Utjecaj tvari s imunomodulatornim djelovanjem na galektin-3

Dabelić, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2004

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:513894

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sanja Dabelić

Utjecaj tvari s imunomodulatornim djelovanjem na galektin-3

Doktorska disertacija
predložena Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti biologije

Zagreb, 2004.

Istraživanje predstavljeno u ovom radu dio je projekta 0006611 "Biološka uloga glikozilacije i drugih posttranslacijskih modifikacija" financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. Eksperimentalni je dio rada obavljen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom doc. dr. sc. Jerke Dumić Belamarić.

Pitala sam se kako i čime istaknuti divne ljude bez čije podrške, pomoći i suradnje sve ovo gotovo da i ne bi bilo moguće ostvariti.

Mogla bih pričati o razumijevanju, povjerenju, spoznaji da možemo i znamo, ali postoji nešto više – što reći i kako objasniti vlastitu misao o prijateljstvu?!

Odgovor je neopisivo jednostavan i lijep jer prava je tek jedna jedina riječ –

HVALA!

SADRŽAJ

SADRŽAJ III

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA V

BASIC DOCUMENTATION CARD VI

1. UVOD 1

1.1 GALEKTINI 2

1.1.1 Galektin-3 3
1.1.1.1 Strukturna obilježja galektina-3 3
1.1.1.2 *LGALS3* – gen za galektin-3 4
1.1.1.3 Stanična raspodjela galektina-3 6
1.1.1.4 Sekrecija galektina-3 6
1.1.1.5 Specifičnost galektina-3 prema ugljikohidratnim strukturama 7
1.1.1.6 Uloge galektina-3 8
1.1.1.7 Galektin-3 u imunom odgovoru 10
1.1.1.8 Galektin-3 u autoimunim bolestima 10
1.1.1.9 Galektin-3 u tumorima 11

1.2 UPALA 12

1.2.1 Signalni putevi protein kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK) 13
1.2.1.1 Transkripcijski faktor AP-1 14
1.2.1.2 Transkripcijski faktor NF-κB 15
1.2.2 Tvari s imunomodulatornim djelovanjem 18
1.2.2.1 Nesteroidne protuupalne tvari (NSAIDs) 18
1.2.2.2 Steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem-glukokortikoidi 21

1.3 CILJ ISTRAŽIVANJA 24

2. MATERIJAL I METODE 25

2.1 MATERIJAL 26
2.1.1 Standardne kemikalije 26
2.1.2 Boje 27
2.1.3 Standardi 27
2.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija - kompleti 27
2.1.5 Protutijela 27
2.1.6 Pribor 28
2.1.7 Otopine i puferi 28
2.1.8 Gelovi za elektroforezu 29

2.2 METODE 30
2.2.1 Stanične kulture 30
2.2.2 Tretiranje stanica THP-1 aspirinom 30
2.2.3 Tretiranje stanica THP-1 indometacinom 31
2.2.4 Tretiranje stanica THP-1 hidrokortizonom 32
2.2.5 Tretiranje stanica THP-1 deksametazonom 33
2.2.6 Tretiranje diferenciranih stanica THP-1 aspirinom, indometacinom, hidrokortizonom i deksametazonom 33
2.2.7 Određivanje broja živih stanica bojanjem tripanskim modrilom 34
2.2.8 MTS test 34
2.2.9 Izolacija ukupne RNA 35
2.2.10 Određivanje koncentracije i kvalitete izolirane RNA 36
2.2.11 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom 36

2.2.12 Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata 38
2.2.13 Određivanje veličine i količine PCR produkata 40
2.2.14 Priprava staničnog homogenata 40
2.2.15 Određivanje koncentracije proteina 40
2.2.16 Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu 40
2.2.17 Postupak Western-blot 41
2.2.18 Statističke metode 41

3. REZULTATI 42

3.1 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 tijekom kultiviranja 43

3.2 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 48

3.3 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 53

3.4 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 57

3.5 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 61

3.6 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 tijekom diferencijacije stanica THP-1 pomoću PMA 65

3.7 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom kultiviranja 67

3.8 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1 71

3.9 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1 74

3.10 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1 77

3.11 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1 81

4. RASPRAVA 84

5. ZAKLJUČCI 96

6. LITERATURA 98

7. POPIS KRATICA I SIMBOLA 108

8. POPIS SLIKA I TABLICA 113

9. ŽIVOTOPIS 116

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište u Zagrebu Doktorska disertacija
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

UTJECAJ TVARI S IMUNOMODULATORNIM DJELOVANJEM NA GALEKTIN-3

Sanja Dabelić

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, Zagreb, Hrvatska

Galektin-3, lektin koji specifično prepoznaje β-galaktozidne strukture, djeluje kao jak proinflamatorni signal koji modulira staničnu proliferaciju i adheziju, kemotaksiju, fagocitozu te sintezu upalnih medijatora. Mnoge tvari s imunomodulatornim djelovanjem djeluju na signalne puteve u kojima sudjeluju i transkripcijski faktori čija su vezna mjesta prisutna u promotorskoj regiji gena za galektin-3 (*LGALS3*). Zbog česte uporabe ovih tvari u terapijske svrhe te važnosti galektina-3 u fiziologiji stanica monocitno-makrofagne loze, u ovom je radu ispitan utjecaj nesteroidnih (aspirina i indometacina) i steroidnih (hidrokortizona i deksametazona) tvari s imunomodulatornim djelovanjem primijenjenih u različitim terapijskim rasponima na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u nediferenciranim i diferenciranim stanicama monocitne stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja. Niti jedna od ispitanih tvari u primijenjenim koncentracijama tijekom 72 sata kultiviranja nije citotoksično djelovala na stanice. Količina mRNA za galektin-3 određena je primjenom metode RT-PCR praćene analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser, a količina galektina-3 u staničnim homogenatima Western-imunoblot metodom. Rezultati su pokazali da ispitivane tvari mijenjaju ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 te da njihovi učinci ovise o diferenciranosti stanica, koncentraciji primijenjene tvari kao i vremenu izlaganja. U nediferenciranim stanicama sve ispitane tvari svih primijenjenih koncentracija inhibiraju ekspresiju i *LGALS3* i galektina-3, a inhibitorni je učinak u korelaciji s vremenom izlaganja. Tijekom 48-satne preobrazbe nediferenciranih stanica u diferencirane, dolazi do snažne indukcije ekspresije i *LGALS3* (3 puta) i galektina-3 (3,5 puta). U diferenciranim stanicama sve ispitivane tvari u početku inhibiraju ekspresiju *LGALS3* nakon čega dolazi do uspostave konstitutivne razine mRNA, dok na proteinskoj razini dugotrajnije izlaganje ispitivanim tvarima potiče ekspresiju galektina-3. U oba slučaja, intenzitet promjena kao i njihov vremenski slijed ovise o vrsti i koncentraciji primijenjene tvari. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti da primijenjene tvari s imunomodulatornim djelovanjem utječu na različite signalne puteve kao i mehanizme regulacije ekspresije galektina-3 na genskoj i proteinskoj razini, a da promjene ovise o vrsti i koncentraciji tvari te vremenu izloženosti, kao i o diferencijacijskom stupnju stanica. Dobiveni rezultati predstavljaju važan korak u razumijevanju djelovanja tvari s imunomodulatornim djelovanjem na galektin-3 u stanicama monocitno-makrofagne loze, a time i na njihove brojne fiziološke funkcije.

(117 stranica/40 slika/8 tablica/181 literaturnih navoda/jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, A. Kovačića 1, Zagreb

Ključne riječi:
aspirin/deksametazon/ekspresija/galektin-3/hidrokortizon/indometacin/*LGALS3*

Voditelj: Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić, docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivan Bašić, redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić, docent Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Dražena Papeš, redoviti profesor Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

Rad prihvaćen dana: 8. prosinca 2004.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

EFFECTS OF IMMUNOMODULATORY DRUGS ON GALECTIN-3

Sanja Dabelić

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia

Galectin-3, a β-galactoside binding lectin, acts as a strong pro-inflammatory signal that modulates cell proliferation and adhesion, chemotaxis, phagocytosis and synthesis of inflammatory mediators. Many immunomodulatory drugs affect signaling pathways that comprise transcriptional factors which binding sites are present in the promoter region of galectin-3 gene (*LGALS3*). Because of the frequent therapeutic application of immunomodulatory drugs and the importance of galectin-3 in the physiology of monocytes and macrophages, we investigated effects of non-steroidal (aspirin and indomethacin) and steroidal (hydrocortisone and dexamethasone) immunomodulatory drugs, applied in different therapeutic ranges, on the expression of *LGALS3* and galectin-3 in non-differentiated and differentiated cells of monocytic THP-1 cell-line during 72 hours of cultivation. None of the studied drugs in applied concentrations during 72 hours of cultivation had cytotoxic effect on the cells.

The targeted mRNA level was evaluated using relative RT-PCR technique and analysis on the AbiPrism 310 Genetic Analyser. Galectin-3 expression in cell homogenates was determined by western-immunoblot analysis. The results showed that the chosen immunomodulatory drugs affect *LGALS3* and galectin-3 expression and that their effects depend on cell differentiation level, concentration of the applied drug, as well as time of exposure. In undifferentiated cells all of the studied drugs (in all applied concentrations) inhibit expression of *LGALS3* and galectin-3, and inhibitory effect correlates with time of exposure. Differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages during 48-hours strongly induces expression of *LGALS3* (3 times) and galectin-3 (3,5 times). In differentiated cells, all studied drugs inhibited *LGALS3* expression at the beginning, but during further incubation constitutive level of galectin-3 mRNA was reestablished. On the protein level, prolonged exposure to all applied drugs induce galectin-3 expression. Intensity and time-course of both, mRNA and protein level changes depend on drug type and on applied concentration. These findings indicate that the applied immunomodulatory drugs affect different signaling pathways and mechanisms of regulation of galectin-3, on both mRNA and protein level. The changes depend on drug type and concentration, time of exposure as well as cell differentiation level. The results obtained in this study represent important step in the understanding of the effects of immunomodulatory drugs on galectin-3 in monocytes/macrophages, hence on their numerous physiological roles.

(117 pages/40 figures/8 tables/181 references/original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb

Key words:
aspirin/dexamethasone/expression/galectin-3/hydrocortisone/indomethacin/*LGALS3*

Supervisor: Dr. Jerka Dumić Belamarić, assistant professor

Reviewers: Dr. Ivan Bašić, professor
Dr. Jerka Dumić Belamarić, assistant professor
Dr. Dražena Papeš, professor

Thesis accepted: December 8, 2004.

UVOD

Glikozilacija je proces enzimskog pripajanja oligosaharidnih struktura proteinima ili lipidima pri čemu nastaju glikokonjugati – glikoproteini, proteoglikani, glikozilfosfatidil inozitol sidra ili glikolipidi. Prisutnost glikanskih struktura na glikokonjugatima utječe na njihovu veličinu, stabilnost, naboj i antigena svojstva.
Zbog svoje iznimne strukturne raznolikosti glikani predstavljaju idealan medij za pohranu bioloških informacija. Molekule koje mogu "protumačiti" te informacije su lektini, fiziološki receptori glikana. Nalazimo ih u mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Prepoznavanje ugljikohidrata lektinom temelji se na specifičnim interakcijama domene koja prepoznaje ugljikohidrate (*engl.* carbohydrate recognition domain, CRD) i ugljikohidrata. Lektinska vezna mjesta su niskog afiniteta, ali su brojna i visoke specifičnosti. Lektini su prvi put otkriveni u biljaka krajem prošlog stoljeća, te su, nedugo nakon otkrića, klasificirani u skupine ovisno o ugljikohidratnim strukturama koje prepoznaju. Razvojem molekularne biologije stvoren je temelj za novi način klasifikacije lektina, ovisno o njihovoj strukturnoj homologiji i evolucijskoj povezanosti. Biljni su lektini podijeljeni prema biljnim vrstama iz kojih su izolirani – lektini mahunarki i lektini žitarica. Životinjski su lektini na osnovi aminokiselinskog slijeda dijela molekule koji prepoznaje ugljikohidrate podijeljeni u četiri skupine: tip C, tip S, tip P te tip I lektina (Tablica 1.1).

Tablica 1.1 Obitelji životinjskih lektina

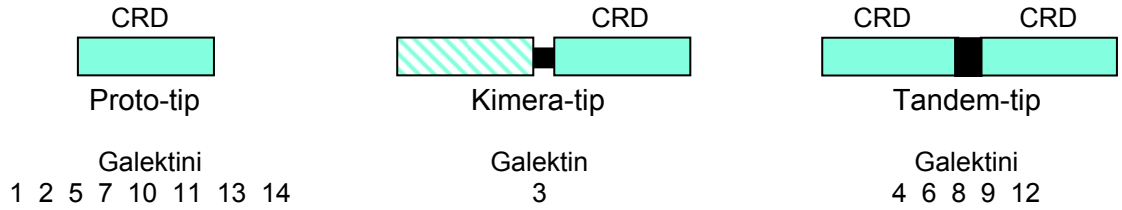
Lektini	Dosad poznati broj članova	Ovisnost o Ca^{2+}	Specifičnost
tip C	<20	+	različita
tip S	>14	-	β-Gal, poli-LacNAc
tip P	2	+/-	Man-6-P
tip I	>5	-	različita

Brojni se biološki procesi, kao što su oplodnja, embrionalni razvoj, diferencijacija, adhezija i imuni odgovor temelje na visokospecifičnim interakcijama oligosaharidnih struktura glikokonjugata i lektina.

1.1 GALEKTINI

Galektini su lektini koje karakterizira specifično prepoznavanje β-galaktozidnih jedinica glikokonjugata te veliki broj očuvanih aminokiselinskih ostataka unutar domene odgovorne za prepoznavanje ugljikohidrata [1]. Do danas je poznato 14 različitih galektina sisavaca, a mnogi su galektini izolirani i iz drugih kralješnjaka, bezkralješnjaka (kao što su nematode i insekti) pa čak i iz protista (spužvi i gljiva)[2]. Kako se prvotno smatralo da je za punu aktivnost ovih lektina potrebna prisutnost reducirajućih agensa (tiola), njihov je stari naziv bio lektini tipa S. Kasnije je utvrđeno da to ne vrijedi za sve članove ove obitelji te su nazvani galektinima [3]. Svi galektini sadrže barem jednu domenu CRD izgrađenu od oko 130 aminokiselina, od kojih su mnoge visokoočuvane. Prema

strukturnim obilježjima podijeljeni su u tri skupine: proto-tip, kimera-tip i tandem-tip (Slika 1.1).



Slika 1.1 Strukture galektina. Proto-tip sadrži jednu domenu CRD, kimera-tip sadrži jednu domenu CRD povezanu s domenom bogatom prolinom i glicinom, a tandem-tip sadrži dvije CRD domene.

Većina je galektina smještena u citosolu; međutim, neki od njih nalaze se i u jezgri i u izvanstaničnom prostoru, premda ne sadrže sljedove karakteristične za upućivanje proteina izvan stanice niti transmembransku domenu. Njihova točna uloga nije još u potpunosti razjašnjena, ali je poznato da mnogi galektini sudjeluju u održavanju homeostaze modulirajući stanični rast, kontrolirajući stanični ciklus te inducirajući ili inibirajući apoptozu [4].

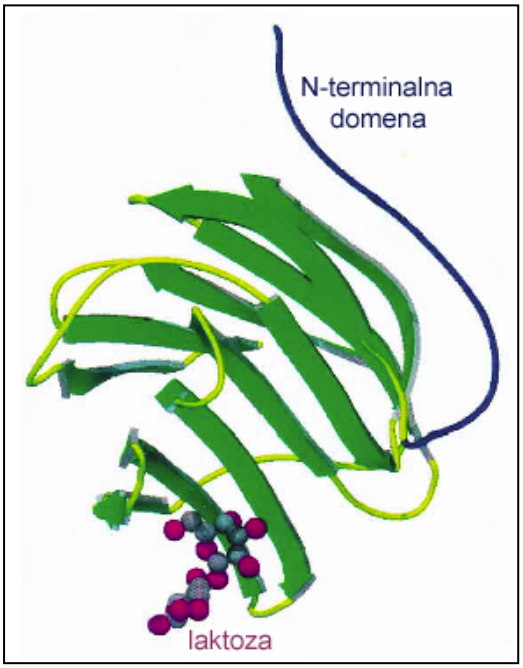
1.1.1 GALEKTIN-3

1.1.1.1 Strukturna obilježja galektina-3

Prije no što usvojeno današnje nazivlje, galektin-3 bio je poznat i pod imenom CBP30/35 [5], Mac-2 [6], L-29 [7], L-34 [8], LBP [9] i εBP [10]. Galektin-3 je monomer relativne molekulske mase 26 200 do 30 300, ovisno o vrsti iz koje je izoliran, premda se približna molekulska masa, određena denaturirajućom SDS-poliakrilamidnom elektroforezom, čini veća (29-35 kDa). Humani je galektin-3 izgrađen od 249 aminokiselina, mišji od 264, a štakorski od 262 aminokiselina, koje tvore tri strukturno različite domene: malu N-terminalnu domenu, domenu koja sadrži ponavljajuće elemente i C-terminalnu domenu koja je odgovorna za lektinsku aktivnost galektina-3.
Mala N-terminalna domena izgrađena je od 12 aminokiselina i vjerojatno je odgovorna za izlučivanje galektina-3 iz stanice, obzirom da delecija prvih 11 aminokiselina sprečava njegovu sekreciju [11]. Galektin-3 može biti fosforiliran na položaju Ser^{6} i Ser^{12}, s time da je više od 90% fosfata prisutno na Ser^{6}, a manje od 10% na Ser^{12} [12]. Nefosforilirani oblik galektina-3 (pI 8,7) prisutan je isključivo u jezgri, a fosforilirani (pI 8,2) u jezgri i citoplazmi [13]. Čini se da je fosforilacija Ser^{6} nužan preduvjet za antiapoptozno djelovanje galektina-3 [14, 15]. Fosforilacijom se međutim smanjuje afinitet vezanja glikoproteinskih liganada na galektin-3 [16-18]. Galektin-3 (izoliran iz staničnih ekstrakata) acetiliran je na svom N-terminalnom kraju [19].
Na malu N-terminalnu domenu nastavlja se domena izgrađena od 8-13 ponavljajućih motiva, strukture nalik kolagenu. Nazvana je domena bogata glicinom i prolinom, s obzirom na to da je slijed aminokiselina u motivu: -Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly-X-X-X- (gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu). Taj visokoočuvani slijed aminokiselina je ~25% istovjetan slijedu nekih

heterogenih nuklearnih ribonukleoproteinskih (hnRNP) kompleksa. Čini se da ova domena sudjeluje u stvaranju dimera ili visokouređenih oligomera [20] koji omogućavaju multivalentne interakcije neophodne za biološku aktivnost galektina-3. Ujedno je supstrat za djelovanje metaloproteinaza –2 i –9 (MMP). Kidanjem veze Ala^{62}-Tyr^{63} djelovanjem MMP nastaje fragment galektina-3 veličine 22 kDa s očuvanom lektinskom aktivnošću, ali smanjenom mogućnošću stvaranja homoagregata.

Domena koja prepoznaje ugljikohidrate obuhvaća ~130 aminokiselina C-terminalnog dijela galektina-3. Sadrži hidrofilna i hidrofobna područja, te je stoga globularne prirode. Građena je od 12 β-lanaca organiziranih u dvije β-nabrane ploče [21] (Slika 1.2).



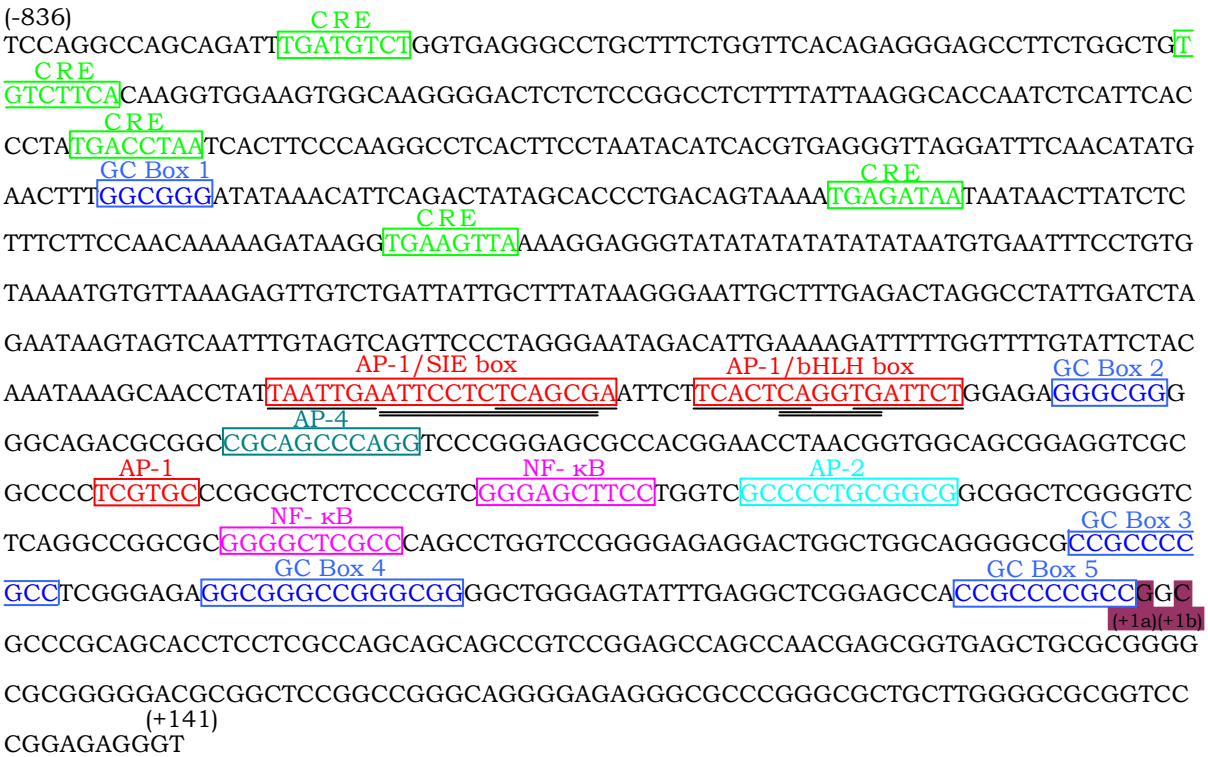
Slika 1.2 Struktura galektina-3. Domena koja prepoznaje ugljikohidrate (prikazana u kompleksu s laktozom) izgrađena je od 12 β-lanaca (zeleno) organiziranih u dvije β-nabrane ploče. Hipotetska konformacija dijela N-terminalne domene prikazana je plavom bojom [22].

C-terminalna domena djelomično je (<30%) homologna BH1 domeni proteina antiapoptoznog faktora Bcl-2. Čini se da je slijed NWGR (Asn-Trp-Gly-Arg), prisutan u CRD galektina-3 kao i u BH1 domeni Bcl-2, odgovoran za antiapoptozno djelovanje oba proteina. Domena CRD vjerojatno ima ulogu i prilikom stvaranja oligomera galektina-3 [23, 24].

