животиња. Након примене LPS-а забележена је статистички значајна редукција вредности овог параметра локомоторне активности у обе експерименталне групе. Укупно време кретања је током акутне инфламације било значајно смањено и код WT и Gal-3-/- мишева у односу на укупно време кретања у базалним условима ($p<0.01$), с тим што је делеција гена за Gal-3 ублажила ефекат акутне инфламације на редукцију вредности овог параметра. Постојала је и статистички значајна разлика ($p<0.05$) у вредностима овог параметра локомоторне активности између WT и Gal-3-/- мишева током акутне инфламације.



Слика 4.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време кретања (s) у тесту отвореног поља. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време проведено у централној зони

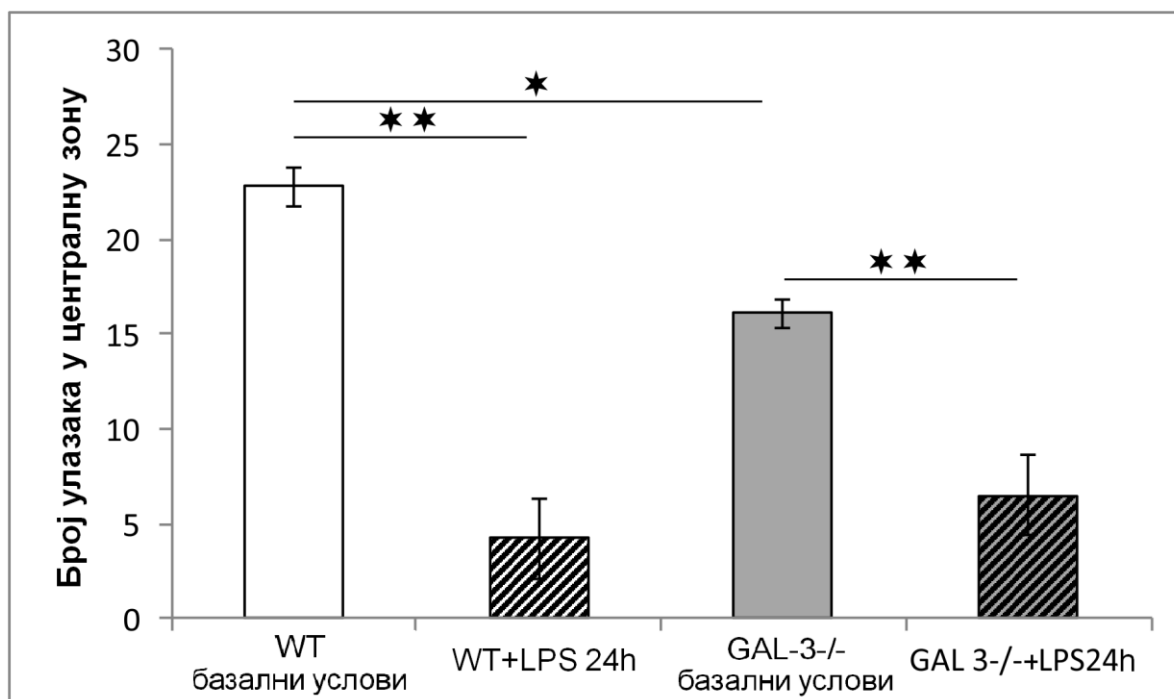
На слици 4.3. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време проведено у централној зони (s) у тесту отвореног поља. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=11.899$, $df=3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 била праћена смањењем укупног времена проведеног у централној зони, а уочена је и статистички значајна разлика у вредности овог параметра између WT и Gal-3 дефицијентних животиња ($p<0.05$). Након примене LPS-а детектована је редукција укупног времена проведеног у централној зони у обе експерименталне групе, али је 24h након примене LPS-а статистички значајна разлика постојала само код WT животиња у односу на базалне услове ($p<0.01$).



Слика 4.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време проведено у централној зони (s) у тесту отвореног поља. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број улазака у централну зону

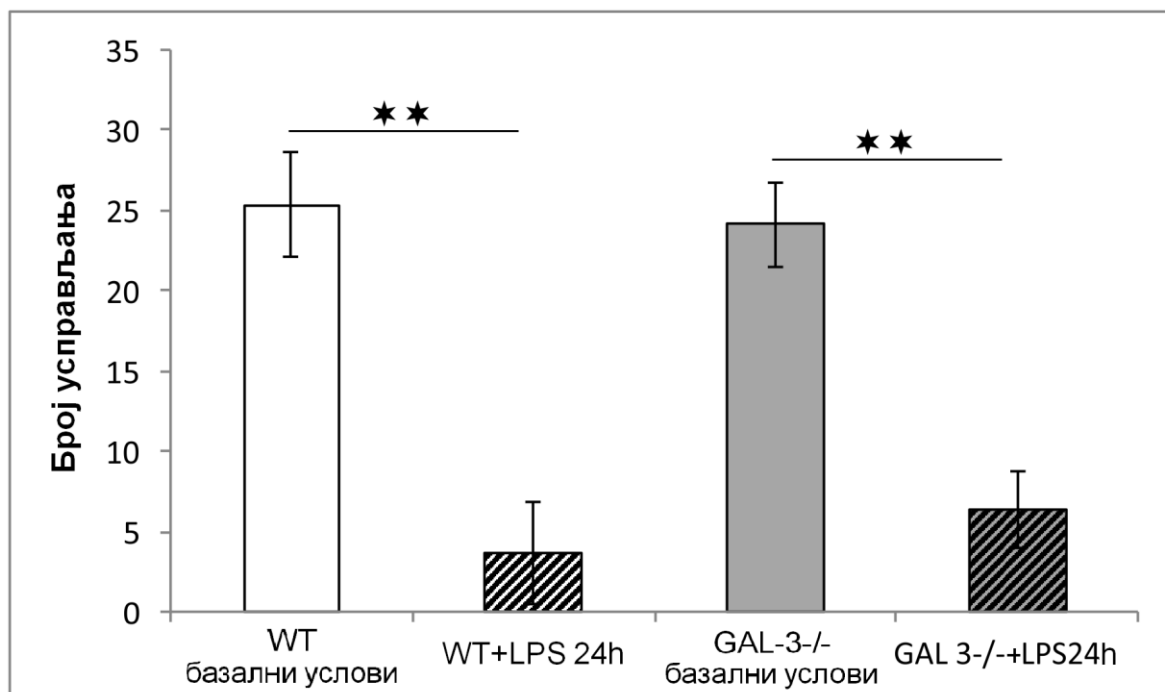
На слици 4.4. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број улазака у централну зону у тесту отвореног поља. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у вредности овог параметра ($F=27.569$, $df = 3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 била праћена смањењем број улазака у централну зону, а постојала је статистички значајна разлика у вредности овог параметра између WT и Gal-3-дефицијентних животиња ($p<0.05$). Након примене LPS-а уочена је редукција број улазака у централну зону у обе експерименталне групе. Забележена је статистички значајна разлика између вредности овог параметра током акутне инфламације и код WT и код Gal-3-/- животиња у односу на базалне услове ($p<0.01$).



Слика 4.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број улазака у централну зону у тесту отвореног поља. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.1.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број усправљања

На слици 4.5. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број усправљања у тесту отвореног поља. Делеција гена за Gal-3 није утицала на вредности овог параметра експлоративне активности. Није било статистички значајне разлике у вредности броја усправљања између WT и Gal-3 дефицијентних животиња у базалним условима. Након примене LPS-а дошло је до статистички значајне редукције броја усправљања у обе експерименталне групе у односу на базалне услове ($F=15.753$, $df=3$, $p<0.01$).

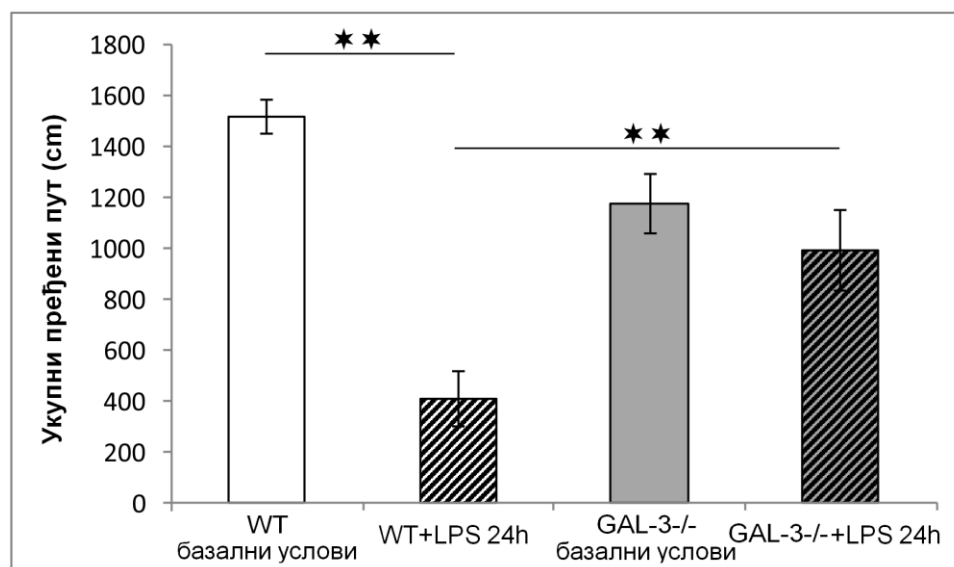


Слика 4.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број усправљања у тесту отвореног поља. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2. Тест уздигнутог крстастог лавиринта

4.1.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупни пређени пут

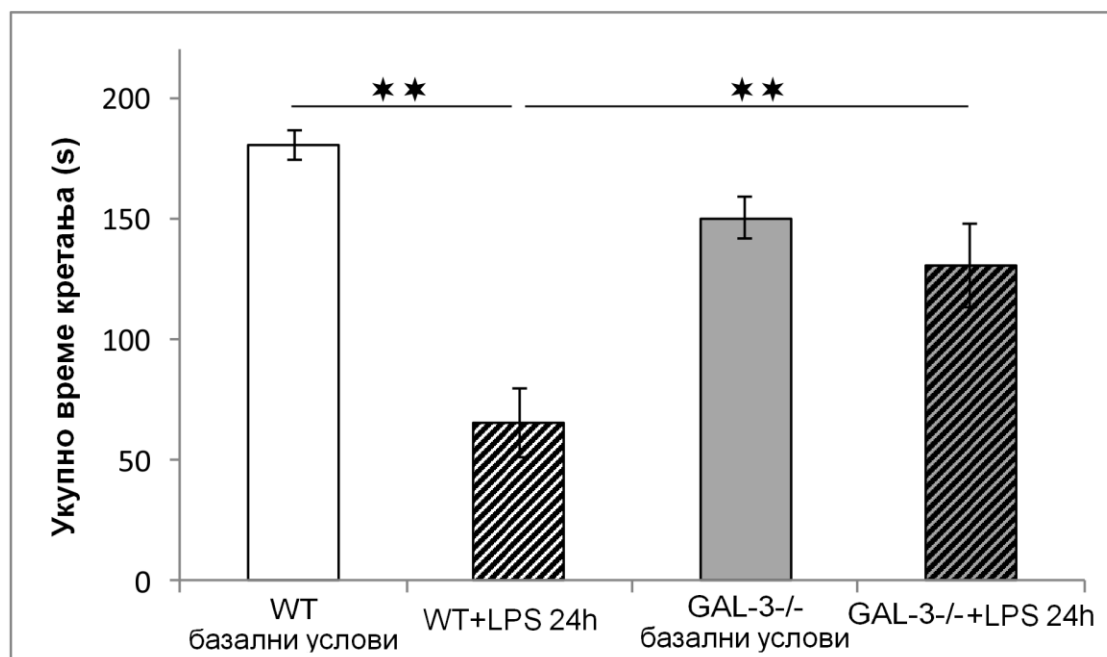
На слици 4.6. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупни пређени пут (cm) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=15.716$, $df=3$). У базалним условима делеција гена за Gal-3 је довела до редукције вредности овог параметра, али није било статистички значајне разлике у локомоторној активности између WT и Gal-3 дефицијентних животиња. Након примене LPS-а дошло је до смањења вредности укупног пређеног пута и код WT и код Gal-3^{-/-} мишева у односу на вредности у базалним условима, међутим промена вредности овог параметра је била статистички значајна само код WT животиња ($p<0.01$). Делеција гена за Gal-3 била је праћена слабијом редукцијом локомоторне активности након примене LPS-а у поређењу са редукцијом активности код WT животиња. Забележена је статистички значајна разлика у укупном пређеном путу између WT и Gal-3^{-/-} мишева током акутне инфламације ($p<0.01$).



Слика 4.6. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупни пређени пут (cm) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време кретања

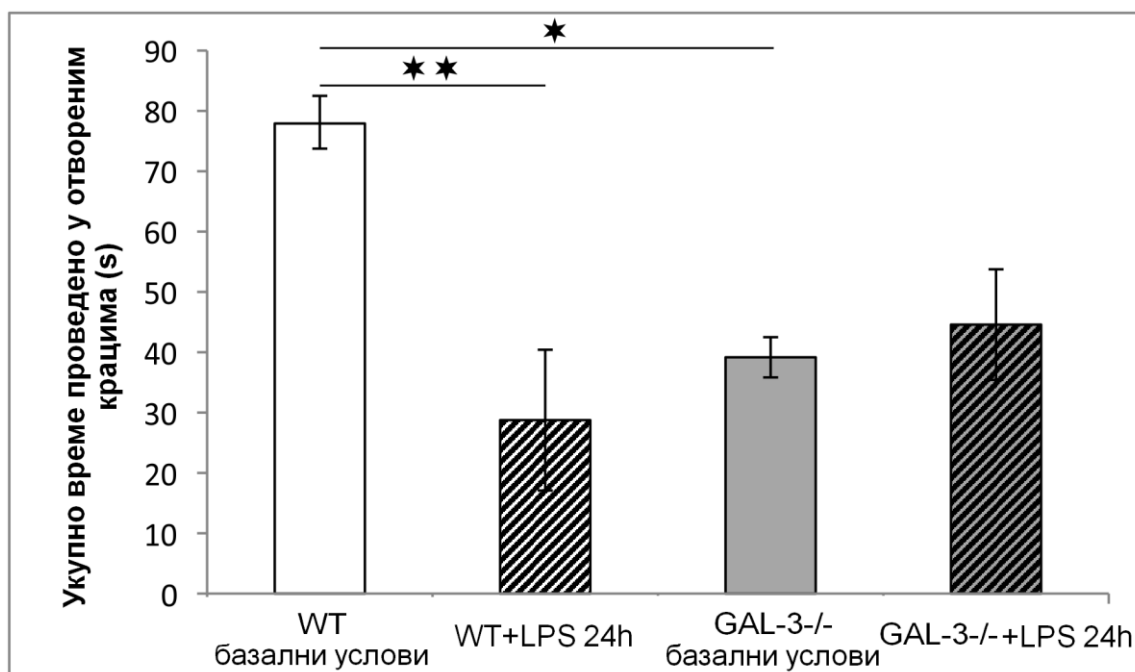
На слици 4.7. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време кретања (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=15.533$, $df=3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 довела до редукције вредности овог параметра, међутим није забележена статистички значајна разлика у укупном времену кретања између WT и Gal-3-дефицијентних животиња. Укупно време кретања је током акутне инфламације било смањено и код WT и Gal-3-/- мишева у односу на базалне услове, али је након примене LPS-а забележена значајна редукција вредности овог параметра локомоторне активности само код WT мишева ($p<0.01$). Током акутне инфламације је постојала и статистички значајна разлика ($p<0.01$) у вредностима овог параметра локомоторне активности између WT и Gal-3-/- мишева, при чему је код Gal-3-/- мишева детектована већа вредност укупног времена кретања у односу на WT мишеве.



Слика 4.7. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време кретања (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време проведено у отвореним крацима

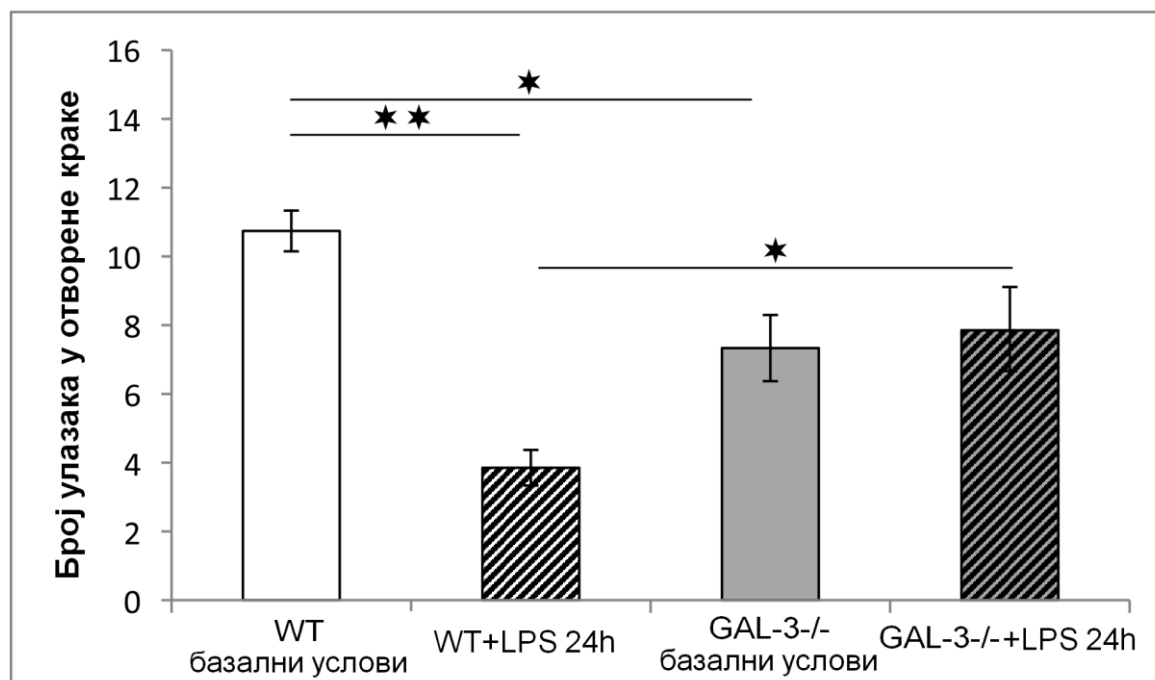
На слици 4.8. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време проведено у отвореним крацима у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (s). Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=7.27$, $df=3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 била праћена смањењем вредности овог параметра. Забележена је статистички значајна разлика у укупном времену проведеном у отвореним крацима између WT и Gal-3-дефицијентних животиња у базалним условима ($p<0.05$). Код WT животиња је након примене LPS-а уочена значајна редукција вредности овог параметра ($p<0.01$) у односу на базалне услове. С друге стране, код Gal-3 дефицијентних животиња је након примене LPS-а дошло до повећања вредности овог параметра, али разлика није била статистички значајна у односу на вредности у базалним условима.



Слика 4.8. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време проведено у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број улазака у отворене краке

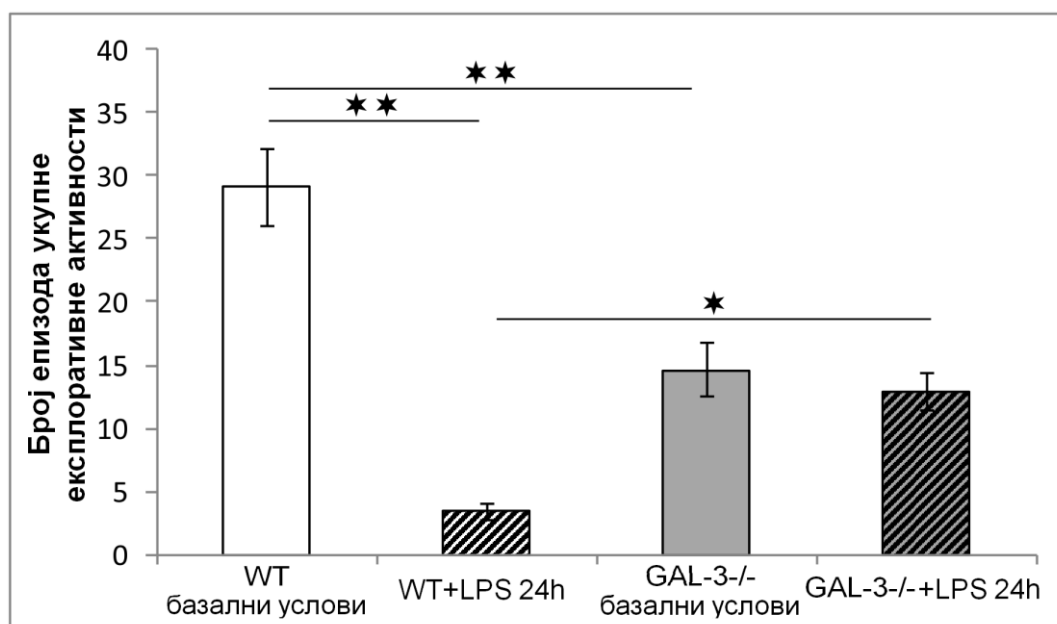
На слици 4.8. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број улазака у отворене краке у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (s). Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=10.658$, $df=3$). У базалним условима је код Gal-3^{-/-} мишева постојала статистички значајно израженија редукција вредности овог параметра у односу на WT мишеве ($p<0.05$). Код WT животиња је након примене LPS-а дошло до значајне редукције вредности овог параметра у односу на базалне услове ($p<0.01$). Насупрот овоме, код Gal-3 дефицијентних животиња је након примене LPS-а забележена већа вредности овог параметра у односу на базалне услове, али разлика није била статистички значајна. Током акутне инфламације постојала је статистички значајна разлика у броју улазака у отворене краке између Gal-3 и WT мишева ($p<0.05$).



Слика 4.9. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број улазака у отворене краке у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.2.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број епизода укупне експлоративне активности

На слици 4.8. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број епизода укупне експлоративне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена вредности овог параметра у одређеним експерименталним групама ($F=27.082$, $df=3$). Број епизода укупне експлоративне активности представља збир броја усправљања, који се углавном бележи у затвореним крацима и броја нагињања животиње, који се може запазити само у отвореним крацима. У базалним условима је код Gal-3 мишева постојала статистички значајно израженија редукција вредности овог параметра у односу на WT мишеве ($p<0.01$). За разлику од WT животиња, Gal-3^{-/-} мишеви нису показали значајно смањење експлоративне активности 24 часа након примене LPS-а у односу на базалне услове. Код Gal-3^{-/-} мишева су се одржале вредности приближне базалним вредностима, које су значајно биле веће од вредности забележених код WT животиња 24h након примене LPS-а ($p<0.05$).

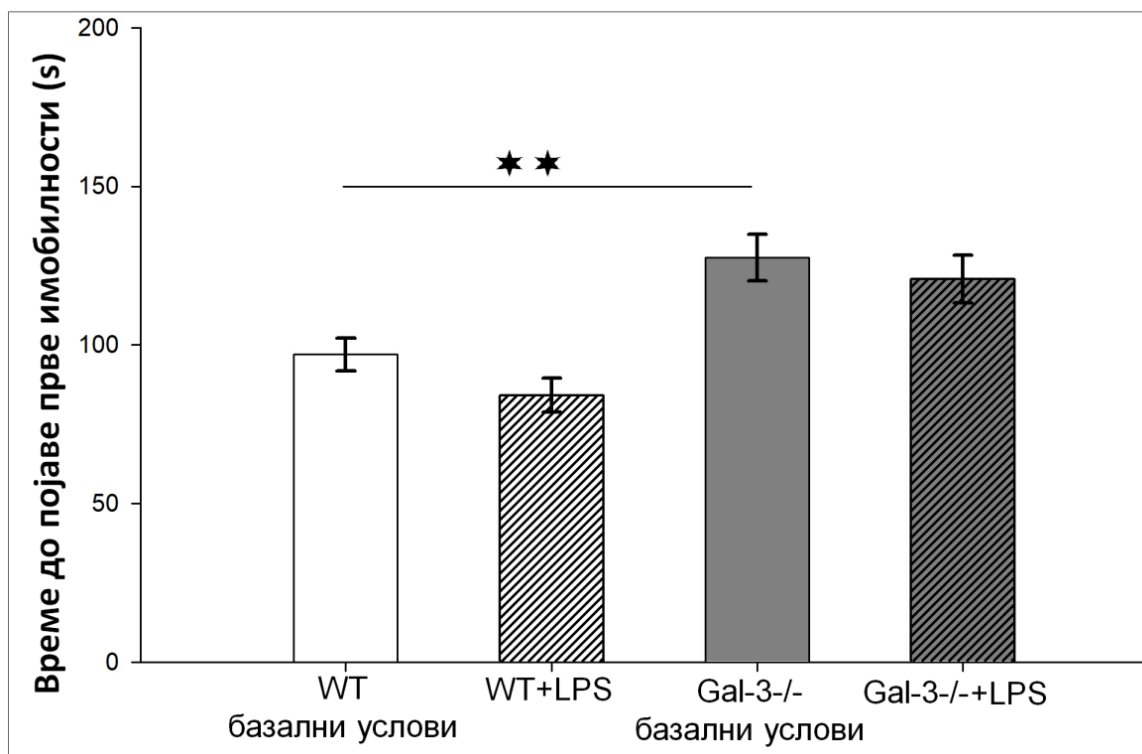


Слика 4.10. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број епизода укупне експлоративне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3. Тест качења за реп

4.1.3.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на време до појаве прве имобилности

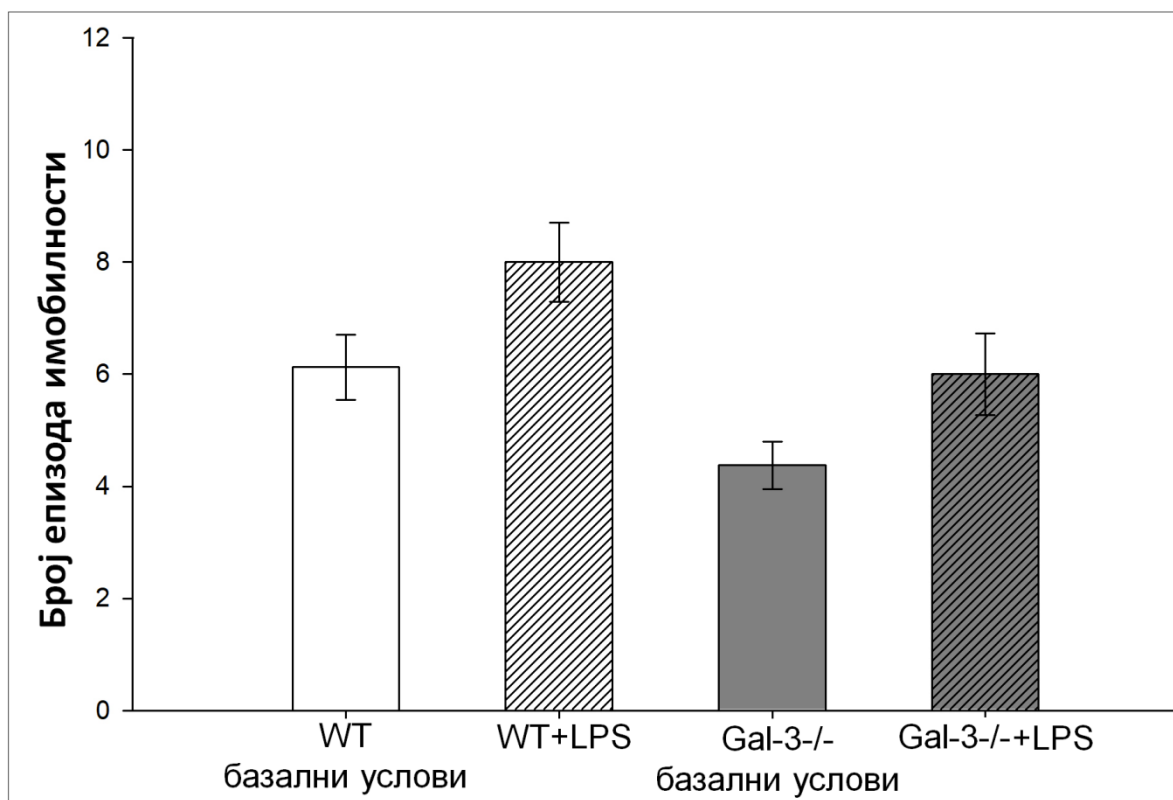
На слици 4.11. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на време до појаве прве имобилности (s) у тесту качења за реп. У базалним условима је код Gal-3 дефицијентних мишева забележено статистички значајно дуже време до појаве прве имобилности у односу на WT мишеве ($F=14.636$, $df=3$, $p<0.01$). Након примене LPS-а дошло је до смањења вредности овог параметра у обе експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-}) у односу на вредности у базалним условима, али ове промене нису биле статистички значајне.



