

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Andela Žic

Tomislav Pavičić

IMUNOMODULACIJSKO DJELOVANJE
GALEKTINA-3 NA LJUDSKE MAKROFAGE

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je na Zvodu za biokemiju i molekularnu biologiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jerke Dumić u sklopu znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske #006-0061194-1218 i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/09.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

Ala – alanin

LPS – lipopolisaharid iz stijenke G(-) bakterije

Kd – konstanta disocijacije

kDa – kilodalton (kgmol^{-1})

Pro – prolin

Gly – glicin

Ser – serin

kb – kilobaza

PBS – fosfatom puferirana otopina soli (*eng.* Phosphate Buffered Saline)

RPMI – medij za uzgoj stanica

NaHCO₃ – natrijev hidrogenkarbonat

FCS – fetalni teleći serum (*eng.* Fetal Calf Serum)

PE – fikoeritrin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Imunost	2
1.2. Nespecifična imunost	3
1.2.1. <u>Aktivacija makrofaga</u>	4
1.2.1.1. <u>Citokini i kemokini</u>	4
1.3. Specifična imunost	8
1.4. Galektin-3	9
1.4.1. <u>Izvanstanični galektin-3</u>	12
2. HIPOTEZA	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijal	18
3.2. Metode	19
3.2.1. <u>Uzorci krvi</u>	19
3.2.2. <u>In vitro izolacija monocita Ficoll postupkom</u>	19
3.2.3. <u>Tretiranje stanica LPS-om i galektinom-3</u>	19
3.2.4. <u>Priprema uzorka i otopina za protočnu citometriju</u>	20
3.2.5. <u>Određivanje citokina na protočnom citometru</u>	21
3.2.6. <u>Statistička obrada podataka</u>	22
4. REZULTATI	24
4.1. <u>In vitro izolacija monocita Ficoll postupkom</u>	25
4.2. <u>Tretiranje stanica LPS-om i galektinom-3</u>	25
4.3. <u>Priprema uzorka i otopina za protočnu citometriju</u>	26
4.4. <u>Određivanje citokina na protočnom citometru</u>	26
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČCI	37
7. ZAHVALE	39

8. POPIS LITERATURE.....	41
9. SAŽETAK.....	45
10. SUMMARY.....	47
11. ŽIVOTOPISI.....	49

1. UVOD

1.1 Imunost

Imunologija je biomedicinska znanost koja proučava imunost (*lat.* immunitas – otpornost, neprijemljivost), odnosno sposobnost organizma da se odupre djelovanju stranih agensa/antigena. Pojam imunosti u širem smislu danas se odnosi na specifične i nespecifične reakcije protiv najrazličitijih agenasa (mikroorganizmi, toksini, tumori) u smislu očuvanja genetskog integriteta organizma. Nespecifična (urođena) otpornost postoji bez prethodnog dodira organizma s određenim antigenom i usmjerena je protiv praktično svih antigena koji ulaze u organizam. Specifična imunoreakcija pojavljuje se tek nakon dodira organizma s nekim antigenom i usmjerena je specifično protiv njega.

Brojne su prijetnje kojima se danas organizam mora oduprijeti kako bi preživio: gubitak individualnosti fuzijom s nekom drugom stanicom, najezda različitih mikroorganizama, ulazak štetnih tvari, opasnost od vlastitih stanica promjenjenih po smještaju ili po ponašanju (primjerice tumori, autoimunereakcije). Prema izvršnim mehanizmima postoje općenito dva oblika obrambenih reakcija: humoralna obrana posredovana topljivim tvarima u tjelesnim tekućinama (prvenstveno antitijelima) i stanična (celularna obrana) posredovana stanicama. Urođena nespecifična imunost služi kao prva crta obrane i čine ju različite anatomske, fiziološke, stanične (fagociti – monocitno makrofagna loza, neutrofilni leukociti, NK) te upalne zapreke patogenima. Nedostatak urođene imunosti je nemogućnost imunog pamćenja patogena koji je već prethodno inficirao određeni organizam. Na učinkovitost nespecifične obrane utječu brojni čimbenici: spol, dob, genetska podloga, prehrana, razne bolesti jedinke te primjena imunosupresijskih i imunostimulacijskih tvari (Andreis I i sur., 2004).

Upalna reakcija kojom organizam reagira na bilo koje oštećenje – fizičko, kemijsko ili biološko je zapravo uvertira u svaku specifičnu imunoreakciju. Specifična stečena imunost usmjerena je naspram antigena koji je ušao u organizam i rezultat je podražaja imunosnog sustava. Imunosni sustav skupni je naziv za organe, tkiva, stanice i njihove produkte koji u organizmu služe za prepoznavanje stranih bioloških tvari te obranu od istih. Ta mreža stanica i molekula koje stupaju u dinamičke interakcije održavaju se u stabilnim oscilacijama na principu sličnom zakonu o djelovanju masa.

Stanice koje sudjeluju u imunoreakciji nastaju iz pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica dvama diferencijacijskim putevima. Diferencijacijskim putem limfopoeze nastaju sve vrste limfocita. Razlikuju se tri osnovne populacije limfocita: limfociti T koji sazrijevaju u timusu te limfociti B i prirodno ubilačke stanice (NK stanice, prema *eng.* Natural Killer cells) koje sazrijevaju u koštanoj srži. Limfociti T i B ekspimiraju receptore za antigen i glavne su stanice specifične imunosti. Nasuprot tome NK ne ekspimiraju antigenske receptore, a po funkciji pripadaju stanicama urođene imunosti.

Diferencijacijskim putem mijelopoese iz mijeloidnih matičnih stanica nastaju stanice koje sudjeluju u urođenom nespecifičnom imunom odgovoru (fagociti, dendritičke stanice, posredničke stanice, mast stanice). Fagociti u koje se ubrajaju monociti-makrofagi, neutrofilni i eozinofilni granulociti, dobili su ime po fagocitozi, procesu proždiranja stranih stanica i obično netopljivih čestica. Osnovna zadaća dendritičkih stanica je izlaganje antigena na svojoj površini čime pomažu limfocitima u prepoznavanju antigena i potiču njihovu aktivaciju pa se ubrajaju u skupinu tzv. predočnih stanica. Također nose vlastite antigene i tako migrirajući u tijela i iz njih induciraju toleranciju organizma na vlastita tkiva. Posredničke (medijatorske) stanice (mastociti, bazofilni leukociti, trombociti) uključuju se u već pokrenutu imunoreakciju izlučivanjem različitih, biološki vrlo učinkovitih tvari koje pojačavaju imunoreakciju, a katkad i oštećuju tkivo (reakcije preosjetljivosti). (Andreis I i sur., 2004)

1.2 Nespecifična imunost

Nespecifična (urođena, prirođena) imunost predstavlja prvu i glavnu crtu obrane od bakterija, gljivica, virusa i drugih parazitskih ili potencijalno parazitskih oblika života te ima najvažniju ulogu u održavanju antigenskog i genskog integriteta individualnosti organizma. Ona postoji kao konstitucijska značajka organizma, tj. svojstvena mu je i bez prethodnog dodira s antigenom. Prepoznavanje cilja od strane fagocita nije klonski organizirano što znači da se geni za receptore nalaze u stanicama zametne loze i izraženi su na mnogim imunskim stanicama.

Različiti su efektorski mehanizmi urođene imunosti, no prije svega tu su koža i sluznice te njihova normalna flora kao anatomske fizičke zapreke ulasku mikroba. Pored toga, epitelne stanice luče brojne peptide bogate cisteinom-*defenzive* koji kao prirodni antibiotici ubijaju mikroorganizme (Malenica B, 2005).

Fiziološke zapreke prodoru uljeza jesu neke konstitucijske značajke, kao što su pH, koncentracija kisika i brojne tvari u izvanstaničnoj tekućini koje djeluju mikrobicidno (komplementarni sustav, β -lizin, interferon, C-reaktivni protein, proteini akutne faze upale, prirodna protutijela). Glavni nositelji urođene stanične obrane su mononuklearni fagociti i polimorfonuklearni leukociti. Makrofagi i neutrofilni vežu patogene svojim posebnim površinskim receptorima koji prepoznaju karakteristične molekularne uzorke (PAMP, prema *eng.* pathogen-associated molecular patterns) pa im otuda naziv receptori za prepoznavanje uzorka (*eng.* pattern recognition receptors, PRR). Na monocitima i makrofagima nalaze se receptori CD14⁺ i TLR (prema *eng.* Toll-like receptor) za različite gradivne komponente patogena (bakterijski lipopolisaharid, LPS). Njihovom aktivacijom stvara se transkripcijski faktor NF- κ B koji regulira ekspresiju više gena pa nastaju faktor tumorske nekroze (*eng.* tumor necrosis factor, TNF), antimikrobni peptidi i NADPH-oksidge koje stvaraju reaktivne

kisikove međuprodukte. Makrofagi svojim receptorima-čistačima (*eng.* Scavenger Receptors) uklanjaju apoptotične stanice i vežu mnoge negativno nabijene ligande (primjerice lipoteihoičnu kiselinu, komponentu stanične stijenke gram-pozitivnih bakterija). Glukanskim i manoznim (lektini) receptorima, makrofagi prepoznaju ugljikohidrate na površinama mnogih bakterija, ali i virusa, primjerice humanog virusa imunodeficijencije (HIV) te pospješuju njihovu fagocitozu. Druga važna interakcija između patogena i tkivnih makrofaga je aktivacija makrofaga u smjeru produkcije citokina (strukturno različite skupine malih proteina koji djeluju autokrino i parakrino) i kemokina (kemoatraktantnih citokina, malih proteina koji stimuliraju aktivaciju i migraciju drugih stanica) te ostalih medijatora koji označavaju stanje upale u tkivu i privlače neutrofile na mjesto infekcije. Vjeruje se kako se ova interakcija ostvaruje putem signala koji se prenose nakon vezanja membranskih receptora makrofaga na specifične molekule na površini patogena (Andreis I i sur. 2004).

1.2.1 Aktivacija makrofaga

Makrofage mogu aktivirati različite egzogene i endogene tvari; od endogenih najvažniji su citokini koje luče aktivirani limfociti T, NK stanice i sami makrofagi, dok od egzogenih faktora, makrofage najsnažnije aktiviraju proizvodi mikroorganizama (bakterijska DNA i lipopolisaharidi) ili sami mikroorganizmi koji specifično napadaju makrofage (primjerice *Mycobacterium tuberculosis*).

Posebice je proučena i najbolje definirana aktivacija fagocitnih stanica lipopolisaharidom iz stijenke gram-negativnih bakterija. Cirkulirajući LPS veže se najprije za protein koji veže LPS (*eng.* LPS binding protein, LBP), a zatim za molekulu CD14⁺ na površini fagocita. Kompleks aktivira evolucijski konzervirani transmembranski receptor TLR-4 (receptor sličan *Toll*-receptoru) koji zatim aktivira niz signalnih putova poput puta MAPK (*eng.* mitogen-activated protein kinase, MAPK) koji uključuje putove ERK 1 i 2, JNK i p38 (Cooper GM, 2004). Navedenim signalnim putovima aktiviraju se posljedično i brojni transkripcijski faktori (poput NF- κ B i AP-1) čime započinje transkripcija brojnih gena. Kod ljudi i općenito kralješnjaka, aktivacija transkripcijskog faktora NF- κ B putem *Toll* dovodi do produkcije proupalnih citokina i kemokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) koji pospješuju upalnu reakciju te produkcije citokina IFN- γ , IL-12, IL-15 koji pospješuju predočivanje antigena limfocitima (povećavaju ekspresiju proteina MHC klase II i ko-stimulatornih molekula B7.1 – CD80 i B7.2 – CD86) te aktiviraju i usmjeruju razvoj adaptivne humoralne i stanične imunosti.

1.2.1.1 Citokini i kemokini

Citokini su niskomolekularni N-acetilirani glikoproteini (15-25 kDa) koji omogućavaju međustaničnu komunikaciju te na taj način usklađuju funkcije stanica. Luče ih mnoge stanice

u organizmu, ali najvećim dijelom imunosne i upalne stanice. Djeluju na same stanice koje ih luče (autokrino djelovanje), ali i na različite druge stanice kao što su fibroblasti, hepatociti, keratinociti (parakrino djelovanje). Smatraju se lokalnim hormonima jer se za razliku od sistemskih luče lokalno i učinak im brzo nestaje (poluvijek im je nekoliko minuta). Samo manji broj citokina djeluje na različite udaljene organe i sustave (endokino djelovanje). Većina citokina potiče aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduje ili regulira imunoreakcije, djeluje kemotaktički i regulira upalne procese. Drugi pak citokini inhibiraju rast stanica ili djeluju citotoksično. Kasnije su otkriveni citokini znatno manje molekulske mase od klasičnih citokina, a glavno im je djelovanje kemotaksija pa su stoga nazvani kemokini (prema *eng.* chemoattractive cytokines) (Andreis I i sur., 2004).