1.1.1.2 *LGALS3* – gen za galektin-3

Galektin-3 je kodiran genom *LGALS3* (*engl.* lectin, galactoside-binding, soluble), smještenom kod ljudi na kromosomu 14, lokusu q21-q22 [25]. *LGALS3* je izgrađen od približno 17 kb, koje su organizirane u šest eksona i pet introna. Postoje dva mjesta početka transkripcije, nazvana +1a i +1b, koja se nalaze 52, odnosno 50 nukleotida (nt) uzvodno od spoja ekson I – intron 1. Početno mjesto translacije nalazi se u eksonu II. Domena bogata prolinom i glicinom kodirana je unutar eksona III, dok je slijed koji kodira

C-terminalnu domenu (CRD) smješten u potpunosti unutar eksona V. Genski fragment koji obuhvaća slijed od –836 nt do +141 nt (relativno od +1a) ima snažnu promotorsku aktivnost. U promotorskoj je regiji smješteno više "GC box" motiva za vezanje posvuda prisutnog transkripcijskog faktora Sp1, što je osobina promotora konstitutivno eksprimiranih (*engl.* housekeeping) gena. No kako ekspresija *LGALS3* raste prilikom odgovora stanica na stimulaciju serumom, *LGALS3* se smatra genom ranog odgovora (*engl.* immediate early gene). Regija koja odgovara na aktivaciju serumom smještena je između –513 i –339 nt i između –339 i –229 nt; dodatna aktivacijska regija smještena je između –105 i –15 nt. U promotorskoj regiji identificirani su sljedovi za vezanje mnogih transkripcijskih faktora, primjerice Sp1, AP-1, NF-κB i CREB (*engl.* cAMP-response element binding factor). Sazrijevanjem pre-mRNA u mišjim fibroblastima 3T3 nastaju dva oblika mRNA, koji se razlikuju u 27 bp neprevedenog slijeda eksona I, a u protein se prevode jednakom učestalošću [26, 27]. Značenje alternativnog sazrijevanja do danas nije objašnjeno [28], premda je utvrđeno da na taj način mogu nastati forme galektina-3 (veličine 36 kDa) koje sadrže transmembransku domenu [28]. *LGALS3* je neobično građen-unutar njega se nalazi još jedan gen, *galig*. Naime, drugi intron unutar *LGALS3* sadrži interni promotor, čijom se aktivacijom stvaraju dva transkripta. Oni zbog pomaknutog okvira čitanja kodiraju proteine u potpunosti različite od galektina-3 [29].



Slika 1.3 Slijed nukleotida promotorske regije ljudskog *LGALS3*. Prikazani slijed proteže se od –836 nt uzvodno i +141 nt nizvodno od mjesta početka transkripcije (+1a). Mjesta vezanja transkripcijskih faktora obilježena su bojama. U sekvencama "AP-1/SIE box" i "AP-1/bHLH box" niz DNA za vezanje transkripcijskog faktora AP-1 podvučen je jednostrukom linijom, dok je niz za vezanje SIE, odnosno bHLH podvučen dvostrukom linijom. ([25]).

Ekspresija *LGALS3* se mijenja pod utjecajem različitih stimulansa. Ovisno o tipu stimulansa, aktiviraju se ili inhibiraju pojedini transkripcijski faktori koji se mogu vezati na promotorske regije *LGALS3* [30, 31]. O signalnim putevima kojima se regulira ekspresija *LGALS3* zna se vrlo malo. Nedavna su istraživanja pokazala da u regulaciji ekspresije galektina-3 u makrofagima važnu ulogu ima signalni put protein kinaza aktiviranih mitogenima (Ras/MEKK1/MKK1) kojim se aktivira transkripcijski faktor AP-1 [32].

1.1.1.3 Stanična raspodjela galektina-3

Galektin-3 eksprimiraju različite stanične vrste, primjerice fagocitni leukociti (monociti, makrofagi, dendritske stanice, mastociti i neutrofili) epitelne stanice, fibroblasti i aktivirani limfociti T, kao i velik broj tumorskih stanica [33]. Prisutnost galektina-3 utvrđena je u gotovo svim staničnim odjeljcima, ovisno o tipu stanice. U jezgri se galektin-3 nalazi u fosforiliranom i nefosforiliranom obliku [13, 34]. U sklopu ribonukleoproteinskog kompleksa, neovisno o svojoj lektinskoj aktivnosti (premda pomoću domene CRD) veže jednolančanu DNA ili RNA te djeluje kao čimbenik sazrijevanja pre-mRNA [35]. Čini se da galektin-3 može čak modulirati transkripcijsku aktivnost pojedinih transkripcijskih faktora [36]. Galektin-3 nalazimo i u mitohondrijima [37], u fagosomima makrofaga i egzosomima dendritskih stanica [38, 39]. U većini stanica galektin-3 nalazi se mahom u citosolu, isključivo u fosforiliranom obliku. Može se u različitoj mjeri izlučivati u izvanstanični prostor, te se potom vezati na izvanstanične glikoproteine kao i na membranske receptore okolnih stanica ili stanice iz koje je izlučen. Po vezanju liganada, galektin-3 može oligomerizirati.

1.1.1.4 Sekrecija galektina-3

Kapacitet sekrecije galektina-3 pojedinih tipova stanica je jako različit. Primjerice, mirujući mišji makrofagi WEHI-3 izlučuju izrazito malo (ako uopće) galektina-3, stanice BHK [40] i MDCK [41] 10-15%, makrofagi J774.2 30-45% [40], a stanice CHO-K1 gotovo 100% ukupne količine galektina-3 [42]. Sekrecija galektina-3 ovisna je i o razvojnom stupnju i aktiviranosti stanice. Mirujući makrofagi izlučuju malo, a makrofagi potaknuti tioglikolatom čak 30-40% galektina-3. Galektin-3, kao ni drugi galektini, ne sadrži signalne sljedove za upućivanje u endoplazmatski retikulum niti transmembransku domenu. Istraživanja temeljena na primjeni inhibitora različitih sekretornih puteva pokazala su da se galektin-3 ne izlučuje klasičnim sekretornim putem kroz endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat (Tablica 1.2).

Tablica 1.2 Utjecaj različitih tvari na sekreciju galektina-3 [43].

Cilj	Tretman	Relativna sekrecija*	
		BHK	MDCK
toplinski šok	42°C	+	+
put ER-Golgi	brefeldin A	NP	NP
	monezin	+	+
	18-20°C	NP	-
unos Ca^{2+}	A23187	+	+
endo/egzocitoza	metilamin	-	NP
	nedostatak seruma	-	
citoskelet	citokalazin B	NP	
	kolhicin	NP	
	nokodazol		-
mdr sustav	verapamil		NP
	ciklosporin	+	

* = izraženo u odnosu na kontrolu pri 37°C
NP = nema promjene, + = povećana sekrecija, - = smanjena sekrecija
mdr sustav = sustav kojim se ostvaruje otpornost na različite lijekove (*engl.* multi drug resistant system)

Zasad još nije u potpunosti poznat način sekrecije galektina-3, ali postoje naznake da se on izlučuje procesom ektocitoze – nakon nakupljanja galektina-3 uz staničnu membranu, stvaraju se pupovi membrane unutar kojih se nalazi galektin-3. Oni se odjeljuju od membrane kao izvanstanične vezikule iz kojih se, nakon narušavanja njihove strukture, oslobađa galektin-3 [43]. Sekrecija se galektina-3 u nekim stanicama može ostvariti i putem vezikula koje se stapaju sa staničnom membranom [39, 44] ili izravnom translokacijom posredovanom transmembranskim prijenosnicima [41, 42].

1.1.1.5 Specifičnost galektina-3 prema ugljikohidratnim strukturama

Galektin-3, kao i ostali galektini, prepoznaje i veže galaktozu. Interakcije između domene koja prepoznaje ugljikohidrate i galaktoze su slabe, s konstantom disocijacije mikromolarnog reda veličina. Galektin-3 pokazuje međutim puno veći afinitet vezanja za laktozu i N-acetillaktozamin, kao i za mnoge druge oligosaharide koji sadrže galaktozu (Tablica 1.3).

Tablica 1.3 Relativni afiniteti vezanja galektina-3 na glikoligande [45].

Ligand	Relativan afinitet*	
Lac	1,0**	1,0***
LacNAc	6,6	
2'-αFuc-Lac	3,0	
3-αGal-LacNAc	23,3	
3,6 $LacNAc_2$-Lac	29,1	
3-αGalNAc-(2-αFuc)-Gal	16,7	
3'-αGalNAc-(2'-αFuc)-Gal	17,3	
3'-NAc-LacNAc		11,6
3'-NBzl-LacNAc		97,6
3'-Nsuc-LacNAc		105,0
3'-N(4-MeO-F_4-Blz)-LacNAc		311,0

* izmjereno pri 25-26°C
** izmjereno mikrokalorimetrijom [46]
*** izmjereno postupkom ELISA [47]

Premda je galektin-3 monomer koji sadrži samo jedno vezno mjesto za ugljikohidrate, može se pozitivno kooperativno vezati na svoje glikoproteinske ligande. Kinetička mjerenja su pokazala da se vezanje odvija u dva koraka: brzo vezanje malog afiniteta prati sporo vezanje visokog afiniteta [47]. Nedavna su istraživanja pokazala da se visoki afinitet postiže stvaranjem multivalentnog lektinskog kompleksa, putem interakcija između N-terminalnih dijelova molekula galektina-3. Većina do danas poznatih liganada galektina-3 su membranski ili izvanstanični glikoproteini na koje se galektin-3 veže nakon što se izluči iz stanice. Valja međutim naglasiti da s unutarstaničnim ligandima (osim s citokeratinom i CBP70) galektin-3 ostvaruje interakcije neovisne o lektinskoj aktivnosti.

1.1.1.6 Uloge galektina-3

Točna uloga galektina-3 nije poznata, no promjene njegove ekspresije, staničnog smještaja i sekrecije uočene su tijekom embrionalnog razvoja, karcinogeneze, metastaziranja tumora, imunim reakcijama, odnosno procesima koji se temelje na međudjelovanju stanica, stanica i izvanstaničnog matriksa te prijenosu signala [45, 48-50]. Galektin-3 sudjeluje u regulaciji rasta stanica, inhibiciji apoptoze i procesiranju pre-mRNA [51]. Ligandi galektina-3 te funkcije posredovane njegovim vezanjem prikazani su u tablici 1.4.

Tablica 1.4 Ligandi galektina-3.

Ligand	Funkcija posredovana vezanjem galektina-3
*Bcl-2	antiapoptozno djelovanje [52]
*Gemin4	procesiranje pre-mRNA [53]
*CBP70	nepoznata [54]
*Chrp	nepoznata [55]
*Alix/AIP-1	antiapoptozno djelovanje? [39]
*TTF-1 (transkripcijski faktor specifičan za štitnjaču)	aktivacija [36]
*citokeratin	nepoznata [56]
laminin	adhezija stanica na izvanstanični matriks [57, 58]
kolagen IV	adhezija stanica na izvanstanični matriks [59]
fibronektin vitronektin	adhezija stanica na izvanstanični matriks [60, 61]
henzin	održava diferencijaciju epitelnih stanica [62]
elastin	adhezija stanica na elastin [63]
Mac-2BP (gp 90)	međustanična adhezija i adhezija stanica na izvanstanični matriks [64, 65]
kubilin	adhezija i endocitoza [66]
MP20 protein leće	adhezija stanica na izvanstanični matriks [67]
mucini karcinoma kolona	međustanična adhezija i adhezija stanica na izvanstanični matriks [68, 69]
karcino-embrionski antigen (CEA)	međustanična adhezija i adhezija stanica na izvanstanični matriks [69]
produkti glikacije (AGE)	posreduje endocitozi AGE [70, 71]
integrini α1β1	adhezija stanica na izvanstanični matriks [59, 72]
αMβ1 (CD11b/CD18, Mac-1 antigen) (humani makrofagi)	adhezija stanica na izvanstanični matriks [73, 74]
CD66a/CD66b (humani neutrofili)	potiče aktivaciju NADH oksidaze i adheziju stanica na izvanstanični matriks [75]
CD98 (stanice Jurkat)	potiče unos izvanstaničnog Ca^{2+} i modulira adheziju stanica na izvanstanični matriks [76]
$CD4^+/CD8^+$ (limfociti T)	inhibira apoptozu i modulira adheziju stanica na izvanstanični matriks [22, 77]
FcgRII (stanice humane eozinofilne leukemije)	smanjuje ekspresiju gena za IL-5 [78]
NCA-160 (humani neutrofili)	potiče oksidativni prasak u neutrofilima [79]
adhezijske molekule neuralnih stanica (NCAM), MAG, L1	adhezija stanica na izvanstanični matriks [80]
IgE (stanice štakorske bazofilne leukemije)	potiče degranulaciju i otpuštanje serotonina [81, 82]
Lamp-1, Lamp-2 (tumorske stanice)	međustanična adhezija i adhezija stanica na izvanstanični matriks [69, 83]
Lipopolisaharid (LPS) (bakterije)	adhezija patogenih organizama na stanice i izvanstanični matriks [84]

* označava unutarstanične ligande

1.1.1.7 Galektin-3 u imunom odgovoru

U imunim su procesima uloge galektin-3, bilo ovisne ili neovisne o njegovoj lektinskoj aktivnosti, brojne. Između ostalog, on modulira apoptozu, staničnu adheziju i kemotaksiju imunih stanica. Jak je proinflamatorni signal [48, 85], te aktivira mastocite i bazofile, a modulira i aktivaciju limfocita T. Pregled uloge galektina-3 u imunom odgovoru prikazan je u tablici 1.5.

Tablica 1.5 Funkcije galektina-3 u imunom odgovoru.

Funkcija
Međustanična adhezija ili interakcije stanice i patogena
Sudjeluje u adheziji neutrofila na laminin [86]
Posreduje adheziji neutrofila na vaskularne endotelne stanice [87]
Sudjeluje u adheziji *P. aeruginosa* na endotelne stanice mrežnice [84]
Prijenos signala putem nakupljanja receptora
Potiče unos Ca^{2+} u limfocite T i monocite [76, 88]
Izaziva oksidativni prasak u makrofagima i neutrofilima [79, 89, 90]
Povećava stvaranje IL-1 u monocitima [91]
Započinje degranulaciju mastocita [82]
Smanjuje ekspresiju IL-5 u leukocitima [78, 92]
Kemoatraktant je za monocite i makrofage [88]
Kemoatraktant je za endotelne stanice [93]
Potiče stvaranje kapilara i inducira angiogenezu [93]
Inducira regrutaciju leukocita *in vivo* [94]
Imunoregulacija putem površinskih rešetki multivalentnih galektina-3
Povećava prag aktivacije limfocita T [95]
Inhibira proliferaciju stanica koštane srši potaknutu GM-CSF [96]

1.1.1.8 Galektin-3 u autoimunim bolestima

Za aktivaciju limfocita T potrebno je nakupljanje barem minimalnog broja receptorima na limfocitima T (TCR, *engl.* T-cell receptors). Nedostatak enzima β1,6 N-acetilglukozaminiltransferaze V (Mgat5) onemogućava stvaranje oligosaharidnih struktura na TCR na koje se inače veže galektin-3. Uloga je galektina-3 vezanog na TCR ograničavanje lateralne mobilnosti TCR. Ukoliko galektin-3 nije vezan na TCR, olakšava se nakupljanje TCR i samim tim aktivacija limfocita T. Miševi kojima nedostaje Mgat5 (tj. $Mgat5^{-/-}$ miševi) imaju autoimunu bolest bubrega, pojačani odgođeni tip hipersenzitivnosti te povećanu podložnost eksperimentalno izazvanom autoimunom encefalomijelitisu [97]. Sprečavanje vezanja galektina-3 na TCR postignuto pre-tretmanom limfocita T s laktozom stvara fenokopiju $Mgat5^{-/-}$ nakupljanja TCR. Ti podaci pokazuju da galektin-3 igra važnu ulogu u ograničavanju regrutacije kompleksa TCR na mjestu prezentacije antigena te da smanjeno vezanje galektina-3 na TCR povećava podložnost autoimunim bolestima, kao što je multipla skleroza [95].

U pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa utvrđena je povećana koncentracija galektina-3 u serumu i sinovijalnoj tekućini [98], koja korelira s poremećenom apoptozom limfocita T [99].

Autoantitijela na galektin-3 ne postoje u ljudi koji boluju od reumatoidnog artritisa, ali je njihova prisutnost utvrđena u serumu ljudi koji boluju od sistemskog lupusa eritematozusa, poliomiozitisa/dermatomiozitisa [100] te Kronove bolesti [101].

1.1.1.9 Galektin-3 u tumorima

Prisutnost galektina-3 utvrđena je na mnogim vrstama tumorskih stanica, neovisno o tome da li su tumori nastali spontano ili su izazvani virusima, zračenjem ili kemijskim agensima. Točnu ulogu galektina-3 u tumorskim stanicama, kao ni u drugim biološkim sustavima, nije moguće definirati, ali je poznato da galektin-3 sudjeluje u sljedećim procesima bitnim za progresiju i metastaziranje tumora:

- potiče adheziju stanične linije tumora dojke Evsa-T na laminin, fibronektin, vitronektin [102]
- potiče adheziju stanične linije tumora dojke BT549 na laminin, kolagen IV [103]
- inhibira adheziju stanica tumora dojke, prostate, melanoma, fibrosarkoma na laminin, kolagen IV, fibronektin [59]
- povećava ekspresiju integrina α6β1 u staničnoj liniji BT549 [103]
- povećava ekspresiju integrina α4β7 u staničnoj liniji Evsa-T [102]
- smanjuje ekspresiju integrina β1 u staničnoj liniji MDA-MB-231 [104]
- štiti stanice stanične linije BT549 od apoptoze [14, 105]
- posreduje homotipskoj agregaciji izoliranih tumorskih stanica [106]
- veže antigen T i posreduje adheziji tumorskih stanica na endotel [106, 107]
- stimulira neovaskularizaciju *in vitro* [102]

Povećana ekspresija galektina-3 utvrđena je u stanicama karcinoma skvamoznih stanica glave i vrata [108], karcinoma želuca [109], anaplastičnog velikostaničnog limfoma [110] te tumora središnjeg živčanog sustava [111] u odnosu na ekspresiju u zdravom tkivu. Povišenu količinu galektina-3 eksprimiraju i stanice malignih neoplazmi štitnjače u odnosu na zdravo tkivo, ali i u odnosu na benigne adenome štitnjače te se galektin-3 smatra markerom prema kojem je moguće razlikovati maligne od benignih neoplazmi štitnjače [112]. Također je ustanovljeno da metastatsko tkivo eksprimira veće količine galektina-3 od primarnih tumora [113]. Povećanje razine cirkulirajućeg galektina-3 povezano je s prisutnošću udaljenih metastaza [114]. Negativna korelacija između ekspresije galektina-3 i progresije tumora utvrđena je međutim u stanicama karcinoma dojke [115], jajnika i prostate [116], dočim su podaci za stanice tumora kolona kontradiktorni [113, 117, 118].

1.2 UPALA

Upala je strogo reguliran fiziološki proces koji je od ključne važnosti za održavanje homeostaze. Mogu ga izazvati različiti signali kao što su infekcija patogenima, fizička ozljeda ili UV zračenje.
Simptomi su upale crvenilo, oticanje, vrućica, bol i oštećena funkcionalnost što nastaje kao posljedica oštećenja tkiva i perfuzije terminalnih kapilara usljed eksudacije plazme u međustanični prostor zbog povećane permeabilnosti kapilara. Ujedno dolazi i do stimulacije receptora boli. Te reakcije ovise o otpuštanju medijatora kao što su histamin, serotonin, prostaglandini i kinini. Nakon inicijalne reakcije upalni se produkti prenose s mjesta upale krvlju ili dolazi do okončanja upalne reakcije. Eksudacija plazme često je praćena emigracijom krvnih stanica, primjerice granulocita i monocita u međustanični prostor kao i proliferacijom makrofaga i fibroblasta. Svi su ti događaju važni za održavanje homeostaze, ali ponekad mogu uzrokovati nastanak upalnih bolesti, primjerice kroničnog reumatoidnog artritisa.

Upalni je odgovor praćen nakupljanjem limfocita T, plazma stanica, monocita, makrofaga, neutrofila i trombocita, koji, kao i tkivne endotelne stanice i fibroblasti, izlučuju mnoštvo lipida, faktora rasta, citokina i enzima koji uzrokuju lokalno oštećenje tkiva, a ponekad i proliferaciju i fibrozu. Leukociti se na mjestu ozljede nakupljaju privučeni citokinima, kemokinima i drugim medijatorima upale. Također dolazi do indukcije enzima kao što su ciklooksigenaza-2 (COX-2) i dušik-oksid-sintaze čiji produkti (prostaglandini i dušikov oksid) potiču lokalan protok krvi. Molekule koje potiču stvaranje citokina i drugih proteina upalnog odgovora su mikrobni produkti (primjerice, lipopolisaharid-LPS) i sami citokini (primjerice, IL-1, TNF-α, IL-17 i IL-18). Te molekule, vežući se na različite receptore aktiviraju četiri osnovna unutarstanična signalna puta kojima se kontrolira ekspresija gena uključenih u upalni odgovor na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini [119, 120]. To su:

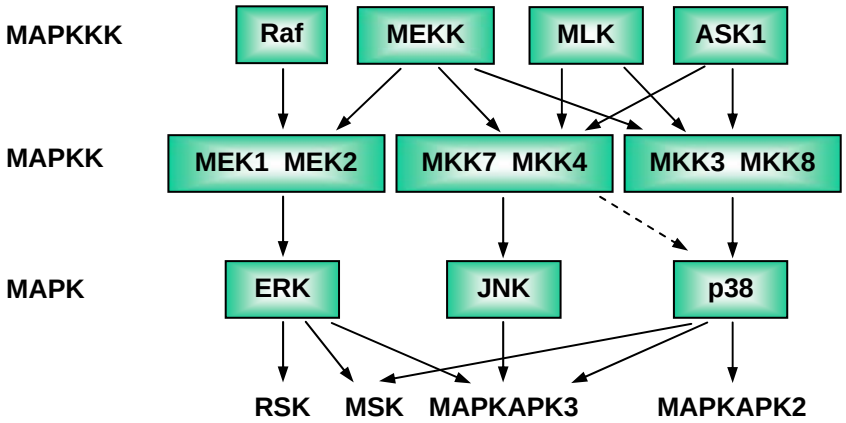
1) signalni put protein kinaza kojim se aktivira transkripcijski faktor NF-κB (*engl.* nuclear factor kappa B)
2) signalni putevi protein kinaza aktiviranih mitogenima (*engl.* mitogen-activated protein kinase, MAPK):
   a) signalni put kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (*engl.* extracellular-signal-regulated kinase, ERK)
   b) signalni put c-Jun N-terminalne kinaze (*engl.* c-Jun-N-terminal kinase, JNK) odnosno protein kinaze aktivirane stresom (*engl.* stress-activated-protein-kinase, SAPK)
   c) signalni put kinaze p38

Svi ti putevi vjerojatno reguliraju proces transkripcije, a signalni put kinaze p38 ima i dodatnu važnu ulogu u post-transkripcijskoj regulaciji jer utječe na stabilnost mRNA gena koji sudjeluju u upalnom odgovoru [121-123].
Koji će se signalni putevi aktivirati, u kojoj mjeri i na koji način, ovisi o tipu izvanstaničnog poticaja, kao i vrsti i razvojnom stupnju stanice. Osim toga, valja uzeti u obzir da se signalni putevi isprepliću te stoga jedna molekula

može biti uključena u regulaciju više signalnih puteva a različiti signalni putevi u konačnici mogu regulirati ekspresiju i/ili aktivnost iste molekule.