Слика 4.11. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на време до појаве прве имобилности (s) у тесту качења за реп. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број епизода имобилности

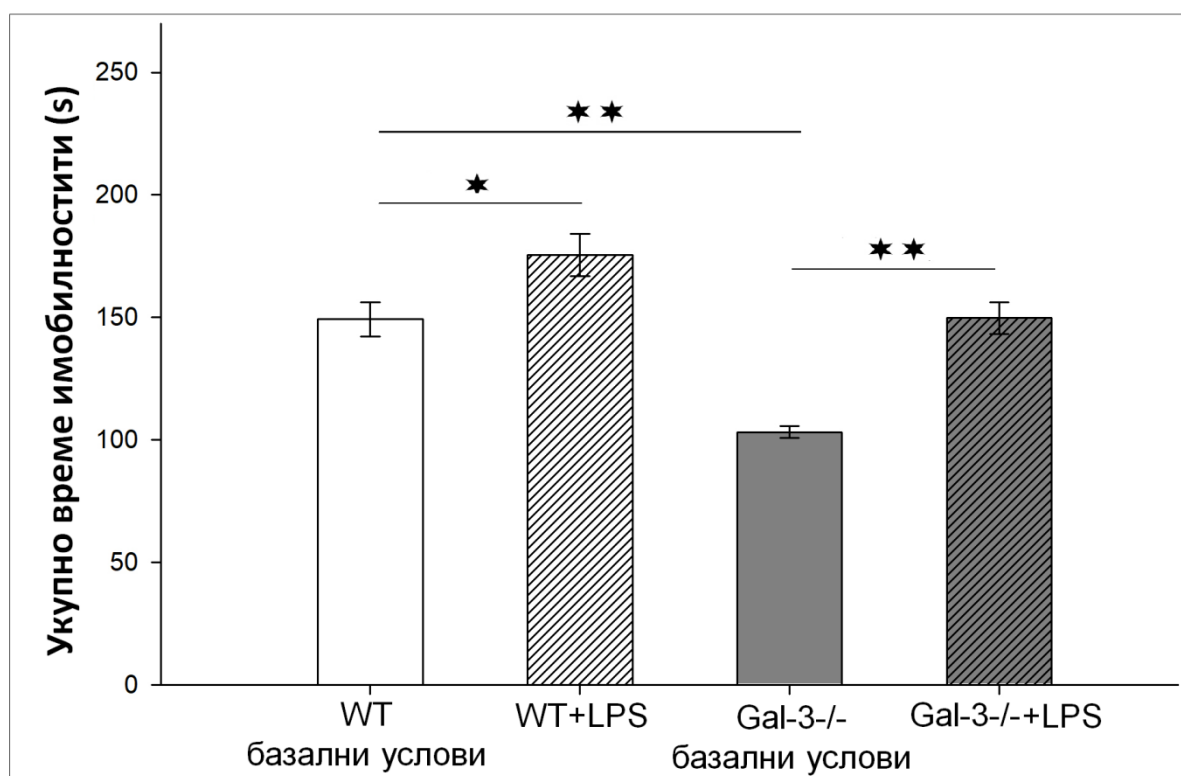
На слици 4.12. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број епизода имобилности у тесту качења за реп. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација нису довеле до значајних промена вредности овог параметра ($F=5.675$, $df=3$). У базалним условима су Gal-3 дефицијентни мишеви имали мањи број епизода имобилности у односу на WT мишеве, али није постојала статистички значајна разлика. Током акутне инфламације дошло је до повећања броја епизода имобилности и код WT и код Gal-3 дефицијентних мишева, али у односу на вредности у базалним условима није било статистички значајне разлике.



Слика 4.12. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број епизода имобилности у тесту качења за реп. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.1.3.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупно време имобилности

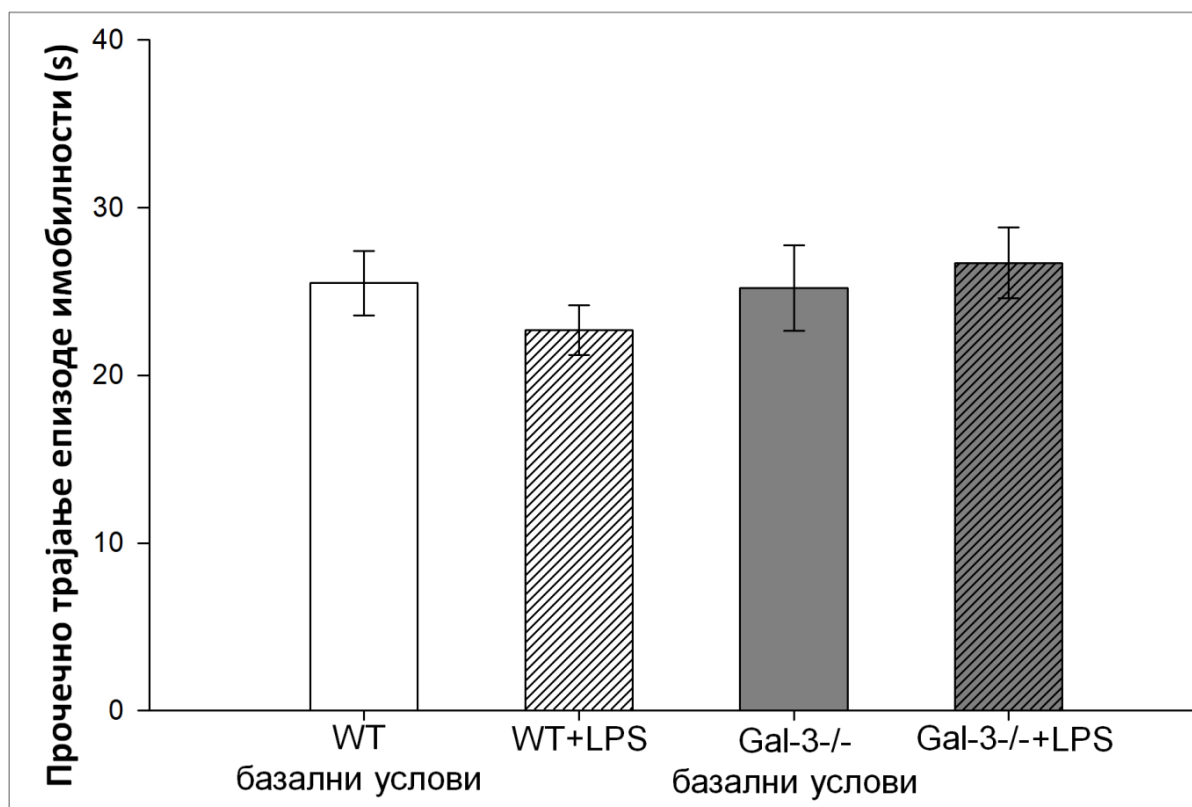
На слици 4.13. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време имобилности (s) у тесту качења за реп. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација довели су до значајних промена у вредности овог параметра ($F=21.384$, $df=3$). У базалним условима је код Gal-3 дефицијентних мишева забележено статистички значајно краће трајање имобилности у односу на WT мишеве ($p<0.01$). Након примене LPS-а дошло је до статистички значајног продужења укупног времена имобилности у обе експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-}) у односу на вредности у базалним условима ($p<0.05$ и $p<0.01$).



Слика 4.13. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупно време имобилности (s) у тесту качења за реп. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.1.3.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на просечно трајање епизоде имобилности

На слици 4.14. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на просечно трајање епизоде имобилности (s) у тесту качења за реп. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација нису довеле до значајних промена вредности овог параметра ($F=0.66$, $df=3$). У базалним условима је вредности просечног трајања епизоде имобилности код Gal-3 дефицијентних мишева била слична вредности овог параметра код WT мишева. Током акутне инфламације код WT животиња је забележена мања вредност овог параметра, док је код Gal-3 дефицијентних животиња дошло до повећања вредности овог параметра, али ове промене нису биле статистички значајне у односу на вредности у базалним условима.

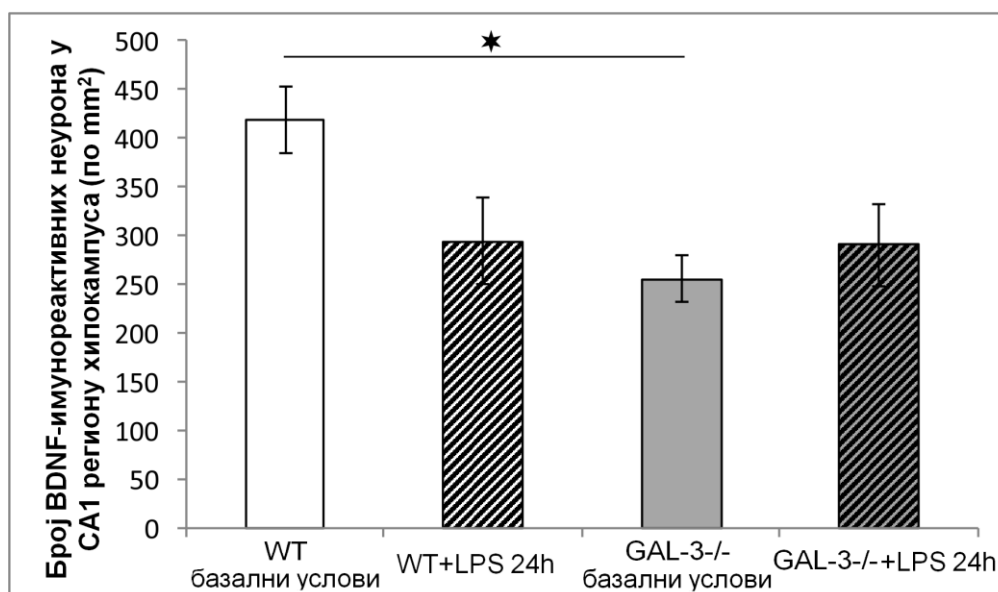


Слика 4.14. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на просечно трајање епизоде имобилности (s) у тесту качења за реп. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $X \pm SEM$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

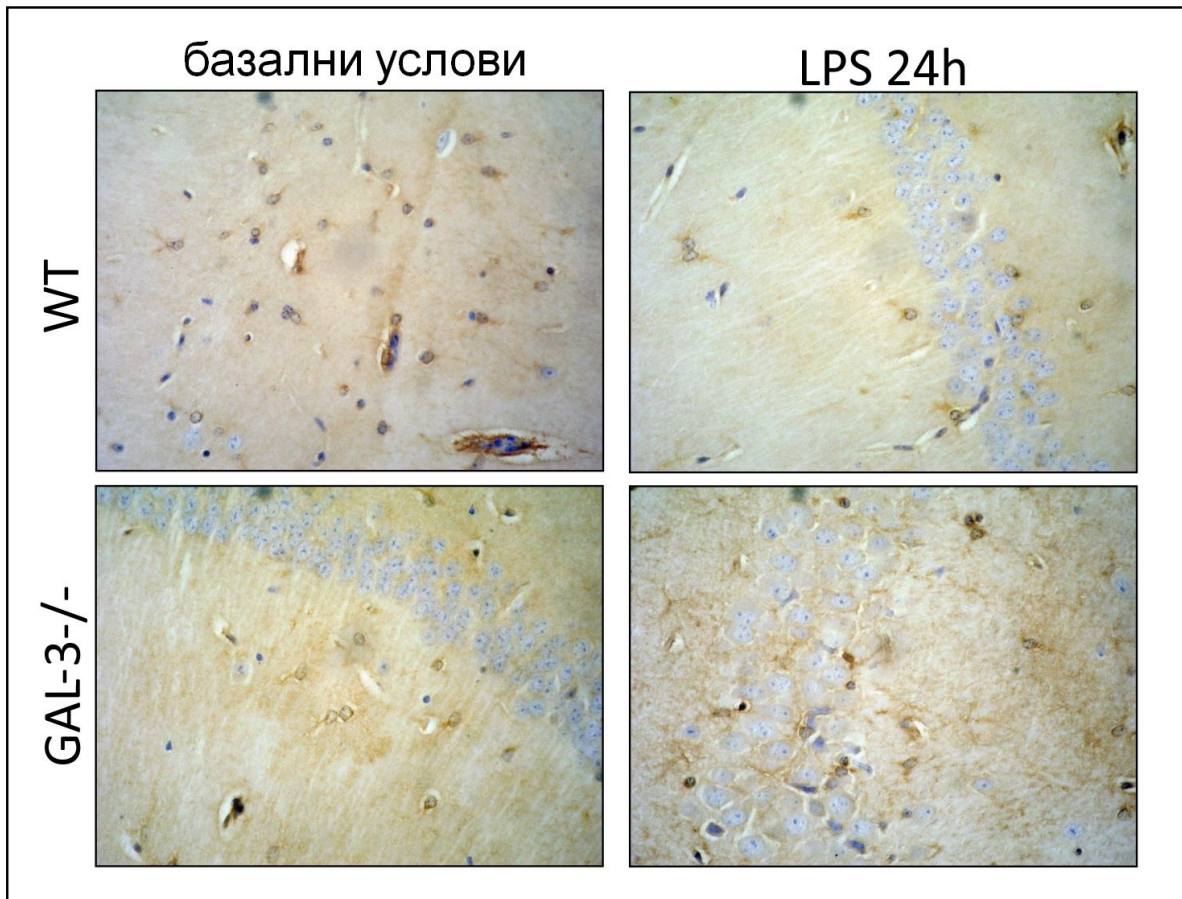
4.2. Имунохистохемијска испитивања – анализа броја и дистрибуције BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу

4.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса

На сликама 4.15. и 4.16. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на промене у броју BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса. Делеција гена за Gal-3 је довела до значајних промена вредности овог параметра у базалним условима ($F=3.923$, $df=3$). Gal-3 дефицијентни мишеви су имали мањи број BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса у поређењу са WT животињама у базалним условима ($p<0.05$). Током акутне инфламације код WT мишева дошло је до смањења, док је код Gal-3 дефицијентних мишева дошло до повећања броја BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса, међутим ове промене нису биле статистички значајне у односу на базалне услове.



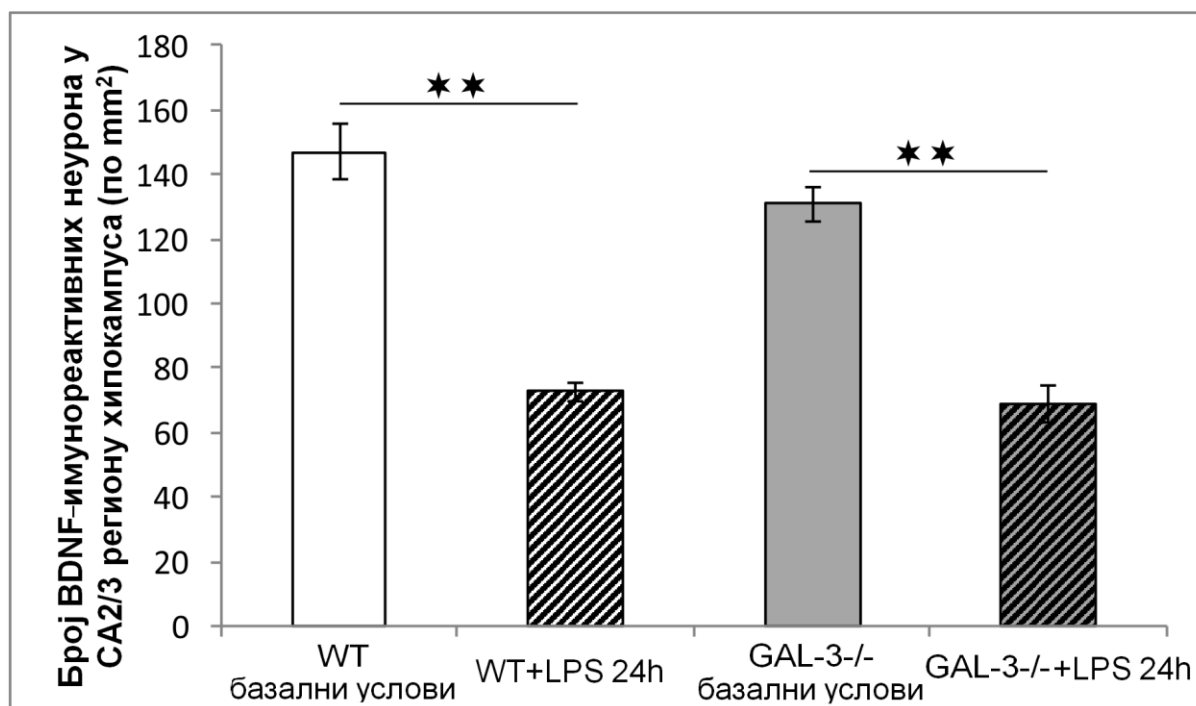
Слика 4.15. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.



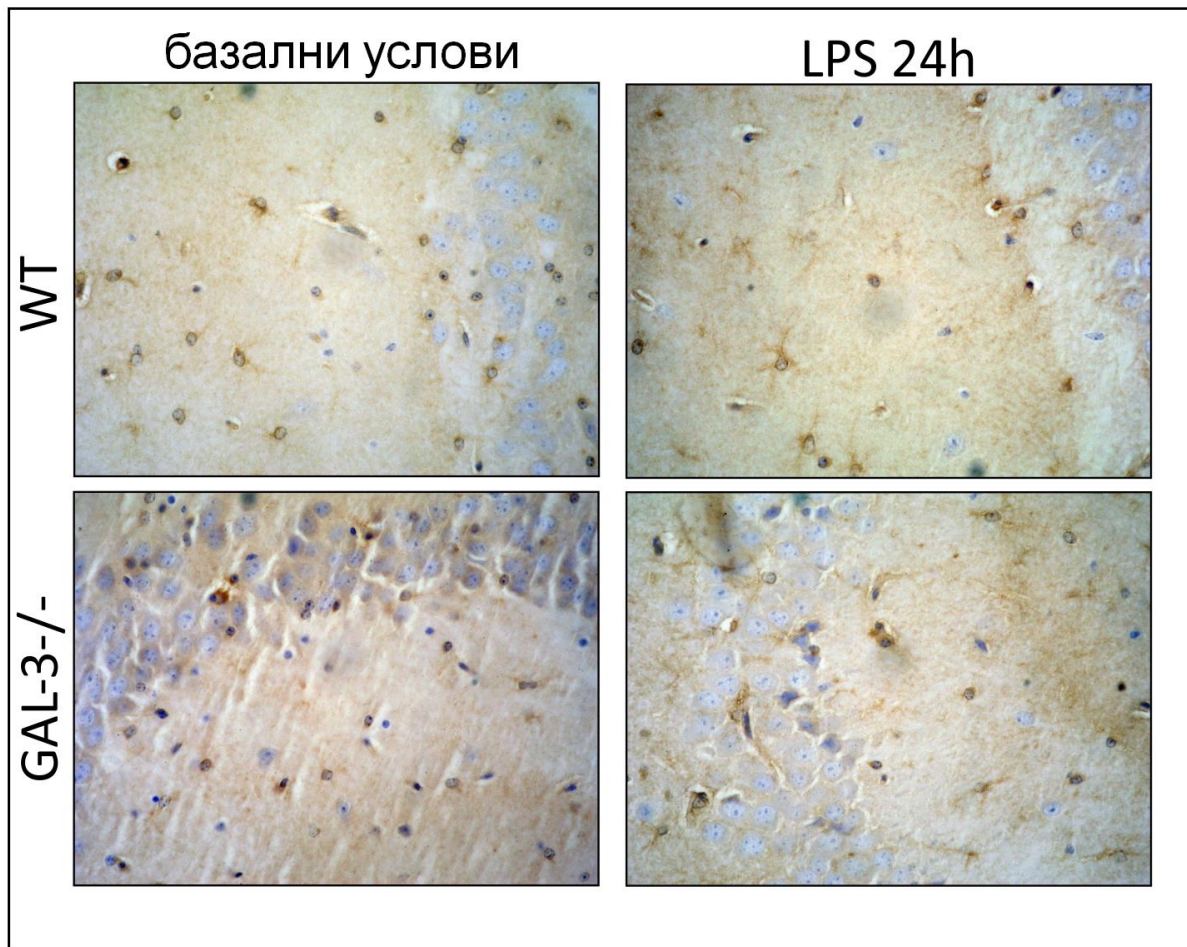
Слика 4.16. Имунохистохемијска експресија BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону хипокампуса мишева. На слици су представљени појединачни BDNF-позитивни неурони из CA1 региона хипокампуса (са одговарајућим увећањем). Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT и Gal-3-/- мишеви; акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT и Gal-3-/- мишеви.

4.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 региону хипокампуса

На сликама 4.17. и 4.18. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на промене у броју BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 региону хипокампуса. Смањење броја BDNF-имунореактивних неурона код Gal-3 дефицијентних мишева у базалним условима није било значајно у односу на WT мишеве. Акутна инфламација индукована LPS-ом значајно је смањила број BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 хипокампаљном региону и код WT и код Gal-3 дефицијентних животиња ($F=42.325$, $df=3$, $p<0.01$).



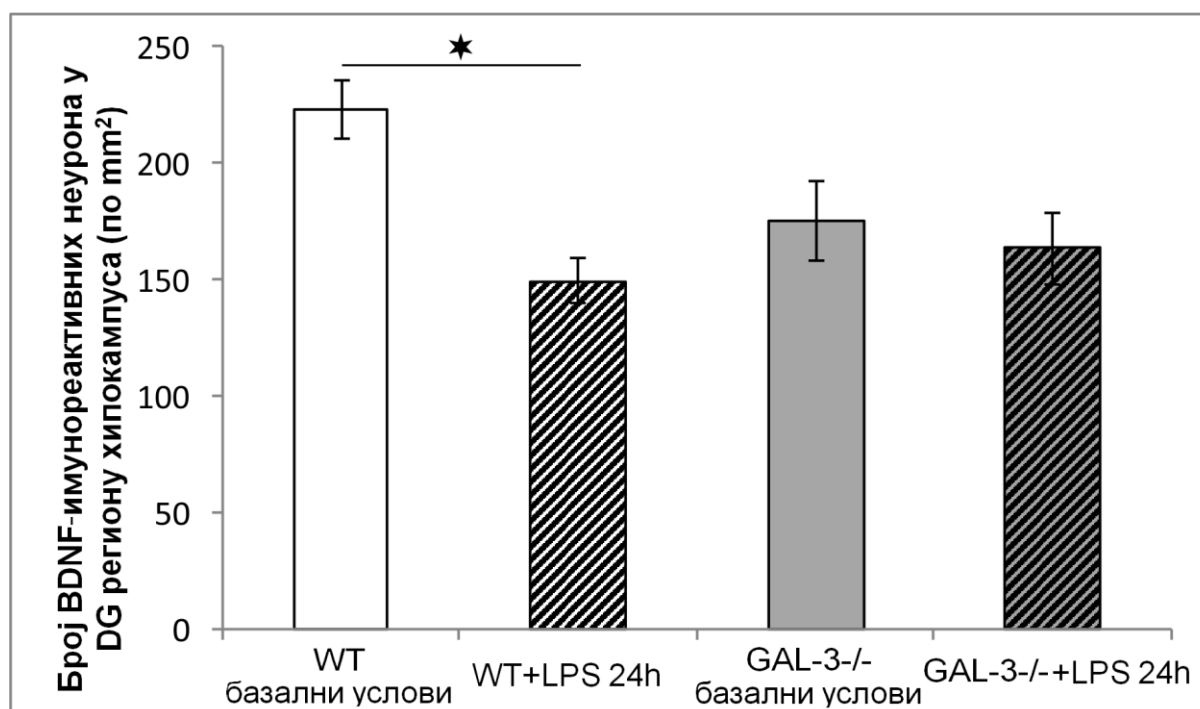
Слика 4.17. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 региону хипокампуса. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.



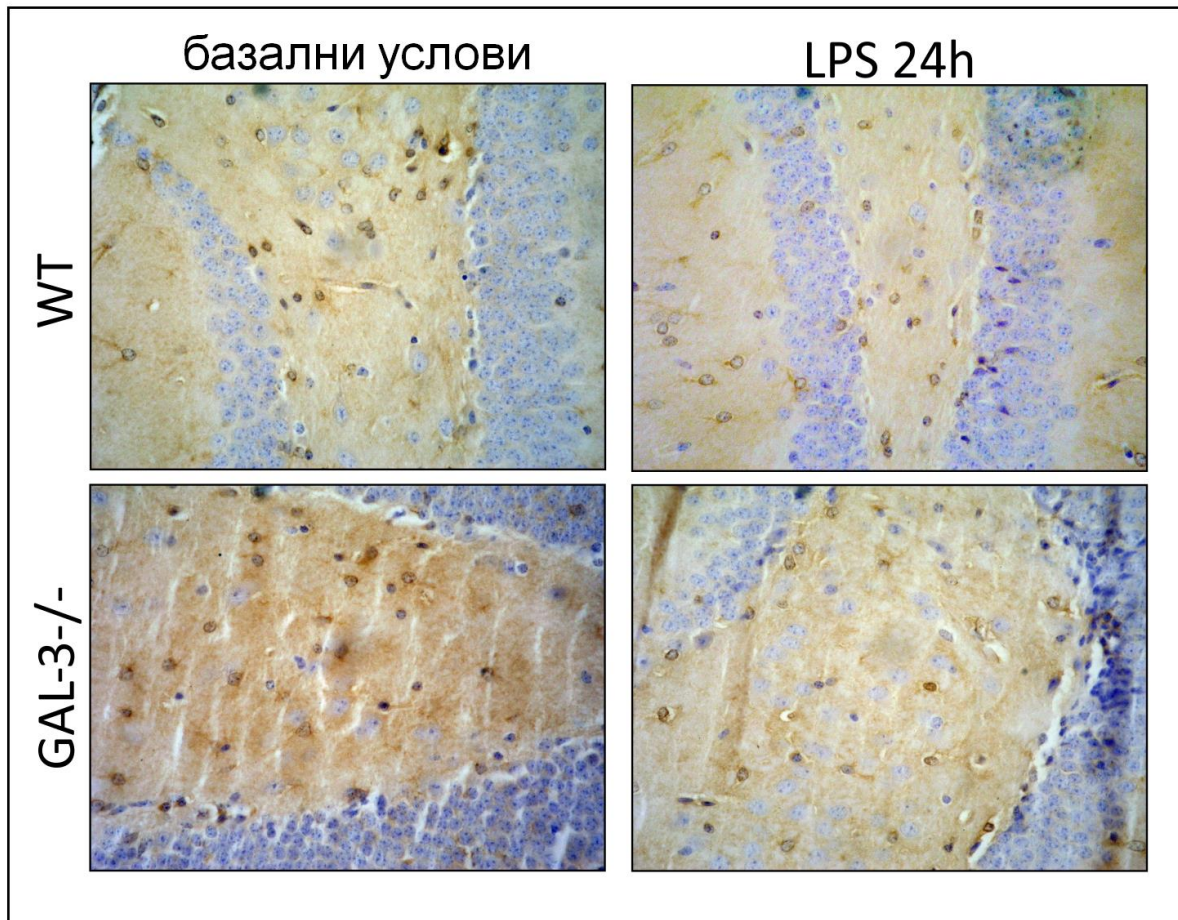
Слика 4.18. Имунохистохемијска експресија BDNF-имунореактивних неурона у CA2/3 региону хипокампуса мишева. На слици су представљени појединачни BDNF-позитивни неурони из CA2/3 региона хипокампуса (са одговарајућим увеличањем). Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT и Gal-3-/- мишеви; акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT и Gal-3-/- мишеви.

4.2.3. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на број BDNF-имунореактивних неурона у DG региону хипокампуса

На сликама 4.19. и 4.20. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на промене у броју BDNF-имунореактивних неурона у DG региону хипокампуса. У базалним условима је код Gal-3 дефицијентних мишева детектован мањи број BDNF-имунореактивних неурона у односу на WT мишеве, али ова разлика у имунореактивности није била статистички значајана. Акутна инфламација индукована LPS-ом је довела до редукције броја BDNF-имунореактивних неурона у DG региону и код WT и код Gal-3 дефицијентних животиња, међутим статистички значајна разлика у односу на базалне услове је забележена само код WT мишева ($F=4.595$, $df=3$, $p<0.05$).