Citokini djeluju na stanice koje eksprimiraju odgovarajuće receptore. Nakon interakcije citokina i receptora dolazi do prijenosa unutarstaničnih signala što dovodi do aktivacije stanica. Signalne podjedinice citokinskih receptora induciraju fosforilaciju tirozinskih ostataka tako što se povezuju s tirozin-kinazama u citosolu stanice; većinom su povezane s porodicom nazvanom Janus-kinazama (JAK). Nakon vezanja citokina uslijed konformacijske promjene dolazi do aktivacije JAK koje fosforiliraju unutarstanične dijelove receptora, ali se i auto-fosforiliraju, čime JAK povećava svoju katalitičku aktivnost. Aktivirani kompleks citokinskog receptora i JAK-a fosforilira (aktivira) proteine porodice STAT u citoplazmi koji preko fosfotirozina na svojim SH2 domenama stvaraju dimere te odlaze u jezgru gdje aktiviraju transkripciju vezanjem za određena mjesta u DNA (Cooper GM, 2004). Citokini nadziru gotovo sve funkcije urođene i stečene imunosti. Za djelovanje mnogih citokina svojstven je pleotropizam tj. pojava da jedan citokin djeluje na nekoliko vrsta stanica i ima više različitih učinaka. Za citokine je također karakteristična i pojava redundancije, odnosno više različitih citokina može imati isto djelovanje na istu stanicu što bi drugim riječima značilo da se djelovanja različitih citokina dobrim dijelom preklapaju. Ipak, unatoč redundanciji, spektar djelovanja pojedinog citokina je jedinstven.

Citokini se mogu svrstati u različite skupine na najmanje dva različita načina. Prvi je klasičan koji se temelji na povijesnom otkriću pojedinih citokina i prvim otkrivenim djelovanjima pojedinih citokina. Druga podjela temelji se na funkciji pojedinih citokina. U novije vrijeme citokini se razvrstavaju na temelju svoje građe ili na temelju građe njihovih receptora.

Klasično citokini se stvrstavaju u četiri skupine: interleukini, interferoni, citoksini i faktori rasta hematopoetskih stanica.

Interleukini (IL) su dobili ime po tome što ih luče leukociti i djeluju na leukocite, no zapravo njih mogu lučiti i druge stanice te mogu djelovati na druge neleukocitne stanice. Mali broj citokina koje luče monociti-makrofagi (IL-6, IL-8, IL-12) imaju jako proupalno djelovanje pa se često nazivaju i proupalni citokini. Ostali interleukini ili potiču različite faze specifične imunoreakcije (imunopoticajni citokini) ili ih suprimiraju (imunosupresijski citokini).

Interferoni se dijele u dvije skupine: neimuni interferoni koji imaju antivirusno djelovanje (IFN- α , IFN- β) i imuni interferon (IFN- γ) koji uz antivirusni učinak ispoljava i imunopoticajno djelovanje na limfocite i makrofage.

Dva najvažnija citoksina su faktor tumorske nekroze (TNF) i limfotoksin (LT). Njih kodiraju geni unutar kompleksa MHC, pa imaju sličnu građu i djelovanje. Prema tome za njih su predloženi slični nazivi TNF- α i TNF- β odnosno LT. TNF- α uglavnom proizvode monociti-makrofagi, a TNF- β citotoksični limfociti. Zajedničko obilježje tih citokina je njihova citotoksičnost odnosno izazivanje apoptoze (stanična smrt) u ciljnim stanicama.

Čimbenici poticanja kolonija (CSF, prema *eng.* colony stimulating factors) potiču rast i diferencijaciju kolonija hematopoetskih stanica *in vitro* (Andreis I i sur. 2004.)

Ima čitav niz drugih citokina koji se ne mogu svrstati u navedene skupine a među njima su najznačajniji transformirajući faktor rasta β (TGF- β , prema *eng.* transforming growth factor- β) i najranije otkriveni citokin – faktor inhibicije migracije makrofaga.

(MIF). TGF- β inhibira rast i aktivnost mnogih imunskih stanica te djeluje protuupalno.

Tablica 1.1 Biološke uloge citokina

<i>Citokin</i>	<i>Stanični izvor</i>	<i>Cilj</i>	<i>Aktivnosti</i>
Proupalni citokini			
IL-1	makrofagi dendritičke stanice	limfociti endotelne stanice SŽS jetra	pojačavaju odgovor aktivacija temperatura (endogeni pirogen) sinteza i oslobađanje proteina akutne faze
IL-6	makrofagi dendritičke stanice endotel Th2 stanice	jetra B stanice	sinteza i otpuštanje proteina akutne faze proliferacija
TNF- α	makrofagi dendritičke stanice Th1 stanice	endotelne stanice neutrofili hipotalamus jetra	aktivira vaskularni endotel-povećava permeabilnost i stimulira adheziju molekula aktivacija temperatura sinteza i otpuštanje proteina akutne faze
Protuupalni citokini			
IL-10	makrofagi Th2	makrofagi dendritičke stanice	inhibira proizvodnju IL-12 inhibira sintezu proupalnih citokina
IL-12	makrofagi dendritičke stanice	CD4 + T pomoćne stanice NK stanice	Th1 diferencijacija sinteza IFN- γ
Citokini uključeni u stečeni imunosni odgovor			
IL-2	T limfociti	T stanice NK stanice B stanice	proliferacija aktivacija i proliferacija proliferacija
IL-4	Th2 stanice mast stanice	T stanice B stanice makrofagi	razvoj/proliferacija Th2 stanica gensko prekapćanje na sintezu IgG1 i IgE inhibira aktivaciju IFN- γ
IFN- γ	Th1 stanice citotoksične stanice NK stanice	T stanice B stanice makrofagi	razvoj Th1 stanica gensko prekapćanje na sintezu IgG aktivacija

Citokini i kemokini obično se luče u kaskadi i stvaraju lokalnu citokinsku mrežu, u kojoj se njihova djelovanja preklapaju (pleotropizam i redundancija). Stabilnost i lokalno djelovanje te mreže održavaju razni inhibitori (anticitokini) kao što su antagonisti receptora, otpuštanje staničnih receptora koji blokiraju citokine te prirodni blokatori citokina. Pojačano lučenje citokina i njihovo «prelijevanje» u sistemsku cirkulaciju obično ima negativne posljedice za organizam (osobito TNF- α) jer može izazvati stanje nalik septičkom šoku.

1.3 Specifična imunost

Nespecifična imunost najuže surađuje sa specifičnom u održavanju homeostaze. Obje se imunosti nadopunjuju i preklapaju u djelovanju.

Za razliku od nespecifične (urođene) imunosti, specifična (stečena) imunost razvija se tek nakon prepoznavanja i procesiranja antigena te sazrijevanja limfocita T i B u efektorske stanice. Na temelju efektorskih mehanizama razlikujemo dva oblika specifične imunosti, humoralnu i staničnu. Humoralna imunost je imunost posredovana protutijelima (imunoglobulinima) koje sintetiziraju završni oblici diferencijacije limfocita B – plazma stanice te ih izlučuju u izvanstaničnu tekućinu, u plazmu i sekrete. Protutijela

se stvaraju nakon ulaska antigena u organizam, bilo topljivog bilo vezanog za površinu neke čestice. Stanična imunost je imunost posredovana stanicama, pretežno limfocitima T i makrofagima. Pri ulasku nekih unutarstaničnih bakterija, virusa, stanica, transplantata i tumora, limfociti T izravno djeluju izravno citotoksično ili pomoću svojih humoralnih produkata (citokina) pridonose uništenju ciljnih stanica. Izvršni citotoksični limfociti ekspimiraju na svojoj površini CD8⁺ molekulu (nazivaju se i CD8⁺ limfocitima T) i oni su glavni posrednici stanične imunosti, kasne preosjetljivosti, odbacivanja transplantata i tumora te ubijanja vlastitih stanica zaraženih virusima. Regulacijski limfociti na svojoj površini ekprimiraju CD4⁺ molekulu. Djele se na Th1 stanice koje prepoznaju antigen na makrofagima, aktiviraju ih te ih svojim citokinima i kemokinima još privlače na mjesto infekcije. Druga podskupina CD4⁺ limfocita, Th2 prepoznaje antigen predodčen limfocitima B te na taj način ima važnu ulogu u produkciji protutijela, odnosno u poticanju humoralne imunosti. Za vrijeme infekcije limfociti T intenzivno proliferiraju i diferenciraju u efektorske limfocite, a taj proces je kontroliran interleukinom 2 (IL-2) kojeg proizvode i sami aktivirani limfociti. IL-2 se stoga smatra faktorom preživljavanja i promotorom diferencijacije limfocita T (Andreis I i sur., 2004).

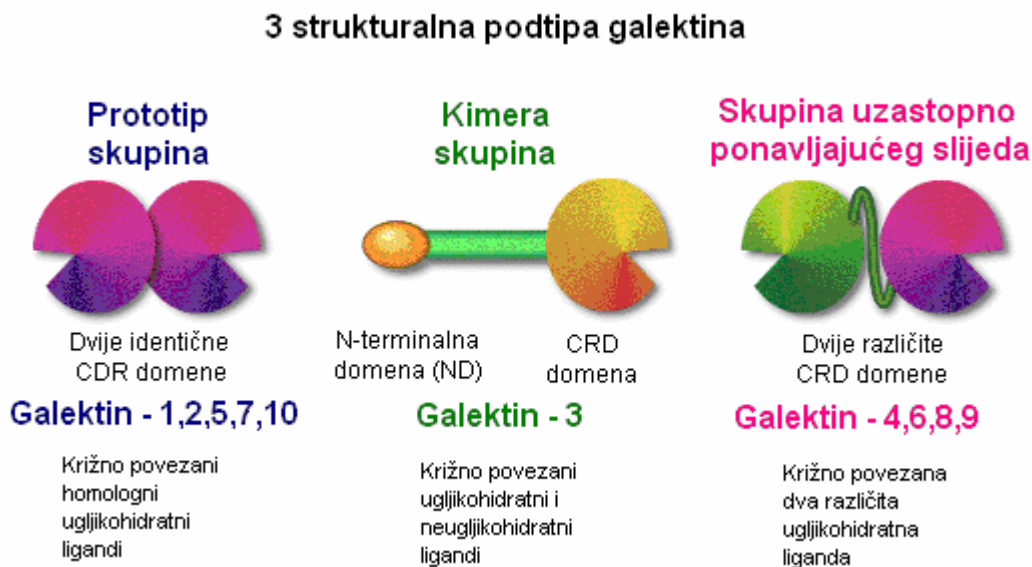
Pri specifičnoj imunoreakciji prepoznavanje cilja ne uključuje samo tuđe antigenske determinante već i istodobno prepoznavanje vlastitih antigena tkivne podudarnosti (skupina I MHC).

1.4 Galektin-3

Lektini su jedinstvena skupina proteina koji imaju ulogu "tumača" bioloških informacija pohranjenih u ugljikohidratnim strukturama glikoproteina. Klasificirani su u porodice, među kojima su galektini evolucijski stara i iznimno zanimljiva obitelj. Članovi porodice galektina su svojstveni po specifičnom vezanju β -galaktozidnih struktura evolucijski očuvanim aminokiselinskim slijedom (Barondes SH i sur., 1994).

Među sisavcima identificirano je 14 galektina, a svaki od njih sadržava konzerviranu domenu koja veže šećere (*eng.* carbohydrate-recognition-binding domain, CRD) sastavljenu od oko 130 aminokiselina, koja prepoznaje i veže ugljikohidrate.

Na temelju broja i organizacije takvih domena, članovi galektinske obitelji svrstavaju se u 3 podtipa: prototipna skupina, kimera skupina i skupina "uzastopno ponavljajućeg slijeda" (slika 1.1).



Slika 1.1 Članovi galektinske obitelji svrstani na temelju broja i organizacije CRD domena.