1.2.1 SIGNALNI PUTEVI PROTEIN KINAZA AKTIVIRANIH MITOGENIMA (MAPK)

Tri su osnovne skupine MAPK u stanicama sisavaca koje se aktiviraju u upalnom odgovoru: kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (ERK), c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) odnosno protein kinaza aktivirana stresom (SAPK), te kinaza p38.
Osnovna je značajka signalnih puteva protein kinaza aktiviranih mitogenima očuvan trokomponentni model aktivacije, a sastoji se od tri kinaze u slijedu koje se međusobno aktiviraju (Slika 1.4).

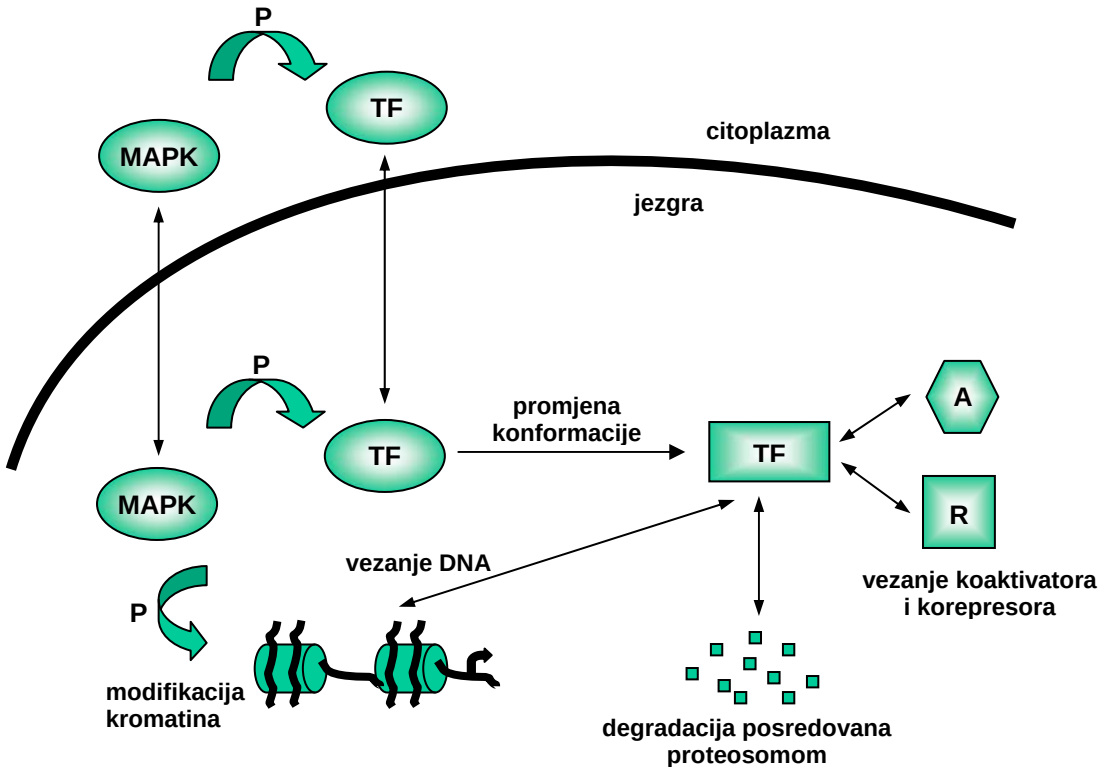


Slika 1.4 Shema trokomponentnog modela aktivacije MAPK. Kaskada MAPK sastoji se od tri kinaze u slijedu koje se međusobno aktiviraju. Pojedine MAPKKK su često komponente više signalnih puteva. MAPKK selektivno fosforiliraju pojedine MAPK, osim MKK4, koja osim JNK može aktivirati i p38. MAPK mogu fosforilirati transkripcijske faktore ili kinaze koje potom fosforiliraju transkripcijske faktore (kratice: MKKK-kinaza kinaze protein kinaze aktivirane mitogenima, MKK-kinaza protein kinaze aktivirane mitogenima, MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenima) [124].

Prva kinaza u slijedu je kinaza kinaze MAPK (MAPKKK) koja se aktivira ili fosforilacijom kinazom kinaze kinaze MAPK (MAPKKKK) ili interakcijom s malim proteinima iz obitelji Ras ili Rho koji vežu GTP. MAPKKK fosforilira i aktivira sljedeću kinazu u nizu, kinazu MAPK (MAPKK). MAPK su posljednje kinaze u nizu koje uglavnom fosforiliraju brojne transkripcijske faktore (TF), ali i mnoge druge supstrate, poput protein kinaza, fosfolipaza te proteina citoskeleta. Do danas je u stanicama sisavaca identificirano 14 MAPKKK, 7 MKK i 13 MAPK, a postoji i veliki broj njihovih izoformi nastalih alternativnim procesiranjem [125].
Fosforilacija transkripcijskih faktora (TF) protein kinazama aktiviranim mitogenima regulira njihovu aktivnost tako što djeluje na:

a) unutarstaničnu lokalizaciju TF [126]
b) razinu ekspresije TF [127, 128]
c) vezanje TF na DNA [129]
d) interakciju TF s regulatornim proteinima [130, 131].

Pojednostavljeni prikaz moguće regulacije aktivnosti TF signalnim putem MAPK prikazan je na slici 1.5.
Signalnim putevima MAPK reguliraju se aktivnosti velikog broja transkripcijskih faktora, primjerice p53, STAT1 (*engl.* signal transducer and activator protein 1), STAT3 (*engl.* signal transducer and activator protein 3), C/EBPβ (*engl.* CCAAT-enhancer-binding protein β), Sp-1, CREB (*engl.* cAMP-response-element binding protein), NFAT (*engl.* nuclear factor of activated T cells) i AP-1 (*engl.* activator protein 1).
Čini se da transkripciju najvećeg broja gena čija se ekspresija mijenja u stanju upale, uz transkripcijski faktor NF-κB, regulira upravo transkripcijski faktor AP-1 [124, 132].



Slika 1.5 Regulacija aktivnosti TF signalnim putem MAPK. MAPK mogu fosforilirati (P) transkripcijske faktore (TF) i regulirati njihov ulazak i izlazak iz jezgre. Jednom fosforilirani, TF često mijenjaju konformaciju regulirajući na taj način svoje funkcije, kao što su vezanje DNA i vezanje koaktivatora i korepresora. Koaktivatori i korepresori su, kao i komponente kromatina, također podložni regulaciji putem MAPK. U nekim slučajevima, fosforilacija transkripcijskih faktora modulira njihovu stabilnost. Kratice: MAPK - protein kinaze aktivirane mitogenima, TF – transkripcijski faktori, P – fosforilacija, A – koaktivatori, R – korepresori [124].

1.2.1.1 Transkripcijski faktor AP-1

Transkripcijski faktor AP-1, kodiran protoonkogenima, homodimer je ili heterodimer članova obitelji proteina Jun (c-Jun, v-Jun, Jun-B, Jun-D), Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2), faktora aktivacije transkripcije (*engl.* activating transcription factor; ATF-2, ATF-3/LRF-1, B-ATF, JDP-1, JDP-2) ili Maf (v-Maf, c-Maf, Maf-A/B/F/G/K, Nrl). Svi oni pripadaju klasi *basic zipper* dimernih proteina koji prepoznaju specifične sljedove DNA i vežu se na njih

[133]. Geni *fos* i *jun* su geni ranog odgovora (*engl.* immediate early gene) što znači da njihova transkripcija započinje neposredno nakon stimulacije stanice [134]. Proteini Jun mogu stvarati stabilne dimere koji prepoznaju sljedove DNA (5'-TGAG/CTCA-3') poznate pod nazivom TREs (*engl.* phorbol-12-O-tetradecanoate-13-acetate response elements); proteini Fos ne stvaraju stabilne dimere, ali mogu stvarati heterodimere s proteinima Jun koji su stabilniji od homodimera Jun/Jun. Proteini ATF stvaraju homodimere i heterodimere s proteinima Jun koji prepoznaju sljedove CRE (*engl.* cAMP responsive elements; 5'-TGACGTTCA-3'). U mnoštvo gena koji u svojoj promotorskoj regiji sadrže sljedove koje prepoznaju pojedine kombinacije komponenti transkripcijskog faktora AP-1 ubrajamo i same gene *c-jun* i *c-fos*.

Regulacija aktivnosti AP-1 je vrlo složena i odvija se na nekoliko razina koje uključuju regulacije:

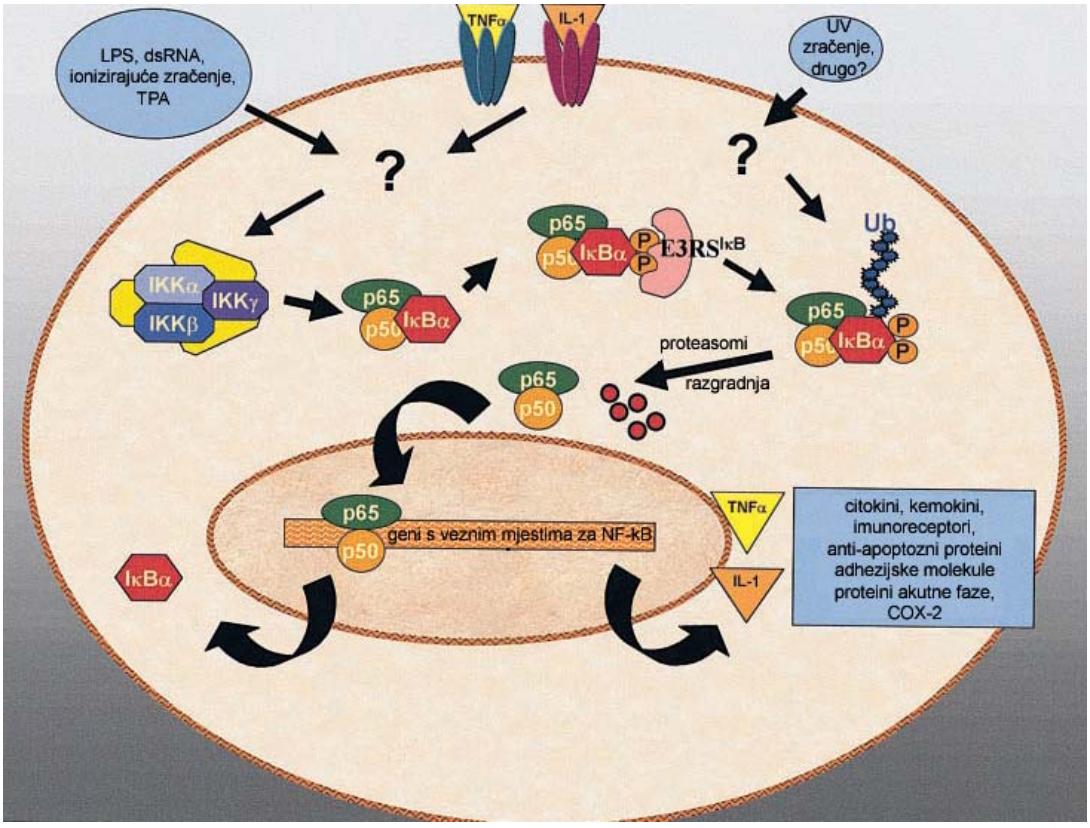
a) razine transkripcije gena *jun* i *fos* te stupnja razgradnje pripadnih mRNA (*engl.* mRNA turnover)
b) stupnja razgradnje proteina Jun i Fos
c) posttranskripcijskih modifikacija proteina Jun i Fos koje mijenjaju njihov transaktivacijski potencijal
d) interakcija s drugim transkripcijskim faktorima koje mogu narušiti ili pojačati aktivnost AP-1 [134-136].

Aktivnost AP-1 inducira se pod utjecajem velikog broja različitih signala (kao što su prisutnost faktora rasta, citokina, hormona, virusa, farmakoloških tvari, teških metala te pod djelovanjem UV- i γ- zračenja), koji u različitoj mjeri aktiviraju pojedine kaskade MAPK (JNK, ERK i p38), a one pak pojačavaju aktivnost AP-1 fosforiliranjem određenih supstrata. Primjerice, transkripcijska aktivnost c-Jun se pojačava uslijed amino-terminalne fosforilacije Ser^{63} i Ser^{73} djelovanjem JNK [137], kao i uz prisutnost fosforiliranog transkripcijskog kofaktora CBP (*engl.* CREB-binding protein) [138]. c-Jun potiče staničnu proliferaciju smanjujući ekspresiju tumor-supresor gena i potičući transkripciju gena koji kodira za ciklin D1, dočim JunB djeluje upravo na suprotan način. Zasada ostaje nerazjašnjeno kako c-Jun i JunB, koji prepoznaju gotovo identične sljedove DNA, mogu tako oprečno djelovati [139].

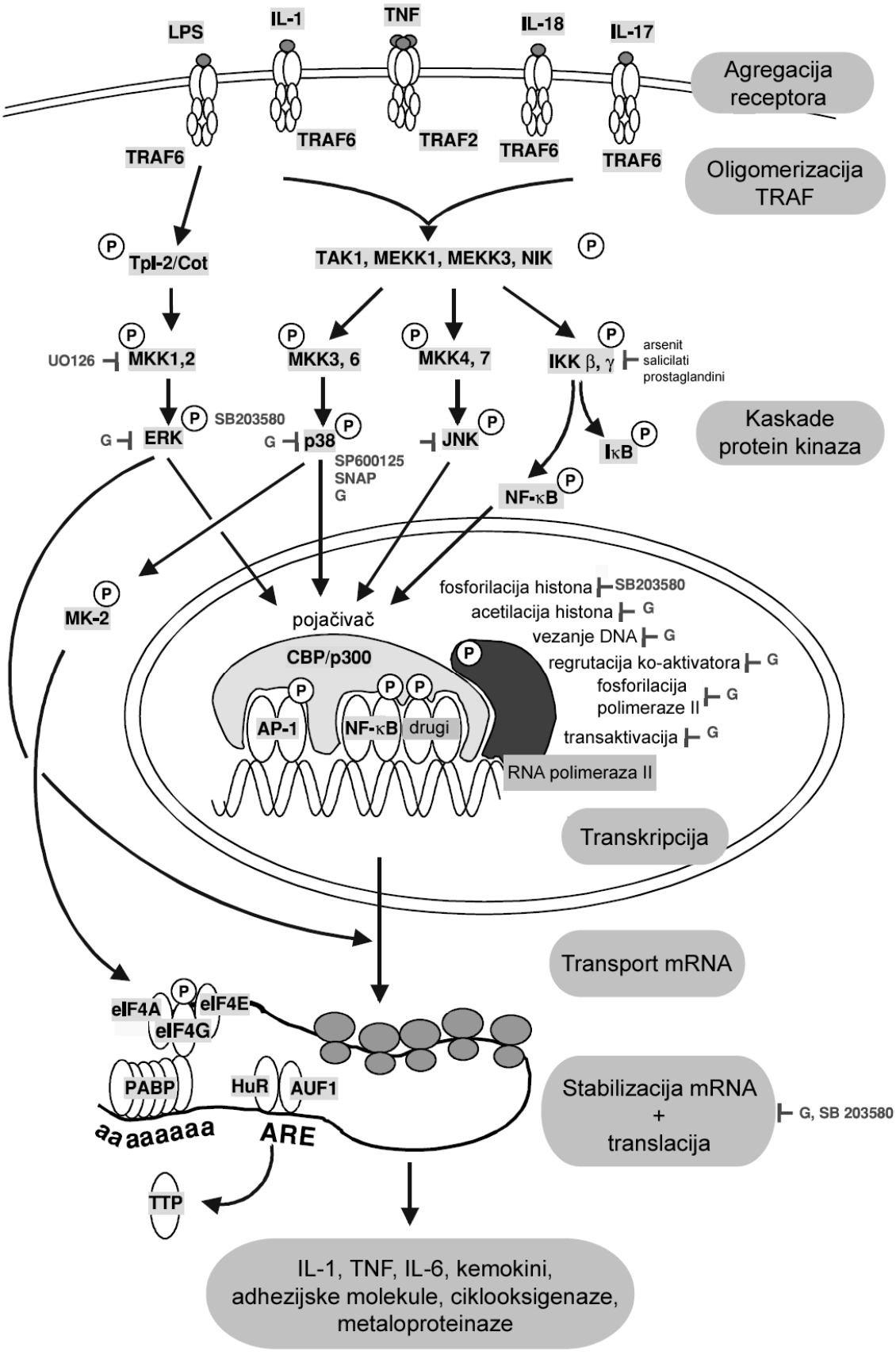
1.2.1.2 Transkripcijski faktor NF-κB

Transkripcijski faktor NF-κB (*engl.* nuclear factor kappa B) nalazi se u gotovo svim tipovima stanica i sudjeluje u regulaciji ekspresije više od stotinu gena. NF-κB je skupni naziv za inducibilne homo- ili heterodimerne transkripcijske faktore sastavljene od proteina obitelji Rel koji vežu DNA. U sisavaca obitelj proteina Rel čini pet članova: Rel (c-Rel), RelA (p65/NF-κB3) RelB, NF-κB1 (p50 i njegov prekursor p105) te NF-κB2 (p52 i njegov prekursor p100). Svi oni sadrže homolognu domenu Rel (*engl.* Rel homology domain) veličine oko 300 aminokiselina, koja je odgovorna za njihovu dimerizaciju i vezanje DNA, a ujedno je i regulatorna domena. Unutar nje se nalazi signalni slijed za smještanje u jezgru (*engl.* nuclear localization sequence, NLS).

U nestimuliranim stanicama dimeri NF-κB nalaze se u citoplazmi povezani s inhibitornim proteinima klase IκB. Obitelj proteina IκB čine IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-δ, IκB-ε i Bcl-3, premda i p105 i p100 mogu djelovati kao IκB. Aktivaciju NF-κB mogu izazvati različiti poticaji (primjerice citokini, bakterijski ili virusni produkti, UV i γ zračenje) koji, do danas slabo razjašnjenim signalnim putevima, aktiviraju multiproteinski kompleks kinaza IκB (IKK) uzrokujući fosforilaciju N-terminalnog dijela (Ser^{32} i Ser^{36}) IκB i njegovu disocijaciju. Signalni slijed za smještanje u jezgru NF-κB stoga više nije zaklonjen te se NF-κB upućuje u jezgru, a fosforilirani se IκB ubikvitinira i usmjerava do 26S proteasoma gdje se hidrolitički razgrađuje (Slika 1.6). Premda je disocijacija IκB i translokacija NF-κB u jezgru ključna za aktivaciju tog transkripcijskog faktora, njegova se transkripcijska aktivnost može dodatno pojačati fosforilacijom i acetilacijom p65 podjedinice, kao i vezanjem različitih kofaktora. Čini se da u tom procesu, a možda i u samoj aktivaciji IKK, sudjeluju i neke od protein kinaza aktiviranih mitogenima [140-142].



Slika 1.6 Shematski prikaz aktivacije NF-κB. Različiti stimulansi, uključujući proinflamatorne citokine TNFα i IL-1, još nerazjašnjenim signalnim putem aktiviraju IKK. IKK fosforilira IκB-α, omogućavajući prepoznavanje IκB pomoću E3RS, komponente SCF tipa E3. Posljedična poliubikvitinilacija IκB-α usmjerava IκB-α do 26S proteosoma gdje se on proteolitički razgrađuje. Signalni slijed za smještanje u jezgru NF-κB više nije zaklonjen te se NF-κB premješta u jezgru. NF-κB u jezgri potiče transkripciju različitih gena, uključujući i IκB-α, čime se ponovno inhibira aktivnost NF-κB. NF-κB potiče transkripciju gena koji kodiraju za medijatore upale, kao što su TNFα, IL-1 i kemokini, što pak dovodi do regrutacije dodatnih stanica na mjesto upale [132].


LPS
IL-1
TNF
IL-18
IL-17
Agregacija receptora
TRAF6
TRAF6
TRAF2
TRAF6
TRAF6
Oligomerizacija TRAF
Tpl-2/Cot
TAK1, MEKK1, MEKK3, NIK
UO126
MKK1,2
MKK3, 6
MKK4, 7
IKK β, γ
arsenit
salicilati
prostaglandini
SB203580
ERK
p38
JNK
IκB
Kaskade protein kinaza
SP600125
SNAP
G
NF-κB
MK-2
pojačivač
fosforilacija histona
SB203580
acetilacija histona
G
vezanje DNA
G
CBP/p300
regrutacija ko-aktivatora
G
fosforilacija polimeraze II
G
AP-1
NF-κB
drugi
transaktivacija
G
RNA polimeraza II
Transkripcija
Transport mRNA
eIF4A
eIF4E
eIF4G
PABP
HuR
AUF1
aa aaaaaa
ARE
Stabilizacija mRNA + translacija
G, SB 203580
TTP
IL-1, TNF, IL-6, kemokini, adhezijske molekule, ciklooksigenaze, metaloproteinaze

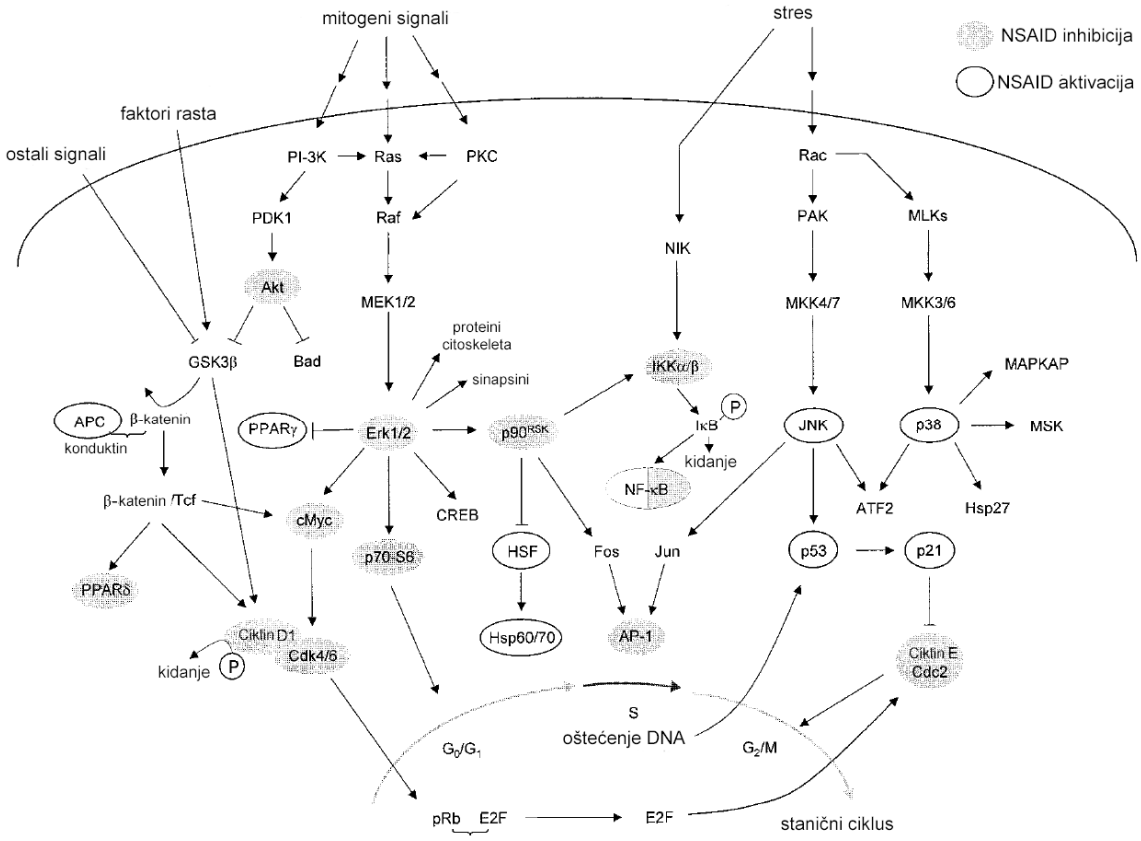
Slika 1.7 Shematski prikaz signalnih puteva i mehanizama regulacije gena uključenih u upalni odgovor. Citokini (IL-1, IL-17, IL-18, TNF) ili mikrobni produkti (LPS) potiču nakupljanje receptora i oligomerizaciju TRAF, što je ključni događaj za aktivaciju kinaze IκB te signalnih puteva ERK, JNK i p38. Te kinaze fosforiliraju ili IκB i NF-κB ili transaktivacijske domene AP-1, aktivirajući na taj način NF-κB i AP-1. Za jaku transkripciju potrebna je, uz aktivaciju NF-κB, aktivacija barem još jednog signalnog puta MAPK. Ona uzrokuje acetilaciju i fosforilaciju histona, koju prati stvaranje višeproteinskih kompleksa – pojačivača transkripcije. Unutar tih pojačivača NF-κB i AP-1 intereagiraju s DNA, drugim transkripcijskim faktorima, koaktivatorima (npr. CBP/p300) i holoenzimom RNA polimerazom II. Posljedica varijacije u strukturi pojačivača je aktivacija specifičnih gena. Novosintetizirana mRNA je stabilizirana signalnim putem p38-MK-2. Inhibicija ključnih koraka prijenosa signala može se postići primjenom glukokortikoida (G), inhibitora protein-kinaza (UO126, SP600125, SB203580), donora NO (SNAP; S-nitro-N-acetil-*DL*-penicilamin), salicilata i arsenita (kratice: AP-1-transkripcijski factor AP-1, ARE - elementi bogati slijedom AU, AUF1 - faktor vezanja AU 1, CREB - protein koji veže CBP, eIF - faktor inicijacije elongacije, ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalima, IκB – inhibitor NF-κB, IKK – kinaza IκB, JNK – c-Jun N-terminalna kinaza, MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenima, MEKK – ERK kinaza aktivirana mitogenima, MKK – kinaza MAPK, PABP – protein koji veže poliA-rep, P – fosforilacija, TTP – tristetraprolin, TAK1 – protein kinaza 1 aktivirana faktorom rasta tumora, TNF – faktor nekroze tumora, TRAF – faktor vezanja receptora TNF) [121].