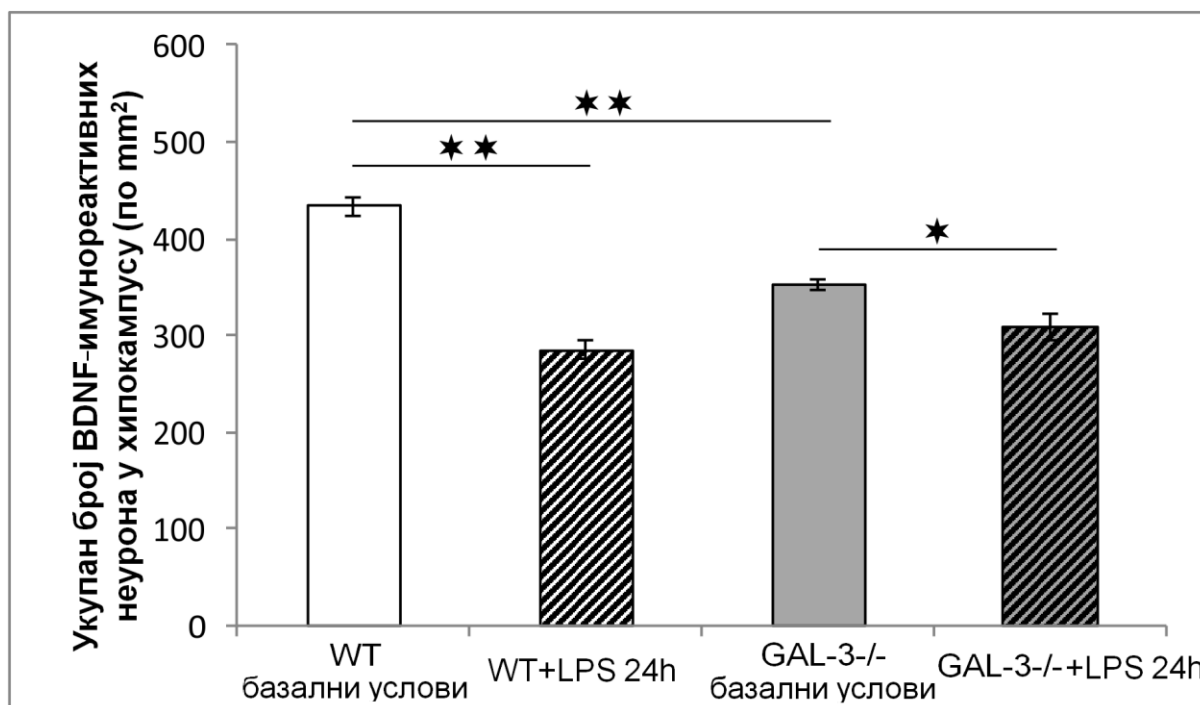
Слика 4.19. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на број BDNF-имунореактивних неурона у DG региону хипокампуса. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3-/- (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.



Слика 4.20. Имунохистохемијска експресија BDNF-имунореактивних неурона у DG региону хипокампуса мишева. На слици су представљени појединачни BDNF-позитивни неурони из DG региона хипокампуса (са одговарајућим увећањем). Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT и Gal-3-/- мишеви; акутна инфламација, 24h након примене LPS-a, WT и Gal-3-/- мишеви.

4.2.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на укупан број BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу

На слици 4.21. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупан број BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена укупног броја BDNF-имунореактивних неурона у одређеним групама ($F=38.323$, $df=3$). У базалним условима је укупан број BDNF-позитивних неурона био значајно мањи у поређењу са WT мишевима ($p<0.01$). Укупан број BDNF-имунореактивних неурона на пресеку хипокампуса је био значајно смањен 24 сата након примене LPS-а и код WT животиња и код Gal-3 дефицијентних мишева у односу на базалне услове ($p<0.01$ и $p<0.05$), али је делеција гена за Gal-3 ублажила редукцију.

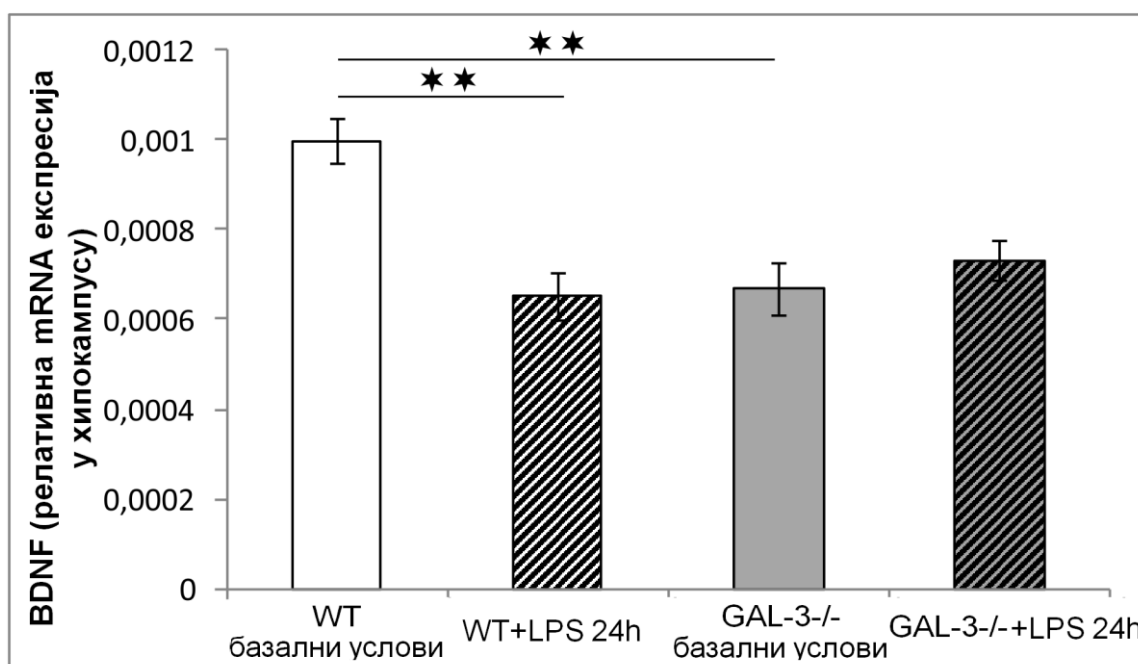


Слика 4.21. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на укупан број BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3. Утицај експресије гена за BDNF, GABA-AR2S, GABA-AR5S, TLR4 и цитокина у ткиву хипокампуса (резултати qRT-PCR-а)

4.3.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за BDNF у хипокампусу

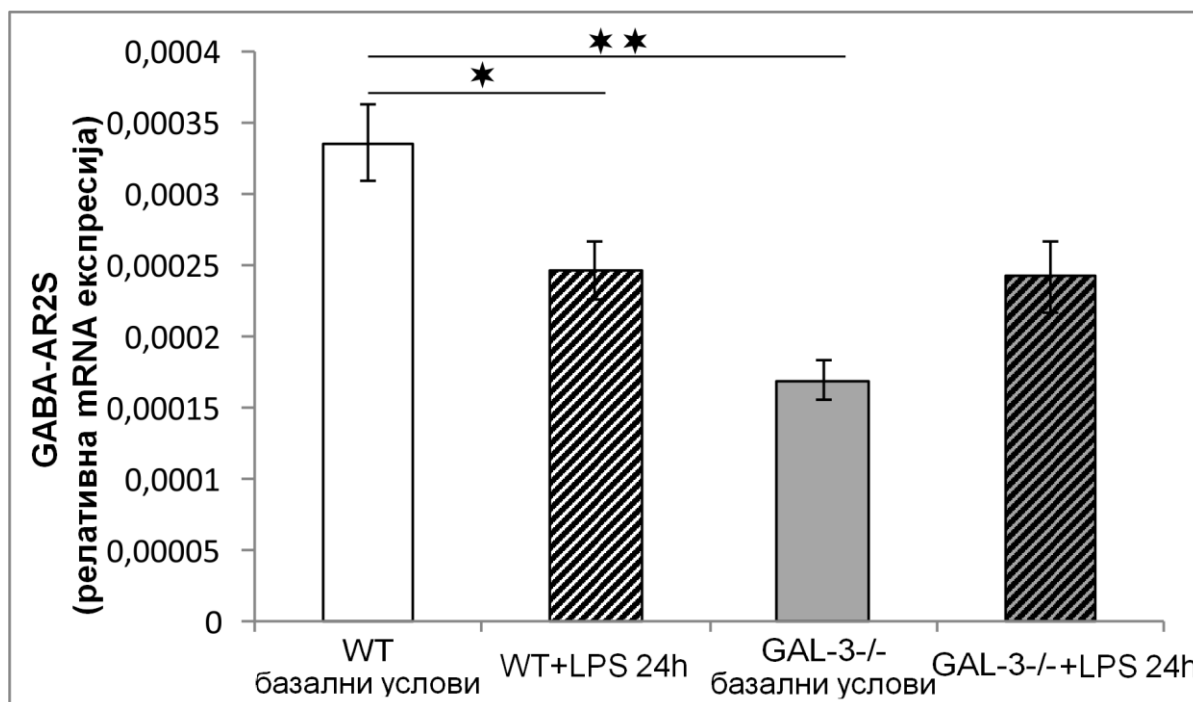
На слици 4.22. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за BDNF у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена експресије гена за BDNF у одређеним експерименталним групама ($F=9.702$, $df=3$). Дефицијенција Gal-3 је у базалним условима била праћена значајно нижом експресијом BDNF-а у односу на WT животиње ($p<0.01$). Акутна инфламација индукована LPS-ом условила је значајно смањење експресије гена за BDNF у хипокампусу код WT мишева у односу на базалне услове ($p<0.01$), док је код Gal-3^{-/-} мишева дошло до повећања експресије гена за BDNF, али без статистичке значајности.



Слика 4.22. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за BDNF у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за GABA-AR2S у хипокампусу

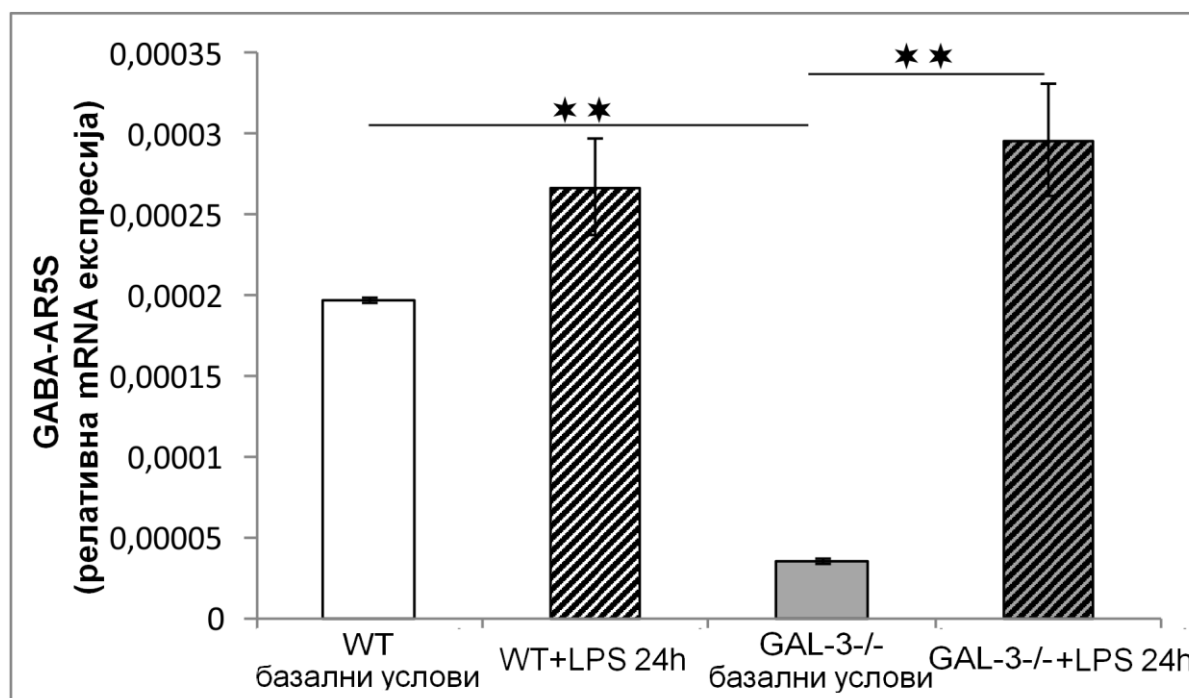
На слици 4.23. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за GABA-AR2S у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у хипокампадној експресији гена за GABA-AR2S у одређеним експерименталним групама ($F=9.397$, $df=3$). У базалним условима је код Gal-3 дефицијентних мишева експресија гена за GABA-AR2S била значајно смањена у поређењу са WT животињама ($p<0.01$). Акутна инфламација индукована применом LPS-а је код WT животиња била праћена значајним смањењем експресије гена за GABA-AR2S у односу на базалне услове ($p<0.05$), док код Gal-3 дефицијентних животиња није забележена значајна разлика у експресији гена за GABA-AR2S у односу на базалне услове.



Слика 4.23. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за GABA-AR2S у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.3 Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за GABA-AR5S у хипокампусу

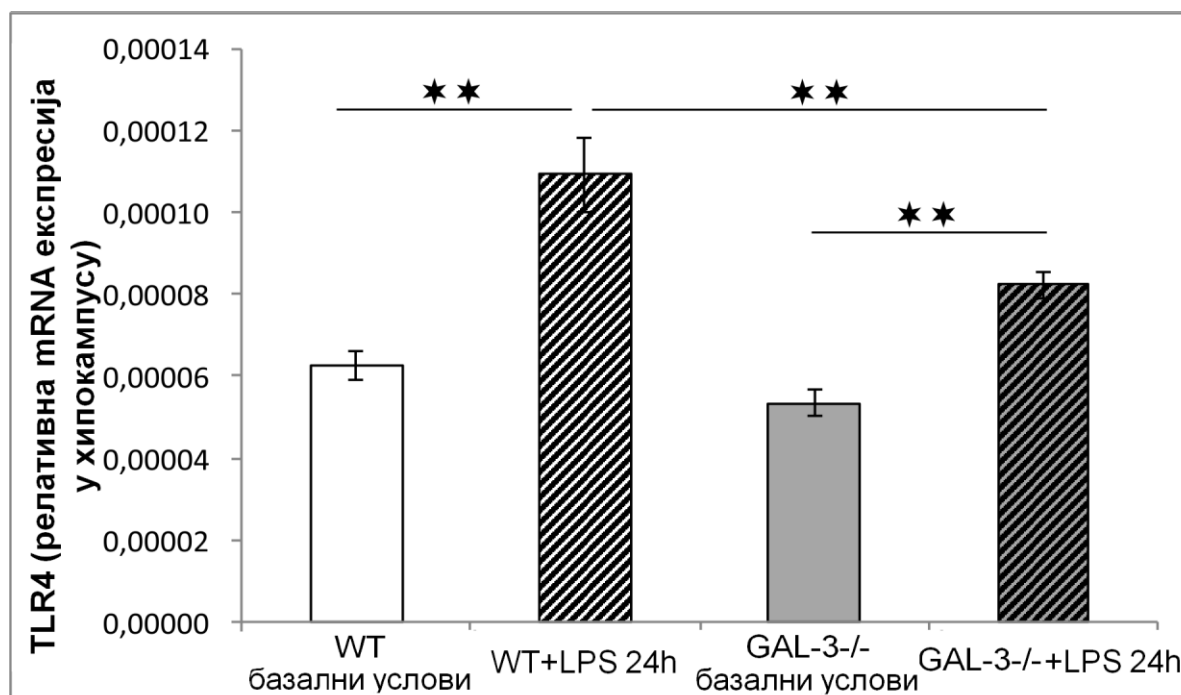
На слици 4.24. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за GABA-AR5S у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у хипокампадној експресији гена за GABA-AR5S у одређеним експерименталним групама ($F=25.462$, $df=3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 изазвала значајно смањење GABA-AR5S у односу на WT мишеве ($p<0.01$). Повећање експресије гена за GABA-AR5S, индуковано применом LPS-а, забележено је и код Gal-3 дефицијентних и код WT мишева, али је у односу на базалне услове ово повећање било значајно само код Gal-3 дефицијентних мишева ($p<0.01$).



Слика 4.24. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за GABA-AR5S у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.4. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за TLR4 у хипокампусу

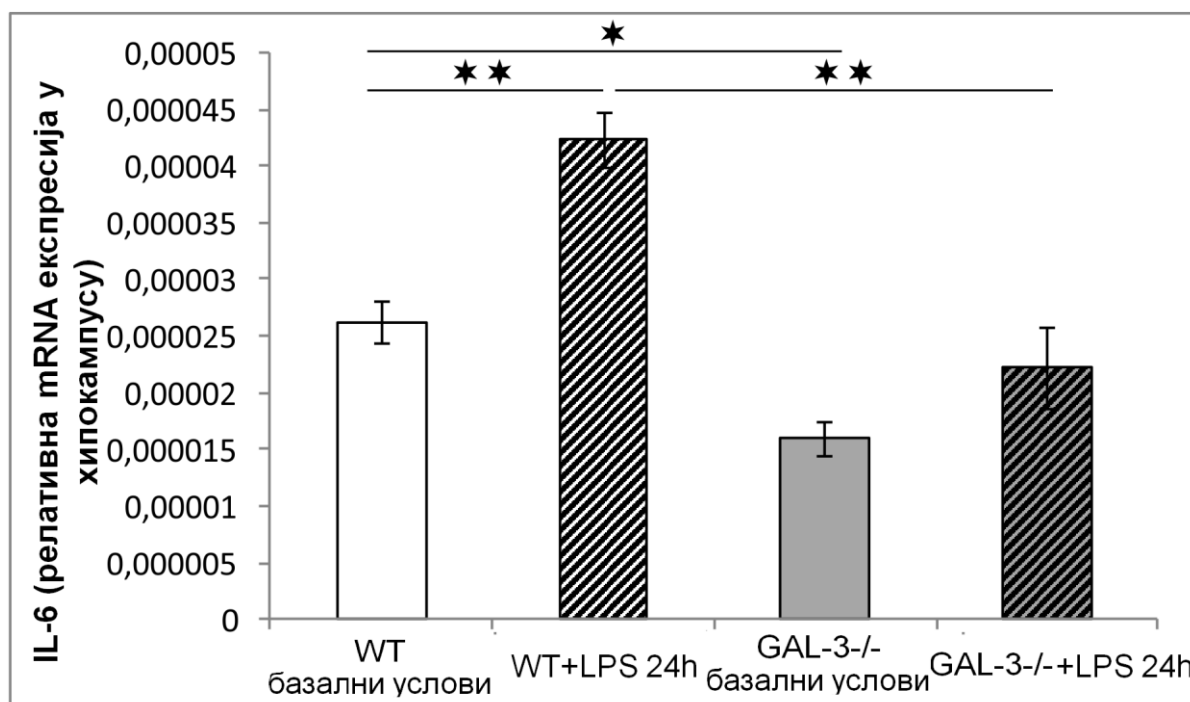
На слици 4.25. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за TLR4 у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у хипокампадној експресији гена за TLR4 у одређеним експерименталним групама ($F=21.626$, $df=3$). Делеција гена за Gal-3 није утицала на хипокампадно експресију гена за TLR4 у базалним условима. Насупрот овоме, након примене LPS-а и код WT и код Gal-3 дефицијентних мишева потврђено је значајно повећање експресије гена за TLR4 у односу на базалне услове ($p<0.01$). Међутим, повећање експресије гена за TLR4 индуковано применом LPS-а је било значајно мање код Gal-3 дефицијентних у поређењу са WT мишевима.



Слика 4.25. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за TLR4 у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.5. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за IL-6 у хипокампусу

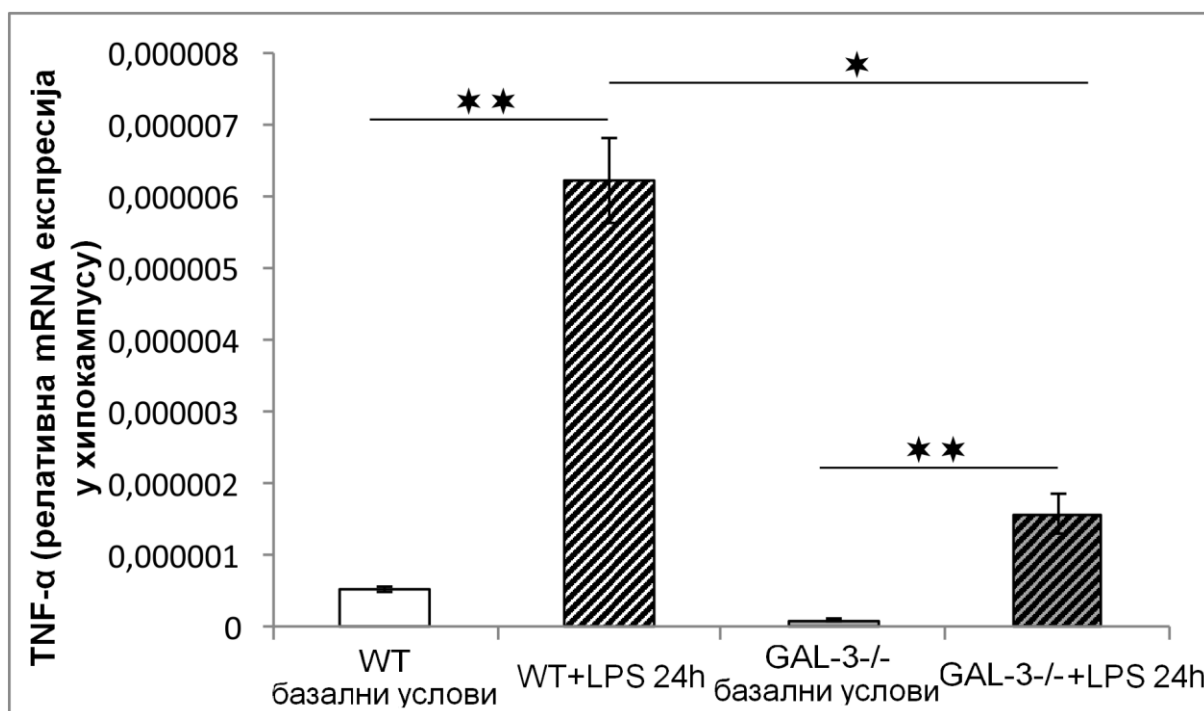
На слици 4.26. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за IL-6 у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена у хипокампадној експресији гена за IL-6 у одређеним експерименталним групама ($F=20.585$, $df=3$). У базалним условима је експресија гена за IL-6 у хипокампусу била знатно нижа код Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са WT животињама ($p<0.05$). Током акутне инфламације је експресија гена за IL-6 била повећана и код WT и код Gal-3 дефицијентних животиња, али је статистички значајна разлика у односу на базалне услове постојала само код WT мишева ($p<0.01$). Забележена је значајно мања експресија гена за IL-6 код Gal-3^{-/-} у поређењу са WT животињама, 24h након примене LPS-а ($p<0.01$).



Слика 4.26. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за IL-6 у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT (n=8) и Gal-3^{-/-} (n=8). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.3.6. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на експресију гена за TNF- α у хипокампусу

На слици 4.27. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на експресију гена за TNF- α у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних променау хипокампадној експресији гена за TNF- α у одређеним експерименталним групама ($F=75.973$, $df=3$). У базалним условима је делеција гена за Gal-3 довела до редукције експресије гена за TNF- α , али ова промена у односу на вредности код WT мишева није била статистички значајна. Значајно повећање експресије гена за TNF- α у хипокампусу је примећено и код WT и код Gal-3 дефицијентних мишева 24 сата након примене LPS-а, у односу на базалне услове ($p<0.01$). Током акутне инфламације је забележена статистички значајно мања вредност овог цитокина код Gal-3^{-/-} у односу на WT мишеве ($p<0.05$).

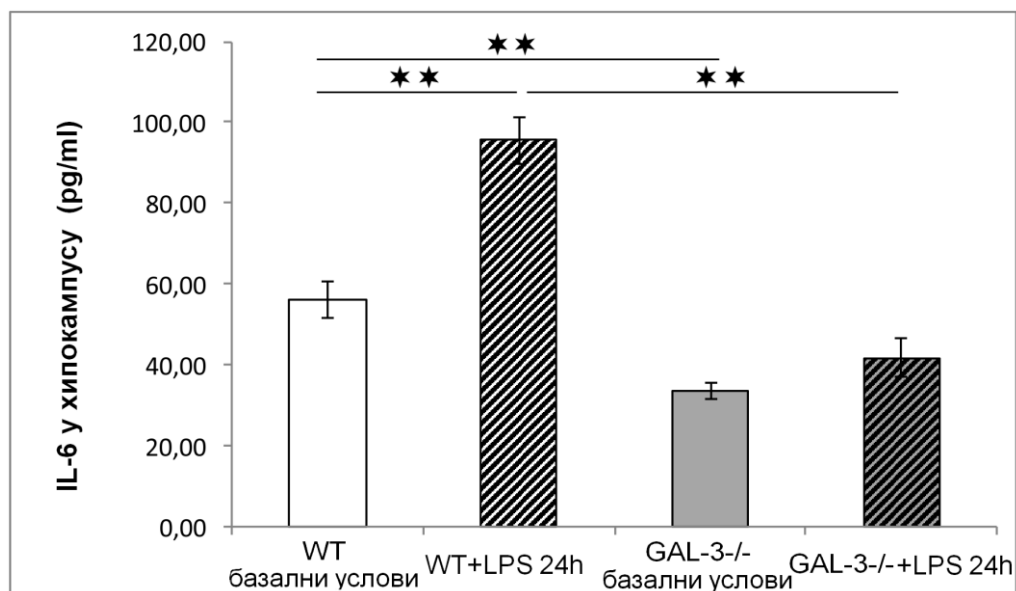


Слика 4.27. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на релативну експресију гена за TNF- α у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3^{-/-} мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3^{-/-} ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3^{-/-} ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.4. Испитивања концентрације цитокина у ткиву хипокампуса (резултати ELISA теста)

4.4.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на концентрацију IL-6 у хипокампусу

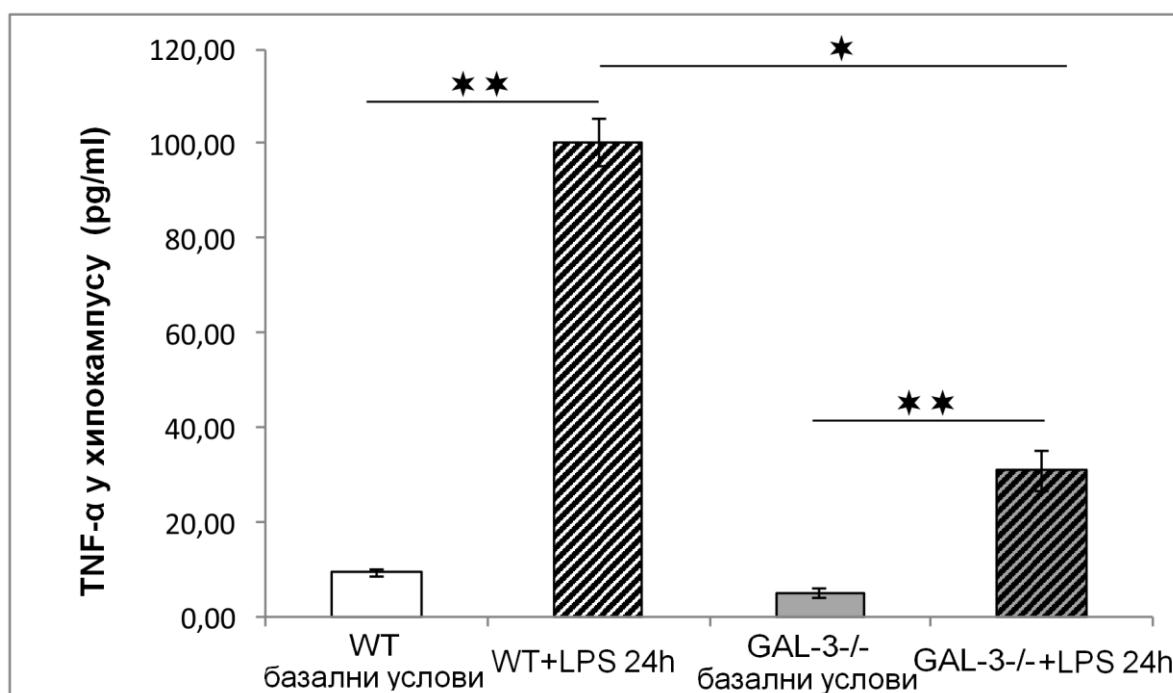
На слици 4.28. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на концентрацију IL-6 у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена хипокампалних концентрација IL-6 у одређеним експерименталним групама ($F=37.791$, $df=3$). У базалним условима је концентрација IL-6 у хипокампусу мишева била значајно нижа код Gal-3 дефицијентних мишева у поређењу са WT животињама ($p<0.01$). Међутим, 24 сата након примене LPS-а хипокампални садржај IL-6 је у односу на базалне услове значајно био повећан у групи WT животиња ($p<0.01$), док код Gal-3-/- животиња није било значајне промене. Током акутне инфламације је хипокампални садржај IL-6 код Gal-3-/- животиња био значајно мањи у поређењу са WT животињама ($p<0.01$).