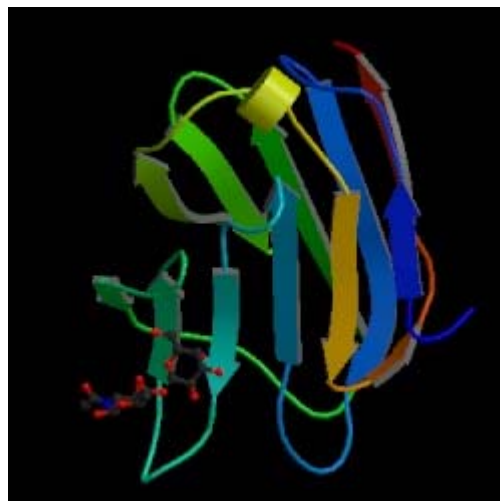
CRD – domena koja prepoznaje ugljikohidrata (*eng.* carbohydrate-recognition-binding domain)

Članovi prototipne skupine (galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14) sadrže jednu domenu koja prepoznaje ugljikohidrate. Galektin-3, jedini predstavnik kimera galektina, sastoji se od jedne CRD domene spojene s neobično dugom N-terminalnom domenom bogatom prolinima i glicinima. Članovi skupine "uzastopno ponavljajućeg slijeda" (galektin-4, -6, -8, -9, -12) sastavljeni su od jednog polipeptidnog lanca koji formira dvije različite, ali homologne domene koje prepoznaju šećere, odvojene nekonzerviranim povezujućim slijedom od oko 70 aminokiselina. Upravo stoga što posjeduju dvije CDR mogu vezati dva zasebna ugljikohidratna epitopa. Galektini s jednom CRD mogu stvarati dimere i oligomere ovisno o

specifičnim uvjetima (koncentraciji ili prisutnosti liganda) što omogućuje bivalentno ili multivalentno vezanje ugljikohidratnih liganada te je ključno za neke od njihovih bioloških funkcija. Premda je prisutnost galaktoze prijeko potrebna za vezanje svih galektina, afinitet za monosaharidne ligande je relativno slab, s vrijednostima K_d u mM rasponu (Hirabayashi J i sur., 2002) Afinitet galektina za vezanje raste ukoliko je galaktoza povezana s nekim drugim saharidima, primjerice N-acetilglukozaminom te tako formira N-acetilaktozamin. Galektini su kod kralježnjaka nađeni u različitim tipovima stanica i tkiva, u staničnoj citoplazmi i jezgri, na staničnoj površini te u izvanstaničnom prostoru. Prisutnost galektina izvan stanice posljedica je sekrecije ne-klasičnim putem, s obzirom na to da nemaju signalni slijed za usmjeravanje u endoplazmatski retikulum. Unutar galektinske obitelji, najproučavaniji član je galektin-3.

Galektin-3 je protein Mr 29-35 kDa čija se struktura čini jedinstvenom u galektinskom svijetu. Njegov polipeptidni lanac formira dvije strukturno različite domene: netipičnu N-terminalnu domenu (ND) i C-terminalnu domenu (Argwal N i sur., 1993).

N-terminalna domena se sastoji od 110-130 aminokiselina, ovisno o vrsti. Ova razmjerno fleksibilna sturktura sadržava višestruko homologna ponavljanja (7-14), od kojih svaki obuhvaća usuglašeni slijed Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly, nakon kojeg slijede tri dodatne aminokiseline (slika 1.2). Iako N-terminalnoj domeni nedostaje aktivnost vezanja ugljikohidrata, istraživanja su pokazala da je neophodna za potpunu biološku aktivnost galektina-3 (Seetharaman J i sur., 1998)



Slika 1.2 Model tercijarne strukture proteina galektina-3 s njegovim preferiranim ligandom N-acetil-laktozamin

C-terminalna domena galektina-3 sastavljena je od 130 aminokiselina koje formiraju globularnu strukturu, koja je mjesto vezanja ugljikohidrata te je stoga odgovorna za lektinsku aktivnost galektina-3. Postoje brojni biološki ligandi galektina-3 koji se strukturno i funkcijski jako razlikuju, no studije aktivnosti i specifičnosti vezanja ugljikohidrata su pokazale da je N-acetilaktozamin njegov prioritetni ligand. Interakcija CRD s ugljikohidratnim ligandima popraćena je konformacijskim promjenama i premještanjem glavnih osi petlja u blizini mjesta vezanja. Pored toga, fosforilacija na položaju Ser⁶ galektina-3 snažno utječe na njegovu aktivnost multivalentnog vezanja, te se smatra sklopkom (*eng.* "on/off" switch) niza njegovih daljnjih bioloških učinaka. Afinitet vezanja ugljikohidrata galektina-3 i njegova fosforilacija nisu jedini faktori koji određuju specifičnost vezanja određene biološke strukture, već tu ulogu imaju i vremenska i prostorna koordinacija njene ekspresije, kao i glikanska i proteinska komponenta te biološke strukture (Mazurek N i sur., 2000).

U humanom genomu galektin-3 kodira jedinstveni gen *LGALS3* koji je smješten na kromosomu 14, lokus q21-q22. Humani gen *LGALS3* sastoji se od 6 egzona i 5 introna, veličine oko 17 kb. Slijed koji kodira N-terminalnu domenu smješten je potpuno unutar egzona III, a slijed koji kodira CDR domenu unutar egzona V (Raimond J i sur., 1997)

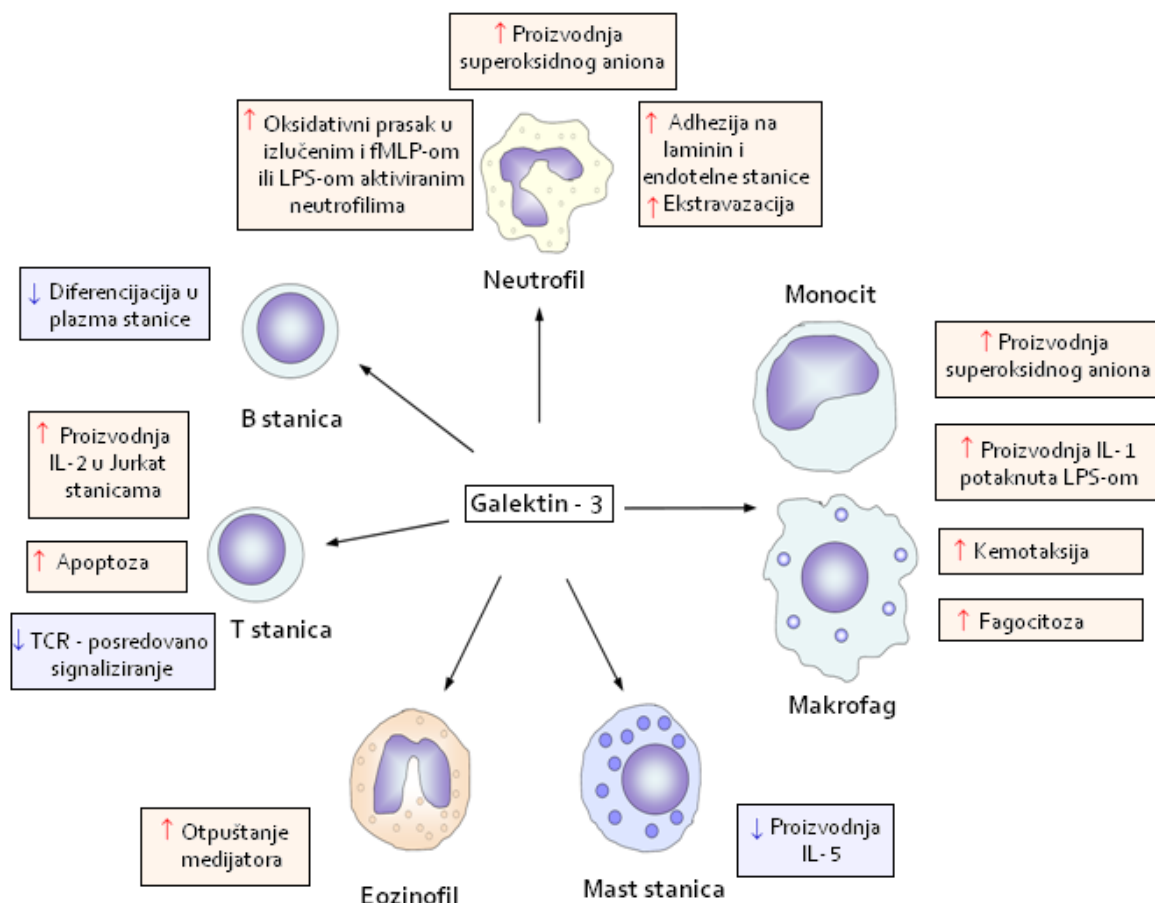
Galektin-3 smješten je unutar stanične jezgre i citoplazme, na površini stanice i u izvanstaničnom prostoru. Lokalizacija mu ovisi o različitim faktorima kao što su tip stanice i proliferacijski status, uvjeti kultivacije te neoplastična progresija i transformacija, a važna je jer mu definira biološku ulogu.

Kod odraslih osoba galektin-3 ekspimiran je u mnogim normalnim tkivima. Ipak ekspresija je, kao i tijekom embriogeneze, uglavnom ograničena na epitelne i mijeloidne ameboidne stanice: male intestinalne stanice, ograničeno područje olfaktornog epitela, epitelne stanice bubrega, pluća, timusa, dojke i prostate, duktalne stanice salivarnih žlijezda, pankreas, i intrahepatički žučni vodovi. Također se ekspimiraju u stanicama uključenim u imuni odgovor, kao što su neutrofil, eozinofil, bazofil, mast stanice, Langerhansove stanice, dendritičke stanice, te monociti i makrofagi iz različitih tkiva. Ekspresija galektina-3 u potpunosti je regulirana u fagocitnim makrofagima pa se zbog toga i smatra "biljegom makrofagne aktivacije" (Elliott MJ i sur., 1991). U limfocitnim linijama i limfocitima u mirovanju, galektin-3, zanimljivo, vrlo je rijetko ili gotovo uopće nije ekspimiran, dok se u aktiviranim limfocitima, njegova ekspresija povećava (primjerice, u T limfocitima aktiviranim križno vezanim protutijelima s CD3 ili konkalininom A). Galektin-3 ekspimiran je i u različitim tumorima, a intenzitet ekspresije uvelike ovisi o tumorskoj progresiji, invazivnosti i metastatskom potencijalu. Važno je reći da, iako su u literaturi objavljeni mnogi podaci na temu ekspresije galektina-3, sam mehanizam regulacije tog procesa još uvijek nerazjašnjen (van den Brule F i sur., 2004)

1.4.1 Izvanstanični galektin-3

Galektin-3, kao i ostali galektini u kralježnjaka, nema prepoznatljiv sekrecijski signalni slijed te ne prolazi standardni sekrecijski ER/Golgi put (Hughes, 1999) Ipak, potvrđeno je da se nalazi i izvan stanice. Pronađen je na staničnim površinama i u izvanstaničnom matriksu, vezan za brojne izvanstanične komponente, u biološkim tekućinama, kao i u medijima određenih staničnih linija. Galektin-3 može se brzo internalizirati iz izvanstaničnog odjeljka endocitozom ovisnom o prisutnosti laktoze, što je istraženo na tumorskim stanicama (Furtak V i sur., 2001)

Izvanstanični galektin-3 ima brojne autokrine i parakrine učinke (slika 1.3). On posreduje u staničnoj adheziji i aktivaciji stanica te djeluje kemoatraktivno na određene stanične linije (Hsu i Liu, 2004) Na taj način, galektin-3 utječe na različite biološke procese kao što su održavanje stanične homeostaze, imunosne reakcije, organogenezu i angiogenezu, invazivnost tumora i metastaziranje. Ulogu posrednika u staničnoj adheziji omogućuju mu njegova multivalentna svojstva i sposobnost vezanja glikoproteina staničnih površina te glikoziliranih komponenti izvanstaničnog matriksa (primjerice, laminin, integrin, selektin, fibronektin, kolagen IV, hensin, elastin). Galektin-3 pojačava produkciju interleukina-1 (IL-1) induciranu lipopolisaharidom (LPS) te potiče proizvodnju superoksidnog aniona tj. oksidativni prasak (*eng.* respiratory burst) u humanim monocitima periferne krvi i neutrofilima (Liu, 2005).



Slika 1.3 Utjecaji galektina-3 na imunosne stanice. Crvene strelice prema gore predstavljaju pozitivne utjecaje. Plave strelice prema dolje predstavljaju negativne utjecaje. Proupalne utjecaje galektina-3 pokazuju crveno obojani kvadrati, a protuupalne utjecaje pokazuju plavo obojani kvadrati. fMLP – formil-metionil-leucil-fenilalanin, IL-1, -2, -5 – interleukin-1, -2, -5, LPS – lipopolisaharid, TCR – receptor T stanica

Jednako tako, on potiče otpuštanje medijatora u mast stanicama, vjerojatno preko križnog povezivanja s FcεRI i/ili FcεRI-IgE kompleksom, pošto je pokazano da se oboje, FcεRI i IgE, vežu za galektin-3. Izloženost humanih eozinofila, perifernih mononuklearnih stanica krvi (PBMC) i antigen-specifične T stanične linije galektinu-3, rezultira selektivnom inhibicijom ekspresije IL-5, na razini proteina i mRNA (Hsu DK i sur., 1996). Ovo je jedan od primjera negativnog učinka galektina-3.