1.2.2 TVARI S IMUNOMODULATORNIM DJELOVANJEM

1.2.2.1 Nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (NSAIDs)

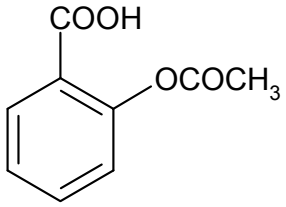
Nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (*engl.* non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) su jedna od najčešće rabljenih skupina lijekova. Djeluju kao analgetici, antipiretici, antiinflamatorici te sprečavaju agregaciju trombocita. Koriste se u terapiji različitih bolesti (primjerice, astme, ateroskleroze, artritisa). Njihovo se djelovanje temelji ponajviše na sposobnosti inhibicije ciklooksigenaze (COX) drugim imenom prostaglandin H sintaze, ključnog enzima biosintetskog puta prostaglandina. COX je bifunkcionalan enzim–katalizira konverziju arahidonske kiseline u prostaglandin G_2 (PG_2), a potom u prostaglandin H_2 (PGH_2). On je preteča biološki aktivnih prostaglandina - PGE_2, PGI_2, PGD_2 i TXA_2 (tromboksana), molekula koje su medijatori upale - djeluju kao vazodilatatori, a imaju i antiproliferativan učinak na limfocite T i B. COX postoji u obliku dviju izoformi-COX-1 i COX-2. COX-1 je konstitutivno eksprimiran u gotovo svim stanicama organizma i sudjeluje u fiziološkim funkcijama (citoprotekciji stanica želuca, agregaciji trombocita). COX-2 je proteinski produkt gena ranog odgovora, koji eksprimiraju stanice uključene u upalni odgovor (monociti, makrofagi, sinoviociti) i većinom posreduje sintezu prostanoida uključenih u patološke procese, kao što su akutna i kronična upala. Većina je negativnih popratnih učinaka NSAIDs (primjerice iritacija gastrointestinalnog sustava i krvarenje, disfunkcija trombocita) rezultat inhibicije COX-1, a antiinflamatorna, antipiretička i analgetička djelovanja rezultat su inhibicije COX-2 [143]. Do danas nije točno utvrđeno mogu li NSAIDs inhibirati i samu ekspresiju, a ne samo aktivnost COX [144].

U posljednje se vrijeme pojedini NSAIDs sve više koriste za prevenciju kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara kao i za suportivno liječenje tumora (npr. tumora kolona) [145, 146]. Sve je više dokaza da antitumorsko, a djelomice i protuupalno djelovanje NSAIDs nije samo rezultat inhibicije COX, već djelovanja NSAIDs na različite signalne puteve i transkripcijske faktore (Slika 1.8). Istraživanja na tom području do danas su dala vrijedne, ali često nepotpune i oprečne rezultate, ali se čini da modulacija signalnih puteva i TF ovisi kako o vrsti i primijenjenoj koncentraciji NSAIDs, tako i o tipu stanice, njezinom razvojnom stadiju i okruženju u kojem se nalazi [147].



Slika 1.8 Učinak nesteroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem na pojedine komponente signalnih puteva. Komponente signalnih puteva inhibirane djelovanjem NSAIDs označene su sivim ovalom, a komponente aktivirane NSAIDs bijelim ovalom. (kratice: Akt/PKB – protein kinaza B, APC - *adenomatous polyposis coli* tumor supresor gen, Cdk – ciklin-ovisna kinaza, CREB - protein koji veže CBP, Erk - kinaza regulirana izvanstaničnim signalima, GSK3b – kinaza 3 β glikogen-sintaze, HSF – faktor toplinskog šoka, Hsp – proteini toplinskog šoka, IKK - kinaza IκB, JNK – c-Jun N-terminalna kinaza, MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenima, MAPKAP – protein kinaza aktivirana MAPK, MEK/MKK – kinaza protein kinaze aktivirane mitogenima, MLK – protein kinaza iz različitih obitelji, MSK – protein kinaza aktivirana mitogenima i stresom, NIK – kinaza koja inducira NF-κB, PAK – p21-aktivirana kinaza, PDK – kinaza ovisna o fosfoinozitolu, PI-3K – fosfoinozitol-3-kinaza, PKC – protein kinaza C, pRb – retinoblastoma protein, p70-S6K – p70-S6 kinaza, p90RSK – ribosomska S6 kinaza, Tcf – faktor stanica T [147].

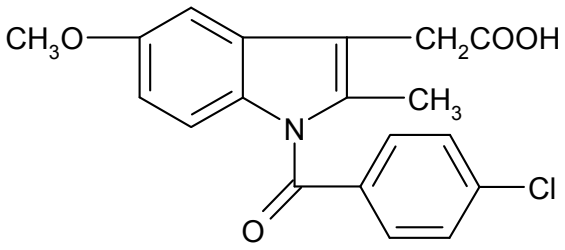
Aspirin
Aspirin (acetil-salicilna kiselina, ASA, kemijska formula $C_9H_8O_4$, Mr= 180,16) ireverzibilno inaktivira COX-1 i COX-2 acetiliranjem hidroksilne skupine serina koji se nalazi u veznom mjestu enzima, onemogućavajući na taj način vezanje arahidonske kiseline na COX [148, 149].



Slika 1.9 Struktura aspirina

Djelovanja aspirina koja su neovisna o inhibiciji COX uključuju:
- modulaciju signalnog puta MAPK koja su rezultat:
  - inhibicije aktivnosti Erk
  - aktivacije p38 MAPK
  - inhibicije ili u pojedinim slučajevima aktivacije JNK
- inhibiciju NF-κB koja je rezultat inhibicije fosforilacije i/ili proteosomske razgradnje IκB. Aspirin se može vezati na IKKβ sprečavajući na taj način vezanje ATP, što inhibira kinaznu aktivnost IKKβ. Na sličan način aspirin vjerojatno može utjecati i na druge kinaze.
- inhibiciju AP-1 [150]
- aktivaciju STAT1 koja je rezultat povećanja sposobnosti vezanja DNA [151]

Indometacin
Indometacin (1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1-H-indol-3-octena kiselina, kemijska formula $C_{19}H_{16}ClNO_4$ Mr=357,81) djeluje puno jače od aspirina, a kako često izaziva ozbiljne popratne pojave (hematološka i jetrena oštećenja, poremećaje gastrointestinalnog sustava), rabi se rjeđe nego aspirin, i to najčešće u liječenju težih bolesti praćenih jakom boli, kao što je ankilozantni spondilitis i osteoartroza.



Slika 1.10 Struktura indometacina

Indometacin uzrokuje sporu i vremenski ovisnu inhibiciju COX-1 i COX-2, koja je rezultat konformacijskih promjena do kojih dolazi ostvarivanjem ionskih interakcija karboksilne skupine indometacina i arginina polipeptidnog lanca COX. Za razliku od aspirina, indometacin vjerojatno ne inhibira niti NF-κB niti AP-1 niti MAPK [152]. Veže se i aktivira receptor γ

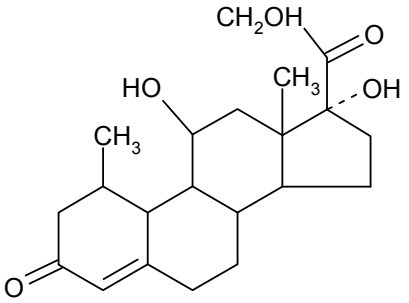
aktiviran proliferatorom peroksisoma (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ), nuklearni hormonski receptor koji nakon vezanja hormona djeluje kao transkripcijski faktor [153, 154]. PPARγ sudjeluje u diferencijaciji adipocita, ali i u modulaciji imunog odgovora suprimiranjem ekspresije proinflamatornih gena u makrofaga (IL-1, TNF-α, dušik-oksid sintaze). Njegovi fiziološki ligandi nisu točno poznati, premda postoje određene naznake da se na njega mogu vezati prostaglandini i nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem. Vezanjem agonista PPARs heterodimerizira s retinoičnim receptorom X te se veže na svoja vezna mjesta u promotorskim regijama gena. Osim toga, takav može transrepresijom inaktivirati druge transkripcijske faktore, kao što je NF-κB.

1.2.2.2 Steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem-glukokortikoidi

Glukokortikoidi (GC) su vrlo često upotrebljavana skupina lijekova, koja se koristi u liječenju alergijskih i autoimunih bolesti, reumatoidnog artritisa, reumatske groznice, brojnih kožnih bolesti, nekih oblika leukemija, a primjenjuju se i kao imunosupresivi nakon transplantacije organa. U cirkulaciji uzrokuju redistribuciju leukocita te inhibiraju funkciju leukocita i tkivnih makrofaga. Protuupalno i imunosupresivno djelovanje GC temelji se ponajviše na inhibiciji transkripcije citokina i kemokina (IL-1β, IL-2, Il-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-16, TNF-α, GM-CSF (*engl.* granulocyte-macrophage colony stimulating factor) IFN-γ i eotaksina) i citokinskih receptora [155]. Prirodni glukokortikoidi proizvode se u izvornom obliku ili kao acetati, a postoji i velik broj sintetskih glukokortikoida koji se donekle razlikuju od prirodnih hormona. Međusobno se razlikuju po trajanju učinka, intenzitetu djelovanja i lokalnoj aktivnosti. Glavni predstavnici sintetskih glukokortikoida su hidrokortizon i deksametazon.

Hidrokortizon

Hidrokortizon (drugim imenom kortizol, 17-hidroksikortikosteron, kemijska formula $C_{21}H_{30}O_5$, Mr=362,5) je kristalinični prašak teško topljiv u vodi. Nakon oralne aplikacije resorbira se u probavnom sustavu. U krvi ga je 95% vezano za α_2-globulin, a ostatak od 5% je biološki aktivan.

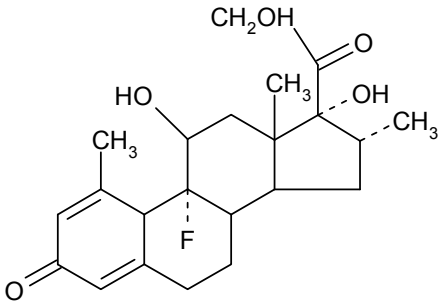


Slika 1.11 Struktura hidrokortizona

Deksametazon

Deksametazon (9-fluoro-11β,17,21-trihidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion, kemijska formula $C_{22}H_{29}FO_5$, Mr=392,47) je bijeli kristalinični prah teško topljiv u vodi. Ima 30 puta jače protuupalno djelovanje od

hidrokortizona. Za farmakološki učinak svih glukokortikoida bitna je prisutnost slobodne hidroksilne skupine na C-11 atomu, ali je također bitna i jačina vezanja za receptore. Svi sintetski glukokortikoidi, derivati hidrokortizona, jače se vežu na glukokortikoidne receptore.



Slika 1.12 Struktura deksametazona

Glukokortikoidi (GC) su relativno male lipofilne molekule koje difundiraju kroz lipidni dvosloj stanične membrane i vežu se na svoje citoplazmatske receptore. Glukokortikoidni receptori (GR) se u citoplazmi nalaze vezani na šaperone (najčešće Hsp 90 i Hsp 70) i ko-šaperonske molekule (poglavito imunofiline). Po vezanju GC na GR dolazi do hiperfosforilacije, koja potiče zamjenu jednog imunofilina (FKBP-51) drugim (FKBP-52) te vezanje transportnog proteina dineina na novonastali kompleks. On se upućuje u jezgru gdje dolazi do njegove disocijacije i konverzije GR u oblik koji može vezati DNA [156, 157].
Geni čija je ekspresija pozitivno regulirana djelovanjem GC u svojoj promotorskoj regiji sadrže elemente odgovora na GC (*engl.* GC-response elements, GRE), na koje se aktivirani GR veže kao homodimer, a geni čija je ekspresija negativno regulirana djelovanjem GC ili u svojoj promotorskoj regiji sadrže negativne elemente odgovora na GC (*engl.* negative GC-response elements, nGRE) ili je njihova transkripcija inhibirana izravnim ili posrednim djelovanjem GR na transkripcijsku aktivnost drugih transkripcijskih faktora (kao što su NF-κB, AP-1, CREB, C/EBPβ, STAT i p53) [158, 159]. Protuupalno djelovanje GC nije moguće objasniti ekspresijom gena koji su pozitivno regulirani GC (kao što se geni za tirozin- i alanin-aminotransferazu i fosfoenolpiruvat karboksikinazu), a kako geni koji se aktiviraju u upalnom odgovoru ne sadrže nGRE, čini se da je za protuupalni učinak GC ključno djelovanje GR na transkripcijsku aktivnost TF [160].

Načini kojima se to ostvaruje su:

- Indukcija sinteze IκB
  GC u pojedinim tipovima stanica induciraju transkripciju gena za IκB, inhibitora transkripcijskog faktora NF-κB [161].
- Model proteinskih interakcija
  a) "jednostavan model"
     GR se može vezati na različite transkripcijske faktore (NF-AT, NF-κB i AP-1) stvarajući na taj način kompleks koji se ne može vezati na DNA. Taj je mehanizam djelovanja poznat pod nazivom transrepresija [162, 163].

b) "mješoviti model"
GR se može vezati na transkripcijske faktore (NF-κB i AP-1) koji su već vezani na DNA i inhibirati njihovu transkripcijsku aktivnost [163, 164].

c) "model transmodulacije"
Ukoliko se GRE nalazi u blizini veznih mjesta za druge transkripcijske faktore (AP-1, NF-AT, ANF-1 ili ANF-2), vezanjem GR na GRE može doći do stvaranja proteinskih interakcija s transkripcijskim faktorima koji su već vezani na DNA. To pak onemogućava stvaranje funkcionalnog preinicijacijskog kompleksa a samim time i inicijaciju transkripcije [165-167].

d) "model kompeticije"
Transkripcijska aktivnost GR, AP-1 i NF-κB može se potaknuti prisutnošću kofaktora kao što su CBP, p300 ili histon-acetiltransferaze (*engl.* histone acetyltransferase, HAT), te stoga kompeticija GR i AP-1 ili NF-κB za iste kofaktore može uzrokovati promjenu transkripcijske aktivnosti tih TF [168].

- Indukcija gena reguliranog glukokortikoidima (GILZ)
GC potiču ekspresiju gena GILZ (*engl.* GC-induced leucine zipper). GILZ je transkripcijski faktor koji može inhibirati translokaciju NF-κB i AP-1 stvarajući interakcije s pojedinim komponentama tih TF. GILZ može također inhibirati signalni put kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (ERK) vežući se na jednu od MAPKKK, preciznije-Raf [169].
- Indukcija gena za MKP-1
GC induciraju ekspresiju fosfataze MAPK-1 (MKP-1, *engl.* MAPK phosphatase 1). Defosforilacijom MAPK uzrokovanom djelovanjem MKP-1 inaktiviraju se signalni putevi JNK i p38 [170].

1.3 CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni je cilj ovog rada sustavno ispitati učinke imunomodulatornih tvari na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u nediferenciranim i diferenciranim stanicama monocitno-makrofagne loze.

Kako bi se mogao ostvariti postavljeni cilj, potrebno je:

- izabrati prikladnu staničnu liniju monocitno-makrofagne loze koja u detektabilnoj mjeri eksprimira *LGALS3* i galektin-3
- optimirati metodu za određivanje razine ekspresije *LGALS3*, koja uključuje izolaciju intaktne RNA, reverznu transkripciju praćenu lančanom reakcijom polimerazom te određivanje količine nastalih produkata
- potvrditi specifičnost umnažanja lančanom reakcijom polimerazom sekvenciranjem produkata te reakcije
- izložiti stanice monocitne stanične linije 72-satnom djelovanju
  - slabe nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (aspirina)
  - jake nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (indometacina)
  - slabe steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (hidroksikortizona)
  - jake steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (deksametazona)

  niskih, srednjih i visokih terapeutskih koncentracija.
- odrediti vijabilnost i metaboličku aktivnost stanica izloženih djelovanju imunomodulatornih tvari, odnosno citotoksičnost primijenjenih koncentracija imunomodulatornih tvari
- diferencirati stanice monocitne stanične linije u makrofage
- izložiti diferencirane stanice 72-satnom djelovanju
  - slabe nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (aspirina)
  - jake nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (indometacina)
  - slabe steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (hidroksikortizona)
  - jake steroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (deksametazona)

  srednjih i visokih terapeutskih koncentracija
- prirediti stanične homogenate kontrolnih stanica i stanica sakupljenih 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon izlaganja navedenim tvarima
- odrediti količinu galektina-3 u staničnim homogenatima imunoblot metodom uz primjenu specifičnih protutijelaodrediti količinu mRNA za galektin-3 u kontrolnim stanicama i stanicama sakupljenim 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon izlaganja navedenim tvarima optimiranom metodom za određivanje razine ekspresije *LGALS3*

MATERIJAL I METODE

2.1 MATERIJAL

Materijal i kemikalije upotrijebljeni u ovom radu nabavljeni su od:

Agilent Technologies (Palo Alto, CA, SAD)
Amersham Biosciences (Cardiff, Velika Britanija)
Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD)
Biochrom (Berlin, Njemačka)
Fermentas (Vilnius, Litva)
Fluka (St. Louis, MO, SAD)
Invitrogen (Carlsbad, CA, SAD)
Kemika (Zagreb, Hrvatska)
Merck (Darmstadt, Njemačka)
Millipore (Bedford, MA, SAD)
Oncogene Research Products (Darmstadt, Njemačka)
Pharmacia (Uppsala, Švedska)
Promega (Madison, WI, SAD)
Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, SAD)
Roche (Mannheim, Njemačka)
Roth (Karlsruhe, Njemačka)
Sigma (St. Louis, MO, SAD)

2.1.1 Standardne kemikalije

agaroza	Sigma
albumin goveđeg seruma	Roth
akrilamid/bisakrilamid mix 37,5:1 (30%)	Sigma
amfotericin	Invitrogen
amonijev persulfat	Sigma
aspirin	Sigma
bicinkoninična kiselina	Sigma
$CuSO_4$ x $5H_2O$	Sigma
deksametazon	Sigma
dietil-pirokarbonat	Sigma
DMSO	Sigma
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
EDTA	Roth
etanol (96%)	Kemika
etidij bromid	Sigma
fetalni teleći serum	Invitrogen
forbol-12-miristat-13-acetat	Sigma
GBX Developer/Replanisher	Sigma
GBX Fixer/Replanisher	Sigma
glicerol (redest.)	Kemika
glicin	Sigma
HCl (36%)	Kemika
hidrokortizon	Sigma
indometacin	Fluka
izopropanol	Sigma
ledena octena kiselina	Kemika
β-merkaptoetanol	Sigma
metanol	Kemika
MuL V reverzna transkriptaza	Invitrogen
NaCl	Roth

NaOH	Sigma
PBS - Seromed®, Dulbeco, pH 7,4	Biochrom
penicillin G	Sigma
Platinum Taq polimeraza	Invitrogen
plazmocin	Invitrogen
PMSF	Sigma
ribonukleazni inhibitor	Invitrogen
SDS	Sigma
streptomicin-sulfat	Sigma
Temed	Sigma
Template Suppression Reagent	Applied Biosystems
Tris (tris[hidroksimetil]aminometan) - Trizma baze®	Sigma
Triton X-100	Merck
Tween-20	Roth

2.1.2 Boje

bromfenol plavo	Sigma
tripansko modrilo	Sigma
ksilen-cijanol	Sigma

2.1.3 Standardi

obojeni standardi molekulskih masa-proteini	Sigma
standardi molekulskih masa-DNA	Fermentas
GeneScan®-500 TAMRA standard	Applied Biosystems

2.1.4 Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija - kompleti

ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTag®DNA Polymerase	Applied Biosystems
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma
CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution Reagent	Promega
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen
RNA 6000 Nano LabChip®Kit	Agilent Technologies
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.5 Protutijela

- štakorsko monoklonsko protutijelo M3/38 razvijeno naspram mišjeg galektina-3 koje hibridoma stanice TIB-166 izlučuju u medij (ATCC, SAD)
- mišje monoklonsko protutijelo razvijeno naspram kokošjeg aktina (Oncogene Research Products, Darmstadt, Njemačka)
- kozje poliklonsko protutijelo razvijeno naspram cijele molekule štakorskog imunoglobulina G obilježeno peroksidazom iz hrena (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- kozje poliklonsko protutijelo razvijeno naspram cijele molekule mišjeg imunoglobulina M obilježeno peroksidazom iz hrena (Oncogene Research Products, Darmstadt, Njemačka)

2.1.6 Pribor

filter papir Munktell® 1F	Pharmacia
Immobilon-PVDF membrane	Millipore
Lumi-film Chemiluminescent Detection Film	Roche

2.1.7 Otopine i puferi

Otopina aspirina

aspirin	2 M
u DMSO	

Otopina deksametazona

deksametazon	0,5 mM
u DMSO	

Otopina indometacina

indometacin	5 mM
u DMSO	

Otopina hidrokortizona

hidrokortizon	5 mM
u DMSO	

Otopina etidij bromida

etidij bromid	5 x 10^{-5} %
u dest. vodi	

Otopina PMSF

PMSF	100 mM
u izopropanolu	

Pufer za elektroforezu u SDS-PAG, pH 8,3

glicin	192,0 mM
Tris HCl	25,0 mM
SDS	3,5 mM
u dest. vodi	

Pufer za homogenizaciju stanica, pH 8,0

Tris HCl	5 mM
NaCl	15 mM
PMSF	2 mM
Triton X-100	1%
u dest. vodi	

Pufer za nanošenje uzoraka na SDS-PAG, pH 6,8

Tris HCl	0,1875 M
glicerol	20,0%
β-merkaptoetanol	5,0%
SDS	6%
bromfenol plavo	0,1%
u dest. vodi	

6 x pufer za nanošenje uzoraka DNA, pH 6,8

glicerol	30,0%
bromfenol plavo	0,25%
ksilen-cijanol	0,25 %
u dest. vodi	

Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer I, pH 10,4

Tris HCl	0,3 M
metanol	20%
u dest. vodi	

Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer II, pH 10,4

Tris HCl	0,025 M
metanol	20%
u dest. vodi	

Pufer za prijenos na membranu - katodni pufer, pH 9,4

Tris HCl	0,025 M
glicin	0,04 M
metanol	20%
u dest. vodi	

TAE-pufer, pH 8,3

Tris acetat	40 mM
EDTA	1 mM
u dest. vodi	

TBS, pH 7,5

Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
u dest. vodi	

TBST, pH 7,5

Tween-20	0,1%
u *TBS, pH 7,5*	

2.1.8 Gelovi za elektroforezu

Gel za sabijanje 5%

akrilamid/bisakrilamid mix 37,5:1 (30%)	5,00%
Tris HCl, pH 6,8	0,25 M
SDS	0,10%
amonijev persulfat	0,10%
Temed	0,05%
u dest. vodi	

Gel za razdvajanje 12%

akrilamid/bisakrilamid mix 37,5:1 (30%)	12,00%
Tris HCl, pH 8,8	0,375 M
SDS	0,10%
amonijev persulfat	0,10%
Temed	0,05%
u dest. vodi	

2.2 METODE

2.2.1 Stanične kulture

U pokusima su korištene stanice stanične linije ljudskih monocitnih stanica THP-1 te diferencirane stanice stanične linije THP-1. Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u plastičnim bocama/petrijevkama za stanične kulture u termostatu pri 37°C u struji zraka s 5% CO_2, relativne vlažnosti 95%. Kao hranidbeni medij korišten je RPMI 1640 medij obogaćen dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma, 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml streptomicin-sulfata, 250 ng/ml amfotericina te 2,5 µg/ml plazmocina.
Gustoća stanične kulture nediferenciranih stanica THP-1 održavana je između 1 x 10^5 i 8 x 10^5 stanica / ml kulture. Stanice su brojane uporabom hemocitometra.