Слика 4.28. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на концентрацију IL-6 у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3-/- мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3-/- ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

4.4.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом на концентрацију TNF- α у хипокампусу

На слици 4.29. су приказани ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на концентрацију TNF- α у хипокампусу. Делеција гена за Gal-3 и акутна инфламација су довеле до значајних промена хипокампаљних концентрација TNF- α у одређеним експерименталним групама ($F=164.476$, $df=3$). У базалним условима није постојала статистички значајна разлика у вредностима хипокампаљне концентрације TNF- α између Gal-3 дефицијентних и WT мишева. Значајно повећање концентрације TNF- α у хипокампусу је 24 сата након примене LPS-а, у односу на базалне услове, примећено и код WT и Gal-3 дефицијентних мишева ($p<0.01$), с тим што је ово повећање било израженије код WT мишева. Током акутне инфламације забележена је значајно мања концентрација TNF- α код Gal-3 $^{-/-}$ у односу на WT мишеве ($p<0.05$).

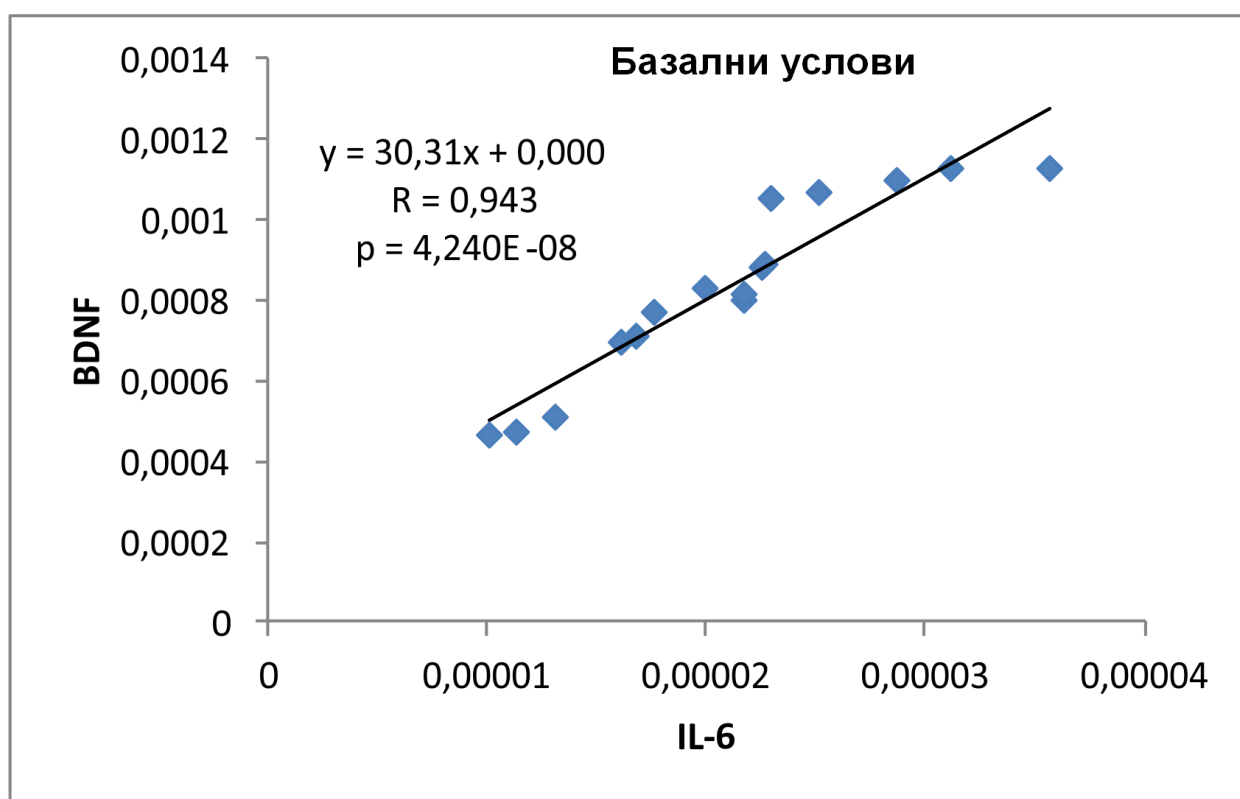


Слика 4.29. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане интраперитонеалном применом LPS-а на концентрацију TNF- α у хипокампусу мишева. Експерименталне групе (WT и Gal-3 $^{-/-}$ мишеви, соја C57BL/6): базални услови, WT ($n=8$) и Gal-3 $^{-/-}$ ($n=8$); акутна инфламација, 24h након примене LPS-а, WT ($n=8$) и Gal-3 $^{-/-}$ ($n=8$). Вредности су представљене као $\bar{X} \pm \text{SEM}$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4.5. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR2S, GABA-AR5S, BDNF и цитокина у хипокампусу и параметара добијених у бихевиоралним тестовима

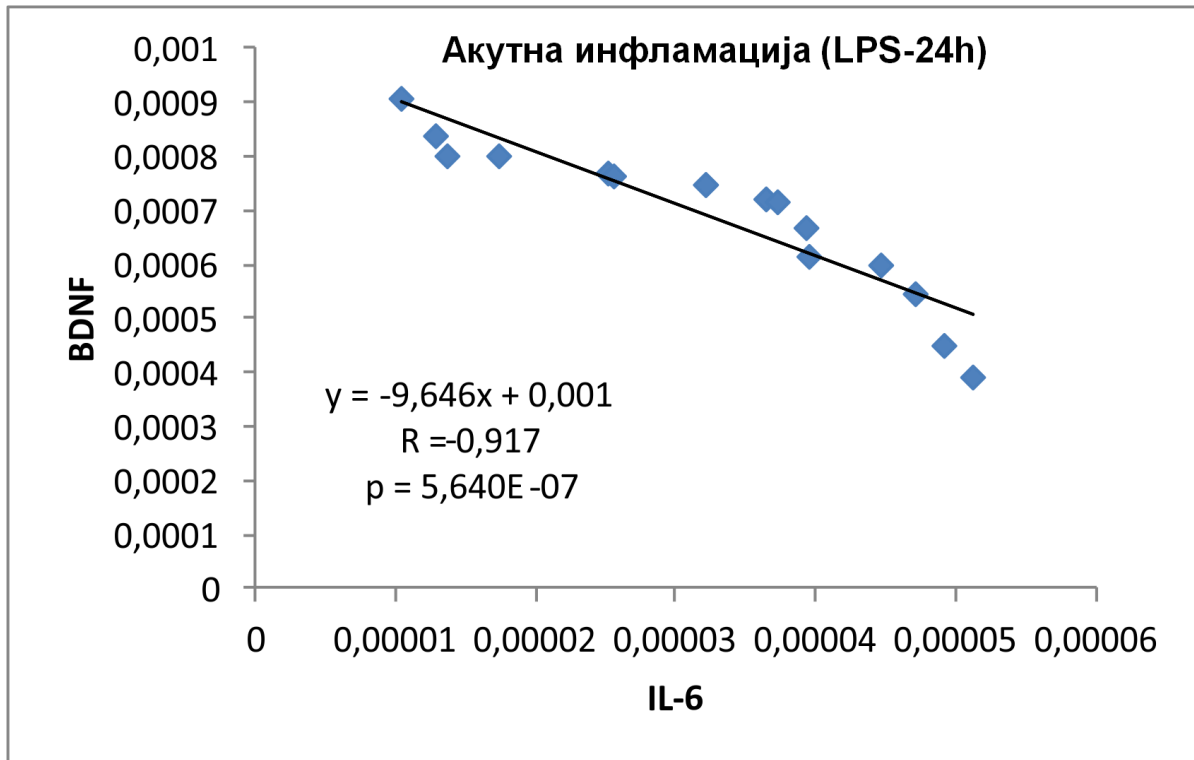
4.5.1. Анализа међусобне повезаности експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу

На слици 4.30. је приказана међусобна повезаност хипокампадне експресије гена за IL-6 и BDNF у базалним условима. Анализом је потврђено да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу ($R=0.943$, $p<0.01$).



Слика 4.30. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (базални услови).

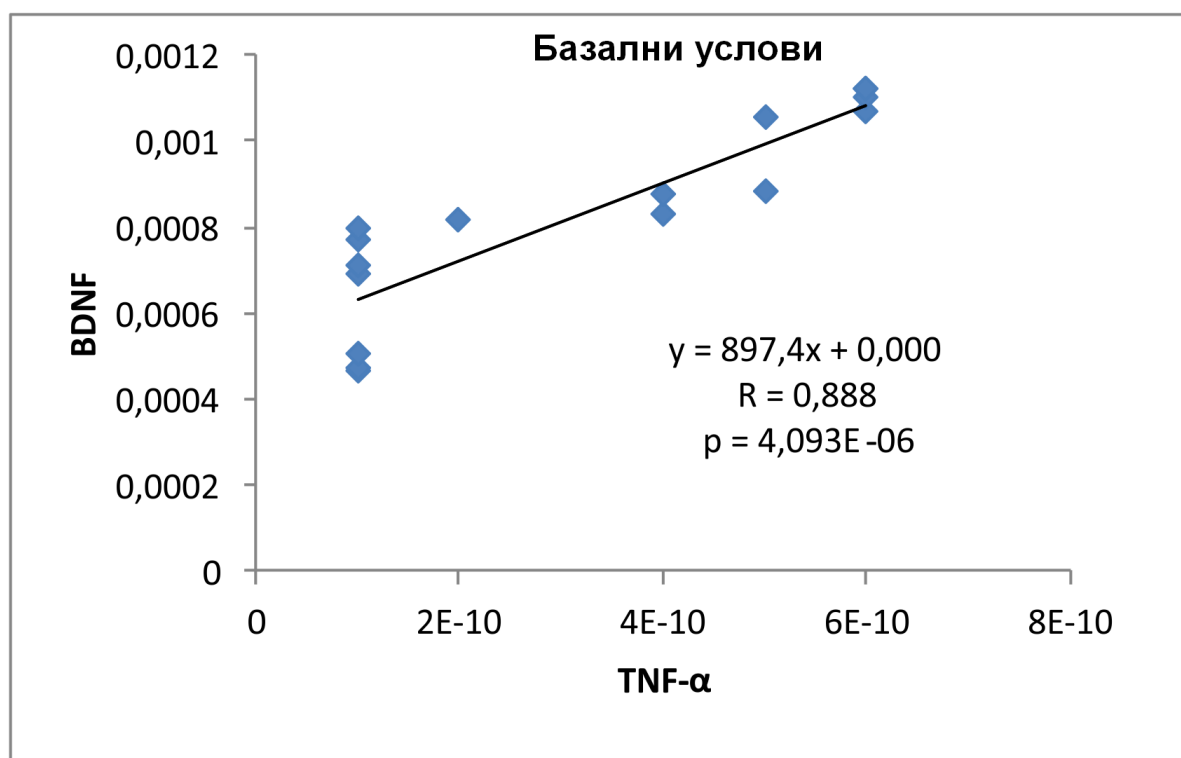
На слици 4.31. је приказана међусобна повезаност експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализом је потврђено да током акутне инфламације постоји јака, негативна корелација између експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу ($R=-0.917$, $p<0.01$).



Слика 4.31. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за IL-6 и BDNF у хипокампусу код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

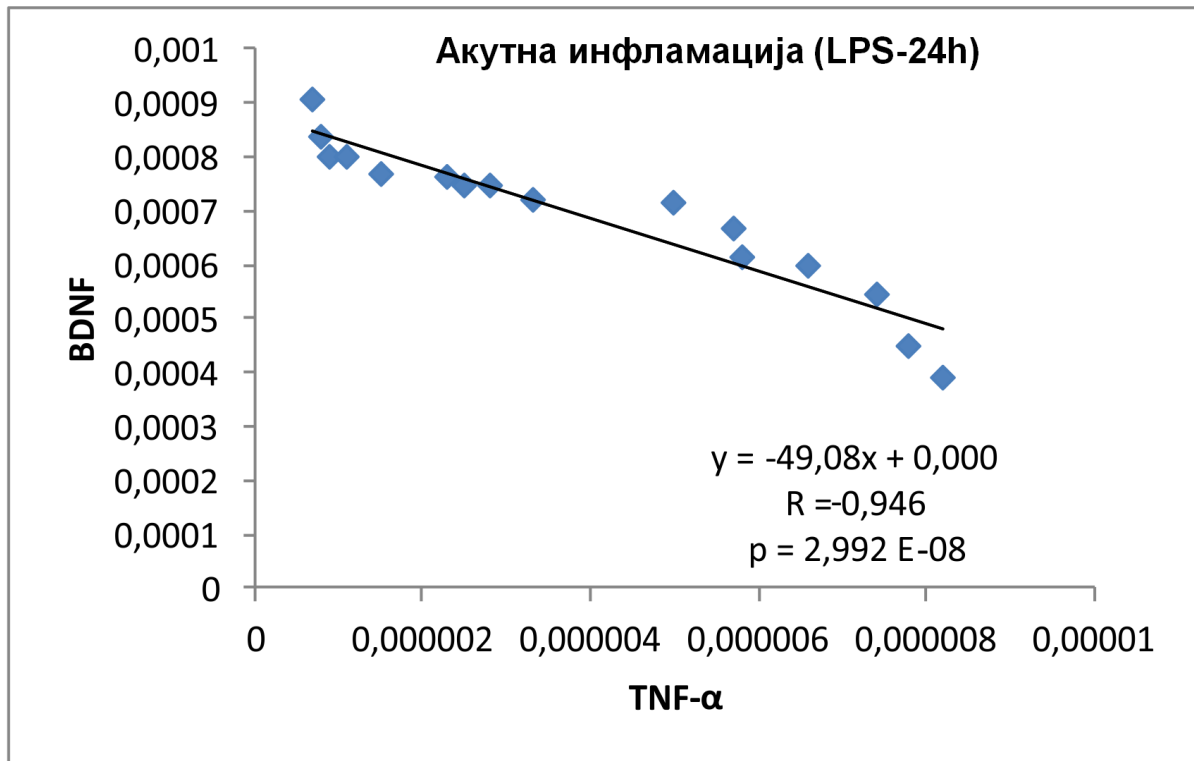
4.5.2. Анализа међусобне повезаности експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу

На слици 4.32. је приказана међусобна повезаност хипокампадне експресије гена за TNF- α и BDNF у базалним условима. Анализом је потврђено да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу ($R=0.888$, $p<0.01$).



Слика 4.32. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу код WT и Gal-3-/- мишева ($n=16$) (базални услови).

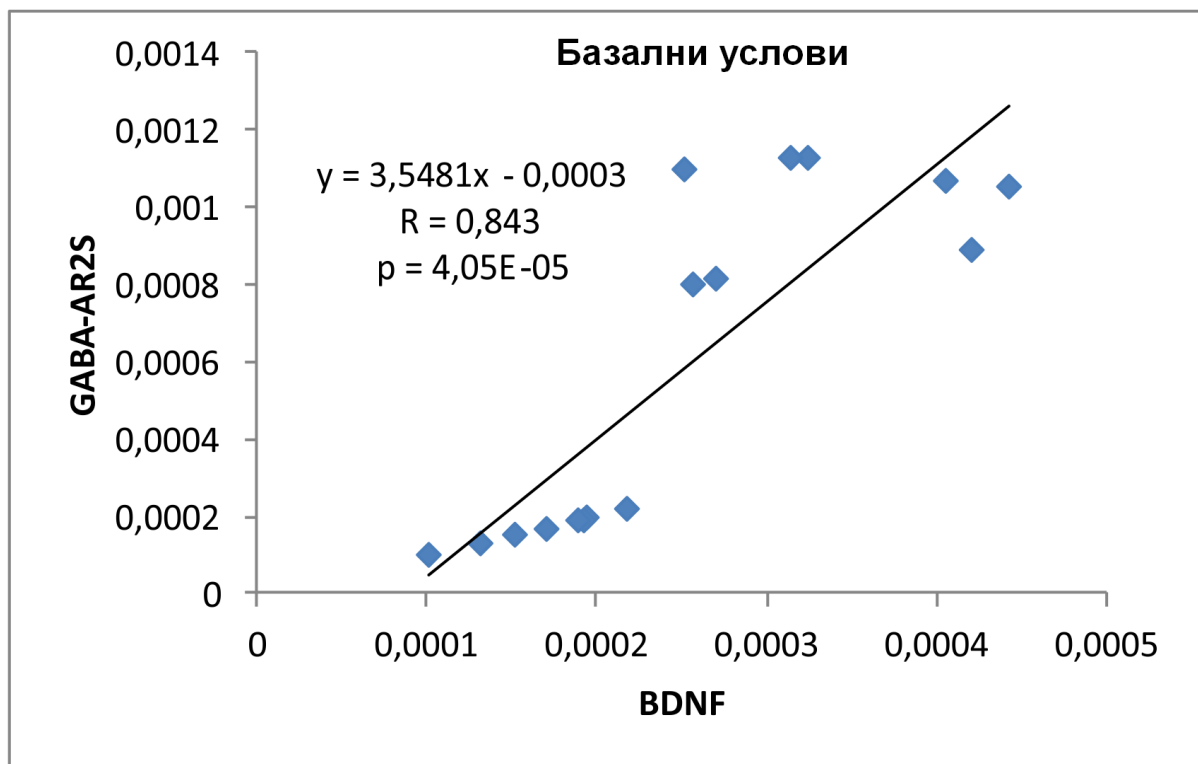
На слици 4.33. је приказана међусобна повезаност експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу 24h након примене LPS-a (акутна инфламација). Анализом је потврђено да током акутне инфламације постоји јака, негативна корелација између експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу ($R=-0.946$, $p<0.01$).



Слика 4.33. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за TNF- α и BDNF у хипокампусу мишева код WT и Gal-3-/- мишева ($n=16$) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-a).

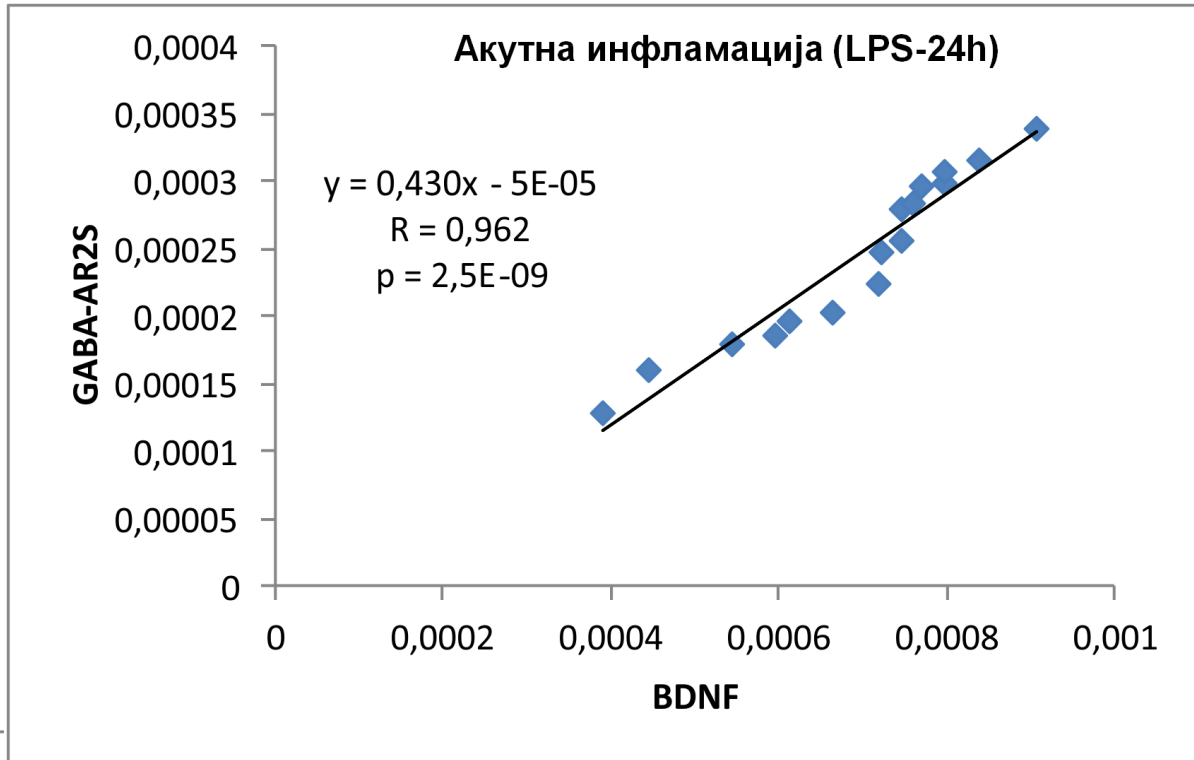
4.5.3. Анализа међусобне повезаности експресије гена за BDNF и GABA-AR2S у хипокампусу

На слици 4.34. је приказана међусобна повезаност хипокампадне експресије гена за BDNF и GABA-AR2S у базалним условима. Анализа је показала да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између генске експресије BDNF-а и GABA-AR2S у хипокампусу ($R=0.843$, $p<0.01$).



Слика 4.34. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за BDNF и GABA-AR2S у хипокампусу мишева код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (базални услови).

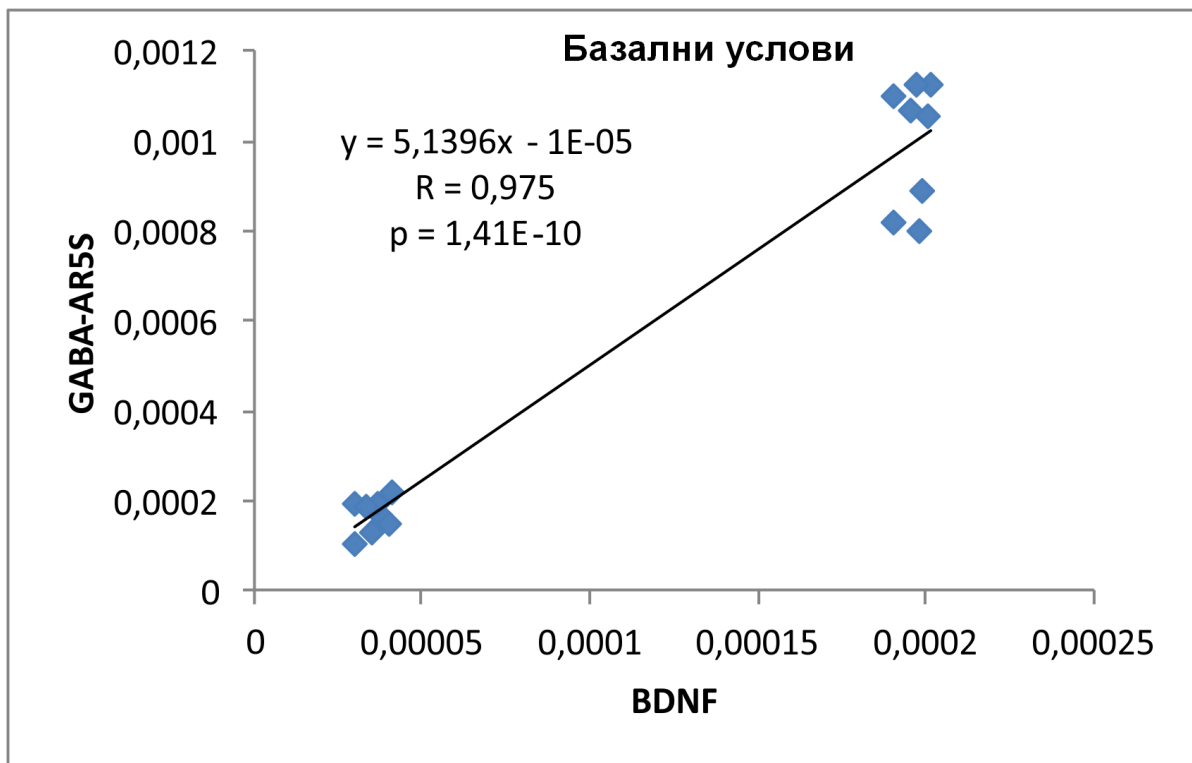
На слици 4.35. је приказана међусобна повезаност хипокампадне експресије гена за BDNF и GABA-AR2S 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализа је показала да током акутне инфламације постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за BDNF-а и GABA-AR2S у хипокампусу ($R=0.962$, $p<0.01$).



Слика 4.35. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за BDNF и GABA-AR2S у хипокампусу код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

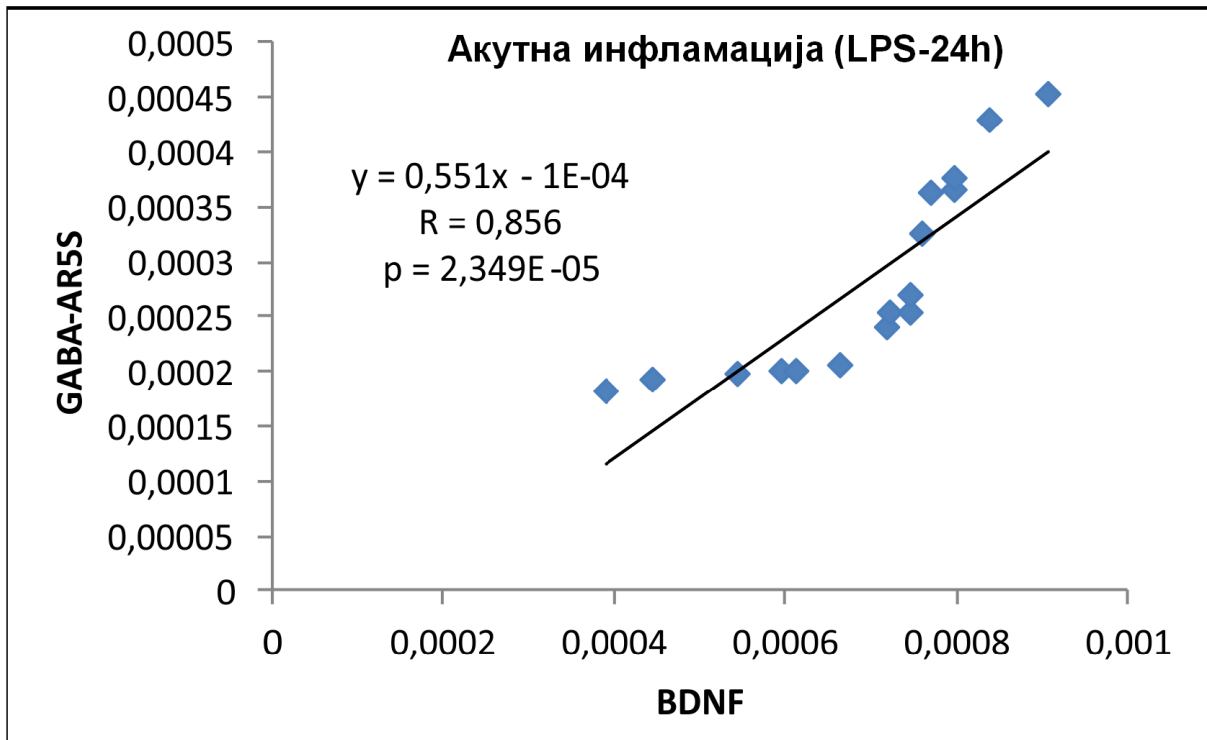
4.5.4. Анализа међусобне повезаности експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу

На слици 4.36. је приказана међусобна повезаност хипокампадне експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у базалним условима. Анализа је показала да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу ($R=0.975$, $p<0.01$).



Слика 4.36. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (базални услови).

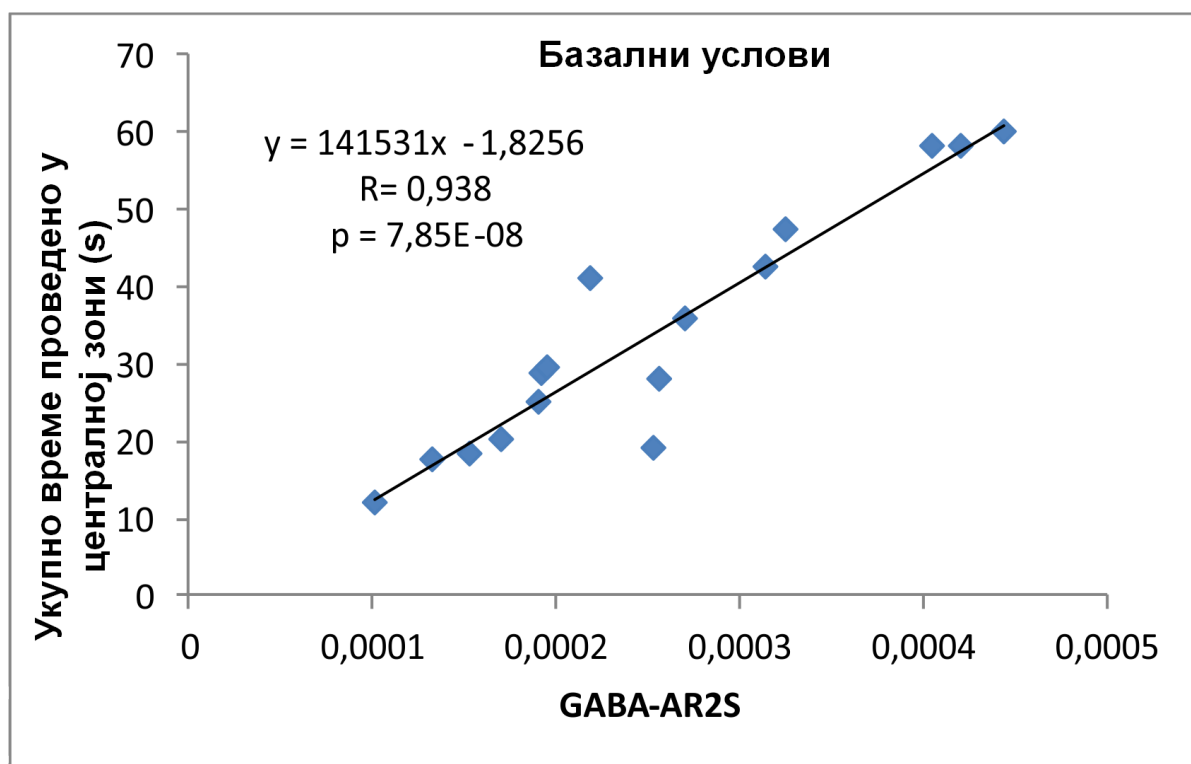
На слици 4.37. је приказана међусобна повезаност експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализа је показала да током акутне инфламације постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу ($R=0.856$, $p<0.01$).