Pored svih uloga, izvanstanični galektin-3 djeluje kemoatraktivno na monocite i makrofage te alveolarne makrofage. Studije *in vivo* i *in vitro* pokazale su da galektin-3 potiče migraciju stanica te da su za taj proces neophodne i N-terminalna domena i CRD (Sano H i sur., 2000). Više koncentracije galektina-3 potrebne su za kemotaktički učinak (1 μM) dok pri

nižim koncentracijama (10-100 nM) uzrokuje kemokinezu, tj. povećava neusmjerena kretanja stanica.

Za galektin-3 bi se ustvari moglo reći da igra važnu ulogu u međuigri života i smrti, s obzirom na to da modulira stanični rast, kontrolu staničnog ciklusa te je uključen u regulaciju apoptoze (Dumić J i sur., 2006).

2. HIPOTEZA

Spektar djelovanja galektina-3 je iznimno širok te se smatra da svojim funkcijama igra važnu ulogu u međugri života i smrti stanice. Sudjeluje u staničnoj adheziji, staničnom rastu i diferencijaciji, samom staničnom ciklusu i na kraju, u staničnoj smrti (apoptozi). Djelovanje galektina-3 značajno ovisi o lokalizaciji, odnosno radi li se o endogenom ili egzogenom galektinu-3; endogeni galektin-3 smatra se anti-apoptoznim faktor, dok egzogeni galektin-3 uglavnom pokazuje pro-apoptozno djelovanje. U dostupnoj literaturi u posljednje vrijeme mnogo se govori o imunomodulacijskom djelovanju galektina-3 u različitim procesima imunskih stanica, od samog prepoznavanja patogena, oblikovanja adaptivnog imunskog odgovora, do finog reguliranja imunskog odgovor. Galektin-3 je općenito poznat kao snažan proupalni signal što što potkrepljuju mnogi znanstveni dokazi. Egzogeni galektin-3 vezanjem za glikozilirane membrane posebno imunskih stanica, djeluje na njih bilo autokrinim bilo parakrinim mehanizmom te između ostalog; započinje i promovira oksidativni prasak u neutrofilima i monocitima, inducira otpuštanje medijatora iz mast stanica, promovira adheziju humanih neutrofila na laminin i endotelne stanice te djeluje kemoatraktivno na monocite i makrofage.

Svrha ovoga rada bila je pridonijeti razumijevanju biološke uloge galektina-3 te mehanizama njegovog djelovanja na stanice monocitno-makrofagne loze. Mjerenjem citokina karakterističnih za makrofage (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α) ispitalo se kako galektin-3 uzječe na njihovo izlučivanje, a time se pridonijelo razumijevanju fiziologije monocitno-makrofagne loze. Kako će daljnja istraživanja biti usmjerena na studiranje molekularnih mehanizama djelovanja galektina-3 ovim je radom postavljen temelj za njihovo uspješno provođenje.

Specifični ciljevi ovog rada su bili:

- I) izolirati humane monocite iz uzorka venske krvi te ih diferencirati u makrofage kultiviranjem u adherirajućim uvjetima
- II) ispitati razinu ciljnih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α) u mediju netretiranih makrofaga i makrofaga aktiviranih lipopolisaharidom izloženih egzogeno dodanom rekombinantnom humanom galektinu-3 protočnom citometrijom.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1 Materijal

OTOPINE

- otopina Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences)
- Fosfatom puferirana otopina soli (*eng.* Phosphate Buffered Saline, PBS), Sigma
- Medij za uzgoj stanica (RPMI medij)
 - 2 g NaHCO₃ (Sigma)
 - 2,5 g D-(+)-glukoza, (Sigma)
 - 2,38 g HEPES (Seromed)
 - 0,11 g Na-piruvat (Sigma)
 - RPMI 1640 + L-glutamin (Gibco) antibiotik-antimikotik (Gibco)
- Fetalni teleći serum (*eng.* Fetal Calf Serum, FCS), (Gibco)
- 10 ng/mL lipopolisaharid iz soja *E.coli* (Sigma)
- 1 mg/mL otopina rekombinantnog humanog galektina-3 eksprimiranog u soju *E.coli*
- komercijalni kit za pripremu uzoraka za protočni citometar - Human Th1/Th2plex Kit II (BenderMedSystem,)
- otopina Flow check (Beckman-Coulter 6605359)
- otopina Flow set (Beckman-Coulter 6607007)

PRIBOR

- Falcon epruvete od 50 mL (BD Falcon™, BD Bioscience-Labware)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica za uzgoj staničnih kultura (BD Falcon™, BD Bioscience-Labware)
- plastične epruvete od 5 mL (Sarstedt)
- automatske pipete (Eppendorf)
- automatska vakuum sisaljka

INSTRUMENTI

- centrifuga Multex MSE
- automatski brojač stanica Z2 Coulter® Particle Counter and Size Analyzer (Beckman-Coulter)
- centrifuga Jouan MR23i (Thermo Electron Corporation)
- protočni citometar Cytomics FC500 MPL (Beckman-Coulter)

3.2 Metode

3.2.1 Uzorci krvi

Uzorci krvi pribavljeni su od dobrovoljnih davatelja, venepunkcijom uz antikoagulans. Postupak je proveden u skladu s odobrenjem Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (Br. 624/2008, od 28.3.2008.).

3.2.2 In vitro izolacija monocita Ficoll postupkom

Ficoll-Paque Plus postupak je brza, jednostavna i pouzdana metoda koja koristi otopinu natrijeva diatrizoata (svojstvene gustoće, viskoznosti i osmotskog tlaka) za *in vitro* izolaciju limfocita.

Uzorak krvi razrjeđuje se otopinom PBS-a u omjeru 1:1 te se 20 mL tako priređene suspenzije pomiješa s 25 mL Ficoll otopine te centrifugira 40 min pri 400g. Nakon centrifugiranja jasno se odjeljuju slojevi: plazma, smjesa limfocita i monocita (*eng.* buffy coat), granulociti te eritrociti. Uzima se sloj buffy coat-a te ga se ponovno centrifugira 10 min pri 200-300g kako bi limfociti i monociti bili pročišćeni od eventualno zaostalih drugih vrsta stanica. Izolirani buffy coat resuspendira se 3 puta većim volumenom PBS-a te se stanice prebroje u automatskom brojaču stanica. Stanice su zatim razrijeđene u mediju RPMI koji sadrži 10% fetalnog telećeg seruma (*eng.* fetal calf serum, FCS) te prnijete u bunariće mikrotitarske pločice (od 96 bunarića) tako da je konačan broj stanica bio 350 000 u 200 μ L, odnosno $1,75 \times 10^6$ st/mL. Populacija monocita čini oko 15-20 % (od ukupnih PBMC) tako da je u svakoj jažici bilo oko 50 000 monocita. Stanice su uzgajane u standardnim uvjetima (37 °C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti) tijekom 2 sata kako bi se monociti adherirali (limfociti ostaju u supernatantu). Nakon 2 sata supernatant je odsisan te je dodano 200 μ L medija RPMI koji je monocitima dostatan za dva dana diferencijacije u makrofage.

3.2.3 Tretiranje stanica LPS-om i galektinom-3

Nakon dvodnevne (48 h) diferencijacije monocita u makrofage, stanice su tretirane otopinom lipopolisaharida (LPS) koncentracije 1 ng/mL tijekom 24h (u svaku jažicu dodano je 100 μ L otopine LPS). Kontrolne stanice uzgajane su pri standardnim uvjetima (uz dodatak svježeg medija). Nakon 24 sata stanice aktivirane LPS i neaktivirane stanice tretirane su galektinom-3 (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M i 2 μ M u triplikatu).

Priprava razrjeđenja galektina-3 (matična otopina Gal-3 = 1 mg/mL tj. 30 μM)

Za 6x200 μL svake koncentracije:

0.2μM	130μl 1μM Gal-3 + 520μl medija
1μM	400μl 2μM Gal-3 + 400μl medija
2μM	550μl 4μM Gal-3 + 550μl medija
4μM	166μl 30μM (tj. 1mg/ml) + 1084μl medija

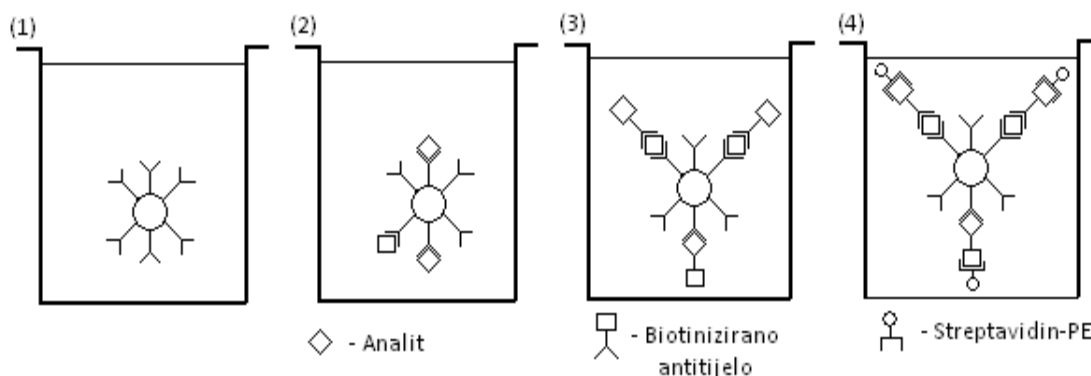
3.2.4 Priprema uzorka i otopina za protočnu citometriju

Za kvantitativnu detekciju humanog IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF-α protočnim citometrom korišten je komercijalni paket Human Th1/Th2plex Kit II (BenderMedSystem, BMS 716FF). Princip se temelji na imunofluorescentnoj metodi koja koristi zrnca (*eng.* beads), a primjenjiva je za određivanje količine ciljnih citokina u supernatantima staničnih kultura, serumu, plazmi, punoj krvi ili u ostalim tjelesnim tekućinama, no danas se koristi isključivo u istraživačke svrhe.

Pojam Th1 citokini i Th2 citokini odnosi se na uzorke citokina koje izlučuju dvije različite subpopulacije murinskih CD4(+) T stanica koje određuju ishod antigenskog odgovora humoralne ili stanično-posredovane imunosti.

Princip metode

Princip metode temelji se na specifičnom prepoznavanja antigena protutijelima koja su čvrsto vezana za fluorescentna zrnca. Svako od protutijela vezano je na zrnca koja su karakteristična po svojoj veličini, odnosno intenzitetu fluorescencije. Nakon vezanja antigena i protutijela, na antigen se vežu protutijela koja su obilježena biotinom, a detekcija se osigurava vezanjem streptavidina obilježenog fikoeritriinom (*eng.* phycoerythrin, PE). Ovim sustavom osigurano je mjerenje intenziteta fluorescencije koje potječe od vezanja specifičnih protutijela na antigen, unutar populacije zrnaca veličine i fluorescencije karakteristične za pojedinu vrstu antigena.



Slika 3.1 Princip imunofluorescentnog testa s zncima (*eng.* Fluorescent Bead Immunoassay) (1) Mikrosfere su prekrivene protutijelima koja specifično reagiraju sa svakim od analita koji će se detektirati u multipleks sistemu. Zrnca se razlikuju prema veličini, odnosno intenzitetu fluorescencije (autofluorescencija zrnaca). (2) Smjesa prekrivenih zrnaca za svaki analit koji će se mjeriti se inkubira sa uzorcima ili standardnom otopinom. Analiti prisutni u uzorku se vežu za protutijela povezana s fluorescentnim zncima. (3) U smjesu se dodaje otopina sekundarnih protutijela konjugiranih biotinom. Specifična sekundarna protutijela vežu se na analite koji su već prihvaćeni za primarno protutijelo. (4) U posljednjem koraku se dodaje streptavidin-fikoeritrin koji se veže na konjugirani biotin i emitira fluorescentne signale.