Diferencijacija stanica THP-1 postignuta je tretiranjem stanica THP-1 forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA) na sljedeći način:
Alikvoti stanične kulture THP-1 koji sadrže 4 x 10^6 stanica, odnosno 1 x 10^6 stanica centrifugirani su 10 min pri 600*g*. Talozi stanica resuspendirani su u 1 ml hranidbenog medija, te razrijeđeni dodatkom otopine PMA u DMSO do konačne koncentracije stanica 5 x 10^5 stanica/ml, koncentracije PMA 10^{-7} M, te koncentracije DMSO < 0,2%. Stanice su kultivirane u sterilnim uvjetima u plastičnim Petri zdjelicama za stanične kulture (4 x 10^6 stanica u 100 x 20 mm Petri zdjelicama, odnosno 1 x 10^6 stanica u 60 x 15 mm Petri zdjelicama) tijekom 1, 3, 5, 24 ili 48 sati. Po isteku navedenih vremena određen je postotak neadheriranih stanica u mediju brojanjem stanica pomoću hemocitometra. Medij je potom odliven, a adherirane su stanice isprane hladnim PBS. Blagim struganjem silikonskim strugačem podignuto je:

- ~ 4 x 10^6 stanica iz 100 x 20 mm Petri zdjelica u 2 ml hladnog PBS. Nakon centrifugiranja 10 minuta pri 600*g* stanice su još dva puta isprane PBS a potom pohranjene na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14.
- ~ 1 x 10^6 stanica iz 60 x 15 mm Petri zdjelica u 350 µl pufera RLT/1 % β-merkaptoetanol te pohranjeno na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.2 Tretiranje stanica THP-1 aspirinom

Za potrebe pokusa alikvoti stanične kulture koji sadrže 3 x 10^7 stanica THP-1 prenijeti su u plastične boce za stanične kulture (175 cm^2, Nunclon) te je dodano:

a) medija do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml. Te su stanice smatrane kontrolnim, netretiranim stanicama.
b) medija i DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml te koncentracije DMSO 0,2%. Te su stanice smatrane kontrolnim stanicama tretiranim DMSO kako bi se isključio mogući utjecaj DMSO.

c) medija i 2 M otopine aspirina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije aspirina 0,1 mM te koncentracije DMSO < 0,2%.
d) medija i 2 M otopine aspirina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije aspirina 0,5 mM te koncentracije DMSO < 0,2%.
e) medija i 2 M otopine aspirina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije aspirina 1 mM te koncentracije DMSO < 0,2%.
f) medija i 2 M otopine aspirina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije aspirina 2 mM te koncentracije DMSO < 0,2%.

Iz svake pojedine, na opisani način priređene kulture 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon početka tretmana odvajani su alikvoti stanične suspenzije koji sadrže 4 x 10^6 stanica te 1 x 10^6 stanica. Iz kontrolne, netretirane kulture alikvot stanica odvojen je i neposredno prije početka pokusa, odnosno u vremenu O. Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 600*g* te su dobiveni talozi, koji sadrže 4 x 10^6 stanica, isprani 3 puta hladnim PBS i pohranjeni na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14. Talozima koji sadrže 1 x 10^6 stanica dodano je 350 µl pufera RLT/1% β-merkaptoetanol. Pohranjeni su na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.3 Tretiranje stanica THP-1 indometacinom

Za potrebe pokusa alikvoti stanične kulture koji sadrže 3 x 10^7 stanica prenijeti su u plastične boce za stanične kulture (175 cm^2, Nunclon) te je dodano:

a) medija do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml. Te su stanice smatrane kontrolnim, netretiranim stanicama.
b) medija i DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml te koncentracije DMSO 0,2%. Te su stanice smatrane kontrolnim stanicama tretiranim DMSO kako bi se isključio mogući utjecaj DMSO.
c) medija i 5 mM otopine indometacina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije indometacina 0,1 µM te koncentracije DMSO < 0,2%.
d) medija i 5 mM otopine indometacina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije indometacina 1 µM te koncentracije DMSO < 0,2%.
e) medija i 5 mM otopine indometacina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije indometacina 5 µM te koncentracije DMSO < 0,2%.
f) medija i 5 mM otopine indometacina u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije indometacina 10 µM te koncentracije DMSO 0,2%.

Iz svake pojedine, na opisani način priređene kulture 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon početka tretmana odvajani su alikvoti stanične suspenzije koji sadrže 4 x 10^6 stanica te 1 x 10^6 stanica. Iz kontrolne, netretirane kulture alikvot stanica odvojen je i neposredno prije početka pokusa, odnosno u vremenu O. Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 600*g* te su dobiveni talozi, koji sadrže 4 x 10^6 stanica, isprani 3 puta hladnim PBS i pohranjeni na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14. Talozima koji sadrže 1 x 10^6 stanica dodano je 350 μl pufera RLT/1% β-merkaptoetanol. Pohranjeni su na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.4 Tretiranje stanica THP-1 hidrokortizonom

Za potrebe pokusa alikvoti stanične kulture koji sadrže 3 x 10^7 stanica prenijeti su u plastične boce za stanične kulture (175 cm^2, Nunclon) te je dodano:

a) medija do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml. Te su stanice smatrane kontrolnim, netretiranim stanicama.
b) medija i DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml te koncentracije DMSO 0,2%. Te su stanice smatrane kontrolnim stanicama tretiranim DMSO kako bi se isključio mogući utjecaj DMSO.
c) medija i 5 mM otopine hidrokortizona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije hidrokortizona 0,1 μM te koncentracije DMSO < 0,2%.
d) medija i 5 mM otopine hidrokortizona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije hidrokortizona 1 μM te koncentracije DMSO < 0,2%.
e) medija i 5 mM otopine hidrokortizona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije hidrokortizona 5 μM te koncentracije DMSO < 0,2%.
f) medija i 5 mM otopine hidrokortizona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije hidrokortizona 10 μM te koncentracije DMSO 0,2%.

Iz svake pojedine, na opisani način priređene kulture 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon početka tretmana odvajani su alikvoti stanične suspenzije koji sadrže 4 x 10^6 stanica te 1 x 10^6 stanica. Iz kontrolne, netretirane kulture alikvot stanica odvojen je i neposredno prije početka pokusa, odnosno u vremenu O. Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 600*g* te su dobiveni talozi koji sadrže 4 x 10^6 stanica isprani su 3 puta hladnim PBS i pohranjeni na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14. Talozima koji sadrže 1 x 10^6 stanica dodano je 350 μl pufera RLT/1% β-merkaptoetanol. Pohranjeni su na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.5 Tretiranje stanica THP-1 deksametazonom

Za potrebe pokusa alikvoti stanične kulture koji sadrže 3 x 10^7 stanica prenijeti su u plastične boce za stanične kulture (175 cm^2, Nunclon) te je dodano:

a) medija do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml. Te su stanice smatrane kontrolnim, netretiranim stanicama.
b) medija i DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml te koncentracije DMSO 0,2%. Te su stanice smatrane kontrolnim stanicama tretiranim DMSO kako bi se isključio mogući utjecaj DMSO.
c) medija i 0,5 mM otopine deksametazona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije deksametazona 0,1 nM te koncentracije DMSO < 0,2%.
d) medija i 0,5 mM otopine deksametazona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije deksametazona 1 nM te koncentracije DMSO < 0,2%.
e) medija i 0,5 mM otopine deksametazona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije deksametazona 10 nM te koncentracije DMSO < 0,2%.
f) medija i 0,5 mM otopine deksametazona u DMSO do konačnog volumena 150 ml, odnosno gustoće stanica 2 x 10^5 stanica/ml, koncentracije deksametazona 100 nM te koncentracije DMSO 0,2%.

Iz svake pojedine, na opisani način priređene kulture 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata nakon početka tretmana odvajani su alikvoti stanične suspenzije koji sadrže 4 x 10^6 stanica te 1 x 10^6 stanica. Iz kontrolne, netretirane kulture alikvot stanica odvojen je i neposredno prije početka pokusa, odnosno u vremenu O. Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 600*g* te su dobiveni talozi, koji sadrže 4 x 10^6 stanica, isprani 3 puta hladnim PBS i pohranjeni na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14. Talozima koji sadrže 1 x 10^6 stanica dodano je 350 µl pufera RLT/1% β-merkaptoetanol. Pohranjeni su na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.6 Tretiranje diferenciranih stanica THP-1 aspirinom, indometacinom, hidrokortizonom i deksametazonom

Stanice THP-1 diferencirane su uz forbol-12-miristat-13-acetat (koncentracije 10^{-7} M) tijekom 48 sati prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.1. Medij (koji sadrži PMA) je zatim odliven, a adheriranim je stanicama potom dodan:

a) medij. Te su stanice smatrane kontrolnim, netretiranim diferenciranim stanicama.
b) medij/0,2% DMSO. Te su stanice smatrane kontrolnim diferenciranim stanicama tretiranim DMSO kako bi se isključio mogući utjecaj DMSO.
c) 0,5 mM otopina aspirina u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO < 0,2%.

d) 2 M otopina aspirina u mediju, u kojoj je koncentracije DMSO < 0,2%.
e) 1 μM otopina indometacina u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO < 0,2%.
f) 10 μM otopina indometacina u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO 0,2%.
g) 1 μM otopina hidrokortizona u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO < 0,2%.
h) 10 μM otopina hidrokortizona u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO 0,2%.
i) 1 nM otopina deksametazona u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO < 0,2%.
j) 100 nM otopina deksametazona u mediju, u kojoj je koncentracija DMSO 0,2%.

Stanice su kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. Medij je potom odliven, a adherirane su stanice isprane hladnim PBS. Blagim struganjem silikonskim strugačem podignuto je:

- ~ 4 x 10^6 stanica iz 100 x 20 mm Petri zdjelica u 2 ml hladnog PBS. Nakon centrifugiranja 10 minuta pri 600*g* stanice su još dva puta isprane PBS a potom pohranjene na –20°C do priprave staničnog homogenata prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.14.
- ~ 1 x 10^6 stanica iz 60 x 15 mm Petri zdjelica u 350 μl pufera RLT/1 % β-merkaptoetanol te pohranjeno na –20°C do izolacije ukupne RNA prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.9.

2.2.7 Određivanje broja živih stanica bojanjem tripanskim modrilom

Postotak živih stanica nakon tretiranja stanica opisanog u poglavljima 2.2.1 do 2.2.6 određen je po sakupljanju stanica metodom bojanja tripanskim modrilom. Žive stanice tripansko modrilo koje prodire u unutrašnjost stanice aktivno izbacuju, dočim mrtve stanice nemaju to svojstvo, pa boja slobodno prodire u stanicu i zadržava se u njoj. Suspenzija stanica u PBS (20 μl) pomiješana je s jednakim volumenom 0,2% otopine tripanskog modrila. Bürkerova komorica napunjena je priređenim uzorkom te su pod mikroskopom (*Opton*, povećanje 8 x 40) izbrojane neobojane i obojane stanice. Rezultat je izražen kao postotak živih stanica.

2.2.8 MTS test

MTS test (CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay) je kolorimetrijska metoda ispitivanja proliferacije i citotoksičnosti. CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution reagens sadrži tetrazolijevu sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij-bromid (MTS) i elektron-akceptor fenazin-etosulfat (PES). MTS (blijedo-žuti supstrat) se reducira enzimima endoplazmatskog retikuluma pri čemu nastaje formazan (tamnosmeđi krajnji produkt). Kako MTS reduciraju samo žive stanice, ovim se kolorimetrijskim testom mjeri redukcijski potencijal stanica odnosno metabolička aktivnost stanica.

Za potrebe ispitivanja proliferacije stanica THP-1 i citotoksičnog djelovanja primijenjenih tvari u jažice mikrotitarske ploče (s 96 jažica) nanijeto je 50 μl stanične kulture THP-1 koncentracije 1 x 10^6 stanica/ml ili 50 μl hranidbenog medija bez stanica. Potom je u jažice nanijeto 50 μl otopine različitih koncentracija aspirina, indometacina, hidrokortizona, deksametazona i DMSO te je konačna koncentracija spojeva bila jedna od navedenih:

a) 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM aspirin
b) 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM indometacin
c) 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM indometacin
d) 0,1 nM, 1 nM, 10 nM i 100 nM deksametazon
e) 0,2 % DMSO

Za potrebe ispitivanja proliferacije stanica THP-1 diferenciranih10^{-7} M otopinom PMA i citotoksičnog djelovanja primijenjenih tvari na njih, u jažice mikrotitarske ploče (s 96 jažica) nanijeto je po 50 μl stanične kulture THP-1 stanica koncentracije 1x 10^6 stanica/ml te 50 μl 2 x 10^{-7} M otopine PMA. Nakon 48 sati inkubacije medij je odsisan, a na adherirane je stanice dodano po 100 μl otopine različitih koncentracija aspirina, indometacina, hidrokortizona, deksametazona i DMSO, te je konačna koncentracija spojeva bila jedna od navedenih:

a) 0,5 mM i 2 mM aspirin
b) 1 μM i 10 μM indometacin
c) 1 μM i 10 μM indometacin
d) 1 μM i 100 μM deksametazon
e) 0,2 % DMSO

Nakon inkubacije tijekom 24, 48 te 72 sata u termostatu pri 37°C u struji zraka s 5%CO_2, relativne vlažnosti 95%, u jažice je dodano po 20 μl reagensa CellTiter 96®AQ_{ueous} One Solution te je nakon 2 sata inkubacije pri 37°C izmjerena apsorbancija otopina pri 490 nm na uređaju Victor^2-1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*). Rezultati su izraženi kao omjeri apsorpcijskih jedinica izmjerenih za tretirane stanice (umanjenih za apsorpcijske jedinice medija sa spojevima bez stanica) i apsorpcijskih jedinica izmjerenih za netretirane stanice (umanjenih za apsorpcijske jedinice hranidbenog medija).

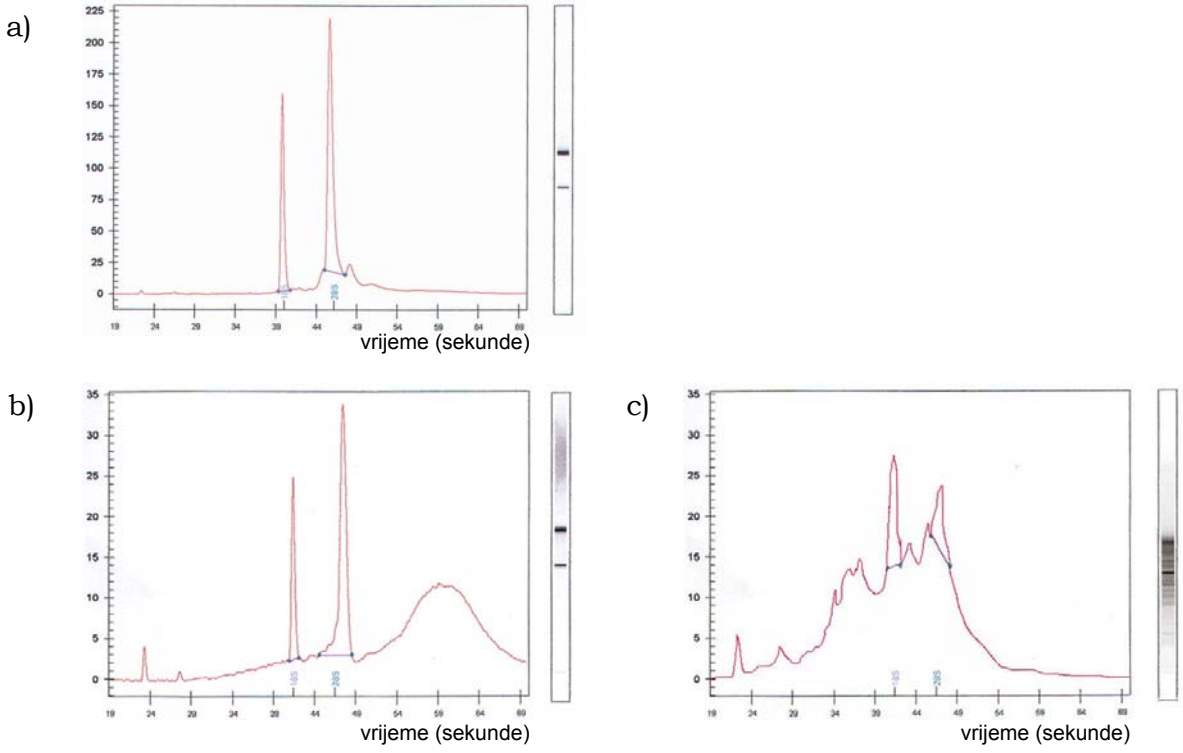
2.2.9 Izolacija ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz stanica u kulturi uporabom kompleta RNeasy® Mini Kit. Stanice su lizirane dodatkom 350 μl pufera RLT/1% β-merkaptoetanol, u lizat je dodano 350 μl 70% etanola u vodi te je tako priređena smjesa nanijeta na RNeasy mini kolonu. Nakon centrifugiranja 15 sekundi pri 8000*g* filtrat je odbačen, a kolona je isprana puferom RW1 (700 μl) te dva puta puferom RPE (500 μl) (nakon dodatka svakog pojedinog pufera uslijedilo je centrifugiranje 15 sec pri 8000*g* i odbacivanje filtrata). Ukupna RNA s kolone je eluirana vodom (u kojoj su uništene ribonukleaze - 30 μl) uz centrifugiranje 1 min pri 8000*g*. U otopinu RNA odmah je dodano

1 µl otopine ribonukleaznog inhibitora (do konačne koncentracije 1 U/µl) te je otopina RNA pohranjena na -80°C.

2.2.10 Određivanje koncentracije i kvalitete izolirane RNA

Provjera integriteta i čistoće izolirane ukupne RNA, kao i određivanje koncentracije RNA provedena je primjenom tehnologije "laboratorija na čipu" na uređaju Agilent 2100 bioanalyzer (*Agilent Technologies*) uporabom kompleta RNA 6000 Nano LabChip®Kit. Metoda se temelji na elektrokinetičkom i tlačnom razdvajanju komponenata smjese nanijete na čip-pločicu čija se unutrašnjost sastoji od mreže tankih kanala ispunjenih gelom, puferom i bojom. Na čip se nanosi po 1 µl uzorka (otopine izolirane ukupne RNA) kao i standard (otopina molekula RNA različitih veličina i poznatih koncentracija). Razdvajanje i analiza rezultata provodi se na uređaju Agilent 2100 bioanalyzer. Rezultati se prikazuju u obliku virtualnog gela ili elektroferograma. Analizom dobivenih vrpci moguće je odrediti koncentraciju ukupne RNA te ujedno provjeriti kvalitetu (intaktnost RNA) i čistoću (prisutnost DNA) uzorka (slika 2.1).



Slika 2.1 Analiza ukupne RNA na uređaju Agilent 2100 bioanalyser. Elektroferogrami i virtualni gelovi dobiveni analizom ukupne RNA na uređaju Agilent 2100 bioanalyser. a) visokokvalitetna ukupna RNA b) ukupna RNA kontaminirana s DNA c) raspadnuta ukupna RNA.

2.2.11 Reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom

Uzorci ukupne RNA za koje je postupkom opisanim u poglavlju 2.2.10 utvrđeno da sadrže intaktnu RNA bez kontaminacije s DNA reverzno su

transkribirani uz uporabu oligo dT ishodnica. Reakcijske smjese za reverznu transkripciju pripravljene su kao što je navedeno u tablici 2.1. Ukupan volumen reakcijske smjese je bio 20 µl.

Tablica 2.1. Sastav reakcijskih smjesa za reverznu transkripciju.

sastojak	volumen	konačna koncentracija
$MgCl_2$ (50 mM)	2 µl	5 mM
10 x PCR pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl, pH= 8,3)	2 µl	1 x
smjesa dNTP (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dTTP, 25 mM dGTP)	0,8 µl	1 mM
MuL V reverzna transkriptaza (200 U/µl)	0,252 µl	2,5 U/µl
ishodnica oligo dT (100 µM)	0,5 µl	2,5 µM
otopina RNA	3,2 µl	~0,8 µg/20 µl
DEPC-H_20	11,248 µl	

Reverzna transkripcija odvijala se u uređaju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp®PCR System 2700, *Applied Biosystems*) tijekom 60 minuta pri 37°C. Potom je uslijedilo zagrijavanje reakcijske smjese na 95°C tijekom 5 minuta kako bi se razdvojili hibridi RNA-cDNA i naglo hlađenje na +4°C.
Kako bi se umnožili dijelovi mRNA za galektin-3 te β-aktin, odvojeno po 2 µl uzorka nakon reverzne transkripcije te su u njih dodani reagensi potrebni za lančanu reakciju polimerazom prema tablici 2.2 (ukupan volumen reakcijske smjese je 10 µl).