Слика 4.37. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за BDNF и GABA-AR5S у хипокампусу код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

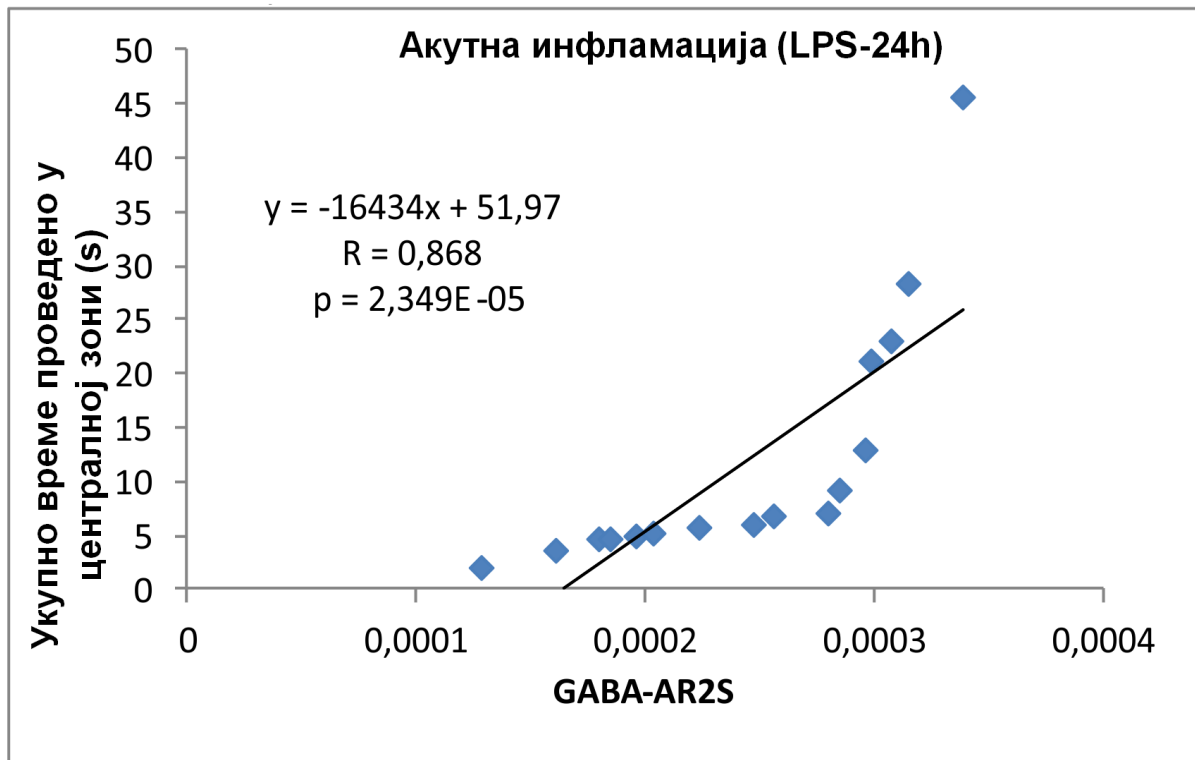
4.5.5. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони у тесту отвореног поља

На слици 4.38. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони (s) у тесту отвореног поља (директни индикатор за процену степена анксиозности) у базалним условима. Анализа је показала да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног централној зони ($R=0.938$, $p<0.01$).



Слика 4.38. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони (s) у тесту отвореног поља код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (базални услови).

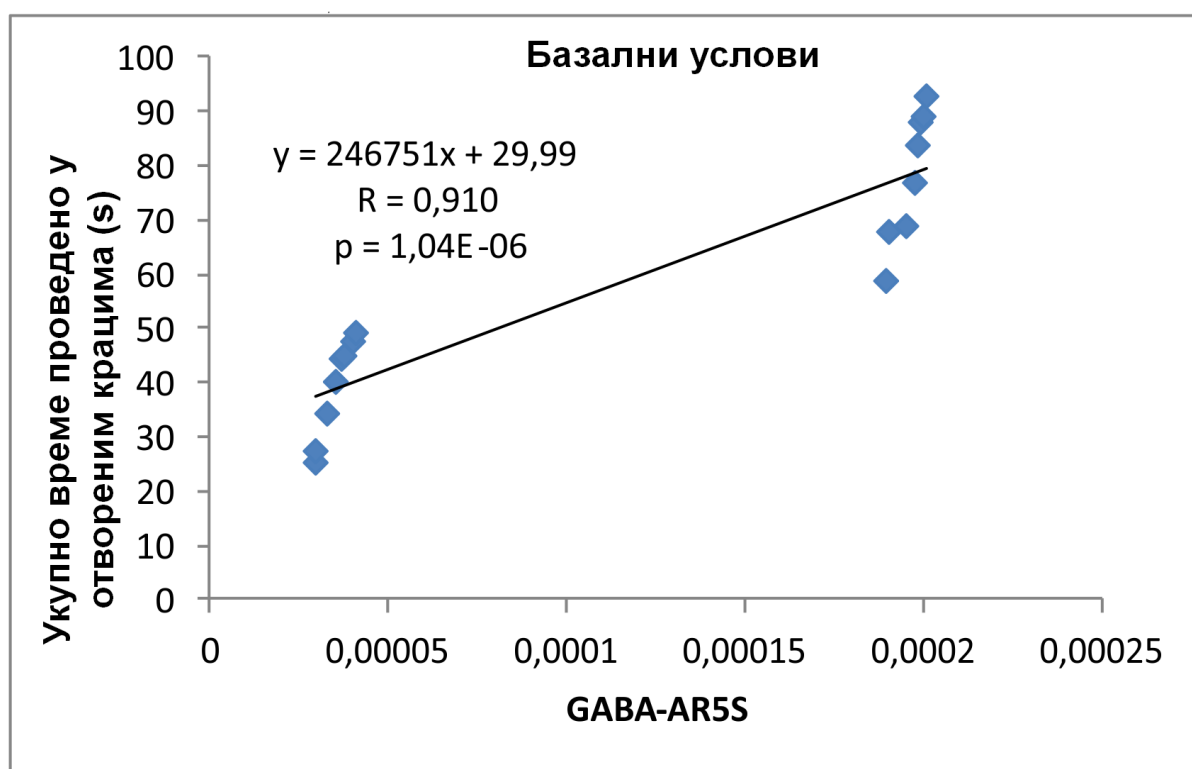
На слици 4.39. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони (s) у тесту отвореног поља 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализом је утврђено да у току акутне инфламације постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони ($R=0.868$, $p<0.01$).



Слика 4.39. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за GABA-AR2S у хипокампусу и укупног времена проведеног у централној зони (s) у тесту отвореног поља код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

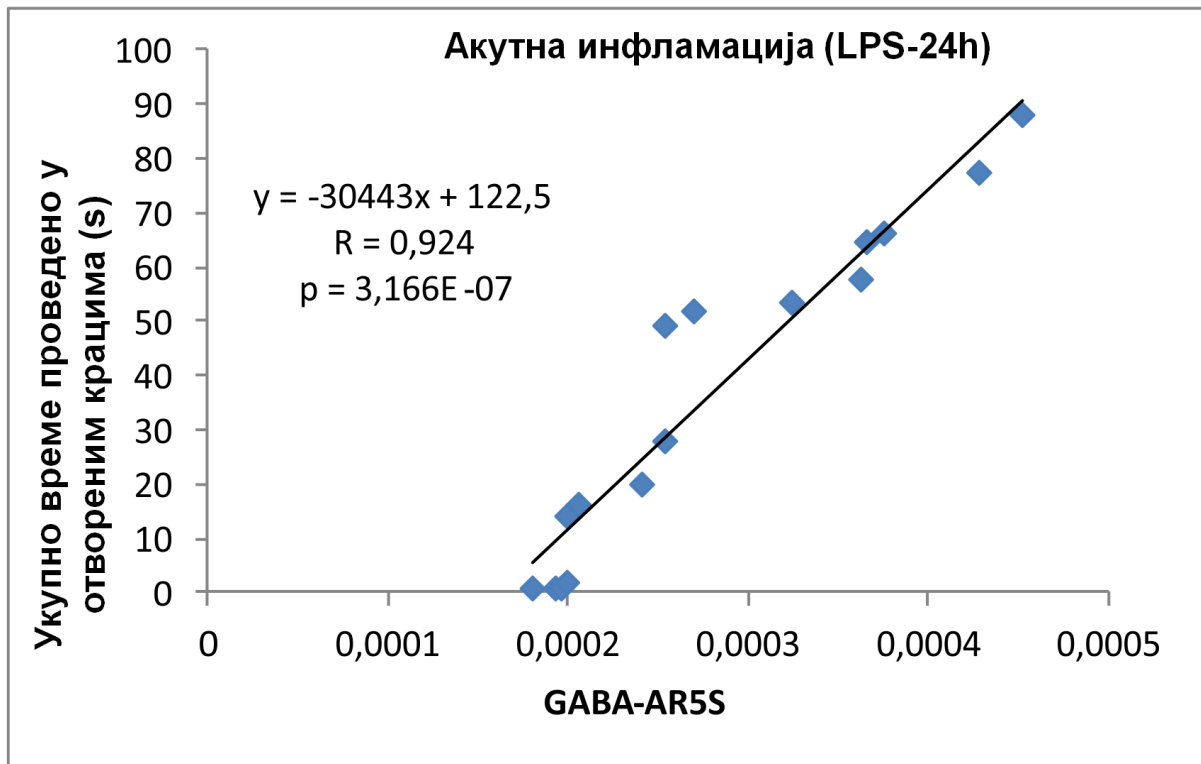
4.5.6. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима у тесту уздигнутог крстастог лавиринта

На слици 4.40. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (директни индикатор за процену степена анксиозности) у базалним условима. Анализа је показала да у базалним условима постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима ($R=0.910$, $p<0.01$).



Слика 4.40. Анализа међусобне повезаности хипокампадне релативне експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (базални услови).

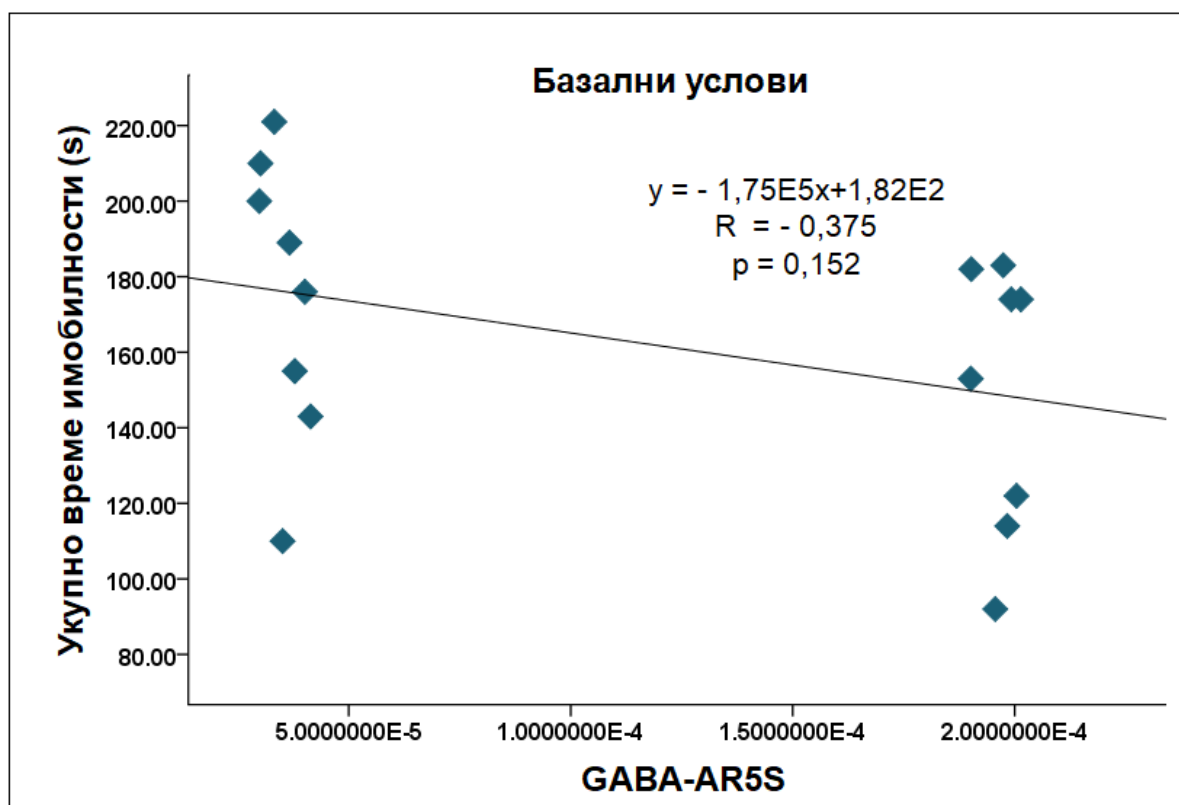
На слици 4.41. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализа је показала да током акутне инфламације постоји јака, позитивна корелација између експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима ($R=0.924$, $p<0.01$).



Слика 4.41. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена проведеног у отвореним крацима (s) у тесту уздигнутог крстастог лавиринта код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

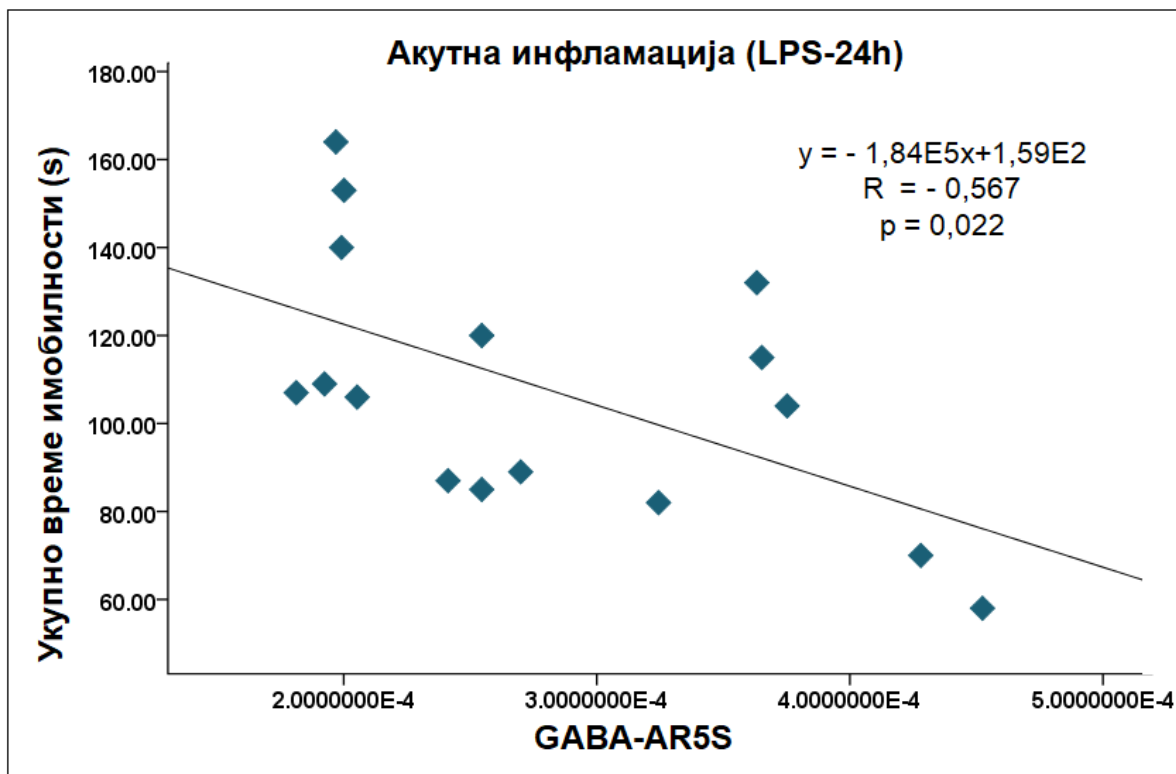
4.5.7. Анализа међусобне повезаности експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности у тесту качења за реп

На слици 4.42. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности (s) у тесту качења за реп (индикатор степена депресивности) у базалним условима. Анализа је показала да је у базалним условима постојала негативна корелација између експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности, али ова корелација није била статистички значајна ($R=-0.375$, $p=0.152$).



Слика 4.42. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности (s) у тесту качења за реп за код WT и Gal-3-/- мишева (n=16) (базални услови).

На слици 4.43. је приказана међусобна повезаност експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности (s) у тесту качења за реп, 24h након примене LPS-а (акутна инфламација). Анализа је показала да током акутне инфламације постоји јака, негативна корелација између експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности ($R=-0.567$, $p<0.05$).



Слика 4.43. Анализа међусобне повезаности релативне експресије гена за GABA-AR5S у хипокампусу и укупног времена имобилности (s) у тесту качења за реп код WT и Gal-3^{-/-} мишева (n=16) (акутна инфламација, 24h након апликације LPS-а).

5. ДИСКУСИЈА

Анксиозни и депресивни поремећаји су једни од најчешћих менталних поремећаја (3, 57) и представљају групу обољења од изузетног јавноздравственог значаја. Код 50-60% пацијената, ови поремећаји се јављају удружено, што указује на чињеницу да се у основи њиховог настанка налазе слични етиолошки фактори (107, 280). Истраживања су потврдила велики значај поремећаја одређених неуротрансмитера и неуропептида у настанку анксиозности и депресије. Доказано је да у настанку ових поремећаја битну улогу има дисфункција норадренергичког, серотонергичког, допаминергичког, глутаматергичког, холинергичког и ГАВАергичког система (39-42, 127). У настанку ових поремећаја потврђен је и велики значај кортикотропин-ослобађајућег фактора, BDNF-а и проинфламацијских цитокина (43, 46, 125). С обзиром на мултикаузалност и комплексност поремећаја понашања, неопходна су константна истраживања, како би се открили нови фактори који могу допринети још бољем разјашњавању настанка анксиозности и депресије. Недавна истраживања су показала да молекула Gal-3 има битне улоге у функционисању и сазревању CNS-а (465, 467, 468). Утврђен је значај Gal-3 код мождане исхемије, прионских, дегенеративних и демиелинизујућих болести CNS-а (472, 480, 498, 499, 509). Посебно су интересантни подаци студија, који указују на могућу повезаност делеције гена за Gal-3 са поремећајима у понашању (464, 493, 516). Досадашњим истраживањима је испитиван ефекат делеције гена за Gal-3 на понашање у одређеним патофизиолошким стањима или на понашање животиња у кавезу. Међутим, још увек није спроведена студија која би омогућила прецизније дефинисање могуће улоге Gal-3 у регулацији понашања под физиолошким условима, помоћу комбинације одговарајућих стандардизованих тестова за анализу понашања на анималним моделима и одређених параметара за процену анксиозности и депресивности у мозгу, који би омогућили потврду ефеката добијених бихевиоралним тестовима. Иако је познато да Gal-3 поспешује неуроинфламацију индуковану LPS-ом, до сада није спроведено истраживање којим би се утврдио последични ефекат на понашање код Gal-3^{-/-} мишева. У циљу јасније процене бихевиоралних ефеката Gal-3, у овом истраживању је испитано понашање животиња у базалним условима и током акутне неуроинфламације индуковане једнократном применом LPS-а. Поред тога, у нашој студији је испитивана повезаност делеције гена за Gal-3, параметара тестова понашања и промена експресије рецептора неуротрансмитера и неуротрофног фактора раста пореклом из мозга, одговорних за контролу понашања, као и концентрације проинфламацијских цитокина у хипокампусу. Наше истраживање

је спроведено на анималним моделима који омогућавају поуздану процену степена анксиозности и депресивности. Бихевиорални тестови су обављени у контролисаним експерименталним условима, што је омогућило добијање параметара на основу којих се прецизно могао одредити степен анксиозности и депресивности експерименталних животиња.

5.1. Утицај делеције гена за Gal-3 на понашање у базалним условима

Још увек не постоји довољно података о експресији Gal-3 и улогама у мозгу у базалним условима. До сада је утврђено да се Gal-3 експримира у субпопулацији ганглијских неурона дорзалног корена кичмене мождине, микроглији и другим потпорним ћелијама нервног система (462-465). Утврђено је да Gal-3, пореклом из глијалних ћелија CNS-а, учествује у процесу мијелинизације (464). Gal-3 се конститутивно експримира у одређеним врстама ћелија у субвентрикуларној зони и има битну улогу у миграцији неуробласта током развоја CNS-а (465). Потврђено је и да се Gal-3 експримира у CA1 региону хипокампуса и да учествује у негативној регулацији формирања меморије у хипокампусу (466). Gal-3 такође стимулише адхезију неурона и раст неурита и има важну улогу у модулацији екстрацелуларног матрикса и функционисању неуронских синапси (467, 468). Узимајући у обзир функције које овај молекул има у нервном систему, основни циљ нашег истраживања је био утврђивање улоге Gal-3 у бихевиоралним процесима.

5.1.1. Утицај делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова за процену степена анксиозности у базалним условима

Поуздани параметри који служе за процену степена анксиозности у истраживањима на анималним моделима се могу добити помоћу теста отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта (532, 533). У нашем истраживању је у базалним условима делеција гена за Gal-3 показала јасан анксиогени ефекат, који је потврђен главним индикаторима анксиозности, добијеним у тестовима отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта. У тесту отвореног поља у базалним условима се повећан степен анксиозности Gal-3^{-/-} мишева манифестовао значајним смањењем оба директна параметра анксиозности (укупног времена боравка у централној зони и броја улазака у централну зону) (слике 4.3 и 4.4) у поређењу са WT животињама. Параметри добијени у тесту уздигнутог крстастог лавиринта су показали још очигледније разлике у понашању између Gal-3 дефицијентних и WT мишева у базалним условима. Код Gal-3^{-/-} мишева је, у базалним условима, примећено значајно смањење оба главна параметра за процену анксиозности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (укупног

времена боравка у отвореним крацима и броја улазака у отворене краке), у односу на WT животиње (слике 4.8. и 4.9.). Ово значајно смањење главних параметара анксиозности теста уздигнутог крстастог лавиринта потврдило је повишен степен анксиозности код Gal-3^{-/-} мишева у базалним условима, који је детектован у тесту отвореног поља.

Главни анксиогени утицај дефицијенције Gal-3 који је квантификован помоћу индикатора директне анксиозности у тесту отвореног поља и тесту уздигнутог крстастог лавиринта је додатно потврђен променама експлоративне активности. Пошто је у претходним истраживањима, на основу одређених параметара добијених у различитим тестовима понашања, утврђено да анксиозност значајно утиче на експлоративну активност, она се може сматрати значајним индикатором анксиозности (534). У нашем истраживању је повишен степен анксиозности код Gal-3^{-/-} мишева у базалним условима потврђен и на основу вредности параметара експлоративнае активности теста уздигнутог крстастог лавиринта (слика 4.10.). Повећање степена анксиозности се код Gal-3 дефицијентних животиња манифестовало значајним смањењем броја епизода укупне експлоративне активности у поређењу са WT мишевима.

У базалним условима је у тесту отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта уочена редукција локомоторне активности код Gal-3^{-/-} мишева. С обзиром на то да су *Prut* и *Belzung* показали да промене у локомоторној активности могу служити за процену анксиозности (96), смањење локомоторне активности Gal-3 дефицијентних животиња такође се могло сматрати индиректном потврдом анксиогених ефеката делеције гена за Gal-3. Смањење локомоторне активности код Gal-3 дефицијентних животиња које је установљено у тесту отвореног поља и тесту уздигнутог крстастог лавиринта у базалним условима у сагласности је са недавним резултатима, на основу којих је такође утврђена смањена локомоторна активност код мишева са делецијом гена за Gal-3 (516). У студији коју су спровели *Chaudoin* и *Bonasera* коришћени су Gal-3^{-/-} и WT мишеви соја C57BL/6J, две старосне групе, 2-3 и 6-7 месеци (516). Ови истраживачи су употребили апаратуру за праћење понашања животиња и испитивали су узимање хране и воде, као и кретање животиња на основу чега су процењени свакодневни обрасци понашања. У обе старосне групе Gal-3^{-/-} мишеви су показали мању локомоторну активност у поређењу са контролама дивљег соја. Примећен је и поремећај бихевиоралних циркадијарних ритмова код Gal-3^{-/-} мишева у обе старосне групе. Gal-3^{-/-} мишеви су испољавали већу варијабилност у

свакодневном храђењу, узимању воде и кретању у поређењу са дивљим сојем. Ови резултати су указали на битну улогу Gal-3 у развоју структура централног нервног система и контроли локомоторне активности. С обзиром да се до ових резултата није дошло помоћу комбинације више стандардизованих тестова понашања, већ само на основу посматрања понашања животиња у кавезу, била су потребна даља истраживања како би се утврдила улога Gal-3 на локомоторну активност.

Pasquini и сарадници су истраживали утицај Gal-3^{-/-} на процес мијелинизације, а у истраживању су користили Gal-3^{-/-} и WT мишеве старости 9-13 недеља (464). Бихевиорални тест за процену анксиозности показао је да су Gal-3^{-/-} мишеви испољили мањи степен анксиозности у односу на одговарајуће WT мишеве. У њиховом истраживању су у тесту крстастог лавиринта Gal-3^{-/-} мишеви имали статистички значајно већи проценат улазака у отворене краке и проценат времена проведеног у отвореним крацима у односу на WT мишеве, док делеција гена за Gal-3 није битно утицала на вредности броја улазака у отворене краке. У истраживању *Pasquini*-а и сарадника нису уочене промене локомоторне и експлоративне активности, док је у нашем тесту уздигнутог крстастог лавиринта постојало значајно смањење експлоративне активности код Gal-3^{-/-} мишева, чиме је додатно потврђен анксиогени ефекат делеције гена за Gal-3. У нашем истраживању је, за разлику од истраживања *Pasquini*-а и сарадника, више параметара из два стандардизована теста за процену степена анксиозности указивало на анксиогени ефекат делеције гена за Gal-3, што нашим резултатима даје већу прецизност у процени степена анксиозности. На разлике у резултатима овог и нашег истраживања је највероватније утицај имала и старост животиња, јер су у нашем истраживању коришћени двоструко старији мишеви, који по старости одговарају зрелој животној доби код људи. Разлике у понашању Gal-3^{-/-} мишева различите старости могу бити повезане и са варијацијама експресија LGALS3 гена, што за последицу има настанак променама у синапасама и губитак њихове функције током старења (468).

У истраживању *Hoуos* и сарадника експерименти су спроведени са Gal-3^{-/-} и WT мишевима старости 8 недеља, којима је демиелинација индукована купризоном, помоћу третмана који је трајао две недеље (493). Након тога, спроведени су тестови понашања. Резултати су показали да мишеви третирани купризоном имају нижи степен анксиозности у поређењу са одговарајућим наивним мишевима. Код Gal-3^{-/-} мишева који су били контрола (мишеви без третмана) уочен је значајно већи проценат улазака у отворене краке у односу на WT контролну групу и након 2 и након 5 недеља од

третмана. Ови резултати су указали на смањење степена анксиозности код Gal-3-/- мишева у условима без третмана. Пошто су ови резултати добијени код мишева који су доста млађи у односу на мишеве који смо користили у нашем истраживању и није коришћена иста поставка бихевиоралних тестова, ови резултати нису у потпуности компарабилни са резултатима нашег истраживања. Осим тога, у истраживању *Hooyos* и сарадника Gal-3-/- мишеви су показали смањење локомоторне активност у оба испитивана периода, што је било у сагласности са резултатима нашег истраживања, јер смањење локомоторне активности индиректно указује на повећање степена анксиозности. Резултати истраживања *Hooyos*-а и сарадника су потврдили битну чињеницу да се Gal-3 експримира у микроглијалним ћелијама, да модулира њихов фенотип и омогућава почетак ремиелијације и диференцијације олигодендроцита. Битна улога Gal-3 у настанку анксиозности потврђена је чињеницом да је овај молекул веома важан за развој и функционисање неурона, као и на основу повезаности са одређеним факторим раста, који имају битну улогу у нервном систему, попут VEGF-а, bFGF-а и IGF-1 (480, 515).