Postupak

Pomiješali smo 25 μL smjese zrnaca, 25 μL standarda/uzorka i 50 μL smjese primarnih protutijela konjugiranih biotinom te ostavili 2 sata na sobnoj temperaturi (18-25 $^{\circ}\text{C}$) u mraku. Nakon 2 h dodan je 1 mL pufera i te je suspenzija centrifugirana 5 min pri 200g. Supernatant je odsisan vakuum sisaljkom do 100 μL te je postupak ispiranja ponovljen. Sljedeće što dodajemo je otopina streptavidin-fikoeritrin i ostavljamo inkubirati na sobnoj temperaturi 1 h. Nakon inkubacije 2 puta ispiramo uzorke na isti način kao što smo napravili poslije dodavanja primarnih protutijela. Na kraju, resuspendiramo standarde i uzorke u 250 μL pufera i analiziramo protočnom citometrijom. Provedena su tri neovisna pokusa, a analiza svakog pojedinog uzorka obavljena je u triplicatu.

3.2.5 Određivanje citokina na protočnom citometru

Protočna citometrija je metoda kojom se mjere fizikalna svojstva stanica, koje se hidrodinamičkim fokusiranjem organiziraju u niz pojedinačnih stanica i tako prolaze mjesto

ispitivanja. Detektira se raspršenje svjetlosti i fluorescencija koja nastaje prolaskom kroz fokusiranu lasersku zraku. Jedna od osnovnih i najvažnijih karakteristika ove metode je činjenica da ne uzima prosjek svojstava svih čestica u populaciji nego se svaka od njih analizira pojedinačno. Svojstva koja se mjere su veličina i granuliranost stanice i relativni intenzitet fluorescencije površinskih ili unutarstaničnih fluorokroma.

Prije analize uzorka potrebno je standardizirati instrument otopinom *Flow Check*. *Flow check* otopina sadrži 10^6 /mL polistirenskih kuglica koje su sve iste veličine (promjer 10 μ m), sve jednako fluoresciraju i to pri svim valnim duljinama koje se koriste za detekciju. Analizom uz uporabu suspenzije *flow check* provjerava se ispravnost protoka uzorka i optičko poravnavanje instrumenta. Analiza suspenzije *Flow set* služi za provjeru i poravnanje stabilnost sustava samog uređaja.

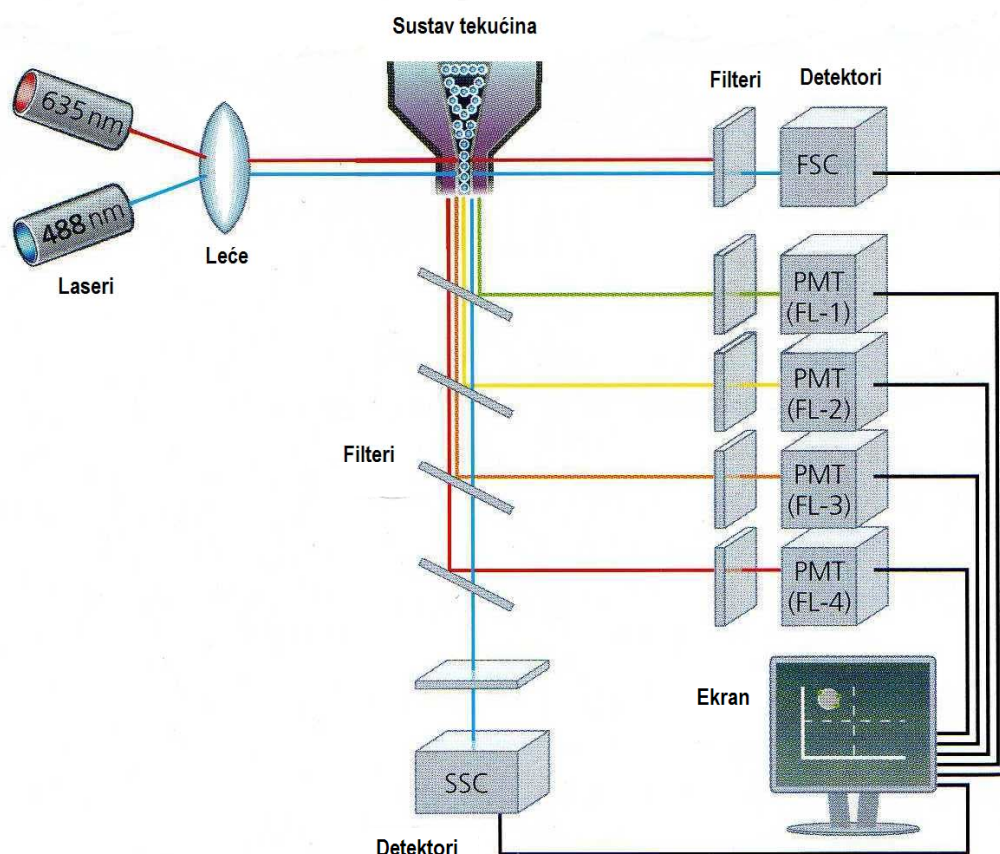
Detektor koji se nalazi u ravnini laserske zrake bilježi prednje raspršenje (*eng.* Forward Scatter Channel, FSC) koje se dovodi u odnos s veličinom čestice. Granuliranost čestice, odnosno njena unutarnja složenost bilježi se na detektoru bočnog raspršenja (*eng.* Side Scatter Channel, SSC).

U provedenom istraživanju, za protočni citometr otvoren je novi protokol te kreiran Dot-plot prozor s FS (*Forward Scatter*) za X- i SSC (*Side Scatter*) za Y-os te postavljen FS i SSC na linearni prikaz. Također je kreiran drugi i treći Dot plot prozor sa FL-2 za X- i FL-4 za Y-os, a same FL kanale smo namjestili na Log prikaz. U "Setup Mode" propuštena je otopina sa zrcima za podećavanje (*eng.* Setup Beads) koja daje najviši signal za fikoeritirin. Reagens korišten u analizi uzoraka sadrži dva seta mikrosfera, pa su na Dot-plot prozoru kreirane dvije regije, gdje R1 regija označava velika zrnca (5,5 μ m), a R2 mala zrnca (4,4 μ m). Broj događaja podešen je tako da bude izmjereno 300 događaja za svaki analit unutar R1 i R2 regije.

Svaki od ta dva seta mikrosfera sastoji se od 5 populacija zrnaca koje su obojane fluorescentnom bojom različitog intenziteta (autofluorescencija mikrosfera). Boje ekscitirane argonskim, He-Ne ili UV laserom, emitiraju u crvenom dijelu spektra (690 nm). Na taj je način s dva seta zrnaca različitih veličina omogućeno razlikovanje 10 setova mikrosfera u samo jednom kanalu fluorescencije tj. simultana kvantifikacija 10 različitih analita u jednom malom volumenu uzorka.

3.2.6 Statistička obrada rezultata

Srednje vrijednosti i standardne devijacije izračunate su pomoću računala korištenjem programa Excel, Microsoft®.



Slika 3.2 Shematski prikaz izvedbe tipičnog protočnog citometra Sastoji se od 3 glavna sustava: sustav tekućina, optike i elektronike. Sustav tekućina sastoji se od cjevčice s fiziološkom otopinom unutar koje se nalazi centralna cjevčica kroz koju se protiskuje uzorak i na taj način se hidrodinamičkim fokusiranjem organizira u niz pojedinačnih stanica. Sustav optike sastoji se od detektora prednjeg raspršenja FSC, detektora bočnog raspršenja SSC i nekoliko detektora fluorescencije FL. Sustav elektronike služi obradi signala, odnosno pretvara svjetlosne signale u elektroničke. FSC – *Forward Scatter Channel*, SSC – *Side Scatter Channel*, FL – *Fluorescence channel*, PMT – *Photomultiplier tubes*

4. REZULTATI

4.1 *In vitro* izolacija monocita Ficoll postupkom

Monociti su izolirani iz uzoraka krvi dobrovoljnih davatelja (500 mL) izolirani su Ficoll-Paque™ Plus postupkom. Uzorak krvi razrijeđen je otopinom PBS u omjeru 1:1 te je 20 mL tako priređene suspenzije pomiješano s 25 mL Ficoll otopine Ficoll-Paque™ Plus. Nakon centrifugiranja pri 400g 40 min jasno su se odjelili slojevi: plazma, smjesa limfocita i monocita (*eng.* buffy coat), granulociti te eritrociti. Izolirani *buffy coat* resuspendiran je 3 puta većim volumenom PBS te su stanice prebrojane u automatskom brojaču stanica. U prosjeku je broj stanica iznosio oko 900 000 st/mL. S obzirom da je ukupan volumen suspenzije stanica bio 110 mL, razrijeđena je RPMI medijem koji sadrži 10% fetalnog telećeg seruma (*eng.* fetal calf serum, FCS) kako bi bila dobivena željena koncentracija od $1,75 \times 10^6$ st/mL. Po 200 μ L stanične suspenzije prenijeto je u svaki bunarić mikrotitarske pločice (od 96 bunarića) tako da je konačan broj stanica u svakoj jažici bio 350 000. S obzirom na to da populacija monocita čini oko 15-20 % od ukupnih mononuklearnih stanica periferne krvi (*eng.* Peripheral Blood Mononuclear Cell PBMC), na ovaj način u svakoj jažici bilo je oko 50 000 monocita. Inkubacijom stanica 2 h pri standardnim uvjetima (37 °C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti) monociti su se adherirali, dok su limfociti ostali u supernatantu. Kako bi adherirani monociti diferencirali u makrofage, uzorci su inkubirani u RPMI mediju s 10% FCS pri standardnim uvjetima tijekom sljedeća dva dana.

4.2 Tretiranje stanica LPS-om i galektinom-3

Nakon dvodnevne (48 h) diferencijacije, dio makrofaga tretiran je otopinom lipopolisaharida (LPS) koncentracije 10 ng/mL tijekom 24h. Na ovaj način priređene su dvije populacije makrofaga, aktivirane LPS-om i neaktivirane. Poslije 24 sata sve stanice osim kontrolnih (potpuno netretirani makrofagi i makrofagi tretirani samo LPS-om) izložene su otopinama humanog rekombinantnog galektina-3, koncentracija 0,1, 0,5, 1 i 2 μ M koje su priređene razrjeđenjem matične otopine koncentracije 30 μ M. Svaki uzorak priređen je u triplicatu.

4.3 Priprema uzorka i otopina za protočnu citometriju

Za kvantitativnu detekciju humanog IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α protočnim citometrom korišten je komercijalni paket Human Th1/Th2plex Kit II (BenderMedSystem, BMS 716FF). Princip se temelji na imunofluorescentnoj metodi koja koristi zrnca (*eng.* beads), a primjenjiva je za određivanje količine ciljnih citokina u supernatantima staničnih kultura, serumu, plazmi, punoj krvi ili u ostalim tjelesnim tekućinama, no danas se koristi isključivo u istraživačke svrhe.

Otopine standarda, otopina suspenzije zrnaca, otopina primarnih protutijela konjugiranih biotinom te otopina streptavidin-fikoeritrin pripravljene su prema zadanim uputama proizvođača korištenog komercijalnog paketa, s time da su potrebni volumeni korigirani ovisno o broju uzoraka.

Pomiješano je 25 μ L smjese zrnaca, 25 μ L standarda/uzorka i 50 μ L smjese primarnih protutijela konjugiranih biotinom. Nakon dvosatne inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku stanice su dva puta isprane od nevezanih protutijela. Zatim je dodana otopina streptavidina obilježenog fikoeritrinom, nakon čega su stanice 2 puta ispirane puferom (*eng.* Assay Buffer) kako bi se uklonio nevezani streptavidin. Uzorci su resuspendirani u 250 μ L pufera te su analizirani protočnom citometrijom. Provedena su tri neovisna pokusa, a analiza svakog pojedinog uzorka obavljena je u triplikatu.