Tablica 2.2 Sastav reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimerazom.

sastojak	volumen	konačna koncentracija
$MgCl_2$ (50 mM)	0,1 µl	1,5 mM
10 x PCR pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl, *pH= 8,3*)	0,8 µl	1 x
Platinum Taq polimeraza (5 U/µl)	0,1 µl	0,05 U/µl
sense ishodnica (50 µM)	0,1 µl	0,5 µM
antisense ishodnica (50 µM)	0,1 µl	0,5 µM
DEPC-H_20	6,8 µl	

Kao ishodnice rabljene su ili ishodnice za β-aktin ili ishodnice za galektin-3 (Tablica 2.3). *Sense* ishodnice bile su na 5'-kraju obilježene fluorescentnom bojom 6-karboksifluoresceinom (6-FAM).

Tablica 2.3 Ishodnice za lančanu reakciju polimerazom.

ishodnica	nukleotidni slijed	T_m (°C)	veličina PCR produkta
sense - za galektin-3	5'-TGCTGATAACAATTCTGGGC-3'	62,5	288 bp
antisense - za galektin-3	5'-TAACCCGATGATTGTACTGC-3'	60	
sense - za β-aktin	5'-CATGTGCAAGGCCGGCTTCG-3'	75	226 bp
antisense - za β-aktin	5'-GAAGGTGTGGTGCCAGATTT-3'	63,9	

Reakcija se odvijala u uređaju za lančanu reakciju polimerazom na sljedeće načine, ovisno o tome jesu li rabljene ishodnice za β-aktin ili galektin-3:

	ishodnice za β-aktin		ishodnice za galektin-3	
1. početna denaturacija	95°C ; 1 minuta 45 sekundi		95°C ; 1 minuta 45 sekundi	
2. a) denaturacija	95°C ; 1 minuta	14 ciklusa	95°C ; 1 minuta	21 ciklus
b) sljepljivanje ishodnica	63°C ; 1 minuta		58°C ; 1 minuta	
c) elongacija	72°C ; 1 minuta		72°C ; 1 minuta	
3. završna elongacija	72°C ; 5 minuta		72°C ; 5 minuta	

Slijedilo je naglo hlađenje na +4°C.

2.2.12 Određivanje nukleotidnog slijeda PCR produkata

Kako bismo provjerili jesu li se po izolaciji RNA i reverznoj transkripciji u lančanoj reakciji polimerazom zaista umnožili upravo i isključivo dijelovi mRNA koji kodiraju galektin-3 i β-aktin, bilo je potrebno provjeriti nukleotidni slijed PCR produkata. Određivanje nukleotidnog slijeda sastoji se od nekoliko koraka:

1. pročišćavanje PCR produkata nakon lančane reakcije polimerazom
2. provjera uspješnosti pročišćavanja i određivanje koncentracije PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu
3. reakcija sekvenciranja
4. pročišćavanje produkata sekvenciranja
5. određivanje nukleotidnog slijeda razdvajanjem produkata sekvenciranja na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*)

1. PROČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA NAKON LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM

Pročišćavanje PCR produkata nakon lančane reakcije polimerazom provedeno je uporabom kompleta QIAquick PCR Purification Kit.
Nakon lančane reakcije polimerazom opisane u poglavlju 2.2.11 (uz jedinu modifikaciju opisanog postupka – umnažanje dijelova cDNA za β-aktin i galektin-3 odvijalo se tijekom 30 ciklusa), 15 µl smjese pomiješano je s 75 µl pufera PB i nanijeto na QIAquick kolonu. Nakon centrifugiranja 60 sekundi pri 12000*g* filtrat je bačen a pranje vezane DNA postignuto je dodatkom 750 µl pufera PE i centrifugiranjem 2 x 60 sekundi pri 12000*g*. QIAquick kolona je premještena u novu epruvetu, na nju je dodano 30 µl pufera EB, te je nakon inkubacije 1 minutu pri sobnoj temperaturi i centrifugiranja 1 minutu pri 12000*g* sakupljen eluat koji sadrži PCR produkte pročišćene od dNTP i ishodnica zaostalih nakon lančane reakcije polimerazom.

2. PROVJERA USPJEŠNOSTI PROČIŠĆAVANJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PCR PRODUKATA ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU

1,5% agarozni gel priređen je zagrijavanjem agaroze u TAE-puferu do vrenja. Otopina ohlađena do 60°C izlivena je u kalup. Uzorcima pročišćenih PCR produkata dodana je 1/5 volumena *6 x pufera za nanošenje uzoraka DNA*. U jednu je jažicu stavljen i standard DNA (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder). Elektroforeza je provedena u TAE-puferu pri jakosti električnog

polja 5-7 V/cm dok tamnoplava boja (bromfenol plavo) nije dosegla rub gela. Gel je bojan 20 minuta u otopini etidij-bromida (0,5 μg/ml) u vodi. Položaj DNA u gelu utvrđen je na temelju fluorescencije interkaliranog etidijevog bromida pri UV-svjetlu valne duljine 312 nm. Na temelju intenziteta fluorescencije moguće je približno odrediti koncentraciju pročišćenih PCR produkata. Pri tom se intenzitet fluorescencije željene vrpce uspoređuje s intenzitetom fluorescencije vrpce približno jednake veličine koja sadrži poznatu količinu DNA.

3. REAKCIJA SEKVENCIRANJA

Reakcija sekvenciranja pročišćenih PCR produkata provedena je uporabom kompleta ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTag®DNA Polymerase. Reakcija se temelji na dideoksi-metodi sekvenciranja DNA. Komplet uz polimerazu, pufer i dNTP sadrži i dideoksi-NTP obilježene četirima različitim rodaminskim fluorescentnim bojama (ddATP je obilježen bojom dR6G, ddCTP bojom dROX, ddGTP bojom dR110 a ddTTP bojom dTAMRA). 10 μl reakcijske smjese priređuje se miješanjem odgovarajućeg volumena pročišćenog PCR produkta (koji sadrži ~5 μg PCR produkta), odgovarajućeg volumena otopine *sense* ishodnice (količina ishodnica 1,6 pmol), 4 μl smjese Ready Reaction mix i vode. Reakcija sekvenciranja se odvija u uređaju za lančanu reakciju polimerazom na sljedeći način:

1. početna denaturacija	95°C; 4 minute	
2. a) denaturacija	95°C; 30 sekundi	} 25 ciklusa
b) sljepljivanje ishodnica	50°C; 15 sekundi	
c) elongacija	60°C; 4 minute	

Slijedi naglo hlađenje na +4°C.

4. PROČIŠĆAVANJE PRODUKATA SEKVENCIRANJA

Nakon reakcije sekvenciranja potrebno je iz reakcijske smjese ukloniti višak dideoksi-NTP obilježenih fluorescentnim bojama. U tu je svrhu rabljen komplet DyeEx™ 2.0 Spin Kit. 1 μl 2,2 % SDS dodan je u reakcijsku smjesu nakon reakcije sekvenciranja (u svrhu boljeg pročišćavanja) te je, nakon inkubacije 5 minuta pri 98°C i 10 minuta pri 25°C smjesa nanijeta na kolonu DyeEx™ 2.0 Spin. Nakon centrifugiranja 3 minute pri 800*g* eluat (koji sadrži pročišćene produkte sekvenciranja) je uparen do suha u uređaju "Speed Vac" (*Applied Biosystems*) tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi.

5. ODREĐIVANJE NUKLEOTIDNOG SLIJEDA PCR PRODUKATA

Upareni pročišćeni produkti sekvenciranja otopljeni su u 17 μl reagensa Template Suppression Reagent (TSR, *Applied Biosystems*), denaturirani pri 95°C tijekom dvije minute, te ohlađeni na ledu. Kapilarna elektroforeza i detekcija fluorescentno obilježenih fragmenata DNA provedene su uređajem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Elektroforeze su provedene tijekom 120 minuta korištenjem modula Seq POP 6 (1 ml) E uz vrijeme injektiranja uzorka 30 sekundi, voltaži struje tijekom elektroforeze 12,2 kV te temperaturi polimera POP 6 50°C. Za analizu rezultata korišten je program Sequencing Analysis software.

2.2.13 Određivanje veličine i količine PCR produkata

Nakon što su lančanom reakcijom polimerazom umnoženi dijelovi mRNA za galektin-3 odnosno β-aktin iz određenog uzorka, po 0,5 µl tih smjesa pomiješano je s 0,5 µl GeneScan®-500 TAMRA standarda i 11,5 µl deioniziranog formamida. GeneScan®-500 TAMRA standard sadrži fragmente DNA poznatih veličina obilježenih fluorescentom bojom TAMRA (karboksitetrametilrodamin). Kapilarna elektroforeza i detekcija fluore–scentno obilježenih fragmenata DNA obavljena je na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Elektroforeze su provedene tijekom 24 minute korištenjem modula GS STR POP 4 (1 ml) A uz vrijeme injektiranja uzorka 3 sekunde, voltaži struje tijekom elektroforeze 15 kV te temperaturi polimera POP 4 60°C.

Za kvantifikaciju količine fragmenata DNA korišten je program GeneScan 2.1 software kojim su određene površine *peakova* na elektroforetogramu koji odgovaraju fragmentima DNA veličine 226 bp (nastalih umnažanjem dijela mRNA za β-aktin) odnosno 288 bp (nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3). Rezultati su izražavani kao omjer površina *peakova* za galektin-3 i β-aktin određenog uzorka u odnosu na omjer površina *peakova* za galektin-3 i β-aktin kontrolnog uzorka (stanica tretiranih 0,2% otopinom DMSO tijekom odgovarajućih vremena).

2.2.14 Priprava staničnog homogenata

Sakupljene i isprane stanice (4 x 10^6 stanica) resuspendirane su u 150 µl *pufera za homogenizaciju stanica* te sonicirane ultrazvučnim sonikatorom (Soniprep 150, *MSE Scientific Instruments*) 4 x 15 sec uz amplitudu 5 µm i frekvenciju 22 kHz na ledu. Nakon centrifugiranja 10 minuta pri 600 g odvojeni su stanični homogenati od netopljivih taloga.

2.2.15 Određivanje koncentracije proteina

Odmah nakon homogenizacije, koncentracija proteina u staničnim homogenatima određena je metodom s bicinkoniničnom kiselinom (BCA) [171]. U tu svrhu po 2 µl staničnih homogenata razrijeđeno je vodom do konačnog volumena 100 µl (razrjeđenje 1:50). Uzorci (100 µl) inkubirani su 30 minuta pri 37°C s 1 ml otopine dobivene miješanjem otopine BCA iz kita s 4%-tnom otopinom $CuSO_4x5H_2O$ u volumnom omjeru 50:1. Nakon što su uzorci ohlađeni na sobnu temperaturu, intenzitet obojenja otopine izmjeren je pri valnoj duljini 562 nm na spektrofotometru Uvikon 860 (*Kontron Instruments*). Koncentracija proteina u uzorcima očitana je iz baždarnog pravca. Kao standardna otopina proteina rabljena je otopina BSA u dest. vodi (područje koncentracija 0,01 – 0,1 mg/ml). Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u duplikatu.

2.2.16 Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Odgovarajućim volumenima uzoraka staničnih homogenata koji su sadržavali 300 µg proteina dodano je 100 µl *pufera za nanošenje uzoraka na SDS-PAG, pH 6,8* te destilirane vode do konačnog volumena 300 µl (odnosno

konačne koncentracije proteina 1 mg/ml). Tako priređeni uzorci kuhani su 5 minuta pri 96°C.
Diskontinuirana denaturirajuća gel-elektroforeza proteina provedena je u 5%-tnom sabijajućem i 12%-tnom razdvajajućem poliakrilamidnog gelu, debljine 0,5 mm, prema metodi po Laemmliju [172]. U pojedinu je jažicu nanošeno po 5 μl uzorka. Uzorka proteina poznatih molekulskih masa nanošeno je po 3 μl.

2.2.17 Postupak Western-blot

Elektroforezom razdvojeni proteini prenijeti su na PVDF Immobilon membranu u uređaju za polusuhi elektroforetski prijenos (LKB, Bromma, *Pharmacia*) pri gustoći električne struje 0,8 $mAcm^{-2}$ [173]. Membrane su potom uzdužno rezrezane na dva dijela na položaju gdje se po prilici nalaze proteini veličine 35 kDa.

Membrane su inkubirane 1 sat u puferu *TBST, pH 7,5,* u svrhu sprečavanja nespecifičnog vezanja proteina na slobodna vezna mjesta na membrani. Potom su dijelovi membrane na kojima se nalaze proteini:

a) manji od 35 kDa izložene vezanju štakorskog monoklonskog protutijela M3/38 (1:200) razvijenog naspram mišjeg galektina-3 preko noći
b) veći od 35 kDa izložene vezanju mišjeg monoklonskog protutijela (1:2500) razvijenog naspram kokošjeg aktina preko noći.

Membrane su zatim isprane (3 puta po 10 minuta) u puferu *TBST, pH 7,5*, a zatim izložene vezanju odgovarajućeg sekundarnog protutijela tijekom jednog sata, odnosno:

a) kozjeg poliklonskog protutijela razvijenog naspram cijele molekule štakorskog imunoglobulina G (1:10000) obilježenog peroksidazom iz hrena
b) kozjeg poliklonskog protutijela razvijenog naspram cijele molekule mišjeg imunoglobulina M (1:10000) obilježenog peroksidazom iz hrena.

Po ispiranju membrane 3 puta po 10 minuta u puferu *TBST, pH 7,5* membrane su inkubirane s reagensom za pojačanu kemiluminiscenciju tijekom jedne minute, a zatim je na njih u mraku postavljen film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, *Roche*), pri čemu vrijeme izlaganje filma membrani ovisilo o intenzitetu signala. Film je potom razvijen uporabom razvijača (GBX Developer/Replanisher, *Sigma*) i fiksativa (GBX Fixer/Replanisher, *Sigma*). Intenzitet signala izmjeren je denzitometrijskom analizom filma korištenjem programa Scion Image, Microsoft®. Rezultati denzitometrijske analize vrpci izraženi su u relativnim denzitometrijskim jedinicama.

2.2.18 Statističke metode

Sednja vrijednost (x) i standardna devijacija (SD) izračunate su pomoću računala korištenjem programa Excel, Microsoft®. Razina značajnosti (p) izračunata je korištenjem Student-t testa, istog programa. Statistički značajnom promjenom smatrana je promjena za koju je $p<0,05$.

REZULTATI

Galektin-3, lektin koji specifično prepoznaje β-galaktozidne strukture i kojeg, između ostalog, eksprimiraju monociti i makrofagi, ima važnu ulogu u imunim reakcijama i upalnom odgovoru. On modulira staničnu proliferaciju, staničnu adheziju, kemotaksiju, fagocitozu, sintezu upalnih medijatora te apoptozu limfocita T.
U radu smo ispitali utjecaj različitih koncentracija nesteroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem aspirina i indometacina, te steroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem hidrokortizona i deksametazona na ekspresiju gena *LGALS3* i njegovog proteinskog produkta - galektina-3 u stanicama monocitne stanične linije THP-1. Razina ekspresije *LGALS3* i galektina-3 prećena je i tijekom diferencijacije stanica THP-1 koja je bila potaknuta forbol-12-miristat-13-acetatom, spojem pod čijim utjecajem stanice THP-1 poprimaju karakteristike makrofaga. Utjecaj različitih koncentracija aspirina, indometacina, hidrokortizona i deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 ispitan je i u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1. U svim je pokusima ispitana i vijabilnost i metabolička aktivnost stanica.

3.1 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1 tijekom kultiviranja

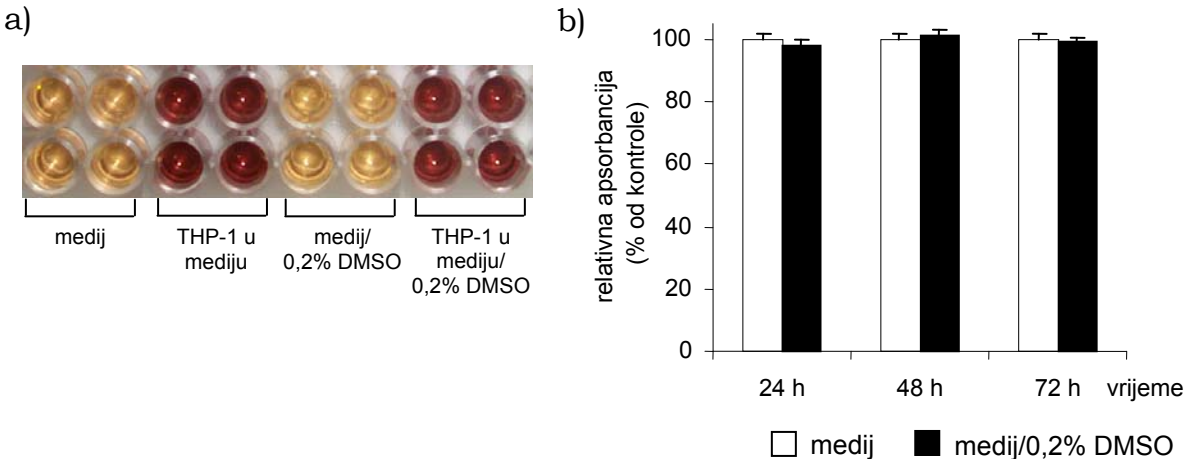
Tvari s imunomodulatornim djelovanjem korištene u ovom radu (aspirin, indometacin, hidrokortizon i deksametazon) su slabo ili uopće nisu topljive u vodenim otopinama. Zbog toga su matične otopine tvari priređene u u DMSO, a potom razrijeđene u vodenoj otopini (preciznije, hranidbenom mediju) do odgovarajućih koncentracija imunomodulatornih tvari. Maksimalna koncentracija DMSO u hranidbenom mediju iznosila je 0,2%.
Prije ispitivanja utjecaja različitih imunomodulatornih tvari na ekspresiju gena *LGALS3* i galektina-3 određene su:

a) vijabilnost i metabolička aktivnost stanica stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u hranidbenom mediju (medij) kao i tijekom 72-satnog kultiviranja u 0,2% otopini DMSO u hranidbenom mediju (medij/0,2% DMSO)
b) razina ekspresije *LGALS3* i galektina-3 tijekom 72-satnog kultiviranja stanica stanične linije THP-1 u hranidbenom mediju (medij) kao i tijekom 72-satnog kultiviranja stanica stanične linije THP-1 u 0,2% otopini DMSO u hranidbenom mediju (medij/0,2% DMSO).

U cilju određivanja vijabilnosti i metaboličke aktivnosti stanica THP-1 stanice su kultivirane tijekom 24, 48 ili 72 sata u mediju ili mediju/0,2% DMSO. Pokusi su ponovljeni 2 puta u kvadriplikatu.
Postotak živih stanica određen je metodom bojanja tripanskim modrilom (opisanom u poglavlju 2.2.7). Rezultati su pokazali da nema razlike u vijabilnosti stanica kultiviranih u mediju/0,2% DMSO u odnosu na stanice kultivirane samo u hranidbenom mediju, te da je u svim slučajevima postotak živih stanica veći od 98%.

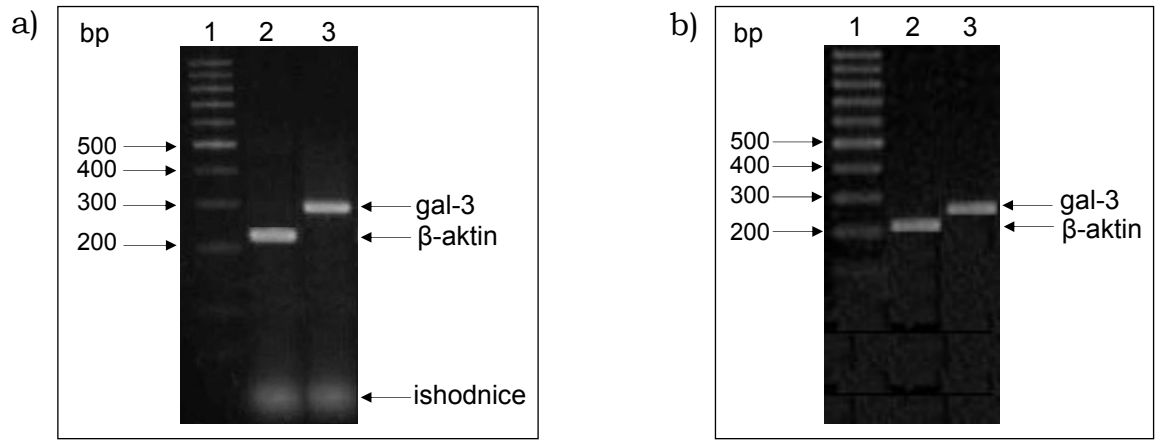
Metabolička aktivnost stanica uz 0,2% DMSO i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da medij/0,2% DMSO ne djeluje citotoksično na stanice stanične

linije THP-1 niti nakon 72 sata kultiviranja te je njihova metabolička aktivnost nepromijenjena (100±2,8%) u odnosu na metaboličku aktivnost stanica kultiviranih u hranidbenom mediju (Slika 3.1).



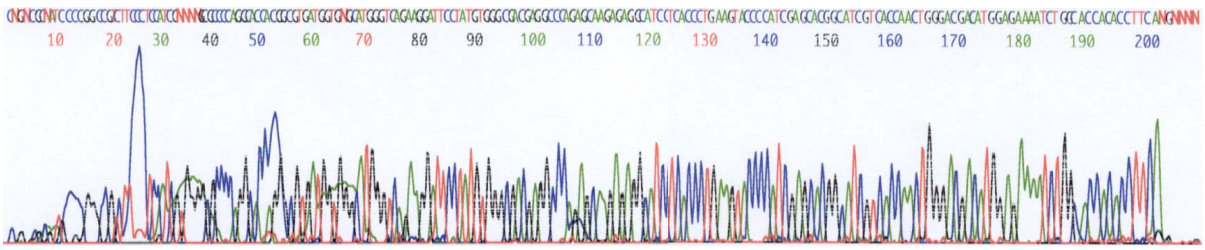
Slika 3.1 Metabolička aktivnost stanica THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju/0,2% DMSO se ne mijenja. a) Slika mikrotitarske pločice nakon MTS testa stanica THP-1 kultiviranih 24 sata u mediju ili mediju/0,2% DMSO. b) Metaboličke aktivnosti stanica THP-1 kultiviranih tijekom 24, 48 ili 72 sata u mediju odnosno mediju/0,2% DMSO izmjerene MTS testom izražene u odnosu na stanice kultivirane tijekom istog vremena u mediju (rezultati kvadriplikata dva neovisna pokusa izraženi su kao $\bar{x}$±SD).

Kako bismo utvrdili relativnu razinu ekspresije gena *LGALS3*, odnosno relativnu količinu mRNA za galektin-3, iz stanica THP-1 izolirana je ukupna RNA te je postupkom reverzne transkripcije uz primjenu oligo dT ishodnica prevedena u cDNA. Dijelovi mRNA za galektin-3 i β-aktin umnoženi su postupkom lančane reakcije polimerazom uz primjenu specifičnih ishodnica. Nakon lančane reakcije polimerazom nukleotidni slijed PCR produkata provjeren je metodom sekvenciranja na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.12. Ukratko, nakon lančane reakcije polimerazom PCR produkti su pročišćeni od viška ishodnica, a uspješnost pročišćavanja i približna koncentracija pročišćenih PCR produkata određena je elektroforezom pročišćenih PCR produkata u 1,5% agaroznom gelu (Slika 3.2).