5.1.2. Утицај делеције гена за Gal-3 на резултате бихевиоралних тестова за процену степена депресивности у базалним условима

Степен депресивности је процењен на основу резултата теста качења за реп. У базалним условима је у овом тесту код Gal-3-/- уочено значајно продужење времена до појаве прве имобилности у односу на WT мишеве (слика 4.11.). Код Gal-3-/- животиња је такође постојало значајно скраћење укупног времена имобилности у односу на WT мишеве (слика 4.13.). Анализирајући број епизода имобилности у базалним условима уочено је смањење овог параметра код Gal-3-/- у односу WT мишеве, међутим ово смањење није било статистички значајно (слика 4.12.). На основу промена наведених параметара теста качења за реп, овакав ефекат делеције гена за Gal-3 би се могао сматрати антидепресантним. Међутим, ако у обзир узмемо закључке претходне студије (521), који указују на то да се у случају преклапања етиопатогенезе и времена детектовања бихевиоралних манифестација два патофизиолошка ентитета, анксизности и депресивности, за анализу у обзир не могу узети само вредности појединачног параметра (131) или вредности параметара добијених из једног теста понашања. У том случају се анализа мора спровести посматрањем већег броја параметара из различитих

тестова, а коначно тумачење ефеката делеције гена за Gal-3 на параметре теста качења за реп у овој студији се треба посматрати у ширем контексту. На основу овога би се хиперреактивност животиња забележена у тесту качења за реп више могла сматрати моторичком манифестацијом повећане анксиозности, која је потврђена у претходним тестовима спроведеним у нашем истраживању, него антидепресантним ефектом делеције гена за Gal-3.

Претрагом литературе пронађено је само једно истраживање које указује на повезаност Gal-3 и депресије. Према резултатима истраживања *Melin* и сарадника високе концентације циркулишућег Gal-3 су биле повезане са депресијом код пацијената са дијабетесом мелитусом тип 1 (535). Пошто из литературе не постоје други релевантни подаци о про- или антидепресантним улогама Gal-3, ови ефекти Gal-3 би се прецизније могли проценити у условима који подразумевају значајне промене нивоа Gal-3, као што су експериментални модели на животињама за неке специфичне болести (476, 500).

Сумирањем резултата тестова понашања у базалним условима недвосмислено је уочен значајан анксиогени ефекат делеције гена за Gal-3. Наредни циљ нашег истраживања био је додатна потврда овог ефекта делеције гена за Gal-3 на понашање анализом промена одговарајућих параметара у хипокампусу.

5.1.3. Повезаност делеције гена за Gal-3, промена у понашању, цитокина, TLR4, BDNF-а, GABA-AR2S и GABA-AR2S у хипокампусу, у базалним условима

Истраживањима је утврђено да промене нивоа одређених цитокина могу бити повезане са поремећајима понашања. Резултати студија су потврдили значај IL-6 и TNF α у одржавању хомеостазе нервног ткива, као и у настанку анксиозних и депресивних поремећаја (251, 253). Постоје докази да делеција гена за Gal-3 смањује продукцију проинфламацијских цитокина у различитим имунским и резидентним ћелијама које су укључене у процес инфламације (454, 453, 476, 536, 537). Овај ефекат Gal-3 је потврђен и у CNS-у, при чему је установљено да делеција гена за Gal-3 смањује продукцију проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-6 (538). У нашем истраживању је анксиогени ефекат делеције гена за Gal-3 био праћен смањењем експресије и концентрације IL-6 и TNF α у базалним условима. Забележено је статистички значајно

смањење концентрације и експресије IL-6 код Gal-3 $-/-$ мишева у односу на WT мишеве (слике 4.26. и 4.28.). Међутим, код Gal-3 $-/-$ мишева није постојало статистички значајно смањење експресије гена и хипокампалног садржаја TNF- α у базалним условима (слике 4.27. и 4.29.). Делација гена за Gal-3 у базалним условима није имала значајног утицаја на експресију TLR4 у хипокампусу (слика 4.25.). Ово је у складу са резултатима претходног истраживања које је потврдило да повећање нивоа одређених цитокина у мозгу (TNF- α) није искључиво посредовано са TLR4 (470). *Femenia* и сарадници су доказали да TLR4 *knockout* мишеви испољавају повећану анксиозност у базалним условима (539). Позитивна корелација између испитиваних проинфламацијских цитокина и BDNF-а, која је у овом истраживању примећена у базалним условима, потврђена је и у другим студијама (540, 541).

Дефицијенција Gal-3 у базалним условима је, поред анксиогеног ефекта који је примећен у тестовима понашања, проузроковала значајно смањење експресије гена за BDNF у хипокампусу (слика 4.22.). Број BDNF-имунореактивних неурона је код Gal-3 $-/-$ мишева био мањи у свим регионима хипокампуса у односу на WT мишеве (слике 4.15.-4.19.). Статистички значајно мањи број BDNF-имунореактивних неурона детектован је код Gal-3 $-/-$ мишева на преску целог хипокампуса, а ова редукција имунореактивности је посебно била изражена у CA1 региону хипокампуса (слике 4.15. и 4.21.). За настанак анксиозности је нарочито важна улога CA1 региона хипокампуса (27), а нашим истраживањем је потврђено да је у базалним условима, у том региону, делација гена за Gal-3 била праћена најизраженијом редукцијом броја BDNF-имунореактивних неурона. Резултати претходног истраживања указују на повезаност експресије Gal-3 и одређених можданих фактора раста у које спада BDNF (462), чиме се може објаснити веза између делације гена за Gal-3 и смањење експресије гена за BDNF у нашој студији. Истраживања су показала да су ниски нивои BDNF-а одговорни за настанак поремећаја расположења (75, 76), као и да заједно са смањењем овог можданог фактора раста, редукција GABA-е има улогу у настанку анксиозности и депресије (542). Смањење концентрације BDNF-а анксиогени ефекат остварује изазивајући редукцију активности GABA-A рецептора и броја хипокампаљних неурона (79, 80). Ова повезаност рецептора главног инхибиторног неуротрансмитера и можданог фактора раста је у сагласности са нашим резултатима, који су указали на постојање снажне позитивне корелације између експресије гена за BDNF и GABA-A рецепторских субјединица 2 и 5 (слике 4.34. и 4.36.). У нашем истраживању је анксиогени ефекат делације гена за Gal-3 (осим редукцијом експресије гена за BDNF)

био праћен и значајним смањењем експресије гена за GABA-A рецепторске субјединице 2 и 5 у ткиву хипокампуса (слике 4.23. и 4.24.). Истраживањима је утврђено да смањење експресије GABA-A 2 и 5 рецепторских субјединица има улогу у настанку анксиозности (54-57) и да је за настанак анксиозности и различитих поремећаја расположења посебно значајна GABAергична дисфункција у хипокампусу (58-60). Ови резултати су такође у сагласности са резултатима нашег истраживања, у коме је забележена значајна повезаност главних параметра анксиозности и ових рецепторских субјединица. Анализом резултата у базалним условима установили смо јаку позитивну корелацију између GABA-A 2 и 5 рецепторских субјединица и главних индикатора анксиозности (укупног времена проведеног у централној зони теста отвореног поља и укупног време проведеног у отвореним крацима у тесту уздигнутог крстастог лавиринта) (слике 4.38. и 4.40.). Међутим, нисмо пронашли значајну повезаност ових рецепторских субјединица и индикатора за процену депресивности (укупног времена имобилности у тесту качења за реп) у базалним условима, при чему је била забележена негативна корелација између ових параметара (4.42.).

5.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на понашање

Анимални модели су се на основу претходних истраживања показали веома погодним за проучавање неуроинфламације индуковане применом проинфламацијских супстанци на периферији. Водећи се претходним студијама, у нашем истраживању смо неуроинфламацију код мишева индуковали једнократном интраперитонеалном применом LPS-а. Претходно је утврђено да овај начин апликације LPS-а код мишева индукује активацију астроцита и микроглије и повећава експресију проинфламацијских цитокина у мозгу (254-257). У нашем истраживању је детектовано и присуство инфламацијских ћелија у ткиву мозга мишева, чиме је потврђен настанак неуроинфламације (слика 3.4.).

5.2.1. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на резултате бихевиоралних тестова за процену степена анксиозности

Резултати претходних истраживања су показали да примена LPS-а може изазвати понашање слично анксиозности и депресији код експерименталних животиња. Утврђено је да LPS примењен на периферији изазива настанак неуроинфламације (262-268, 274). Према резултатима бихевиоралних тестова спроведених у нашем истраживању делеција гена за Gal-3 је изазвала атенуацију анксиогеног ефекта индукованог применом LPS-а. Ефекат инфламације на понашање је детектован помоћу директних показатеља анксиозности из теста отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта. Анксиогени ефекат акутне инфламације се манифестовао смањењем вредности директних индикатора анксиозности у тесту отвореног поља (укупног времена проведеног у централној зони и броја улазака у централну зону) и код WT и код Gal-3^{-/-} животиња у односу на базалне услове (слике 4.3. и 4.4.), док је статистички значајна разлика код Gal-3^{-/-} мишева у односу на базалне услове забележена само у броју улазака у централну зону. Примена LPS-а је изазвала значајно смањење директних индикатора анксиозности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта (укупног времена проведеног у отвореним крацима и броја улазака у отворене краке) код WT мишева у односу на базалне услове. Gal-3^{-/-} животиње нису испољиле значајне

промене у овим параметрима у односу на базалне услове, већ је дошло до пораста вредности директних индикатора анксиозности (слике 4.8. и 4.9.). Током акутне инфламације број улазака у отворене краке је био значајно већи код Gal-3^{-/-} у односу на WT мишеве. У оба теста су након примене LPS-а детектоване веће вредности директних индикатора анксиозности у односу на WT мишеве. Ови резултати су указивали на анксиолитички ефекат делеције гена за Gal-3 током акутне инфламације.

Акутна инфламација изазвана применом LPS-а манифестовала се смањењем локомоторне активности у свим експерименталним групама у тесту отвореног поља у односу на базалне услове (слике 4.1. и 4.2.). Међутим, након примене LPS-а, код Gal-3^{-/-} мишева уочене су статистички значајно веће вредности укупног времена кретања у поређењу са WT животиња. Забележена је мања редукција вредности овог параметра код Gal-3^{-/-} мишева за разлику од WT животиња, што је ишло у прилог анксиолитичког ефекта делеције гена за Gal-3. Смањење локомоторне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта је такође било знатно израженије код WT мишева у поређењу са Gal-3 дефицијентним животињама. Оба параметра локомоторне активности су након примене LPS-а имали значајно веће вредности код Gal-3^{-/-} у односу на WT животиње (слике 4.6. и 4.7.). Параметри локомоторне активности оба теста су указивали на мањи степен анксиозности код Gal-3^{-/-} мишева током акутне инфламације.

Анксиогени ефекат инфламације потврђен је параметрима експлоративне активности оба бихевиорална теста за процену анксиозности. У тесту отвореног поља, вредности индикатора експлоративне активности (броја усправљања) су значајно биле мање након примене LPS-а и код Gal-3^{-/-} и код WT мишева, при чему је забележена мања редукција код Gal-3^{-/-} животиња у односу на базалне услове (слика 4.5.). У тесту уздигнутог крстастог лавиринта, за разлику од WT животиња, Gal-3^{-/-} мишеви нису показали смањење експлоративне активности 24 часа након примене LPS-а. Код њих су се одржавале базалне вредности параметара експлоративне активности, које су биле значајно веће од вредности забележених код WT животиња након инфламације индуковане LPS-ом (4.10.). Резултати процене експлоративне активности из оба теста су додатно потврдили анксиолитички ефекат делеције гена за Gal-3 током акутне инфламације.

Сумирањем ефеката акутне инфламације на вредности параметара за процену степена анксиозности потврђено је њено израженије анксиогено дејство код WT мишева, док је делеција гена за Gal-3 имала анксиолитички ефекат. Ови резултати су у сагласности са недавним истраживањем Yang-а и сарадника (543), који су у својој

студији процењивали бихевиоралне ефекте акутне инфламације индуковане LPS-ом код мишева соја C57BL/6 употребом теста отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта. У истраживању Yang-а и сарадника мишеви третирани LPS-ом су провели значајно мање времена у отвореним крацима и ређе су улазили у отворене краке у поређењу са контролном групом мишева у тесту уздигнутог крстастог лавиринта. Мишеви третирани LPS-ом су провели значајно мање времена у централној зони теста отвореног поља у поређењу са контролним мишевима. За разлику од резултата наше студије, Yang и сарадници нису забележили значајне разлике у параметру локомоторне активности, укупном пређеном путу у тесту отвореног поља, између мишева третираних LPS-ом и контролних мишева. Истраживање Yang-а и сарадника утврдило је анксиогени ефекат примене LPS код WT мишева, што је потврђено и нашим резултатима. Анксиолитичко дејство делеције гена за Gal-3 може се објанити улогом коју овај молекул има у настанку и подстицању инфламације. Истраживањима је утврђено да у централном нервном систему у присуству LPS-а микроглија секретује Gal-3 који функционише као ендогени лиганд за TLR4 рецепторе, што поспешује инфламацију (470).

5.2.2. Утицај делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане применом LPS-а на резултате бихевиоралних тестова за процену степена депресивности

Након примене LPS-а дошло је до смањења времена протеклог до појаве прве имобилности и код WT и код Gal-3 дефицијентних животиња у односу на базалне услове, што је указивало на продепресантно дејство акутне инфламације. Повишен степен депресивности установљен је и на основу повећања вредности друга два индикатора депресивности, броја епизода имобилности и укупног времена имобилности и код WT и код Gal-3 дефицијентних животиња у односу на базалне услове (слике 4.11-4.13). Ови резултати су у сагласности са резултатима претходних истраживања који указују на улогу примене LPS-а и ефекта инфламације на настанак депресије (274). У нашем истраживању није уочен утицај делеције гена за Gal-3 на атенуацију продепресантног ефекта акутне инфламације индуковане применом LPS-а.

5.2.3. Повезаност делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације индуковане LPS-ом са променама у понашању и проинфламацијским цитокинима, TLR4, BDNF-ом, GABA-AR2S и GABA-AR5S у хипокампусу

Делеција гена за Gal-3 је током акутне неуроинфламације смањила LPS-ом индуковано повећање експресије гена и хипокамбални садржај IL-6 у поређењу са вредностима у базалним условима (слике 4.26. и 4.28.), а исти ефекат је детектован и код експресије гена и хипокамбалног садржаја TNF- α (слике 4.27 и 4.29.). Повећање генске експресије и хипокамбалног садржаја IL-6 код WT животиња је током акутне инфламације значајно било израженије у поређењу са Gal-3 дефицијентним животињама након примене LPS-а. Значајно повећање генске експресије и концентрације TNF- α у хипокампусу је примећено и код WT и Gal-3 дефицијентних мишева 24 сата након примене LPS-а, при чему је израженије повећање забележено код WT животиња. Овим резултатима су потврђени закључци претходних истраживања у којима је доказно повећање проинфламацијских цитокина у мозгу током акутне инфламације индуковане применом LPS-а на периферији. Истраживања су утврдила да цитокини који се стварају на периферији не могу доспети до мозга када је очувана хематоенцефална баријера, али могу преносити сигнале до централног нервног система и индуковати неуроинфламацију (262-268). Бројне студије су потврдиле изражену генску експресију проинфламацијских цитокина IL-6 и TNF- α у мозгу мишева соја C57BL/6J након интраперитонеалне примене LPS-а (254, 265, 267, 269-272). Ефекат неуроинфламације на настанак бихевиоралних промена уочен у нашем истраживању је у сагласности са резултатима студија у којима је утврђено да повишени нивои проинфламацијских цитокина могу изазвати настанак промена у понашању (124, 125).

Након примене LPS-а, истовремено са повећањем проинфламацијских цитокина, и WT и Gal-3 дефицијентне животиње су показале повећану експресију гена хипокамбалног TLR4, међутим повећање експресије гена за TLR4 је било значајно израженије код WT мишева (слика 4.25.). Претходне студије су такође утврдиле антиинфламацијски ефекат дефицијенције Gal-3 у моделу инфламације индуковане LPS-ом, у коме је битну улогу имао TLR4 (470). Ово истраживање је показало да под дејством проинфламацијских стимулуса (LPS) микроглија секретује Gal-3 који има улогу ендогеног лиганда за TLR4, што изазива активацију проинфламацијског фенотипа микроглије и промовише неуроинфламацију.

Акутна инфламација индукована LPS-ом условила је значајно смањење експресије гена за BDNF-а у хипокампусу WT мишева у односу на базалне услове. Делеција гена за Gal-3 је 24 часа након примене LPS-а спречила смањење експресије гена за BDNF (слика 4.22.). Акутна инфламација је узроковала појаву значајних регионалних разлика у дистрибуцији BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу (слика 4.22.). Делеција гена за Gal-3 је такође спречила редукцију броја BDNF-имунореактивних неурона у CA1 и DG региону хипокампуса (слике 4.15. и 4.19.). Значајно смањење броја BDNF-имунореактивних неурона, које је пратило акутну инфламацију, детектовано је у CA2/3 региону хипокампуса и у пресецима целе површине хипокампуса и код Gal-3^{-/-} и код WT мишева (слике 4.17. и 4.21.). Смањење броја BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу 24 сата након примене LPS-а било је израженије код WT у поређењу са Gal-3 дефицијентним животињама (34% према 12.5%) (слика 4.21.). Осим тога, делеција гена за Gal-3 спречила је смањење експресије GABA-A рецепторске субјединице 2, које је било изазвано применом LPS-а (слика 4.23.). Делеција гена за Gal-3 је након примене LPS-а такође била праћена повећањем генске експресије GABA-A рецепторске субјединице 5 (слика 4.24.).

Резултати добијени у овој студији су потврдили чињеницу да се експресија проинфламацијских цитокина (IL-6 и TNF- α) у хипокампусу налази у значајној корелацији са експресијом BDNF-а у хипокампусу. Посебно су интересентни резултати нашег истраживања на основу којих је у базалним условима забележена позитивна корелација између IL-6 и TNF- α и експресије BDNF-а, док је LPS-ом индуковано повећање експресије ових проинфламацијских цитокина резултовало негативном корелацијом (слике 4.31 и 4.33.). Оваква промена повезаности између проинфламацијских цитокина и нивоа BDNF-а није забележена у претходним истраживањима. У литератури постоје подаци само позитивној или само о негативној корелације IL-6 и TNF- α са нивоима BDNF-а у централном нервном систему. Позитивна корелација између испитиваних проинфламацијских цитокина и BDNF-а, која је у овом истраживању примећена у базалним условима, претходно је забележена у хипокампусу мишева и у можданој кори, као и у неуронима тригеминалних ганглиона (540, 541). Негативна корелација која се у овом истраживању манифесовала 24 сата након примене LPS-а у сагласности је са претходно описаним снижењем BDNF-а под дејством IL-6 и TNF- α у β -амилоидном моделу Алцхајмерове болести (544). Веома слична негативна корелација између нивоа IL-6 и BDNF-а уочена је у људском серуму 24 сата након интензивне физичке активности (545). Једно од могућих објашњења за

ове "контрадикторне" утицаје испитиваних цитокина на BDNF може се наћи у чињеници да је негативна корелација (описана током акутне неуроинфламације у овој студији) установљена у околностима које се не могу окарактерисати као физиолошки услови (модел болести праћен неуроинфламацијом и/или изузетно тешким вежбама). Позитивна корелација која је постојала у базалним условима у нашем истраживању је детектована у физиолошким условима и била је праћена нижим нивоима проинфламацијских цитокина.

На основу резултата претходних истраживања познато је да BDNF може повећати неуронску пластичност и да је неопходан за правилан развој и опстанак GABA-ергичких неурона (546, 547). Сходно томе, можемо претпоставити да фактори који утичу на нивое BDNF-а у хипокампусу, као што су дефицијенција Gal-3 и инфламација (механизмом који подразумева промене нивоа проинфламацијских цитокина (IL-6 и TNF- α)), могу изазвати анксиогени ефекат депривацијом GABA-ергичког система хипокампуса, путем негативног утицаја на BDNF. Овај закључак је заснован на снажној позитивној корелацији између експресије BDNF-а у хипокампусу и експресије GABA-A рецепторских субјединица 2 и 5 (слике 4.35 и 4.37.), као и на снажној позитивној корелацији између експресије ових GABA-рецепторских субјединица и индикатора анксиозности и депресивности, добијених у тестовима понашања (слике 4.39, 4.41 и 4.43). Ови резултати су у сагласности са претходним истраживањима која су утврдила да је GABAергички систем у мозгу регулисан BDNF/*TrkB* путем (548).

С обзиром да резултати нашег истраживања указују на улогу Gal-3 у регулацији појединих образаца понашања у базалним условима, као и током акутне неуроинфламације, отвара се могућност потенцијалног третирања бихевиоралних поремећаја применом фармаколошких и биолошких модулатора нивоа Gal-3, за шта би била потребна даља истраживања.

6.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата нашег истраживања можемо закључити да Gal-3 има важну улогу у регулисању степена анксиозности.

Основни закључци нашег истраживања су:

- у базалним условима, делеција гена за Gal-3 има за резултат јасан анксиогени ефекат;
- у акутној неуроинфламацији индукованој LPS-ом делеција гена за Gal-3 умањује бихевиоралне манифестације неуроинфламације, што се испољава као анксиолитички ефекат;
- бихевиорални ефекти делеције гена за Gal-3 и акутне инфламације су повезани са променама вредности проинфламацијских цитокина, BDNF-а, GABA-AR2S и GABA-AR5S у хипокампусу;
- претпостављени механизам утицаја Gal-3 на понашање у базалним условима: Gal-3 повећава садржај BDNF-а у хипокампусу, повећање BDNF-а повећава експресију GABAергичких рецептора, повећање броја GABAергичких рецептора у хипокампусу смањује степен анксиозности.

Закључци су изведени на основу следећих резултата:

1. Анксиогени ефекат делеције гена за Gal-3 у базалним условима је утврђен на основу значајне:

- редукције главних индикатора анксиозности у тесту отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта, као и индикатора експлоративне активности у тесту уздигнутог крстастог лавиринта код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- хиперреактивности утврђена у тесту качења за реп, на основу значајног повећања времена до појаве имобилности и смањења укупног времена имобилности (ово наизглед антидепресантно дејство делеције гена за Gal-3 се, на основу свих бихевиоралних тестова, пре се може сматрати потврдом анксиогеног ефекта);
- редукције експресије гена и концентрације IL-6 код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- редукције броја BDNF-имунореактивних неурона у CA1 региону и целом хипокампусу и експресије гена за BDNF у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;

- редукције експресије гена за GABA-AR2S и GABA-AR5S у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;

2. Анксиолитички ефекат делеције гена за Gal-3 током акутне инфламације 24h након примене LPS-а је утврђен на основу:

- мање изражене редукције вредности главних параметара анксиозности у тесту отвореног поља и повећања вредности ових параметара у тесту крстастог лавиринта код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- мање изражене редукције вредности индикатора локомоторне и експлоративне активности у тестовима отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- мање израженог повећања експресије и концентрације IL-6, TNF- α и TLR4 у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- мање израженог повећања експресије гена и концентрације IL-6 и TNF- α и експресије гена за TLR4 у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- повећања експресије гена за BDNF код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева где је забележено смањење овог параметра;
- мање изражене редукције броја BDNF-имунореактивних неурона у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- повећања експресије гена за GABA-AR2S код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;
- израженијег повећања GABA-AR5S у хипокампусу код Gal-3^{-/-}, за разлику од WT мишева;

3. Потврда о повезаности бихевиоралних ефеката делеције гена за Gal-3, акутне инфламације и промена вредности проинфламацијских цитокина, BDNF-а, GABA-AR2S и GABA-AR5S у хипокампусу је изведена на основу:

- позитивне корелације између BDNF-а, IL-6 и TNF- α у базалним условима и негативне корелацијом током акутне инфламације индуковане LPS-ом;
- позитивне корелације BDNF-а, GABA-AR2S и GABA-AR5S у базалним условима и током акутне инфламације индуковане LPS-ом;

- позитивне корелације између GABA-AR2S и GABA-AR5S и главних индикатора анксиозности у тестовима отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта у базалним условима и током акутне инфламације индуковане LPS-ом;
- значајне негативне корелације између GABA-AR5S и индикатора депресивности (укупног броја епизода имобилности) у тесту качења за реп током акутне инфламације индуковане LPS-ом.

7.

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Bouras N, Holt G. *Psychiatric and Behavioral Disorders in Intellectual and Developmental Disabilities*. 2nd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2007.
2. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2163–96.
3. Craske MG, Stein MB. Anxiety. *Lancet* 2016; 388: 3048–59.
4. Kessler RC, Angermeyer M, Anthony JC, DE Graaf R, Demyttenaere K, Gasquet I, et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry* 2007; 6: 168–76.
5. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fifth ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013; 160–68, 189.
6. Barker P. *Psychiatric and Mental Health Nursing: The Craft of Caring*. 2nd ed. London, United Kingdom: Edward Arnold; 2003.
7. World Health Organization. Geneva. *Pharmacological Treatment of Mental Disorders in Primary Health Care*. 2009. (cited 2019. 07. 04.). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143202/>
8. Testa A, Giannuzzi R, Daini S, Bernardini L, Petrongolo L, Gentiloni Silveri N. Psychiatric emergencies (part III): psychiatric symptoms resulting from organic diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 86–99.
9. Testa A, Giannuzzi R, Sollazzo F, Petrongolo L, Bernardini L, Dain S. Psychiatric emergencies (part II): psychiatric disorders coexisting with organic diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 65–85.
10. Testa A, Giannuzzi R, Sollazzo F, Petrongolo L, Bernardini L, Daini S. "Psychiatric emergencies (part I): psychiatric disorders causing organic symptoms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 55–64.
11. Vulić-Prtorić A. Anksiozna osjetljivost: Fenomenologija i teorije. *Suvremena psihologija* 2006; 9: 171-93.
12. Craske MG, Stein MB, Eley TC, Milad R, Holmes A, Rapee RM, et al. Anxiety disorders. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17024.

13. Smoller JW, Andreassen OA, Edenberg HJ, Faraone SV, Glatt SJ, Kendler KS. Correction to: Psychiatric genetics and the structure of psychopathology. *Mol Psychiatry* 2018; 24: 471.
14. Kendler KS. Major Depression and Generalised Anxiety Disorder. *FOCUS* 004; 2: 416–25.
15. Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am* 2009; 32: 549–75.
16. Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 2010; 65: 7–19.
17. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15: 655–69.
18. Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JN. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 2002; 116: 884–901.
19. Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10825–30.
20. Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron* 2013;79: 658–64.
21. Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, et al. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 2013; 77: 955–68.
22. Kjaerby C, Athilingam J, Robinson SE, Iafrati J, Sohal VS. Serotonin 1B Receptors Regulate Prefrontal Function by Gating Callosal and Hippocampal Inputs. *Cell Rep* 2016; 17: 2882–90.
23. Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron* 2016; 89: 857–66.
24. Parfitt GM, Nguyen R, Bang JY, Aqrabawi A, Tran MM, Seo DK, et al. Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviours in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 2017; 42: 1715–28.

25. Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, et al. 5-HT_{1A} receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1606–16.
26. Wu MV, Hen R. Functional dissociation of adult-born neurons along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Hippocampus* 2014; 24: 751–61.
27. Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, Ordek G, et al. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron* 2018; 97: 670–83.e6.
28. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus, Ch 3. Hippocampal Neuroanatomy*. London: Oxford University Press, University College London; 2006. 37–114.
29. Canteras NS. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 481–91.
30. Cenquizca LA, Swanson LW. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J Comp Neurol* 2006; 497: 101–14.
31. Kishi T, Tsumori T, Yokota S, Yasui Y. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 2006; 496: 349–68.
32. Tannenholz L, Jimenez JC, Kheirbek MA. Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 147.
33. Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 2013; 341: 1517–21.
34. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* 2011; 471: 358–62.
35. Hettema JM, Kettenmann B, Ahluwalia V, McCarthy C, Kates WR, Schmitt JE, et al. Pilot multimodal twin imaging study of generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety* 2012; 29: 202–9.
36. Irlé E, Ruhlede M, Lange C, Seidler-Brandler U, Salzer S, Dechent P, et al. Reduced amygdala and hippocampal size in adults with generalized social phobia. *J Psychiatry Neurosci* 2010; 35: 126–31.
37. Kuhn S, Gallinat J. Gray matter correlates of posttraumatic stress disorder: a quantitative meta-analysis. *Biol Psychiatry* 2013; 73: 70–74.