4.4 Određivanje citokina na protočnom citometru

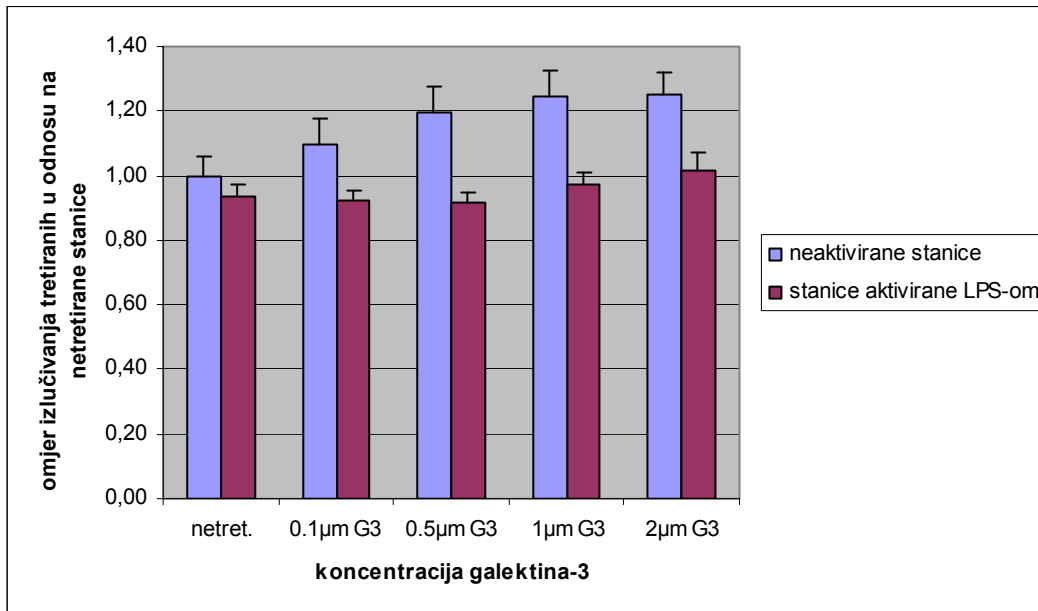
Prije analize uzoraka instrument je standardiziran otopinama *Flow check* i *Flow set* te za dodatnu provjeru ispravnosti instrumenta upotrebljena je otopina *Setup Beads* koja je dio komercijalnog paketa Human Th1/Th2plex Kit II.

Analizom u protočnom citometru dobiveni su podaci srednjeg intenziteta fluorescencije (*eng.* Mean Fluorescence Intensity, MFI) za svaki uzorak. Rezultati analiza statistički su obrađeni programom Excel, Microsoft[®].

4.4.1 Utjecaj egzogenog rh galektina-3 na izlučivanje citokina IL-10

IL-10 važan je immunosupresijski citokin koji potiskuje funkcije makrofaga i sintezu Th-1 citokina te na taj način usmjerava imunoreakciju prema humoralnoj imunosti. Na temelju rezultata analize uočljivo je da izlučivanje IL-10 neaktiviranih stanica blago raste u ovisnosti o koncentraciji egzogenog rekombinantnog humanog galektina-3 tek iznad 0,5 μ M koncentracije. Pri koncentraciji od 0,5 μ M dolazi do 20%-tnog porasta izlučivanja IL-10, a

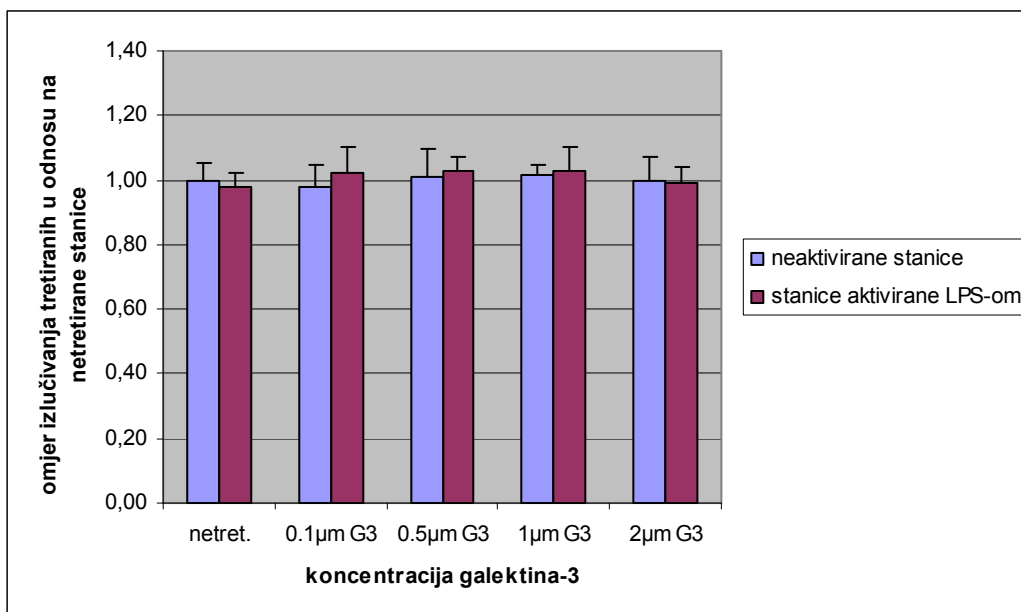
takav porast postignut je i s 1 te 2 μM rh-galektinom-3. Zanimljivo je da ne samo da tretman LPS-om (10 ng/mL) nije izazvao porast IL-10, već da u uzorcima stanicama tretiranim LPS-om i rh-galektinom-3 nije došlo do 20% porasta razine IL-10 koji je uočen kod stanica koje nisu prethodno tretirane LPS-om (slika 4.1).



Slika 4.1 Razina IL-10 u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

4.4.2 Utjecaj egzogenog rh-galektina-3 na izlučivanje citokina IL-12

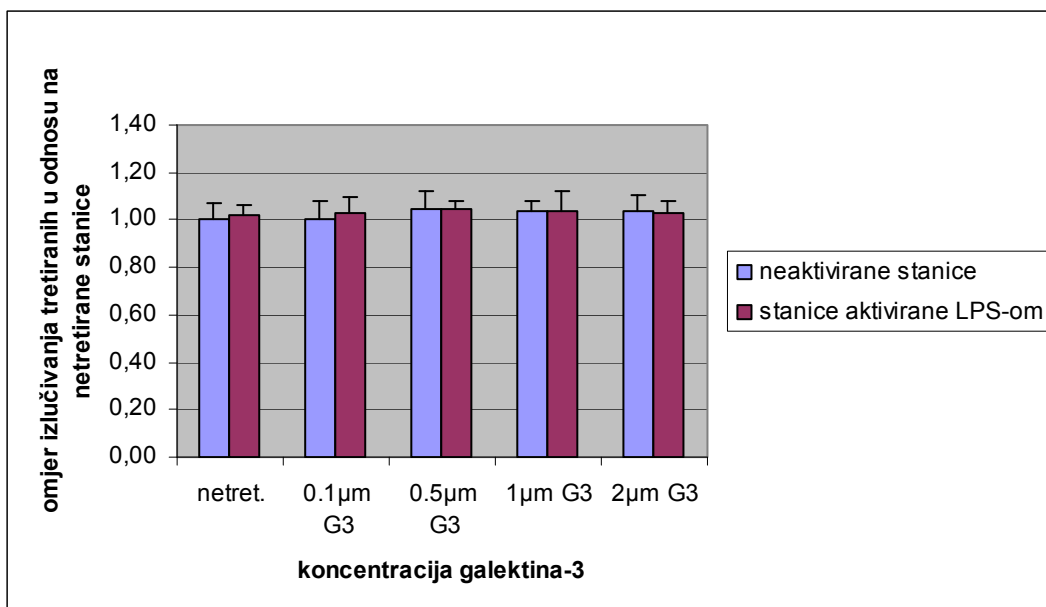
IL-12 za razliku od IL-10 usmjerava reakciju u stanični (a ne humoralni) oblik imunosti (Th1-citokin). Rezultati provedene analize pokazuju da niti aktivacija LPS-om niti galektinom-3, a niti tretmanom s oba agensa nisu potaknuli pojačano izlučivanje IL-12 (slika 4.2).



Slika 4.2 Razina IL-12 u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

4.4.3 Utjecaj egzogenog rh galektina-3 na izlučivanje citokina IL-1 β

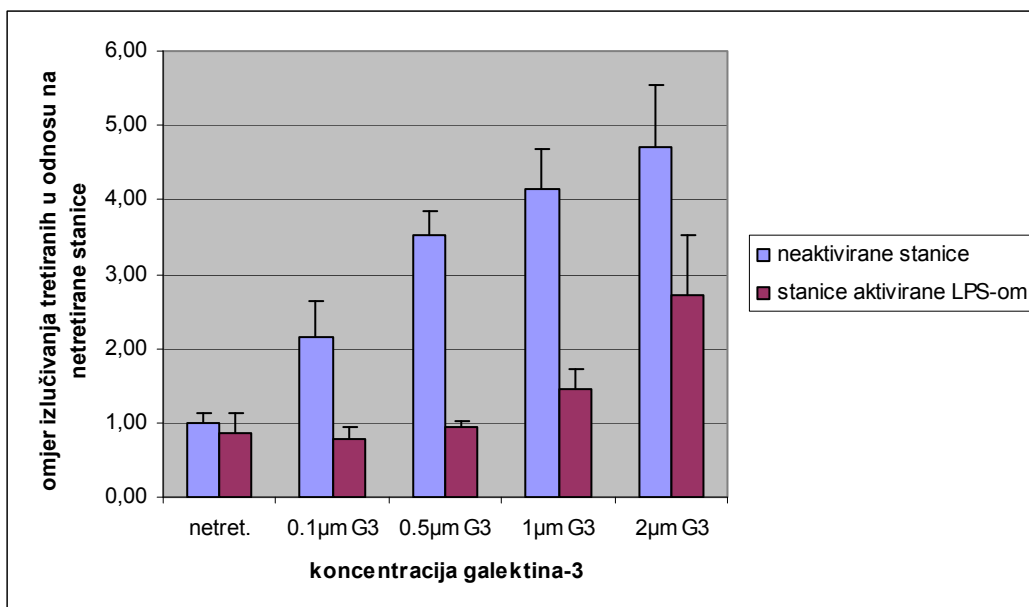
Proupalni citokin IL-1 obuhvaća dvije različite, ali strukturno i funkcijski slične molekule: IL-1 α i IL-1 β . IL-1 α nalazi se na staničnoj membrani, a IL-1 β se izlučuje u izvanstaničnu tekućinu i zato ga je moguće određivati metodom koja je korištena u ovom radu. Rezultati analize njegova izlučivanja pokazuju da su vrijednosti izlučivanja IL-1 β neaktiviranih i aktiviranih makrofaga jednake kao vrijednosti kontrolnih stanica. Također vidljivo da tretman stanica različitim koncentracijama egzogenog rekombinantnog humanog galektina-3 ne utječe na razinu izlučivanja IL-1 β niti u neaktiviranim niti u stanicama aktiviranim LPS-om (slika 4.3).



Slika 4.3 Razina IL-1 β u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

4.4.4 Utjecaj egzogenog rh-galektina-3 na izlučivanje citokina IL-6

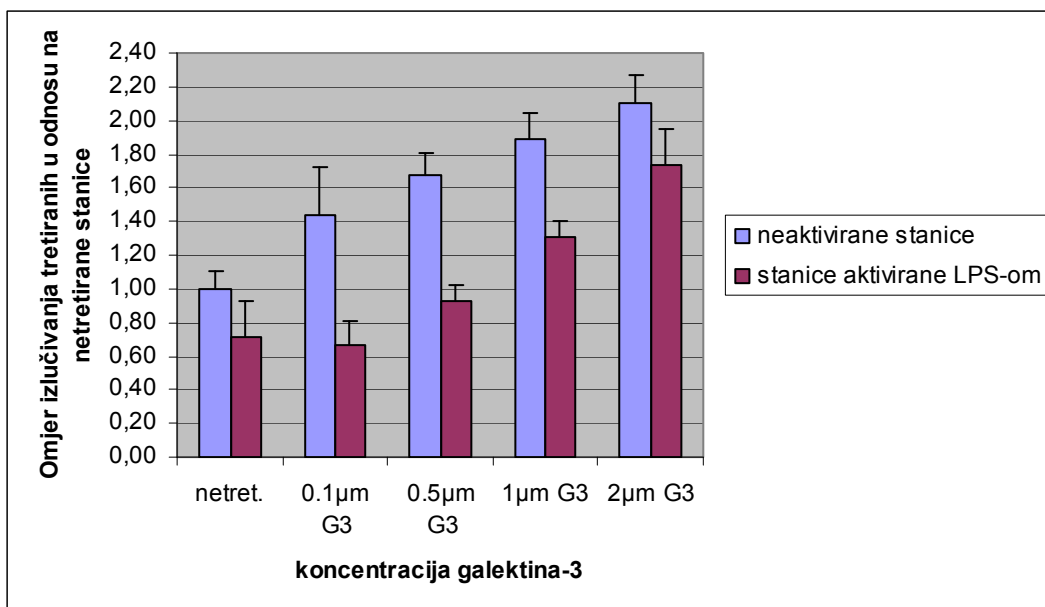
IL-6 svrstava se u proupalne citokine najviše zbog toga što potiče proizvodnju proteina akutne faze u jetri (njegov je učinak jači od IL-1 i TNF- α). IL-6 djeluje imunostimulacijski, a najvažnije mu je djelovanje da potiče diferencijaciju limfocita u plazma stanice, paje stoga važan čimbenik humoralne imunosti). Za IL-6 rezultati analize pokazali su signifikantan utjecaj egzogenog rekombinantnog humanog galektin-3 na njegovo izlučivanje. Razina izlučivanja IL-6 u stanicama tretiranim rh-galektinom-3 odnosu na netretirane stanice, značajno raste i to proporcionalno koncentraciji galektina-3 kojom su stanice tretirane. Već koncentracija rh-galektina-3 od 0,1 μ M podiže razinu IL-6 za 2 puta, 0,5 μ M za 3,5 puta, 1 μ M za 4, a 2 μ M za 4,5 puta. Zanimljivo je da LPS u primjenjenoj koncentraciji nije izazvao porast razine IL-6, dok je rh-galektinu-3 u stanicama koje su prethodno tretirane LPS-om, tek u koncentraciji od 1 μ M potaknuo izlučivanje IL-6 za 50% u odnosu na uzorke koji su tretirane samo s LPS-om. tek je koncentracija od 2 μ M izazvala porast izlučivanja IL-6 ua približno 2,5 puta (slika 4.4).