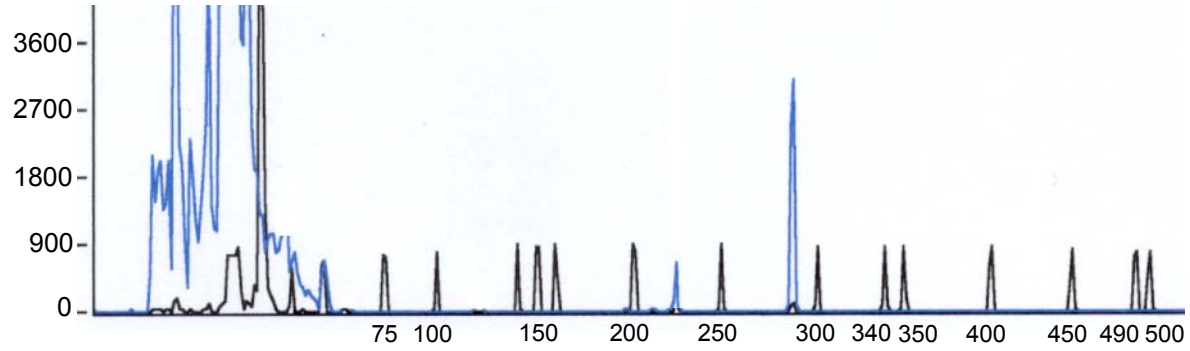
Slika 3.2 Elektroforeza PCR produkata. Nakon izolacije ukupne RNA iz stanica THP-1, reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom, PCR produkti su analizirani elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu a) prije pročišćavanja i b) nakon pročišćavanja. 1: standard molekulskih masa (višekratnik 100 bp) 2: PCR produkt veličine 226 bp (nastao umnažanjem dijela mRNA za β-aktin) 3: PCR produkt veličine 288 bp (nastao umnažanjem dijela mRNA za galektin-3).

PCR produkti (5 µg) podvrgnuti su reakciji sekvenciranja. Nakon uklanjanja zaostalih fluorescentno obilježenih nukleotida i viška ishodnica, nukleotidni je slijed PCR produkata određen analizom produkata sekvenciranja razdvojenih kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser (*Applied Bioystems*)(Slika 3.3). Analiza je provedena korištenjem programa Sequencing Analysis Software, a rezultati su pokazali da nukleotidni sljedovi PCR produkata nastalih uporabom odabranih ishodnica u potpunosti odgovaraju dijelovima mRNA za galektin-3 odnosno β-aktin. PCR produkti su veličine 226 baznih parova (nastali umnažanjem dijela mRNA za β-aktin) odnosno 288 baznih parova (nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3). Utvrđeno je također da su spomenuti produkti ujedno i jedini produkti lančane reakcije polimerazom te da su odabrane temperature pri kojima se odvijao proces sljepljivanja ishodnica tijekom lančane reakcije polimerazom (63°C za ishodnice za β-aktin, odnosno 58°C za ishodnice za galektin-3) odgovarajuće jer se pri navedenim temperaturama ishodnice vežu isključivo na u potpunosti komplementarne dijelove DNA.



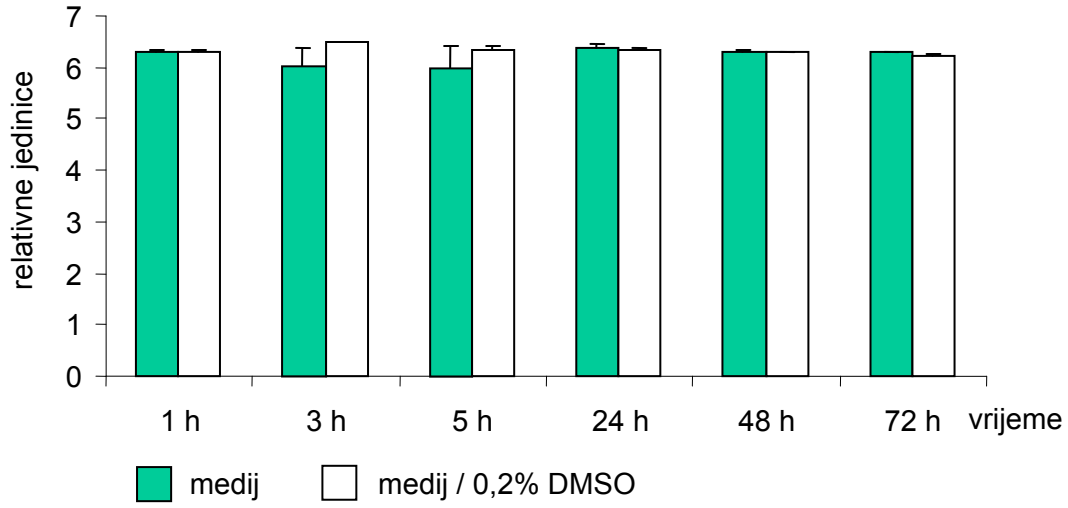
Slika 3.3 Nukleotidni slijed PCR produkta nastalog umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 određen analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser.

S ciljem utvrđivanja relativne razine ekspresije gena *LGALS3*, odnosno relativne količine mRNA za galektin-3 tijekom 72-satnog kultiviranja (uzorci sakupljeni nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata) stanica stanične linije THP-1 u mediju ili mediju/0,2% DMSO, iz stanica je izolirana ukupna RNA, ~0,8 µg ukupne RNA reverzno je transkribirano uz primjenu oligo dT ishodnica te su potom umnoženi dijelovi mRNA za galektin-3 (tijekom 21 ciklusa PCR uz temperaturu sljepljivanja ishodnica 58°C) i β-aktin (tijekom 14 ciklusa PCR uz temperaturu sljepljivanja ishodnica 63°C) primjenom odabranih specifičnih ishodnica. Lančana reakcija polimerazom ne doseže krajnju točku ("end-point") uz navedene reakcijske uvjete već je još uvijek u eksponencijalnoj fazi, što je uvjet da bi ta metoda bila kvantitativna. Na opisani način dobivene koncentracije PCR produkata prikladne su za analizu količine PCR produkata na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. PCR produkti su združeni, razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser (Slika 3.4), a relativan omjer njihovih količina izračunat je uporabom programa GeneScan Analysis Software.



Slika 3.4 GeneScan® elektroforetogram razdvojenih PCR produkata. Ukupna RNA izolirana je iz stanica THP-1 i reverzno transkribirana uz primjenu oligo dT ishodnica. PCR produkti dobiveni primjenom fluorescentno obilježenih specifičnih ishodnica za mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR i PCR produkti dobiveni primjenom fluorescentno obilježenih specifičnih ishodnica za mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Os ordinate predstavlja relativan intenzitet fluorescencije, a os aspcise veličinu razdvojenih fragmenata izraženo u baznim parovima (bp). Crni *peakovi* odgovararaju standardu DNA GeneScan®-500 TAMRA, a plavi PCR produktu β-aktina (226 bp) i galektina-3 (288 bp).

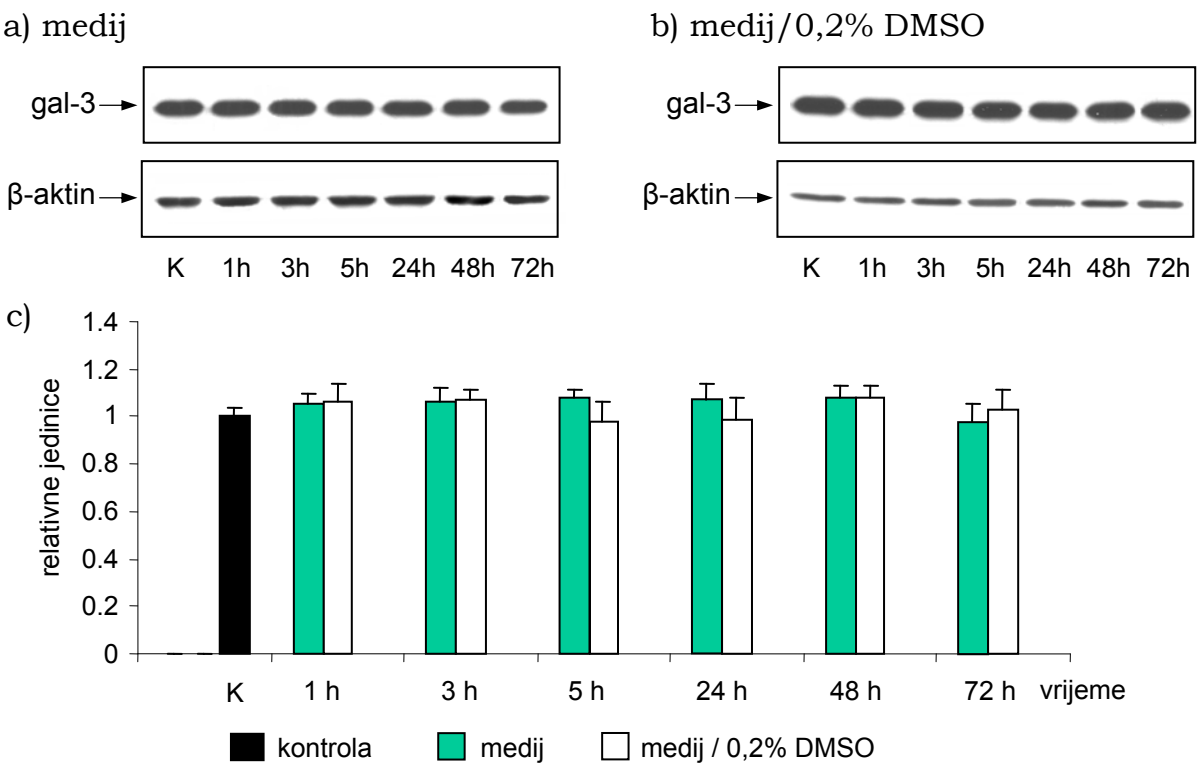
Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu pokazali su da se tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata kultiviranja stanica THP-1 u mediju kao i u mediju/0,2% DMSO relativni omjeri PCR produkata nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 i β-aktin ne mijenjaju (6,28±0,13), odnosno, da se količina mRNA za galektin-3 održava na jednakoj razini (Slika 3.5).



Slika 3.5 U stanicama THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO količina mRNA za galektin-3 se ne mijenja. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u mediju ili u mediju/0,2% DMSO. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina ($\bar{x} \pm SD$). Zeleni stupci – kultiviranje u mediju, bijeli stupci – kultiviranje u mediju/0,2% DMSO.

Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 ispitana je tijekom 72-satnog kultiviranja postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena ekspresija konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka.

Rezultati su pokazali da se količina galektina-3 statistički značajno ne mijenja ($p>0,05$) tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata kultiviranja stanica THP-1 u mediju u odnosu na početnu količinu galektina-3 (105±5,5% početne razine). Razina ekspresije galektina-3 statistički se značajno ne mijenja ($p>0,05$) niti kada se stanice kultiviraju tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata u mediju/0,2% DMSO (103±7% početne razine)(Slika 3.6).



Slika 3.6 Količina galektina-3 u stanicama THP-1 tijekom kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO se ne mijenja. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju i b) mediju/0,2% DMSO (5 µg proteina/jažici). c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$ ±SD). Crni stupac-kontrola, zeleni stupci-kultiviranje u mediju, bijeli stupci – kultiviranje u mediju/0,2% DMSO.

3.2 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1

Aspirin utječe na signalne puteve i transkripcijske fakore koji između ostalog, sudjeluju i u regulaciji ekspresije gena *LGALS3*. Stoga smo u ovom radu željeli ispitati učinak aspirina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.
Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM otopini aspirina u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Postotak živih stanica određen je metodom bojanja tripanskim modrilom (opisanom u poglavlju 2.2.7). Rezultati su pokazali da je postotak živih stanica u svim ispitivanim slučajevima ≥95%, odnosno, da aspirin u primijenjenim koncentracijama ne utječe na vijabilnost stanica THP-1 tijekom 72 sata kultiviranja.

Metabolička aktivnost stanica kultiviranih uz aspirin koncentracija 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM i citotoksičnost primijenjenih koncentracija aspirina određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM otopine aspirina

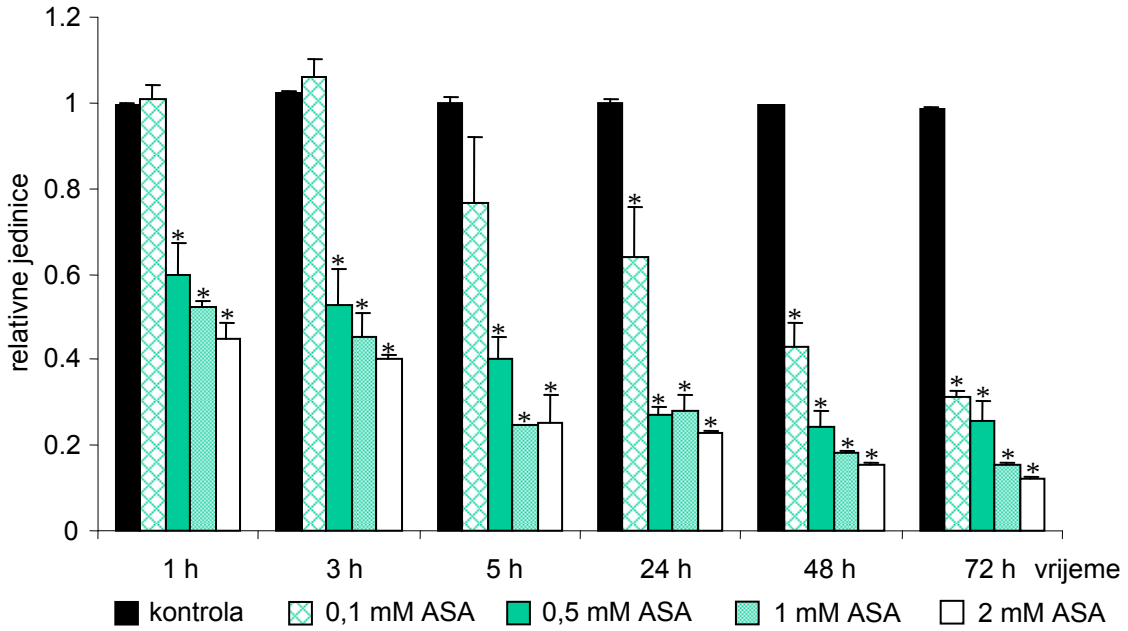
statistički značajno ne mijenjaju metaboličku aktivnost stanica u odnosu na stanice kultivirane u hranidbenom mediju, odnosno da primjenjene koncentracije aspirina nemaju citotoksičan učinak jer je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥91% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Nakon izolacije RNA iz tretiranih stanica i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u stanicama THP-1 kultiviranih tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.7).

Razina ekspresije *LGALS3* u stanicama THP-1 kultiviranim uz aspirin koncentracije 0,1 mM ne mijenja se tijekom prva tri sata kultiviranja, ali se nakon pet sati kultiviranja primjećuje smanjenje razine ekspresije *LGALS3* u odnosu na kontrolu. Ono se kontinuirano nastavlja daljnjim kultiviranjem tijekom 24 sata kada iznosi 64,2±11,6% od razine u kontrolnim stanicama, nakon 48 sati 42,9±5,8%, da bi 72 sat razina ekspresije *LGALS3* iznosila 31,1±1,4% od razine u kontrolnim stanicama.

Kultiviranjem stanica THP-1 u 0,5 mM otopini aspirina/medij razina ekspresije *LGALS3* se smanjuje gotovo na polovinu razine u kontrolnim stanicama već nakon prvog sata (59,6±7,6%) kultiviranja. Daljnjim se kultiviranjem smanjenje nastavlja, pa nakon 3 sata razina galektina pada na 52,8±8%, 5 sati na 40,4±4,8%, 24 sata na 27±1,9%, 48 sati na 24,2±4% te nakon 72 sata kultiviranja na 25,6±4,8% kontrolne razine.

1 mM aspirin uzrokuje još značajnije, vremenski-ovisno smanjenje razine ekspresije gena za galektin-3. Razina galektina-3 nakon prvog sata iznosi 52,2±1,7% razine u kontrolnim stanicama, odnosno početne razine, nakon trećeg sata 45,4±5,3%, petog sata 24,7±0,2%, 24 sata 28±3,9%, 48 sata 18,2% a nakon 72 sata kultiviranja samo 15,5±0,5%.
Najjači pad razine ekspresije *LGALS3* u stanicama THP-1 bio je izazvan najvećom korištenom koncentracija aspirina (2 mM). Nakon 72 sata kultiviranja uz 2 mM aspirin razina *LGALS3* iznosi samo 12,3±0,04% kontrolne razine, a dostignuta je postupnim smanjenjem ekspresije - nakon 1 sat izlaganja stanica THP-1 aspirinu koncentracije 2 mM razina galektina-3 iznosila je 45±3,4%, 3 sata 40,2±0,8%, 5 sati 25,1±6,7% 24 sata 23±0,3%, a nakon 48 sati 15,4±0,5% početne razine.



Slika 3.7 Aspirin inhibira ekspresiju *LGALS3*. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz aspirin koncentracije 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Crni stupci – kontrola, rebrasti stupci - 0,1 mM ASA, tamnozeleni stupci – 0,5 mM ASA, svjetlozeleni stupci – 1 mM ASA, bijeli stupci – 2 mM ASA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

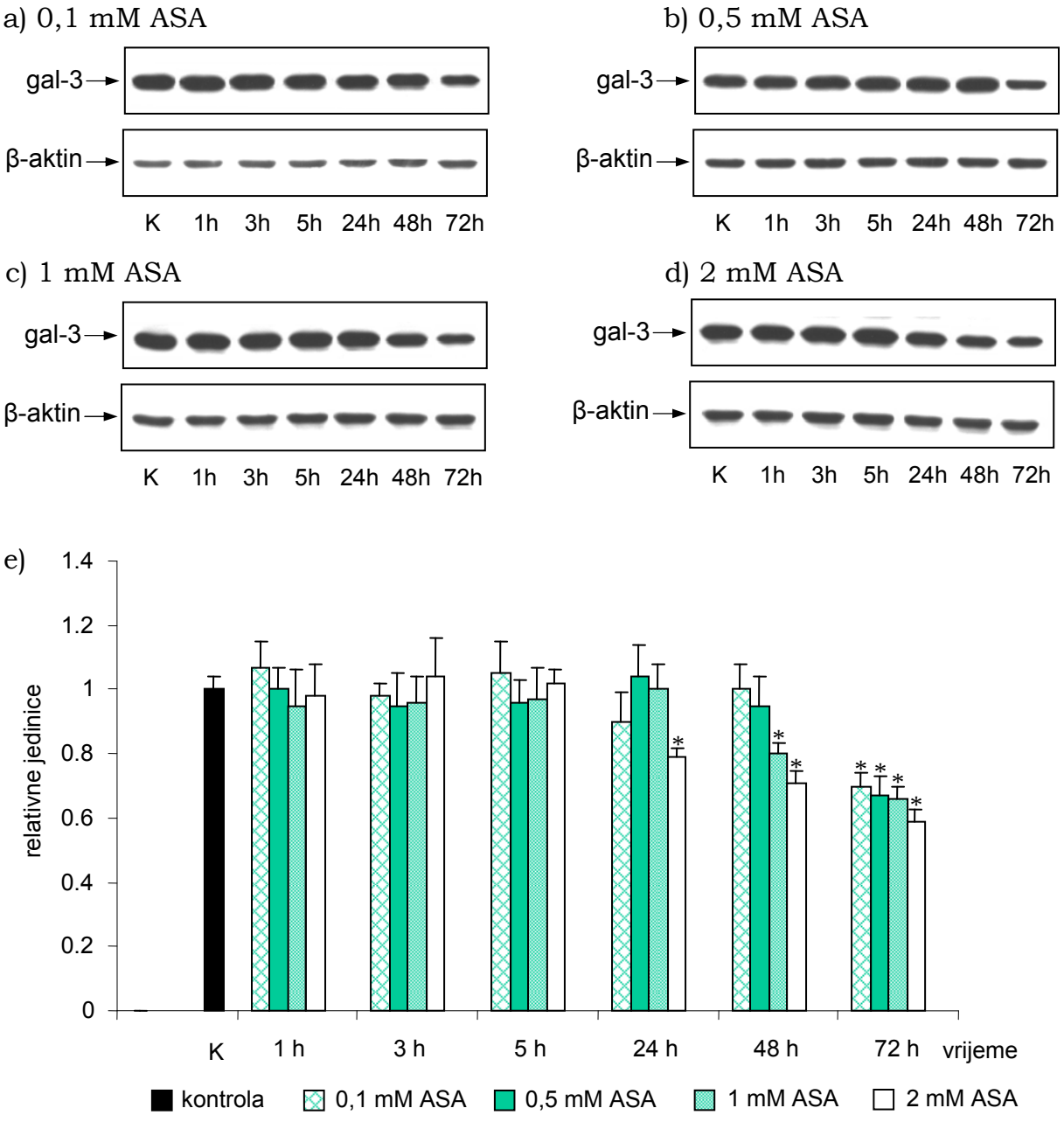
Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz aspirin koncentracija 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka.

Aspirin u nižim koncentracijama (0,1 mM i 0,5 mM) ne utječe na razinu ekspresije galektina-3 tijekom prvih 48 sati kultiviranja. Tek se nakon 72 sata kultiviranja primjećuje pad količine galektina-3 na ~70% početne razine (preciznije, kultiviranjem u mediju/0,1 mM ASA smanjuje se količina

galektina-3 na 70±4%, a u mediju/0,5 mM ASA na 67±6,2% od kontrolne razine).

Kada su stanice kultivirane uz 1 mM aspirin pad količine galektina-3 zabilježen je nakon 48 sati; razina galektina-3 tada je iznosila 79±2,8% početne razine. Daljnjim kultiviranjem došlo je do još značajnijeg smanjenja razine galektina-3 koja je nakon 72 sata iznosila 66±4% početne razine.

Kultiviranje stanica THP-1 uz aspirin koncentracije 2 mM, pad razine galektina-3 izaziva se još ranije – već nakon 24 sata razina galektina-3 iznosi 79±2,8% početne razine. Zatim nastavlja padati te nakon 48 sati iznosi 71±3%, a nakon 72 sata 59±3,4% početne razine (Slika 3.8).



Slika 3.8 Utjecaj aspirina na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/0,1 mM ASA; b) mediju/0,5 mM ASA; c) mediju/1 mM ASA; d) mediju/2 mM ASA (5 μg proteina/jažici). e) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x} \pm$ SD). Crni stupac – kontrola, rebrasti stupci - 0,1 mM ASA, tamnozeleni stupci – 0,5 mM ASA, svjetlozeleni stupci – 1 mM ASA, bijeli stupci – 2 mM ASA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

3.3 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1

Djelovanje indometacina, jake nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem, vrlo je slabo istraženo. Osim o djelovanju indometacina kao inhibitora ciklooksigenaze o kojem se zna nešto više, o njegovom učinku na signalne puteve koji su, između ostalog, uključeni i u regulaciju ekspresije galektina-3 postoje tek naznake. Stoga smo u ovom radu željeli ispitati učinak indometacina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.

Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM otopini indometacina u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Postotak živih stanica određen je metodom bojanja tripanskim modrilom (opisanom u poglavlju 2.2.7). Rezultati su pokazali da je postotak živih stanica u svim ispitivanim slučajevima ≥97%, odnosno, da indometacin u primijenjenim koncentracijama ne utječe na vijabilnost stanica THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja.

Metabolička aktivnost stanica u prisutnosti primijenjenih koncentracija indometacina i njihova citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da se metabolička aktivnost stanica kultiviranih uz indometacin koncentracija 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM ne mijenja u odnosu na metaboličku aktivnost stanica kultiviranih samo u hranidbenom mediju. Indometacin u primijenjenih koncentracijama ne djeluje citotoksično na stanice THP-1 obzirom na to da je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥96% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Relativna razina ekspresije *LGALS3* određena je nakon izolacije ukupne RNA, reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni istim postupkom u stanicama THP-1 kultiviranih tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.9).