38. Woon FL, Sood S, Hedges DW. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 1181–8.
39. Ruhe HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 331–59.
40. Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:3573-8.
41. Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015; 11: 165–75.
42. Amiel JM, Mathew SJ. Glutamate and anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2007; 9: 278–83.
43. Binder EB, Nemeroff CB. The CRF system, stress, depression and anxiety - insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 2010; 15(6): 574–88.
44. Iemolo A, Seiglie M, Blasio A, Cottone P, Sabino V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nucleus of the amygdala induces anxiety via melanocortin receptors. *Psychopharmacology* 2016; 233: 3269–77.
45. Kaur S, Singh R. Role of different neurotransmitters in anxiety: a systemic review, *IJPSR*, 2017; 8: 411–421.
46. Suliman S, Hemmings SMJ, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci* 2013; 7:55.
47. Zachmann M, Tocci P, Nyhan WL. The occurrence of gammaaminobutyric acid in human tissues other than brain. *J Biol Chem* 1966; 241: 1355–1358.
48. Guidotti A, Corda MG, Wise BC, Vaccarino F, Costa E. GABAergic synapses. Supramolecular organization and biochemical regulation. *Neuropharmacology* 1983; 22: 1471–1479.
49. Zaletel I, Filipović D, Puškaš N. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: what do we know so far? *Rev Neurosci* 2016; 274: 397–409.
50. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One* 2017; 12: e0189595.

51. Eder M, Rammes G, Zieglgansberger W, Dodt HU. GABAA and GABAB receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1065–69.
52. Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 514–20.
53. Lydiard RB. The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 2003; 64: 21–7.
54. Hanns S, Möhler H *The GABA Receptor*. New York: Humana Press; 2007. 23–31, 69–87, 87–111.
55. Enoch MA. The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism". *New Insights Into the Function of GABAA Receptor Subtypes*. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 95–104.
56. Botta P, Demmou L, Kasugai Y, Markovic M, Xu C, Fadok JP et al. Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1493–1500.
57. Tasan RO, Bukovac A, Peterschmitt YN, Sartori SB, Landgraf R, Singewald N, ety al. Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety. *Neurosci* 2011; 183: 71–80.
58. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 721–737, 715.
59. Brambilla P, Barale F, Caverzasi E, Soares, JC. Anatomical MRI findings in mood and anxiety disorders. *Epidemiol Psychiatr Soc* 2002; 11: 88–99.
60. Naseri MH, Hesami-Tackallou S, Torabi-Nami M, Zarrindast MR, Nasehi M. Involvement of the Ca1 GABAA receptors in Mk-801-induced anxiolytic like effects: an Isobologram analysis. *Behav Pharmacol* 2014; 25: 197–205.
61. Janke KL, Cominski TP, Kuzhikandathil EV, Servatius RJ, Pang KC. Investigating the Role of Hippocampal BDNF in Anxiety Vulnerability Using Classical Eyeblink Conditioning. *Front psychiatry* 2015; 6: 106.
62. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003; 91: 267–70.
63. Frielingsdorf H, Bath KG, Soliman F, Difede J, Casey BJ, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met endophenotypes: implications for posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1208: 150–7.

64. Jiang X, Xu K, Hoberman J, Tian F, Marko AJ, Waheed JF, et al. BDNF variation and mood disorders: a novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 1353–61.
65. Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta JK. BDNF Val66Met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 812–5.
66. Molendijk ML, van Tol MJ, Penninx BW, van der Wee NJ, Aleman A, Veltman DJ, et al. BDNF val66met affects hippocampal volume and emotion-related hippocampal memory activity. *Transl Psychiatry* 2012; 2 :e74.
67. Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, et al. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci* 2004; 24: 10099–102.
68. Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 631–6.
69. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112: 257–69.
70. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 2003; 23: 6690–4.
71. Lau JY, Goldman D, Buzas B, Hodgkinson C, Leibenluft E, Nelson E, et al. BDNF gene polymorphism (Val66Met) predicts amygdala and anterior hippocampus responses to emotional faces in anxious and depressed adolescents. *Neuroimage* 2010; 53: 952–61.
72. Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 2010; 327: 863–6.
73. Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A, Kasai K, Lasko NB, Orr SP, et al. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1242–7.
74. Gilbertson MW, Williston SK, Paulus LA, Lasko NB, Gurvits TV, Shenton ME, et al. Configural cue performance in identical twins discordant for posttraumatic stress disorder:

theoretical implications for the role of hippocampal function. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 513–20.

75. Rizos EN, Papathanasiou M, Michalopoulou PG, Mazioti A, Douzenis A, Kastania A, et al. Association of serum BDNF levels with hippocampal volumes in first psychotic episode drug-naïve schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2011; 129: 201–4.

76. Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci* 2010; 64: 341–57.

77. Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 527–32.

78. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 1116–27.

79. Nemeroff CB. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37: 133–46.

80. Zen'ko MY, Rybnikova YA, Glushchenko TS. Expression of BDNF neurotrophin in the hippocampus and neocortex of rats during the development of post-stress anxiety and its correction by hypoxic postconditioning. *Morfologija* 2014; 146: 14–18.

81. Waszczuk MA, Zavos HMS, Gregory AM, Eley TC. The Phenotypic and Genetic Structure of Depression and Anxiety Disorder Symptoms in Childhood, Adolescence, and Young Adulthood. *JAMA Psychiatry* 2014; 71: 905–16.

82. Eley TC, McAdams TA, Rijdsdijk FV, Lichtenstein P, Narusyte J, Reiss D, et al. The Intergenerational Transmission of Anxiety: A Children-of-Twins Study. *Am J Psychiatry* 2015; 172: 630–7.

83. Fuchs E, Flüggé G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8: 323–33.

84. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*. 2001; 125: 141–9

85. Padurariu M, Antioch Y, Balmus Y, Ciobica A, El-Lethey HS, Kamel MM. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *Int J Vet Sci Med* 2017; 5: 98–104.

86. Lefter R, Cojocar D, Ciobica A, Paulet IM, Serban IL, Anton E. Aspects of animal models for the major neuropsychiatric disorders. *Arch Biol Sci Belgr* 2014; 66: 1105–15.

87. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2010; 13: 1161–9.
88. Fernando AB, Robbins TW. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 2011; 7: 39–61.
89. Ciobica A, Hritcu L, Padurariu M, Dobrin R, Bild V. Effects of serotonin depletion on behavior and neuronal oxidative stress status in rat: relevance for anxiety and affective disorders. *Adv Med Sci* 2010; 55: 289–96.
90. Jesuthasan S. Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev Neurobiol* 2012; 72: 395–403.
91. Vicens-Costa E, Martínez-Membrives E, López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Cañete T, Blázquez G, et al. Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: a dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. *Physiol Behav* 2011; 103: 148–56.
92. Díaz-Morán S, Palència M, Mont-Cardona C, Cañete T, Blázquez G, Martínez-Membrives E, et al. Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. *Behav Brain Res* 2012; 228: 203–10.
93. Walsh RN, Cummins RA. The open field test: a critical review. *Psychol. Bull* 1976; 83: 481–504.
94. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 1934; 18: 385–403.
95. Belzung C. Measuring exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT. *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. 1st edition. Amsterdam: Elsevier; 1999. 739–749.
96. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3–33.
97. Misslin R, Cigrang M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behav Proc* 1986; 12: 45–50.
98. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92: 180–185.
99. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 289–304.
100. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 21–30.

101. Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 297–303.
102. Kelley AE. Locomotor activity and exploration. In: Sahgal A, ed. *Behavioural Neuroscience. A Practical Approach. Vol II.* Oxford, UK: IRL Press; 1993. 1-21.
103. Bild W, Ciobica A. Angiotensin-(1–7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. *J Affect Disord* 2013; 145: 165–71.
104. World Health Organization. Geneva. *The World Health Report 2001. Mental Health: New Understanding, New Hope.* World Health Organization. 2001. (cited 2019. 07. 04.). Available from: <https://www.who.int/whr/2001/en/>.
105. Richards CS, O'Hara MW. *The Oxford Handbook of Depression and Comorbidity.* New York: Oxford University Press; 2014. 254.
106. Strakowski S, Nelson E *Major Depressive Disorder.* New York: Oxford University Press; 2015. PT27.
107. Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 383–406.
108. Kessler RC, Bromet EJ. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health* 2013; 34: 119–38.
109. Van de Velde S, Bracke P, Levecque K. Gender differences in depression in 23 European countries. Cross-national variation in the gender gap in depression. *Soc Sci Med.* 2010; 71: 305–313.
110. Fava M, Hwang I, Rush AJ, Sampson N, Walters EE, Kessler RC. The importance of irritability as a symptom of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 856-67.
111. Judd LL, Schettler PJ, Coryell W, Akiskal HS, Fiedorowicz JG (November 2013). Overt irritability/anger in unipolar major depressive episodes: past and current characteristics and implications for long-term course. *JAMA Psychiatry* 2013; 70: 1171–80.
112. Fisher JC, Powers WE, Tuerk DB, Edgerton MT. Development of a plastic surgical teaching service in a women's correctional institution. *Am J Surg* 1975; 129: 269–72.
113. American Psychiatric Association *Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth Edition, Text Revision: DSM-IV-TR ed.* Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc; 2000.

114. Voinov B1, Richie WD, Bailey RK. Depression and chronic diseases: it is time for a synergistic mental health and primary care approach. *Prim Care Companion CNS Disord* 2013; 15: pii: PCC.12r01468.

115. Lieb R, Isensee B, Hofler M, Pfister H, Wittchen HU. Parental major depression and the risk of depression and other mental disorders in offspring. A prospective-longitudinal community study. *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59(4): 365–74.

116. Mondimore FM, Zandi PP, MacKinnon DF, McInnis MG, Miller EB, Schweizer B, et al. A comparison of the familiarity of chronic depression in recurrent early-onset depression pedigrees using different definitions of chronicity. *J Affect Disord* 2007; 100: 171–7.

117. Anand A, Charney DS. Norepinephrine dysfunction in depression. *J Clin Psychiatry* 2000; 61: 16–24.

118. Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 2004; 125: 1–6.

119. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, et al. HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 2005; 8: 828–34.

120. Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11:240–9.

121. Holsboer F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 2001; 62:77-91.

122. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 1984; 226: 1342–1344.

123. Hughes' GD. *Outline of Modern Psychiatry*. 5th ed. Chicester: John Wiley & Sons. 2007.

124. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 46–56.

125. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006; 27: 24–31.

126. Edler Schiller CE. The hormone withdrawal hypothesis of postpartum depression: a translational approach [dissertation]. Iowa City (IA): University of Iowa; 2011 [cited 201 July 14]. Available from: <http://ir.uiowa.edu/etd/1261>
127. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry* 2000; 61: 7–11.
128. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 327–37.
129. Albert PR, Benkelfat C, Descarries L. The neurobiology of depression-revisiting the serotonin hypothesis. Cellular and molecular mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367: 2378-81.
130. Groves JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Molecular Psychiatry* 2007; 12: 1079–88.
131. Krishnan V, Nestler EJ. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 2011; 7: 121–147.
132. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985; 85: 367–70.
133. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140: 771–776.
134. Ferrero-Miliani L, Nielsen O, Andersen P, Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 227–35.
135. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140: 871–82.
136. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- κ B Signaling Pathway. *Kidney and Blood Pressure Res* 2016; 41: 901–10.
137. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–20.
138. Chertov O, Yang D, Howard O, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev* 2000; 177: 68–78.
139. Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reprod* 2009; 138: 903–19.
140. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651.

141. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007; 65: 140–6.
142. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999; 145: 33–43.
143. Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100: 2124–6.
144. Akiho H, Yokoyama A, Abe S, Nakazono Y, Murakami M, Otsuka Y, et al. Promising biological therapies for ulcerative colitis: A review of the literature. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2015; 6: 219–27
145. Brück W, Stadelmann C. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24: 265–7.
146. Brusselle G, Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 1: 322–8.
147. Gudkov AV, Komarova EA. p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. *CSH Perspect Med. Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: a026161.
148. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 469–78.
149. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *P Natl Acad Sci* 2000; 97: 13766–71.
150. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu rev of immunol* 2002; 20: 197–216.
151. Yamamoto M, Takeda K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterol Res Pract. Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 240365.
152. Czerkies M, Kwiatkowska K. Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol* 2014; 4: 1–23.
153. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675–80.
154. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS let* 2007; 581: 3723–33.

155. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends immunol* 2007; 28: 429–36.
156. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *BBA* 2005; 1754: 253–262.
157. Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A. The inflammatory/cancer-related IL-6/ STAT3/NF- κ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* 2016; 7: 41974–85.
158. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81: 807–69.
159. Henríquez-Olguín C, Altamirano F, Valladares D, López JR, Allen PD, Jaimovich E. Altered ROS production, NF- κ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *BBA-Mol Basis Disc* 2015; 1852: 1410–9.
160. Girard S, Kadhim H, Roy M, Lavoie K, Brochu ME, Larouche A, et al. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr neurol* 2009; 40: 168–74.
161. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4585–92.
162. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-[kappa]B signaling module. *Oncogene* 2006; 25: 6706–16.
163. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 2006; 13: 861–72.
164. Basak S, Kim H, Kearns JD, Tergaonkar V, O’Dea E, Werner SL, et al. A fourth I κ B protein within the NF- κ B signaling module. *Cell* 2007; 128: 369–81.
165. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Gene Dev* 2012; 26: 203–34.
166. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002; 12: 9–18.
167. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153–183.
168. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *BBA-Mol Basis* 2010; 1802: 396–405.
169. Sabio G, Davis RJ. TNF, MAP kinase signalling pathways. *Semin in Immunol.* 2014; 26: 237–45.

170. Ringeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1247–55.
171. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 2015; 66: 311–28.
172. Walker JG, Smith MD. The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 1650–53.
173. Ivashkiv LB, Hu X. The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective? *Arthritis Rheumatol* 2003; 48: 2092–6.
174. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Therapeut* 2008; 120: 172–85.
175. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011; 12: 695–708.
176. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 108: 2317–22.
177. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000; 55: 114–20.
178. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 1212–8.
179. Ross AC. Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1119–27.
180. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *New Engl J Med* 2004; 351: 2599–610.
181. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2005; 19: 149–54.
182. Carrero JJ, Yilmaz MI, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokine Dysregulation in Chronic Kidney Disease: How Can We Treat It? *Blood Purificat* 2008; 26: 291–9.

183. Machowska A, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. Therapeutics targeting persistent inflammation in chronic kidney disease. *Translat Res J La Clin Med* 2016; 167: 204–13.

184. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psych* 2009; 70: 1078–90.

185. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psych* 2009; 65: 732–41.

186. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease*. *New Engl J Med* 2000; 343:1139–47.

187. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003; 107: 87–92.

188. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, et al. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol Cjasn* 2012; 7: 1938–46

189. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA-Mol Cell Res* 2014; 1843: 2563–82.

190. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenter* 2014; 20: 2515–32.

191. Liu Z, Wang Y, Wang Y, Ning Q, Zhang Y, Gong C, et al. Dexmedetomidine attenuate inflammatory reaction in the lung tissues of septic mice by activating cholinergic anti-inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol* 2016; 35: 210–16.

192. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-Jahn S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:1218–27

193. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. "Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia". *J Infect Dis* 1997; 176: 439–44.

194. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes* 2005; 54: 114–24.

195. Dubiński A, Zdrojewicz Z. The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 291–4.
196. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 339–43.
197. Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 33–40.
198. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 277–81.
199. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. "Interleukin 6 type cytokine signalling through the gp130(Jak/STAT pathway". *Biochem J* 1998; 334: 297–314.
200. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487—501.
201. Mire-Sluis AR, Thorpe R. *Cytokines (Handbook of Immunopharmacology)*. Boston: Academic Press; 1998.
202. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF". *Cell* 1988; 53: 45–53.
203. Tang P, Hung MC, Klostergaard J „Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer". *Biochemistry* 1996; 35: 8216–25.
204. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45–65.
205. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634–5.
206. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1403–8.
207. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185: 23–7.
208. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 2004; 168: 28–40.
209. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS, COX- 2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer* 2007; 121: 2357–63.

210. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog neuro-psychoph* 2014; 48: 102–11.
211. Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 2010; 51: 119–26.
212. Schierbeck H, Lundbäck P, Palmblad K, Klevenvall L, Erlandssonharris H, Andersson U, et al. Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol Med* 2011; 17: 1039–44.
213. Cheng Y, Wang D, Wang B, Li H, Xiong J, Xu S, et al. HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke–induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2017; 28: 201–9.
214. Asavarut P, Zhao H, Gu J, Ma D. The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury. *Acta Anaesthesiol Taiwanica* 2013; 51: 28–33.
215. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1009–17.
216. Van LS, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 258–69.
217. Robb CT, Regan KH, Dorward DA, Rossi AG. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin Immunopathol* 2016; 38: 425–48.
218. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173–82.
219. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 281–6.
220. Huang C, Šali A, Stevens RL. Regulation and Function of Mast Cell Proteases in Inflammation. *J Clin Immunol* 1998; 18: 169–83.
221. DiSabato D, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J Neurochem* 2016; 139: 136–53.
222. Nelson PT, Soma LA, Lavi E. Microglia in diseases of the central nervous system. *Annals Med* 2002; 34: 491–500.
223. Vezzani A, Granata T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia* 2005; 46: 1724–43.
224. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neuro* 2007; 8: 57–69.

225. Koltsakis GC, Stamatelos AM. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neuro* 2001; 2: 734–44.
226. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobio* 2001; 63: 125–49.
227. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330:841–5.
228. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 117: 145–52.
229. Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 2011; 31: 16064–9.
230. Zhou H, Lapointe BM, Clark SR, Zbytnuik L, Kubes P. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2006; 177: 8103–10.
231. Russo MV, McGavern DB. Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol* 2015; 36: 637–50.
232. Norden DM, Godbout JP. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39: 19–34.
233. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 2016; 64: 300–16.
234. Dunn AJ, Swiergiel AH, Zhang H, Quan N. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 96–104.
235. Salter MW, Beggs S. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell* 2014; 158: 15–24.
235. Schafer DP, Stevens B. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23: 1034–40.
236. Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnes KM, Carihfield A, Lynch KR, et al. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med* 2010; 207: 1067–80.
237. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 173–85.

238. Michael BD, Griffiths MJ, Granerod J, Brown D, Keir G, Wnęk M, et al. The interleukin-1 balance is associated with clinical severity, blood-brain barrier permeability, neuroimaging changes and outcome in encephalitis. *J Infect Dis* 2015; 213:1651-60.
239. Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant* 2008; 17: 363–72.
240. Goldman D, Song X, Kitai R, Casadevall A, Zhao ML, Lee SC. Cryptococcus neoformans induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide. *Infect Immun* 2001; 69: 1808–15.
241. Liesz A, Zhou W, Mracsko E, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, et al. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* 2011; 134: 704–20.
242. Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, et al. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 2002; 8: 620–4.
243. Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 947–56.
244. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009; 10: 514–23.
245. Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 1998; 161: 6480–6.
246. Lovas G, Szilagyí N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 2000; 123: 308–17.
247. Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2009; 19 :392–8.
248. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 2002; 416: 507–11.

249. Imeri L, Opp MR. How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 199–210.
250. Tarr AJ, Liu X, Reed NS, Quan N. Kinetic characteristics of euflammation: the induction of controlled inflammation without overt sickness behavior. *Brain Behav Immun* 2014; 42: 96–108.
251. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, A major Cytokine in the Central Nervous system. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 1254–66.
252. Olmos G and Lladó J. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:861231.
253. Vogelzangs N, de Jonge P, Smit JH, Bahn S and Penninx BW. Cytokine production capacity in depression and anxiety. *Transl Psychiatry* 2016; 6: e825.
254. Catorce MN and Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol* 2016; 14: 155–64.
255. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007; 55: 453–62.
256. Erickson MA, Banks WA. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 1637–48.
257. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 271359.
258. Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, et al. Inflammation induced by infection potentiates pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol* 2011; 178: 2811–22.
259. Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, et al. Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflamm* 2012; 9: 197.
260. Okuyama S, Makihata N, Yoshimura M, Amakura Y, Yoshida T, Nakajima M, et al. Oenothien B suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in mouse brain. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 9767–78.
261. Jin M, Jang E, Suk K. Lipocalin-2 acts as a neuroinflammatogen in lipopolysaccharide-injected mice. *Exp Neurobiol* 2014; 23: 155–62.

262. Elmquist JK, Scammell TE, Saper CB. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* 1997; 20: 565–70.

263. Vallieres L, Rivest S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and proinflammatory cytokine interleukin-1 β . *J Neurochem* 1997; 69: 1668–83.

264. Lacroix S, Rivest S. Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* 1998; 70: 452–66.

265. Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1994; 27: 157–62.

266. Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Inflammatory processes induce betaamyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 3032–35.

267. Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F. Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 31: 122–30.

268. Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 1997; 48: 287–98.

269. Ban E, Haour F, Lenstra R. Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration. *Cytokine* 1992; 4: 48–54.

270. Takao T, Culp SG, De Souza EB. Reciprocal modulation of interleukin-1 beta (IL-1 β) and IL-1 receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the mouse brainendocrine-immune axis. *Endocrinology* 1993; 132: 1497–504.

271. Kishikawa H, Lawrence DA. Differential production of interleukin-6 in the brain and spleen of mice treated with lipopolysaccharide in the presence and absence of lead. *J Toxicol Environ. Health* 1998; 53: 357–73.

272. Brochu S, Olivier M, Rivest S. Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines, IkappaBalpha, and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei brucei*. *J Neurosci Res* 1999; 57: 801–16.

273. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent on hematogenous TLR4. *J Neurosci* 2012; 32: 11706–15.

274. Yang TY, Jang EY, Ryu Y, Lee GW, Lee EB, Chang S, et al. Effect of acupuncture on Lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavioral changes: involvement of serotonin system in dorsal Raphe nucleus. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17: 528.

275. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK et al. A metaanalysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 446–57.

276. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med* 2009; 71: 171–86.

277. Knorr U, Vinberg M, Kessing LV, Wetterslev J. Salivary cortisol in depressed patients versus control persons: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35: 1275–86.

278. Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol* 2002; 21: 531–41.

279. Capuron L, Miller AH. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 819–24.

280. Lamers F, van Oppen P, Comijs HC, Smit JH, Spinhoven P, van Balkom AJ et al. Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J Clin Psychiatry* 2011; 72: 341–8.

281. Liukkonen T, Rasanen P, Jokelainen J, Leinonen M, Jarvelin MR, Meyer-Rochow VB et al. The association between anxiety and C-reactive protein (CRP) levels: results from the Northern Finland 1966 birth cohort study. *Eur Psychiatry* 2011; 26: 363–9.

282. Vogelzangs N, Beekman AT, de Jonge P, Penninx BW. Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort. *Transl Psychiatry* 2013; 3: e249.

283. Duijvis HE, Vogelzangs N, Kupper N, de Jonge P, Penninx BW. Differential association of somatic and cognitive symptoms of depression and anxiety with inflammation: findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38: 1573–85.

284. Lamers F, Vogelzangs N, Merikangas KR, de Jonge P, Beekman AT, Penninx BW. Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 692–9.

285. Hamer M, Batty GD, Marmot MG, Singh-Manoux A, Kivimaki M. Anti-depressant medication use and C-reactive protein: results from two population-based studies. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 168–73.
286. Vogelzangs N, Duivis HE, Beekman AT, Kluft C, Neuteboom J, Hoogendijk W et al. Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. *Transl Psychiatry* 2012; 2: e79.
287. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 237–64.
288. Gabills HJ. Animal lectins. *Eur J Biochem* 1997; 243: 543–76.
289. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20807–10.
290. 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.
291. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, et al. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin 1988; *Biochemistry* 27: 692–9.
292. Frigeri LG, Liu FT. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 861–7.
293. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2004; 19: 441–9.
294. Cooper DN, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* 1991; 115: 1437–48.
295. Watt DJ, Jones GE, Goldring K. The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration. *Glycoconj J* 2004; 19: 615–9.
296. Georgiadis V, Stewart HJ, Pollard HJ, Tavsanoğlu Y, Prasad R, Horwood J, et al. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236: 1014–24.
297. Fowles D, Colnot C, Ripoché MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn* 1995; 203: 241–51.
298. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 274–84.
299. GR, Vasta. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 424–38.

300. Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol* 2002; 71:741–52
301. van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* 2010; 20: 2–12
302. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9: 979–84.
303. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 232–54.
304. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, et al. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem* 2008; 283: 10109–23.
305. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 29–41.
306. 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: 13047–52.
307. Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269: 4424–30.
308. 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.
309. Fang R, Mantle M, Ceri H. Characterization of quail intestinal mucin as a ligand for endogenous quail lectin. *Biochem J* 1993; 293: 867–72.
310. Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Nakamura T. Characterization of the *Xenopus* galectin family. Three structurally different types as in mammals and regulated expression during embryogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 12285–93.
311. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 433–40.
312. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e17.
313. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128: 1221–8.

314. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 338–52.
315. 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: 15819–27.
316. Shi Y, He B, Kuchenbecker KM, You L, Xu Z, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2007; 121:1175–81.
317. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 263–73.
318. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313–20.
319. Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 209–31.
320. Roff CF, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; 258: 10657–63.
321. Da Y, Leffler H, Sakakura Y, Kasai K, Barondes SH. Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. *Gene* 1991; 99: 279–83.
322. Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J. Exp. Med* 1989; 170: 1959–72.
323. Raz A, Pazerini G, Carmi P. Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin a a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res* 1989; 49: 3489–93.
324. Raz A, Carmi P, Raz T, Hogan V, Mohamed A, Wolman SR. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. *Cancer Res* 1991; 51: 2173–8.
325. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262: 7383–90.
326. Leffler H, Masiarz FR, Barondes SH. Soluble lactose-binding vertebrate lectins: A growing family. *Biochemistry* 1989; 28: 9222–9.

327. Robertson MW, Albrandt K, Keller D, Liu FT. Human IgE-binding protein: A soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry* 1990; 29: 8093–100.
328. Albrandt K, Orida NK, Liu FT. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6859–63.
329. Cerra RF, Gitt MA, Barondes SH. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *J Biol Chem* 1985; 260: 10474–77.
330. Lotan R, Carralero D, Lotan D, Raz A. Biochemical and immunological characterization of K-1735P melanoma galactoside-binding lectins and their modulation by differentiation inducers. *Cancer Res* 1989; 49: 1261–8.
331. Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major nonintegrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* 1990; 265: 7097–9.
332. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673: 75–93.
333. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83: 667–76.
334. 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: 1679–700.
335. Dumić J, Dabelić S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616–35.
336. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 172–85.
337. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 1194–8.
338. Van den Brûle F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: A critical review. *Glycoconj J* 2004; 19: 537–42.
339. Song L, Tang JW, Owusu L, Sun MZ, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta* 2014; 431: 185–91.
340. Roff CF, Rosevear PR, Wang JL, Barker R. Identification of carbohydrate-binding proteins from mouse and human fibroblasts. *Biochem J* 1983; 211: 625–9.

341. 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: 6009–11.
342. Wang JL, Laing JG, Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* 1991; 3: 243–52.
343. Hughes RC. Mac-2: A versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology* 1994; 4: 5–12.
344. Birdsall B, Feeney J, Burdett IDJ, Bawumia S, Barboni EAM, Hughes RC. NMR solution studies of hamster Gal-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: Evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry* 2001; 40: 4859–66.
345. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19: 575-81.
346. 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 the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 2000; 10: 1201–8.
347. van den Brule FA, Liu FT, Castronovo V. Transglutaminase-mediated oligomerization of galectin-3 modulates human melanoma cell interactions with laminin. *Cell Adhesion Commun* 1998; 5: 425–35.
348. Ahmad N, Gabius HJ, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 10841–7.
349. Massa SM1, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* 1993; 32: 260–7.
350. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; 409: 733–9.
351. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14496–501.
352. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 6239–45.

353. Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci* 1997; 110: 1169–78.

354. 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: 569–76.

355. Yoshii T, Fukumory 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: 6852–7.

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

357. Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, Oberg CT, et al. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *J Biol Chem* 2010; 285: 35079–91.

358. Saraboji K, Hakansson M, Genheden S, Diehl C, Qvist J, Weininger U, et al. The carbohydrate-binding site in galectin-3 is preorganized to recognize a sugarlike framework of oxygens: ultra-high-resolution structures and water dynamics. *Biochemistry* 2012; 51: 296–306.

359. Gauto DF, Di Lella S, Guardia CM, Estrin DA, Martí MA. Carbohydrate-binding proteins: Dissecting ligand structures through solvent environment occupancy. *J Phys Chem B* 2009; 113: 8717–24.

360. Ahmad M, Gu W, Geyer T, Helms V. Adhesive water networks facilitate binding of protein interfaces. *Nat Commun* 2011; 2: 261.