Slika 4.4 Razina IL-6 u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

4.4.5 Utjecaj egzogenog rh galektina-3 na izlučivanje citokina IL-8

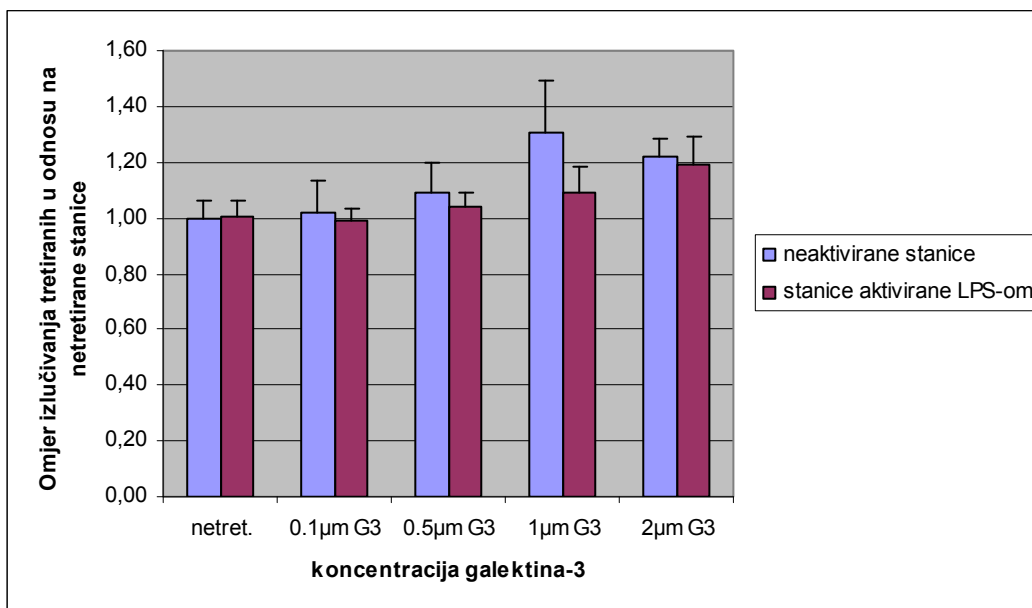
IL-8 na temelju svog djelovanj pripada proupalnim citokinima, ali on je za razliku od ostalih ispitivanih citokina, jedini kemokin. U prvom redu, on djeluje kemotaktički na upalne stanice i uzrokuje njihovu migraciju u upalna područja. Kemokine inače luče dendritičke stanice i makrofagi nakon poticaja produktima makrofaga ili nakon bilo kakavog drugog podražaja tkiva. Temeljem provedene analize, dobiveni su rezultati koji upućuju na činjenicu da egzogeni rekombinantni humani galektin-3 potiče izlučivanje IL-8 od strane netretiranih makrofaga, ali i stanica koje su pretretirane LPS-om. U slučaju izlaganja netretiranih stanica rh-galektinu-3 pojačano izlučivanje uočeno je već pri najnižoj koncentraciji galektin-3 (0,1 μM), za približno 50%. rh-Galektin-3 u koncentraciji od 0,5 μM podigao je razinu izlučivanja za 60%, 1 μM za 80%, dok je 2 μM izazvao 110%-tni porast razine IL-8. Kada su stanice izložene LPS-u došlo je do blagog, ali ipak statistički neznačajnog pada razine IL-8, a značajan pad razine (~40%) uočen je kada su stanice nakon izlaganja LPS-u izložene 0,1 μM rh-galektinu-3. Izlaganjem stanica tretiranih LPS-om rh-galektinu-3 u koncentraciji 0,5 μM razina IL-8 u mediju raste i približno odgovara koncentraciji IL-8 koju izlučuju ničim tretirane stanice, dok je pri višim koncentracijama rh-galektina-3 (1 i 2 μM) veća u odnosu na koncentraciju u stanicama tretiranim samo LPS-om 2, odnosno 3 puta veća (slika 4.5).



Slika 4.5 Razina IL-8 u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

4.4.6 Utjecaj egzogenog rh galektina-3 na izlučivanje citokina TNF- α

Čimbenik tumorske nekroze (TNF- α) ima jake lokalne proupalne učinke i na taj način izrazito povećava otpornost organizma na infekcije, posebice na uzročnike koji žive unutar stanica. Zanimljivo je da iako je egzogeni rekombinantni humani galektin-3 poznati proupalni signal, provedenom analizom dobiveni su rezultati koji pokazuju da on ne tuječe na vrijednosti izlučivanja TNF- α ni kod aktiviranih, niti kod neaktiviranih stanica. Razina izlučivanja u svim uzorcima odgovara razini zabilježene kod netretiranih stanica (slika 4.6).



Slika 4.6 Razina TNF- α u uzorcima netretiranih makrofaga i makrofaga tretiranih LPS-om i/ili rh-galektina-3.

5. RASPRAVA

Danas je poznato da je funkcionalna raznolikost kalupom zadanog genoma posljedica mnogobrojnih postranslacijskih modifikacija. Njihova raznolikost i iznimna mogućnost generiranja toliko različitih, a opet specifičnih i jedinstvenih struktura prirode i organizma je zapanjujuća. Jedna od najvažniji i najučestaliji postranslacijskih modifikacija je glikozilacija, pa su stoga glikani najzastupljeniji i najraznolikiji biopolimeri u prirodi. (Cooper i Hausman, 2004) Glikani su uključeni u mnoge medicinske probleme, kao što su mukopolisaharidoze, kongenitalni poremećaji glikozilacije (CDGs), infekcije mikroorganizmima, alergije, autoimune bolesti i drugi imunološki poremećaji, razvoj tumora i metastaziranje, odbacivanje ksenotransplantata te individualni (ne)odgovor na terapiju. (Rabovich i Toscano, 2009) Upravo zbog ovih razloga velika važnost se danas pridaje istraživanju lektina, fizioloških receptora glikokonjugata. Među njima, evolucijski stara i posebno zanimljiva je obitelj galektina, specifičnih po vezanju β -galaktozidnih struktura preko evolucijski očuvanih slijedova domene koja prepoznaje ugljikohidrate (*eng.* carbohydrate-recognition domain, *CRD*). (Barondes SH i sur., 1994) Galektin-3 jedinstveni je član ove obitelji po samoj svojoj strukturalnoj organiziranosti. Svojim specifičnim interakcijama sa raznolikim unutar- i izvanstaničnim proteinima, galektin-3 utječe na brojne biološke procese te se je uključen u različita fiziološka i patofiziološka stanja, kao što su rast, imunosne reakcije i neoplastične transformacije. Posebice je zanimljiva njegova uloga u regulaciji fizioloških i patofizioloških procesa stanica monocitno-makrofagne loze, koji su ključni sudionici nespecifične obrane organizma. (Liu FT i sur., 1995)

Nespecifična imunosna obrana je prva crta obrane organizma od bilo kojeg stranog mikroorganizma ili toksina, a stanice koje prve dolaze u dodir sa stranim tvarima su upravo fagociti, u koje uz makrofage ubrajamo granulocite i stanice "prirodne ubojice" (*eng.* Natural Killers, NK). Monociti nastaju u koštanoj srži, a u krvi borave samo jedan do četiri dana i potom odlaze u tkiva gdje postaju tkivni makrofagi. Makrofagi su glavni čistači tkivnih prostora gdje fagocitiraju apoptotične stanice, oštećene eritrocite, različite mikroorganizme, a među ostalim funkcijama su im kemotaksija, predočenje anitgena limfocitima T, liziranje mikroorganizma i lučenje više od 60 različitih tvari. Makrofagi luče brojne proupalne citokine, kao što su IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α . S obzirom na to da je galektin-3 snažan proupalni signal (Liu, 2005), u ovom je radu ispitan njegov utjecaj na lučenje gore navedenih proupalnih citokina koje luče makrofagi. U svrhu dobivanja makrofaga u našem istraživanju koristili smo Ficoll-PaqueTM Plus metodu koja je provjereno učinkovita i pouzdana metoda za *in vitro* izolaciju monocita. Izolirani monociti iz uzorka venske krvi dobrovoljnih davatelja dvodnevnom inkubacijom diferencirani su do makrofaga. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj egzogenog rekombinantnog humanog galektina-3 na lučenje citokina IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 i TNF- α neaktiviranih i LPS-om aktiviranih makrofaga. Kako bismo aktivirali makrofage

dio uzoraka tretiran lipopolisaharidom (10 ng/mL) koji je dokazano jedan od najsnažnijih egzogenih čimbenika aktivacije makrofaga. Ipak, izabrana koncentracija LPS je relativno mala i izabrana je stoga što je pokazano da ima blag aktivacijski učinak na makrofage, ne uzrokujući dramatične promjene morfologije i fiziologije stanica (Mey A i sur., 1996). Za određivanje količine izlučenih citokina korištena je metoda protočne citometrije koja je uvelike pridonijela razvoju imunologije, odnosno istraživanju stanica imunskog sustava. Na površinske stanične antigene (primjerice, različite receptore, enzime, ionofore...) moguće je vezati specifična fluorescentno protutijela te na taj ih način obilježiti. U ovom istraživanju razina citokina u mediju je određena uporabom komercijalnih mikrosfera (*eng.* beads) koje su prekrivene primarnim protutijelima razvijenim naspram ispitivanih analita. Svaka pojedina vrsta protutijela vezana je na specifičnu vrstu mikrosfera koja se od ostalih u smjesi razlikuje po veličini i intenzitetu autofluorescencije. Nakon vezanja antigena na kompleks mikrosfera-protutijelo, drugim specifičnim protutijelom koje je obilježeno biotinom, prepoznaje se drugi epitop na antigenu (analitu). Detekcija se provodi streptavidinom koji je obilježen fluorokromom fikoeritriinom. Intenzitet fluorescencije koja potječe od fikoeritrina (unutar određene populacije mikrosfera) proporcionalan je količini antigena.

Kontrolnu skupinu u ovom istraživanju predstavljali su uzorci netretiranih makrofaga (koji su diferencirani iz monocita tijekom 48-satne kultivacije pri standardnim uvjetima). Količini pojedinog citokina koju su izlučile netretirane stanice pripisana je vrijednost 1 (bazalna razina), te su sve ostale vrijednosti dobivene za taj citokin u stanicama tretiranim LPS-om i/ili galektinom-3 izražene u odnosu na tu vrijednost (relativne vrijednosti). Razlog tomu je što su za tri provedena neovisna pokusa korišteni uzorci krvi 3 davatelja. Rezultati su pokazali da se bazalne količine citokina razlikuju, prije svega zbog biološke varijabilnosti. Za aktivaciju makrofaga korišten je LPS u relativno niskoj koncentraciji (10 ng/mL). Premda je bilo za očekivati da će doći do aktivacije makrofaga što bi rezultiralo povećanim izlučivanjem citokina, to nije uočeno; razine svih mjerenih citokina u makrofagima odgovarale su onima u netretiranim stanicama. Moguće je da je razlog tomu što da neki od dobrovoljnih davatelja krvi u obrascu za informirani pristanak nije naveo neku preboljenu bolest unutar mjesec dana (primjerice prehladu, gripu) ili je pak moguće da je trenutno izložen nekom blagom obliku alergije ili nekom procesu u kojem sudjeluje imunski odgovor, a kojeg ispitanik nije svjesan).

Na temelju dobivenih rezultata uočljivo je da egzogeni galektin-3 značajno utječe na izlučivnje nekih od citokina, dok na druge nema utjecaja. Tako primjerice, na razinu izlučivanja TNF- α , IL-12 i IL-1 β ne utječe niti LPS, niti galektin-3. U slučaju IL-10 porast razine izlučenog citokina uočena je kada su makrofagi bili izloženi galektinu-3 u koncentraciji 0,5 μ M ili višoj, dok u slučaju izlaganja samom LPS ili u kombinaciji s rh-galektinom-3 nije došlo do promjene razine izlučivanja u odnosu na netretirane stanice.

Značajan učinak rh-galektina-3 na povećanje lučenja citokina, uočen je u slučaju IL-6 i IL-8. U slučaju IL-6 izlučivanje proporcionalno raste u ovisnosti o koncentraciji egzogenog galektina-3 i kod netretiranih stanica i kod stanice pretretiranih LPS-om, a posebice neaktiviranih stanica. Tako, primjerice 0,1 μM galektin-3 potiče 2 puta, 0,5 μM 3,5 puta dok 1 μM 4 puta, a 2 μM čak 4,5 puta.

Utjecaj galektina-3 na lučenje IL-8 značajnije je povećano (više od 1,5 put) pri koncentraciji 1 μM egzogenog galektina-3 i to za neaktivirane makrofage, dok 2 μM povećava stvaranje IL-8 za 2,1 put.

U prethodnim istraživanjima provedenim na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju FBF, pokazano je da egzogeno dodani rekombinantni humani galektin-3 u koncentraciji od 2 μM , dovodi do apoptoze stanica pa nije prikladna za istraživanje imunomodulacijskog djelovanja galektina-3, dok je 1 μM egzogeni rekombinantni humani galektina-3 neškodljiv za stanice, a ima najjači učinak na neke od ispitivanih interelukina (slika 5.1). Stoga će u daljnjim istraživanjima mehanizama djelovanja rh-galektina-3 biti primjenjivana upravo ta koncentracija.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa, dobivenih rezultata i rasprave moguće je zaključiti sljedeće:

- ❖ Egzogeni rekombinantni humani galektin-3 utječe na ekspresiju proupalnih citokina, IL-6, IL-8 i IL-10, u stanicama makrofaga.
- ❖ Posebno značajan utjecaj zapažen je pri koncentraciji 1 μ M.
- ❖ 1 μ M koncentracija dokazano je optimalna koncentracija za istaživanje utjecaja egzogenog rekombinantnog galektina-3 na izlučivanje različitih citokina.
- ❖ Za IL-12, IL-1 β i TNF α egzogeni rekombinantni humani galektin-3 nema značajno imunomodulacijsko djelovanje, odnosno ne povećava njihovu ekspresiju.
- ❖ Tretiman stanica lipopolisaharidom u koncentraciji 10 ng/mL nije izazvao, očekivano, citokina IL-10, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF α što bi značilo da je ova koncentracija premala za značajno aktiviranje makrofaga, odnosno poticanje imunološkog odgovora.
- ❖ Galektin-3 ima snažno imunomodulacijsko djelovanje na makrofage koje se očituje putem pojačanog izlučivanja nekih od proupalnih citokina.

7. ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo prof.dr. Jerki Dumić što nam je omogućila rad na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i time nam ukazala čast i povjerenje. Osim toga, neizmjereno se zahvaljujemo i na posvećenom vremenu te nesebičnoj pomoći koju nam je pružala tijekom izrade ovog rukopisa. Mentorice, veliko hvala na nadahnuću, optimizmu i motivaciji za bavljenje znanosti te svemu što ste nas naučili!

Posebnu zahvalnost želimo iskazati dipl.ing. Ruđeru Novaku, što nam je sa strpljivošću, humorom, neiscrpnom energijom te mnoštvom korisnih savjeta prve susrete sa znanstvenim svijetom i problemima učinio manje stresnim. Sjećanja na vesele i ozbiljne zajedničke trenutke provedene u laboratoriju još dugo ćemo pamtiti.

Dužni smo se zahvaliti svim anonimnim dobrovoljnim davateljima krvi i tehničkom osoblju Hrvatskog zavoda za transfuziologiju, Petrova 3, Zagreb.

Veliko hvala Inisu na pruženom razumijevanju i potpori te svima koji nas vole i koji su nas podržavali u ostvarenju naših ambicija.

8. LITERATURA

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjic D. *Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb*; 2004. p3-17, p123-139, p197-211

Argwal N, Sun Q, Wang SY, Wang JL. Carbohydrate-binding protein 35.I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem* 1993; 268: 14932-14939

Barondes SH, Castranovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Lffler H, Liu F-T, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM, Wang JL. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 Suppl 1998; 97: 77-89

Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Clin Lab Immunol* 5 Suppl 1976; 5: 9-15

Colnot C, Ripoche MA, Milon G, Montaguelli X, Crocker PR, Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 1998; 94: 260-296

Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. *Medicinska naklada, Zagreb*; 2004. p541-579, p298-313

Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu F-T, Lahoz C. Galectin-3 down regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 1998; 161: 385-389

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1572: 285-293

Dube DH and Bartozzi CR. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Rev Drug Discov* 2005; 4: 477-488

Dumić J, Dabelić S, Flogel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1760: 616-635

Dumić J, Lauc g, Hadzija M, Flogel M. Transfer to in vitro conditions influences expression and intracellular distribution of galectin-3 in murine peritoneal macrophages. *Z Naturforsch* 2000; C 55: 261-266

Elliott MJ, Strasser A, Metcalf D. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J Immunol* 1991; 147: 2957-2963

Furtak V, Hatcher F, Ochieng J. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 845-850

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WGE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity Chromatography. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1572: 232-254

Hsu DK, Liu F-T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate Journal* 2004; 19: 507-515

Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu F-T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156: 1073-1083

Hughes RC. Secretion of galectin family of mammalian carbohydrate-binding-proteins, *Biochim Biophys Acta* 1999; 1572: 172-185

Jeng KC, Frigeri, LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2) potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett* 1994; 42: 113-116

Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 555-564

Liu F-T. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 385-400

Liu F-T, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol* 1995; 147: 1016-1028

Malenica B. Nespecifična i specifična imunost. *Pediatr Croat* 2005; 49 (Supl 1): 23-30

Mey A, Leffer H, Hmama G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaharides via two independent sites. *J Immunol* 1996; 156: 1572-1577

Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the beta-galactoside binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J Biol Chem* 2000; 275: 26311-26315

Nangia-Makker P, Ochieng J, Christman JK, Raz A. Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation. *Cancer Res* 1993; 53: 5033-5037

Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate Journal* 2004; 19: 527-535

Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 788-791

Rabinovich GA, Toscano MA. Turning sweet on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature* 2009; 461: 338-352

Raimond J, Zimonjic DB, Mignon C, Mattein M, Popescu NC, Monsigny M, Legrand A. Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-22. *Mamm Genome* 1997; 8: 706-707

Sato S, Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269: 4424-4430

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanka T, Hirashima M, Liu F-T. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 2156-2164

Sano H, Hsu DK, Apgar L, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu F-T. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* 2003; 112: 389-397

Van den Brule F, Califice S, Castronovo. Expression of galectins in cancer:critical review. *Glycoconj J* 2004; 19: 537-542

9. SAŽETAK

IMUNOMODULACIJSKO DJELOVANJE GALEKTINA-3 NA LJUDSKE MAKROFAGE

Galektin-3, lektin koji veže β -galaktozidne strukture ima važnu ulogu u mnogim biološkim i (pato)fiziološkim procesima (adhezija, proliferacija, diferencijacija, apoptoza, upala, neoplastična transformacija, širenje metastaza). Galektin-3 jedan je od ključnih lektina urođene i stečene imunosti i smatra se jakim pro-upalnim signalom: potiče i pojačava respiratorni prasak monocita, djeluje kao kemoatraktant za monocite/ makrofage i potiče preživljenje upalnih stanica svojim protu-apoptotskim djelovanjem.

Cilj ovoga rada bio je ispitati razinu ciljnih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α) u mediju netretiranih ljudskih makrofaga i makrofaga aktiviranih lipopolisaharidom izloženih egzogeno dodanom rekombinantnom humanom galektinu-3. U tu svrhu korištena je metoda protočne citometrije uz komercijalni paket za određivanje topljivih citokina Human Th1/Th2plex Kit II (BenderMedSystem, BMS 716FF) na protočnom citometru Cytomics FC500 MPL (Beckman-Coulter). Monociti su izolirani Ficoll-PaqueTM Plus postupkom iz krvi dobrovoljnih davatelja. Nakon diferencijacije monocita kultiviranjem u adherirajućim uvjetima tijekom 48 sati, dio uzoraka je izložen aktivaciji lipopolisaharidom (10 ng/mL) tijekom 24 sata dok je drugi dio ne tretiran. Potom su stanice izložene djelovanju egzogeno dodanom rekombinantnom humanom galektinu-3 u koncentracijama 0,1, 0,5, 1 i 2 μ M tijekom 24 sata. Razina citokaina mjerena je u supernatantu stanica.

Rezultati su pokazali da galektin-3 ne djeluje na razinu IL-1 β , IL-12 i TNF α , ali potiče izlučivanje IL-8, IL-10 i TNF- α . Intenzitet njegovog djelovanja ovisi o primjenjenoj koncentraciji. Premda je najjače djelovanje kod sva tri interleukina izazvalo galektin-3 primjenjen u 2 μ M koncentraciji, u daljnjim će istraživanjima molekularnih mehanizama djelovanja galektina-3 biti korištena 1 μ M koncentracija, s obzirom na to da je u istraživanju, čiji rezultati nisu prikazani u ovom radu pokazano, da u koncentraciji od 2 μ M galektin-3 ima pro-apoptozno djelovanje na ljudske makrofage.

Predstavljeno istraživanje predstavlja značajan korak u razumijevanju biološke uloge galektina-3 u fiziologiji ljudskih makrofaga te će pridonijeti daljnjim istraživanjima molekularnih mehanizama ovih procesa.

Ključne riječi: galektin-3, ljudski makrofagi, citokini

10. SUMMARY

IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF GALECTIN-3 ON HUMAN MACROPHAGES

Galectin-3, a β -galactoside binding lectin exerts important roles in many biological and (patho)physiological processes (adhesion, proliferation, differentiation, apoptosis, inflammation, neoplastic transformation, spreading metastases). Being one of the key lectins of innate and acquired immunity, galectin-3 is considered a powerful pro-inflammatory signal. It triggers/promotes respiratory burst in monocytes, acts as a monocyte/macrophage chemoattractant and promotes survival of inflammatory cells through its anti-apoptotic activity.

The aim of this study was to ascertain the level of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α in the cultivating medium of untreated human macrophages and macrophages activated by lipopolysaccharide exposed to exogenously added recombinant human galectin-3. For that purpose flow cytometry technique was applied using commercially available kit for measurement of soluble cytokines Human Th1/Th2plex Kit II (BenderMedSystem, BMS 716FF) by flow cytometer Cytomics FC500 MPL (Beckman-Coulter). Human monocytes were isolated by Ficoll-Paque™ Plus procedure from healthy volunteers. After differentiation of the monocytes by cultivating in adherent conditions during 48 hours, a part of the samples was exposed to lipopolysaccharide (10 ng/mL) during 24 hours while the other part was untreated. Cells were exposed to exogenously added recombinant human galectin-3 in 0.1, 0.5, 1 and 2 μ M concentrations during 24 hours. The level of the target cytokines was measured in cell supernatant.

The results showed that galectin-3 did not affect the level of IL-1 β , IL-12 and TNF α , but induces secretion of IL-8, IL-10 and TNF- α . The intensity of its effects depends on applied concentration. Although the most prominent increases of the level of all three cytokines were achieved when galectin-3 was applied in 2 μ M concentration, in further studies of the molecular mechanism of galectin-3 effects 1 μ M concentration will be used, since it was shown (in the study which results are not presented in this work) that galectin-3 applied in 2 μ M concentration expresses pro-apoptotic effects on human macrophages.

The presented work represents important step in understanding of biological role of galectin-3 in the physiology of human macrophages and these results will contribute further investigation of the molecular mechanisms of these processes.

Key words: galectin-3, human macrophages, cytokines

11. ŽIVOTOPISI

Anđela Žic, absolventica studija Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu rođena je 26. studenog 1985. godine u Rijeci. Nakon završetka osnovne škole, pohađala je Salezijansku klasičnu gimnaziju u Rijeci te maturirala 2004. godine. Iste je godine upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Jedna je od najboljih studenata u generaciji s prosjekom ocjena 4,2.

Tomislav Pavičić, absolvent studija Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu rođen je 21. studenog 1985. godine u Zadru. Nakon završetka osnovne škole, pohađao je Gimnaziju Jurja Barakovića u Zadru te maturirao 2004. godine. Iste je godine upisao Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Jedan je od najboljih studenata u generaciji s prosjekom ocjena 4,1.