361. Zhou Y, H Zhou Karplus M. Cooperativity in Scapharca dimeric hemoglobin: simulation of binding intermediates and elucidation of the role of interfacial water. *J Mol Biol* 2003; 326: 593–606.

362. 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.

363. Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349: 7–20.

364. Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6452–6.

365. Agrwal N, Wang JL, Voss PG. Carbohydrate-binding protein 35. Levels of transcription and mRNA accumulation in quiescent and proliferating cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 17236–42.

366. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 731–8.

367. Dabelic S, Supraha S, Dumic J. Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 701–9.

368. Saada A, Reichert F, Rotshenker S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol* 1996; 133: 159–67.

369. Dumic J, Lauc G, Flogel M. Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10: 149–58.

370. Kim K, Mayer EP, Nachtigal M. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1641: 13–23.

371. Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoché MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of Gal-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* 2002; 12: 329–37.

372. Hsu DK, Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 507–15.

373. Califice S, Castronovo V, Van Den Brûle F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 983–92.

374. Moutsatsos IK, Davis JM, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: Subcellular localization of carbohydrate binding protein 35 in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 1986; 102: 477–83.

375. Cowles EA, Moutsatsos IK, Wang JL, Anderson RL. Expression of carbohydrate binding protein 35 in human fibroblasts: Comparisons between cells with different proliferative capacities. *Exp. Gerontol* 1989; 24: 577–85.

376. Hubert M, Wang SY, Wang JL, Seve AP, Hubert J. Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3. *Exp Cell Res* 1995; 220: 397–406.

377. 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.
378. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 2003; 270: 2109–19.
379. Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport TA. A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 86–8.
380. Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1031–6.
381. Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge S, Magee AI. Palmitoylation of multiple src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 1994; 303: 749–53
382. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19: 527–35.
383. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156: 3939–44.
384. Nieminen J, St Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1127–35.
385. 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: 1813–22.
386. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, poly-lactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem* 1992; 267: 6983–90.
387. Talaga ML, Fan N, Fueri AL, Brown RK, Bandyopadhyay P, Dam TK. Multitasking Human Lectin Galectin-3 Interacts with Sulfated Glycosaminoglycans and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Biochemistry* 2016; 55: 4541–51.
388. Rosenberg I, Cherayil BJ, Isselbacher KJ, Pillai S. Mac-2-binding glycoproteins. Putative ligands for a cytosolic-galactoside lectin. *J Biol Chem* 1991; 266: 18731–6.
389. Koths K, Taylor E, Halenbeck R, Casipit C, Wang A. Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 1993; 268: 14245–9.
390. Probstmeier R, Montag D, Schachner M. Gal-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *J Neurochem* 1995; 64: 2465–72.

391. Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al Awqati Q. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol* 2000; 151: 1235–46.

392. Ochieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem* 1999; 75: 505–14.

393. Andre S, Kojima S, Yamazaki N, Fink C, Kaltner H, Kayser K, Gabius HJ. Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 461–74.

394. Dong S, Hughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J* 1997; 14: 267–74.

395. Ochieng J, Warfield P. Gal-3 binding potentials of mouse tumor RHS and human placental laminins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 402–6.

396. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by Gal-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998; 246: 788–91.

397. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 3580–90.

398. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 2004; 306: 120–4.

399. Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer* 2000; 85: 545–54.

400. Goletz S, Hanisch FG, Karsten U. Novel alpha GalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized in vitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains. *J Cell Sci* 1997; 110: 1585–96.

401. Sève AP, Felin M, Doyennette-Moyne MA, Sahraoui T, Aubery M, Hubert J. Evidence for a lactose-mediated association between two nuclear carbohydrate-binding proteins. *Glycobiology* 1993; 3: 23–30.

402. Menon RP, Strom M, Hughes RC. Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with Gal-3 in a carbohydrate independent manner. *FEBS Lett* 2000; 470: 227–31.
403. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and Gal-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res* 2001; 27: 3595–602.
404. Yang RY, , Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6737–42.
405. Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, et al. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res* 2004; 64: 3376–9.
406. Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *Biochem J* 2004; 380: 31–41.
407. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, et al. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 7546–53.
408. Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 34922–30.
409. 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: 6363–7.
410. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 2005; 65: 3535–7.
411. Surendran K, McCaul SP, Simon TC. A role for Wnt-4 in renal fibrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 2002; 282: 431–41.
412. Missotten M, Nichols A, Rieger K, Sadoul R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ* 1999; 6: 124–9.
413. Van den Brûle FA, Fernandez PL, Buicu C, Liu FT, Jackers P, Lambotte R, et al. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. *Dev Dyn* 1997; 209: 399–405.

414. Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A, et al. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J Exp Med* 1993; 177: 243–8.
415. Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3230–5.
416. Craig SS, Krishnaswamy P, Irani AM, Kepley CL, Liu FT, Schwartz LB. Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. *Anat Rec* 1995; 242: 211–9.
417. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T. Human keratinocytes release the endogenous betagalactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 1993; 178: 777–85.
418. Smetana K, Holíková Z, Klubal R, Bovin NV, Dvoránková B, Bartunková J, et al. Coexpression of binding sites for A(B) histo-blood group trisaccharides with galectin-3 and Lag antigen in human Langerhans cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 644–9.
419. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* 2003; 112: 389–97.
420. 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: 4718–26.
421. Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Miyazaki A, Horiuchi S. The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1183–8.
422. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Scipioni A, Sansoni V, Cordone S, et al. Accelerated lipid-induced atherogenesis in galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 831–6.
423. 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: 1910–20.
424. Nishi Y1, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, et al. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int* 2007; 56: 57–65.
425. Konigshoff M, Rojas M. Galectin-3: the bridge over troubled waters. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 473–5.

426 Jiang JX, Chen X, Hsu DK, Baghy K, Serizawa N, Scott Fet al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: 439–46.

427. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 288–98.

428. Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010; 99: 323–8.

429. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *J Dermatol Sci* 2003; 31: 119–28.

430. Cortegano I, del Pozo V, Cárdbaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 1998; 161: 385–389.

431. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga E., Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2004; 172: 493–502.

432. Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol* 2002; 168: 4034–41.

433. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 1995; 154: 3479–87.

434. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. Modulation of functional properties of galectin-3 by monoclonal antibodies binding to the non-lectin domains. *Biochemistry* 1996; 35: 6073–9.

435. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 2156–64.

436. Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* 1993; 32: 7644–9.

437. Tribulatti MV, Figini MG, Carabelli J, Cattaneo V, Campetella O. Redundant and antagonistic functions of –9.

438. Tribulatti MV, Cattaneo V, Hellman U, Mucci J, Campetella O. Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 371–80.
439. Chen IJ, Chen HL, Demetriou M. Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 35361–72.
440. Swarte VV, Mebius RE, Joziase DH, Van den Eijnden DH, Kraal G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998. 28: 2864–71.
441. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8: 825–34.
442. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumorreactive T cells. *Cancer Res* 2008; 68: 7228–36.
443. Demotte N, Wieërs G, Van Der Smissen P, Moser M, Schmidt C, Thielemans K, et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res* 2010; 70: 7476–88.
444. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol* 1996; 156: 1572–7.
445. Li Y1, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181: 2781–9.
446. Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, Roque-Barreira MC, et al. LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PLoS One* 2011; 6: e26004.
447. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 239–76.
448. Mandrell RE, Apicella MA, Lindstedt R, Leffler H. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol* 1994; 236: 231–54.
449. Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, et al. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB Journal* 2004; 18: 1773–5.

450. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Djukic ALj, Arsenijevic NN, et al. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte* 2013; 2: 266–71.

451. Radosavljevic GD, Pantic J, Jovanovic I, Lukic ML, Arsenijevic N. The two faces of galectin-3: roles in various pathological conditions. *SJECR* 2016; 17: 187–98.

452. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013; 62: 1932–44.

453. Volarevic V, Milovanovic M, Ljujic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012; 55: 1954–64.

454. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PSC, et al. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep* 2016; 6: 23348.

455. Zhong X, Qian X, Chen G, Song X. The role of galectin-3 in heart failure and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019; 46: 197–203.

456. del Pozo V, Rojo M, Rubio ML, Cortegano I, Cárđaba B, Gallardo S, et al. Gene therapy with galectin-3 inhibits bronchial obstruction and inflammation in antigen-challenged rats through interleukin-5 gene downregulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 732–7.

457. López E, del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, et al. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol* 2006; 176: 1943–50.

458. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol* 2004; 165: 2045–53.

459. 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: 247–55.

460. Glinsky VV, Raz A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydr Res* 2009; 344: 1788–91.

461. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int* 2007; 31: 655–62.
462. Pesheva P, Kuklinski S, Biersack HJ, Probstmeier R. Nerve growth factor-mediated expression of galectin-3 in mouse dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 2000; 293: 37–40.
463. Pesheva P, Urschel S, Frei K, Probstmeier R. Murine microglial cells express functionally active galectin-3 in vitro. *J Neurosci Res* 1998; 51: 49–57.
464. Pasquini LA, Millet V, Hoyos HC, Giannoni JP, Croci DO, Marder M, et al. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1746–56.
465. Comte I, Kim Y, Young CC, van der Harg JM, Hockberger P, Bolam PJ, et al. Galectin-3 maintains cell motility from the subventricular zone to the olfactory bulb. *J Cell Sci* 2011; 124: 2438–47.
466. Chen YC, Ma YL, Lin CH, Cheng SJ, Hsu WL, Lee EH. Galectin-3 Negatively Regulates Hippocampus-Dependent Memory Formation through Inhibition of Integrin Signaling and Galectin-3 Phosphorylation. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 217.
467. Pesheva P, Kuklinski S, Schmitz B, Probstmeier R. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *J Neurosci Res* 1998; 54: 639–54.
468. Bonasera SJ, Arikath J, Boska MD, Chaudoin TR, DeKorver NW, Goulding EH, et al. Agerelated changes in cerebellar and hypothalamic function accompany non-microglial immune gene expression, altered synapse organization, and excitatory amino acid neurotransmission deficits. *Aging (Albany NY)* 2016; 8: 2153.
469. Rotshenker S. The Role of Galectin-3/MAC-2 in the Activation of the Innate-Immune Function of Phagocytosis in Microglia in Injury and Disease. *J Mol Neurosci* 2009; 39: 99–103.
470. Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, et al. Microglia-secreted galectin-3 acts as a Toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell Rep* 2015; 10: 1626–38.
471. Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 2010; 185: 7037–46.
472. Reichert F, Rotshenker S. Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Exp Neurol* 1999; 160: 508–14.

473. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. The roles of galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52: 100–10.
474. Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 2006; 26: 328–32.
475. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 617–27.
476. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 182: 1167–73.
477. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev* 2009; 230: 114–27.
478. Doverhag C, Hedtjarn M, Poirier F, Mallard C, Hagberg H, Karlsson A, et al. Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis* 2010; 38: 36–46.
479. Satoh K, Niwa M, Goda W, Binh NH, Nakashima M, Takamatsu M, et al. Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res* 2011; 1382: 266–74.
480. Lalancette-Hébert M, Swarup V, Beaulieu JM, Bohacek I, Abdelhamid E, Weng YC, et al. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 2012; 32: 10383–95.
481. Kang WS, Choi JS, Shin YJ, Kim HY, Cha JH, Lee JY, et al. Differential regulation of osteopontin receptors, CD44 and the alpha(v) and beta(3) integrin subunits, in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2008; 1228: 208–16.
482. Choi JS, Shin YJ, Lee JY, Choi JY, Cha JH, Chun MH, et al. Enhanced expression of SOCS-2 in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Neurotrauma* 2009; 26: 2097–106.
483. Park JM, Shin YJ, Kim HL, Cho JM, Lee MY. Sustained expression of osteopontin is closely associated with calcium deposits in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Histochem Cytochem* 2012; 60: 550–9.
484. Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, Dempsey RJ. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain Res* 2009; 1288: 116–24.

485. Hisamatsu K, Niwa M, Kobayashi K, Miyazaki T, Hirata A, Hatano Y, et al. Galectin-3 expression in hippocampal CA2 following transient forebrain ischemia and its inhibition by hypothermia or antiapoptotic agents. *NeuroReport* 2016; 27: 311–17.

486. McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee VM, et al. The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 251–67

487. Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, et al. Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res* 2004; 1028: 238–42.

488. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2009; 108: 1343–59.

489. Yip PK, Carrillo-Jimenez A, King P, Vilalta A, Nomura K, Chau CC, et al. Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration. *Sci Rep* 2017; 7: 41689.

490. Venkatesan C, Chrzaszcz M, Choi N, Wainwright MS. Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury. *J Neuroinflamm* 2010; 7:32.

491. Pajooesh-Ganji A, Knobloch SM, Faden AI, Byrnes KR. Characterization of inflammatory gene expression and galectin-3 function after spinal cord injury in mice. *Brain Res* 2012; 1475: 96–105.

492. Chen HL, Liao F, Lin TN, Liu FT. Galectins and neuroinflammation. *Adv Neurobiol* 2014; 9: 517–42.

493. Hoyos HC, Rinaldi M, Mendez-Huergoc SP, Mardera M, Rabinovich GA. Galectin-3 controls the response of microglial cells to limit cuprizone-induced demyelination *Neurobiology of Disease*. 2014; 62: 441–55.

494. Mietto BS, Jurgensen S, Alves L, Pecli C, Narciso MS, Assunção-Miranda I, et al. Lack of galectin-3 speeds Wallerian degeneration by altering TLR and pro-inflammatory cytokine expressions in injured sciatic nerve. *J Neurosci* 2013; 37: 1682–90.

495. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumic J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 804–18.

496. Kobayashi K, Niwa M, Hoshi M, Saito K, Hisamatsu K, Hatano Y, et al. Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation. *Neurosci Lett* 2015; 592: 107–12
497. Jin JK, Na YJ, Song JH, Joo HG, Kim S, Kim JI, et al. Galectin-3 expression is correlated with abnormal prion protein accumulation in murine scrapie. *Neurosci Lett* 2007; 420: 138–43.
498. Mok SW, Riemer C, Madela K, Hsu DK, Liu FT, Gültner S, et al. Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 359: 672–8.
499. Boza-Serrano A, Reyes JF, Rey NL, Leffler H, Bousset L, Nilsson U, et al. The role of Galectin-3 in α -synuclein-induced microglial activation. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 156.
500. Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu FT, et al. Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and Behavior* 2012; 2: 563–75.
501. Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, et al. Galectin-3 is a candidate biomarker for ALS: discovery by a proteomics approach. *J. Proteome Res* 2010; 9: 5133–41.
502. Surendranathan A, Rowe JB, O'Brien JT. Neuroinflammation in Lewy body dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2015; 21: 1398–406.
503. Garden GA, Campbell BM. Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia* 2016; 64: 1755–71.
504. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflamm* 2014; 11: 98.
505. Franco PG, Pasquini LA, Pérez MJ, Rosato-Siri MV, Silvestroff L, Pasquini JM. Paving the way for adequate myelination: the contribution of galectin-3, transferrin and iron. *FEBS Lett* 2015; 589: 3388–95.
506. Rinaldi M, Thomas L, Pasquini LA. Galectin-1 in myelin repair. *Oncotarget* 2016; 7: 81979–80.
507. Wuolikainen A, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. Disease-related changes in the cerebrospinal fluid metabolome in amyotrophic lateral sclerosis detected by GC/TOFMS. *PLoS One* 2011; 6: e17947.

508. Sävmán K, Heyes MP, Svedin P, Karlsson A. Microglia/macrophage-derived inflammatory mediators galectin-3 and quinolinic acid are elevated in cerebrospinal fluid from newborn infants after birth asphyxia. *Transl Stroke Res* 2013; 4: 228–35.
509. Wang X, Zhang S, Lin F, Chu W, Yue S. Elevated galectin-3 levels in the serum of patients with Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2015; 30: 729–32.
510. Ashraf GM, Baeesa SS. Investigation of Gal-3 Expression Pattern in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients Suffering From Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 2018; 12: 430.
511. Hartmann M, Heumann R and Lessmann V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBOJ* 2001; 20: 5887–97.
512. Autry AE, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 238–58.
513. MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT et al. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci* 2001; 115: 1145–53.
514. Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1089–93.
515. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* 2010; 207: 1981–93.
516. Chaudoin TR, Bonasera SJ. Mice lacking galectin-3 (Lgals3) function have decreased home cage movement. *BMC Neurosci* 2018; 19: 27.
517. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14: 32.
518. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
519. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156: 1073–83.
520. Neupane S, Srivastav S, Bhurtel S, Katila N, Shadfar S, Park PH, et al. Enhanced neuroinflammatory responses after systemic LPS injection in IL-32 β transgenic mice. *J Chem Neuroanat* 2018; 94: 173–82.
521. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuro Endocrinol Lett* 2014; 35: 703–10.

522. Bento-Silva MT, Martins MCC, Torres-Leal FL, Barros TL, Carvalho ILNF, Filho HAC, et al. Effects of administering testosterone undecanoate in rats subjected to physical exercise: effects on the estrous cycle, motor behavior and morphology of the liver and kidney. *Braz J Pharm Sci* 2010; 46: 79–89.

523. Heiderstadt KM, McLaughlin RM, Wright DC, Walker SE, Gomez Sanchez CE. The effect of chronic food and water restriction on open-field behavior and serum corticosterone levels in rats. *Lab Anim* 2000; 34: 20–8.

524. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21: 205–35.

525. Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett* 2004; 369: 156–61.

526. Selakovic D, Joksimovic J, Obradovic D, Milovanovic D, Djuric M, Rosic G. The adverse effects of exercise and supraphysiological dose of testosterone-*enanthate* (TE) on exploratory activity in elevated plus maze (EPM) test - indications for using total exploratory activity (TEA) as a new parameter for ex. *Neuro Endocrinol Lett* 2016; 37: 383–8.

527. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149–67.

528. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24: 525–9.

529. Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol* 1986; 17: 348-50.

530. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016.

531. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25: 402–8.

532. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015; 96: e52434.

533. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322–8.

534. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol Behav* 2014; 135: 55–71.

535. Melin EO, Dereke J, Txunander M, Xillman M. Depression in type 1 diabetes was associated with high levels of circulating galectin-3. *Endocr Connect* 2018; 7: 819-828.

536. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M. Et al. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages *J Crohns Colitis* 2016; 10: 593–606.

537. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45: 531–43.

538. Shin T. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochem* 2013; 115: 407–11.

539. Femenia T, Qian Y, Arentsen T, Forssberg H, Diaz Hejtz R. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain Behav. Immun* 2018; 69: 273–282.

540. Chowdhury AA, Gawali NB, Shinde P, Munshi R, Juvekar AR. Imperatorin ameliorates lipopolysaccharide induced memory deficit by mitigating proinflammatory cytokines, oxidative stress and modulating brain-derived neurotrophic factor. *Cytokine* 2018; 110: 78–86.

541. Balkowiec-Iskra E, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor- α increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience* 2011; 180: 322–33.

542. Ren Z, Sahir N, Murakami S, Luellen BA, Earnheart JC, Lal R, et al. Defects in dendrite and spine maturation and synaptogenesis associated with an anxious-depressive-like phenotype of GABAA receptor-deficient mice. *Neuropharmacology* 2015; 88: 171–9.

543. Yang L, Wang M, Guo YY, Sun T, Li YJ, Yang Q, Zhang et al. Systemic inflammation induces anxiety disorder through CXCL12/CXCR4 pathway. *Brain Behav Immun* 2016; 56: 352–62.

544. Prakash A, Kumar A. Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of β -amyloid animal model of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 2014; 25: 335–47.

545. Verbickas V, Kamandulis S, Snieckus A, Venckunas T, Baranauskiene N, Brazaitis M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 response to high-volume mechanically demanding exercise. *Muscle Nerve* 2018; 57: E46–E51.

546. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2004; 27: 589–94.

547. Pillai A. Brain-derived neurotropic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals* 2008; 16: 183–93.

548. Xenos D, Kamceva M, Tomasi S, Cardin JA, Schwartz ML, Vaccarino FM. Loss of TrkB Signaling in Parvalbumin-Expressing Basket Cells Results in Network Activity Disruption and Abnormal Behavior. *Cereb Cortex* 2017; 18: 1–15.

СКРАЋЕНИЦЕ

DSM-5 – Дијагностичком и статистичком приручнику за менталне поремећаје, пето издање (енгл. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition*)

DG – дентатни гирус (лат. *gyrus dentatus*)

CA – амонов рог (лат. *cornu ammonis*),

GABA – габааминобутерна киселина (енгл. *gamma-amino butyric acid*)

CRF – кортикотропин-ослобађајући фактор (енгл. *corticotropin releasing factor*)

PACAP – хипофизни аденилат циклаза-активирајући полипептид (енгл. *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*)

BDNF – неуротрофни фактор раста пореклом из мозга (енгл. *brain derived neurotrophic factor*)

GABRA2, GABA-AR2S – GABA-A α -2 рецепторска субјединица (енгл. *GABA receptor subunit alpha-2*)

Val – валин (енгл. *valine*)

Met – метионин (енгл. *methionine*)

NTRK2 – неуротрофни рецептор тирозин киназе 2 (енгл. *neurotrophic receptor tyrosine kinase 2*)

OF тест – тест отвореног поља (ОП) (енгл. *open field test*)

Тест уздигнутог крстастог лавиринта

ЕРМ – тест уздигнути крстасти лавиринт (УКЛ) (енгл. *elevated plus maze*)

CRHR1 – кортикотропин-ослобађајући хормонски рецептор 1 (енгл. *corticotropin-releasing hormone receptor 1*)

МНРГ-а – 3-метокси, 4-хидроксил-етиленгликол (енгл. *3-metoksi, 4-hidroksi-fenil-etilenglikol*)

CNS – централни нервни систем (енгл. *central nervous system*)

5-НИАА – 5-хидрокси-индол-сирћетне киселине (енгл. *5-hydroxy-indole-acetic acid*)

TrkB – рецептор тирозин киназе В (енгл. *tyrosine receptor kinase B*)

bcl-2 – Лимфом В ћелија 2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*)

TST – тест качења за реп (ТКР) (енгл. *tail suspension test*)

PAMPs – молекулски образци патогених микроорганизама (енг. *pathogen-associated molecular patterns*)

PRRs – рецептори за препознавање образаца (енгл. *pattern-recognition receptors*)

DAMPs – молекулски образци повезани са оштећењем ткива (енгл. *damage-associated molecular patterns*)

TLRs – *Toll-like* рецептори (енгл. *toll-like receptors*)

AP-1 – активатор протеина-1 (енгл. *activator protein-1*)

NF-κB – нуклеарни фактор κB (енгл. *nuclear factor κB*)

IRF3 – регулаторни фактор интерферона 3 (енгл. *interferon regulatory factor 3*)

IL – интерлеукин (енгл. *interleukin*)

TNF-α – фактор некрозе тумора α (енгл. *tumor necrosis factor-α*)

IL-1R – рецептор за IL-1 (енгл. *IL-1 receptor*)

TNFR – рецептор за TNF (енгл. *TNF receptor*)

МАРК – митогеном-активирана протеинска киназа (енгл. *mitogen-activated protein kinase*)

JAK-STAT – *Janus* киназа сигналног преносиоца и регулатора транскрипције (енгл. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*)

ERK1/2 – киназа која је регулисана екстрацелуларним сигналом (енгл. *extracellular-signal-regulated kinase*)

JNK – *c-Jun* N- терминална киназа (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*)

CSF – фактор стимулације колонија (енгл. *colony stimulating factors*)

IFN – интерферон (енгл. *interferon*)

CD – кластер диференцијације (енгл. *cluster of differentiation*)

sIL-6R – солубилни IL-6R (енгл. *soluble IL-6R*)

SODD – пригушивач домена смрти (енгл. *silencer of death domains*)

TRADD – протеин домена смрти повезани са TNFR1 (енгл. *TNFR1-associated death domain protein*)

HMGB1 – протеин високе мобилности 1 (енгл. *high-mobility group box 1*),

NADPH – никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NOX – NADPH оксидаза (енгл. *NAPDH oxidase*)

INOS – индуцибилна азот оксид синтаза (енгл. *inducible nitric oxide synthase*)

CCL2 – лиганд за хемокин 2 (енгл. *chemokine ligand 2*)

EAE – експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (енгл. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)

- AMPA – α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолалепропионска киселина (енгл. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)
- NMDA – N-метил-D-аспартат (енгл. *N-methyl-D-aspartate*)
- LPS – липополисахарид (енгл. *lipopolysaccharide*)
- mRNA – информациона рибонуклеинска киселина (енгл. *messenger ribonucleic acid*)
- qRT-PCR – реверзна транскрипција и ланчана реакција полимеризације у реалном времену (енгл. *quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction*)
- i.v. – интравенски (енгл. *intravenous*)
- i.p. – интраперитонеална (енгл. *intraperitoneal*)
- CRD – домен за препознавање угљених хидрата (енгл. *carbohydrate-recognition domain*)
- Gal – галектин (енгл. *galectin*)
- CBP-35 – протеин који се везује за угљене хидрате-35 (енгл. *carbohydrate-binding protein*)
- Ig – имуноглобулин (енгл. *immunoglobulin*)
- GALBP – протеин који се везује за галактозиде (енгл. *galactoside-binding protein*)
- TCR – Т ћелијски рецептор (енгл. *T cell receptor*)
- BH1 – енгл. *Bcl-2 homology 1*
- GM-CSF – гранулоцитно-макрофагни фактор стимулације колоније (енгл. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)
- CRE – cAMP-зависни елемент одговора (енгл. *cAMP-dependent response element*)
- SIE – sis-индуцибилни елемент (енгл. *sis-inducible element*)
- bHLH – хеликс-петља- хеликс (енгл. *basic helix-loop-helix*).
- CREB – елемент-везујући протеин cAMP одговора (енгл. *cAMP-response element-binding protein*)
- Tyr – тирозин (енгл. *tyrosine*)
- Pro – пролин (енгл. *proline*)
- Ser – серин (енгл. *serine*)
- Ala – аланин (енгл. *alanine*)
- Gly – глицин (енгл. *glycine*)
- САТ – хлорамфеникол ацетилтрансфераза (енгл. *chloramphenicol acetyltransferase*)
- EGF – епидермални фактор раста (енгл. *epidermal growth factor*)
- TGF- β – трансформишући фактор раста- β (енгл. *transforming growth factor*.)
- Chrp – протеин богат цистидином и хистидином (енгл. *cystidine/histidine-rich protein*)
- AIP-1 – актин-интерагујући протеин-1 (енгл. *actin-interacting protein-1*),

- PKB – протеин киназа В (енгл. *protein kinase B*)
- PI3-K – фосфатидилинозитол 3-киназа (енгл. *phosphatidylinositol 3-kinase*)
- CKI – казеин киназа I (енгл. *casein kinase I*)
- GSK-3 β – киназа гликоген синтаза 3 β (енгл. *glycogen synthase kinase-3 β*)
- SMN – протеин одговоран за преживљавање моторног неурона (енгл. *survival of motor neuron*)
- cDNA – комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. *complementary deoxyribonucleic acid*)
- ALG-2 – *алфа-1,3*-манозилтрансфераза (енгл. *alpha-1,3-mannosyltransferase*)
- Alix – ALG-2-везујући протеин X (енгл. *ALG-2-interacting protein X*)
- LDL – липопротеин ниске густине (енгл. *low density lipoprotein*)
- AGEs – крајњи продукти гликације (енгл. *advanced glycation end products*)
- Th1- Т хелпер тип 1 (енгл. *T helper type 1*)
- HFD – исхрана богата мастима (енгл. *high fat diet*)
- DRG – дорзални корен кичмене мождине (енгл. *dorsal root ganglion*)
- IGF-1 – фактор раста сличан инсулину-1 (енгл. *insulin-like growth factor-1*)
- IGF-R1 – IGF-1 рецептор (енгл. *IGF-1 receptor*)
- SOCS3 – супресор сигнализације цитокина 3 (енгл. *suppressor of cytokine signaling 3*)
- WT – дивљи соја (енгл. *wild-type*)
- VEGF – васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *vascular endothelial growth factor*)
- bFGF – базични фибробластни фактор раста (енгл. *basic fibroblast growth factor*)
- Neo – неомицин (енгл. *neomycin*)
- TK- тимидин киназа
- FIAU – 1-(29-деокси29-флуоро-1- β -D-арабинофураназол-)-5-јодо-урацил (енгл. *1-(29-deoxy29-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil*)
- FFPE – фиксирани и уроњени у парафин (енгл. *formalin-fixed and paraffin-embedded*),
- PBS – раствор фосфатног пуфера (енгл. *phosphate buffered saline*)
- BSA – албумин говеђег серума (енгл. *bovine serum albumin*)
- HRP – енгл. horseradish peroxidase
- ELISA – имуноензимски тест (енгл. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- CT – енгл. *cycle threshold*
- SPSS – статистички програмски пакет за социјалне науке (енгл. *Statistical package for the social sciences*)