Izlaganje stanica THP-1 indometacinu u svim primijenjenim koncentracijama inhibira ekspresiju *LGALS3* (Slika 3.9).

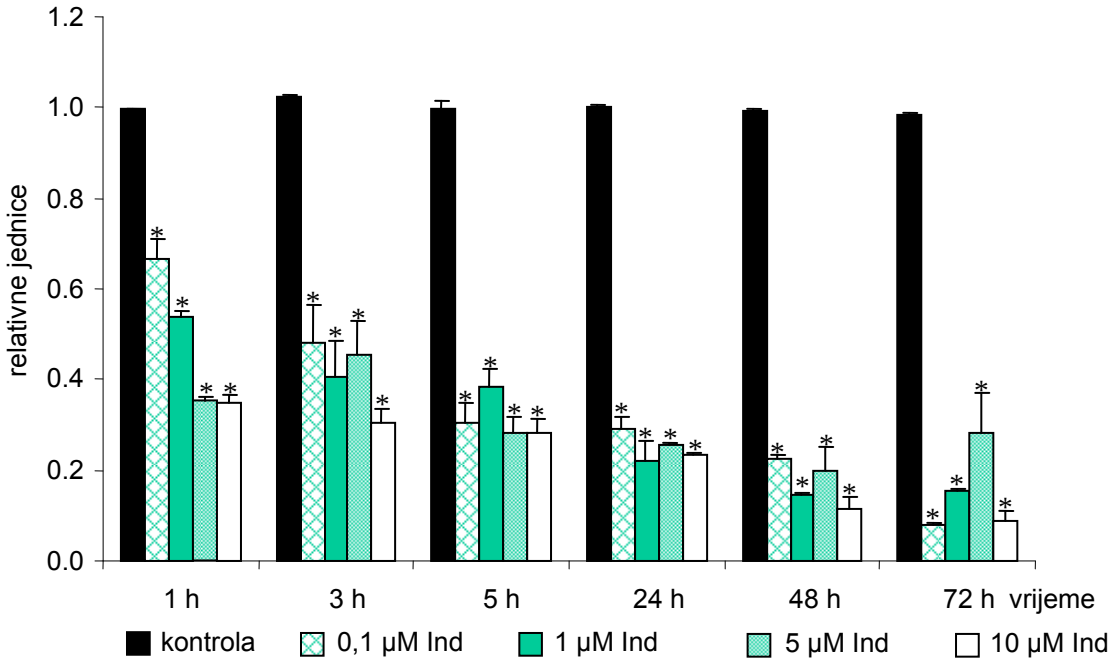
Indometacin koncentracije 0,1 μM uzrokuje smanjenje količine mRNA za galektin-3 na 66,7±4,2% početne razine već nakon prvog sata kultiviranja. Daljnjim kultiviranjem inhibitorno djelovanje indometacina se nastavlja, te se količina mRNA za galektin-3 treći sat smanjuje na 48,1±8,5%, peti sat na 30,2±4,5, 24 sat na 29,2±2,6% i 48 sat na 22,7±0,8%, da bi nakon 72 sata iznosila tek 8%±0,5% početne razine.

Izlaganjem stanica THP-1 indometacinu koncentracije 1 μM razina ekspresije *LGALS3* smanjuje se na polovinu početne razine tijekom prvog sata (53,7±1,4%). Daljnjim kultiviranjem količina mRNA za galektin-3 se

nastavlja smanjivati – nakon 3 sata kultiviranja iznosi 40,6±7,7%, nakon 5 sati 38,4±3,9%, 24 sata 22,2±4,5%, 48 sati 14,1±0,5% a nakon 72-satnog kultiviranja 15,6±0,5% početne razine.

Kada se stanice THP-1 izlože djelovanju indometacina koncentracije 5 μM, količina mRNA za galektin-3 smanji se za ~60% tijekom prva tri sata kultiviranja (nakon prvog sata iznosi 35,2±1,1%, a nakon trećeg 45,6±7,4% početne razine). Duljim izlaganjem stanica THP-1 indometacinu koncentracije 5 μM ekspresija *LGALS3* se smanjuje još desetak posto (5h-28,4±3,3%, 24 h-25,7±0,4%, 48h-20,0±5,3%, 72 h-28,2±9% početne razine).

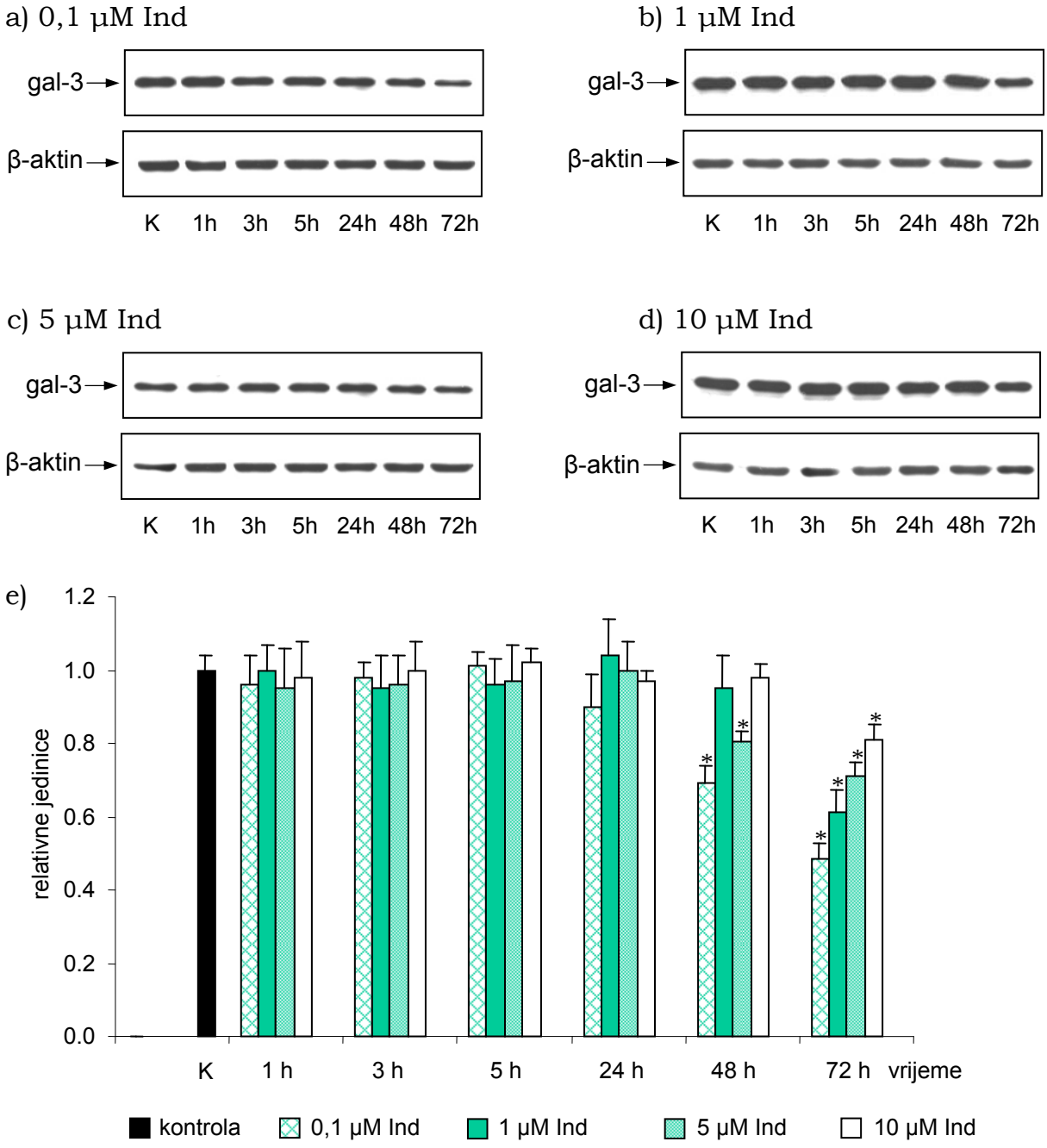
Od svih primijenjenih koncentracija indometacina, najjače inhibitorno djelovanje na ekspresiju *LGALS3* ima 10 μM indometacin. On inhibira ekspresiju *LGALS3* za ~70% tijekom prvih pet sati kultiviranja (nakon prvog sata količina mRNA za galektin-3 iznosi 34,7±1,8%, nakon trećeg 30,6±3,1%, a nakon petog 28,1±3,2% početne razine). Daljnjim kultiviranjem količina mRNA za galektin-3 nastavlja padati i iznosi: 24h-23,2±0,7%, 48h-11,6±2,5% i 72 h-8,9±2,1% početne razine.



Slika 3.9 Indometacin inhibira ekspresiju *LGALS3*. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz indometacin koncentracije 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Crni stupci – kontrola, rebrasti stupci- 0,1 μM Ind, tamnozeleni stupci – 1 μM Ind, svjetlozeleni stupci – 5 μM Ind, bijeli stupci – 10 μM Ind. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz indometacin koncentracija 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka (Slika 3.10).

Količina galektina-3 tijekom prva 24 sata kultiviranja stanica THP-1 uz indometacin svih primjenjenih koncentracija (0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM) održava se na jednakoj razini.
Indometacin koncentracije 0,1 μM nakon 48 sati kultiviranja uzrokuje pad razine galektina-3 na 69,0±5,1%, a nakon 72 sata kultiviranja na 48,5±4,3% početne razine.
Promjena količine galektina-3 u stanicama THP-1 izloženim djelovanju indometacina koncentracije 1 μM uočava se tek nakon 72 sata kultiviranja, kada iznosi 61,0±6,1% početne razine.
Izlaganje stanica THP-1 indometacinu koncentracije 5 μM uzrokuje pad količine galektina-3 za ~20% nakon 48-satnog kultiviranja (80,5±2,7% početne razine), odnosno ~30% nakon 72-satnog kultiviranja (72±3,8% početne razine).
Još manju promjenu ekspresije galektina-3 uzrokuje indometacin koncentracije 10 μM: tek nakon 72 sata kultiviranja ona se mijenja i iznosi 81,2±4,4% početne razine.



Slika 3.10 Utjecaj indometacina na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/0,1 μM Ind; b) mediju/1 μM Ind; c) mediju/5 μM Ind; d) mediju/10 μM Ind (5 μg proteina/jažici). e) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}\pm$ SD). Crni stupac – kontrola, rebrasti stupci-0,1 μM Ind, tamnozeleni stupci – 1 μM Ind, svjetlozeleni stupci – 5 μM Ind, bijeli stupci – 10 μM Ind. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

3.4 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1

Prema literaturi, za hidrokortizon, steroidni imunomodulatorni lijek postoje naznake da utječe na signalne puteve koji su, između ostalog, uključeni i u regulaciju ekspresije galektina-3. Stoga smo u ovom radu željeli ispitati učinak hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.

Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM otopini hidrokortizona u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Postotak živih stanica određen je metodom bojanja tripanskim modrilom (opisanom u poglavlju 2.2.7). Rezultati su pokazali da je postotak živih stanica u svim ispitivanim slučajevima ≥97,5%, odnosno, da hidrokortizon u primijenjenim koncentracijama ne utječe na vijabilnost stanica THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja.

Metabolička aktivnost stanica i citotoksičnost primijenjenih koncentracija hidrokortizona određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da se metabolička aktivnost stanica kultiviranih uz hidrokortizon koncentracija 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM ne mijenja u odnosu na metaboličku aktivnost stanica kultiviranih samo u hranidbenom mediju. Hidrokortizon u primijenjenih koncentracijama ne djeluje citotoksično na stanice THP-1 obzirom da je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥96,4% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Relativna razina ekspresije *LGALS3* određena je nakon izolacije ukupne RNA, reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni istim postupkom u stanicama THP-1 kultiviranih tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.11).

Hidrokortizon u svim primijenjenim koncentracijama inhibira ekspresiju *LGALS3* u stanicama THP-1, a postotak inhibicije je to veći što je vrijeme izloženosti stanica djelovanju hidrokortizona dulje.

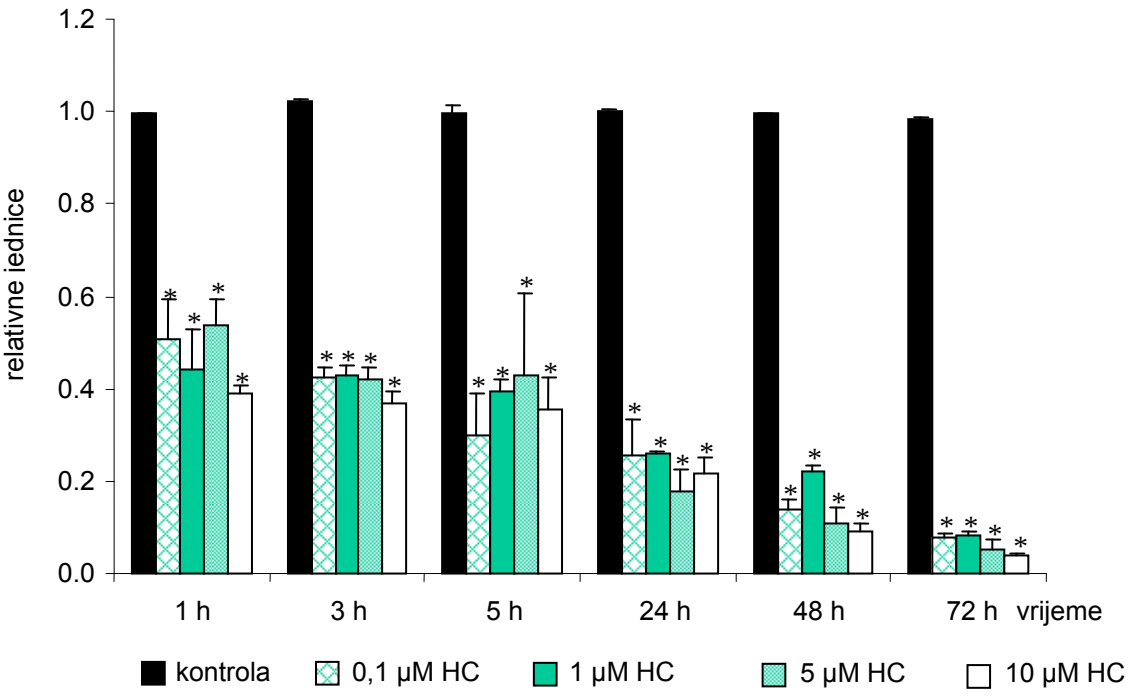
Kultiviranjem stanica THP-1 u 0,1 μM otopini hidrokortizona/medij razina ekspresije *LGALS3* se smanjuje na polovinu već nakon prvog sata kultiviranja (50,8±8,6%), a smanjenje se nastavlja i tijekom 3 sata (na 42,4±2,4%), 5 sati (na 30,1±8,9%), 24 sata (na 25,7±7,6%), 48 sati (na 13,8±2%) i 72 sata kultiviranja, kada pada na 7,7±0,9% kontrolne razine.

Nakon 1 sat kultiviranja stanica THP-1 uz hidrokortizon koncentracije 1 μM količina mRNA za galektin-3 se smanjuje na 44,2±8,8% početne razine i sljedeća četiri sata samo pomalo pada (treći sat iznosi 42,9±2,2%, a peti sat 39,3±2,6%). Jednodnevno kultiviranje uzrokuje pad ekspresije *LGALS3* na

26,2±0,2%, dvodnevno na 22,2±1,3% a trodnevno na samo 8,3±0,6% početne razine.

Nakon 72 sata kultiviranja uz hidrokortizon koncentracije 5 μM razina *LGALS3* iznosi samo 5,4±1,9% početne razine, a dostignuta je postupnim smanjenjem ekspresije: nakon 1 sat - na 53,5±6%, 3 sata - na 42±2,5%, 5 sati - na 42,9±17,8% 24 sata - na 17,9±4,8% i nakon 48 sati na 11±3,2% početne razine.

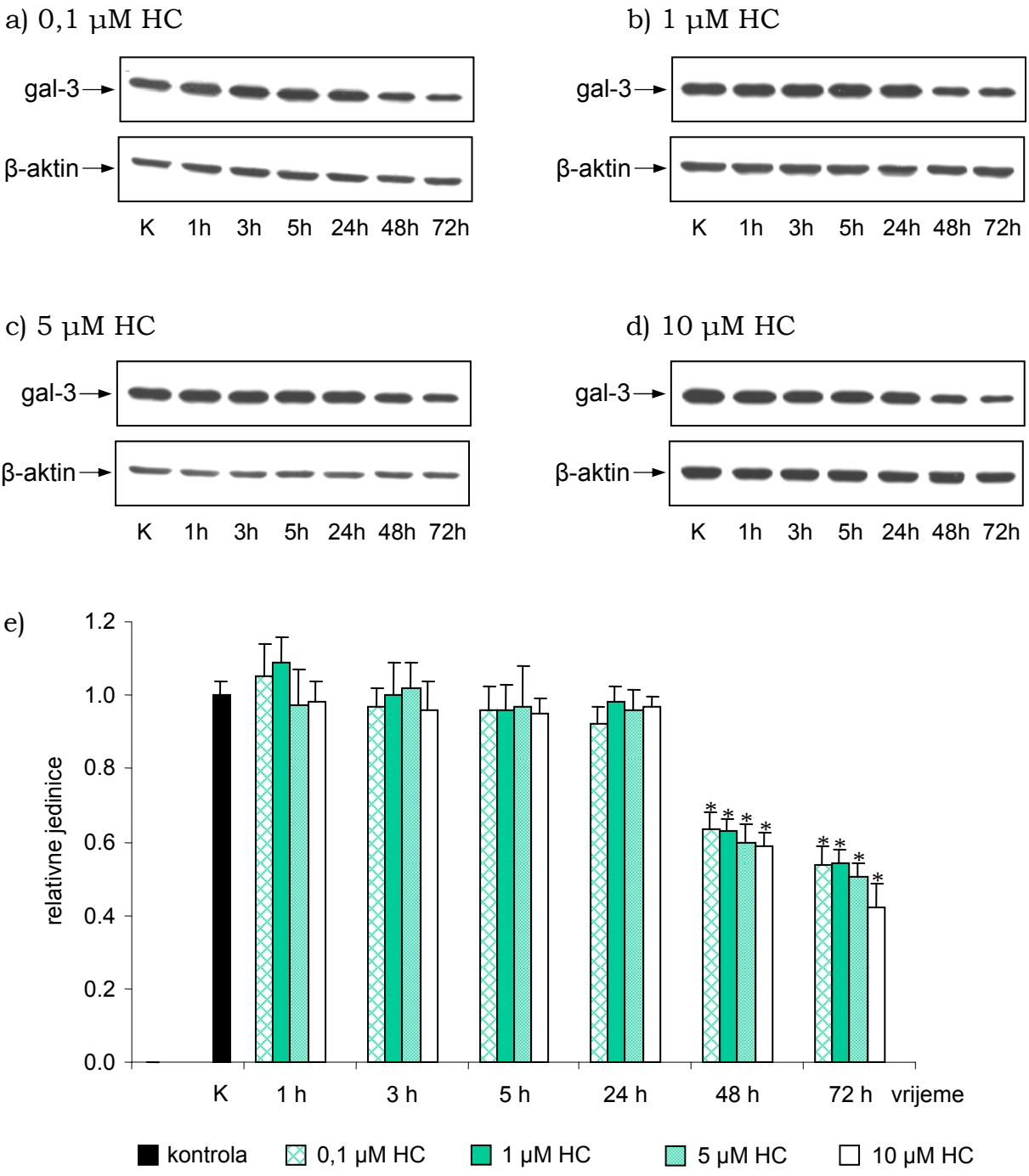
Od svih primijenjenih koncentracija hidrokortizona, najjače inhibitorno djelovanje na ekspresiju *LGALS3* ima 10 μM hidrokortizon. On inhibira ekspresiju *LGALS3* za ~60% tijekom prvih pet sati kultiviranja (nakon prvog sata količina mRNA za galektin-3 iznosi 39±1,5%, nakon trećeg 36,6±2,7%, a nakon petog 35,6±6,6% početne razine). Daljnjim kultiviranjem količina mRNA za galektin-3 nastavlja padati i iznosi: 24h-21,5±3,5%, 48h-9,1±2% i 72 h-3,8±0,4% početne razine.



Slika 3.11 Hidrokortizon inhibira ekspresiju *LGALS3*. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz hidrokortizon koncentracije 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Crni stupci – kontrola, rebrasti stupci-0,1 μM HC, tamnozeleni stupci – 1 μM HC, svjetlozeleni stupci – 5 μM HC, bijeli stupci – 10 μM HC. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz hidrokortizon koncentracija 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka (Slika 3.12).

Tijekom prva 24 sata kultiviranja stanica THP-1 uz hidrokortizon koncentracija 0,1 μM, 1 μM, 5 μM i 10 μM količina galektina-3 u odnosu na kontrolu ostaje nepromijenjena. Nakon 48-satnog kultiviranja razina se ekspresije galektina-3 smanjuje ~40% i iznosi, ovisno o primijenjenim koncentracijama hidrokortizona: 63,3±4,9% (uz 0,1 μM HC), 62,9±3,3% (uz 1 μM HC), 59,9±5,1% (uz 5 μM HC) i 58,8±3,9% početne razine (uz 10 μM HC). Kultiviranjem tijekom 72 sata količina galektina-3 smanjuje se na približno polovinu i iznosi: 53,7±5,2% (uz 0,1 μM HC), 54±4,1% (uz 1 μM HC), 50,3±3,8% (uz 5 μM HC) i 42,3±6,2% početne razine (uz 10 μM HC).



Slika 3.12 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/0,1 μM HC; b) mediju/1 μM HC; c) mediju/5 μM HC; d) mediju/10 μM HC (5 μg proteina/jažici). e) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x} \pm$ SD). Crni stupac – kontrola, rebrasti stupci-0,1 μM HC, tamnozeleni stupci – 1 μM HC, svjetlozeleni stupci – 5 μM HC, bijeli stupci – 10 μM HC. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

3.5 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama THP-1

Deksametazon, steroidni imunomodulatorni lijek utječe na brojne puteve prijenosa signala u stanici. Jedan od njih je signalni put protein kinaza aktiviranih mitogenima (Ras/MEKK1/MKK1) za koji je pokazano da sudjeluje u regulaciji ekspresije galektina-3. Stoga smo u ovom radu željeli ispitati učinak deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.

Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u hranidbenom mediju uz 0,1 nM, 1 nM, 10 nM ili 100 nM deksametazon, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Postotak živih stanica određen je metodom bojanja tripanskim modrilom (opisanom u poglavlju 2.2.7). Rezultati su pokazali da je postotak živih stanica u svim ispitivanim slučajevima ≥95%, odnosno, da deksametazon u primijenjenim koncentracijama ne utječe na vijabilnost stanica THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja.

Metabolička aktivnost stanica uz primijenjene koncentracije deksametazona i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da se metabolička aktivnost stanica kultiviranih uz deksametazon koncentracija 1 nM, 1 nM, 10 nM i 100 nM ne mijenja u odnosu na metaboličku aktivnost stanica kultiviranih samo u hranidbenom mediju. Deksametazon u primijenjenih koncentracijama ne djeluje citotoksično na stanice THP-1 obzirom da je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥95,4% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Relativna razina ekspresije *LGALS3* određena je nakon izolacije ukupne RNA, reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni istim postupkom u stanicama THP-1 kultiviranih tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.13).

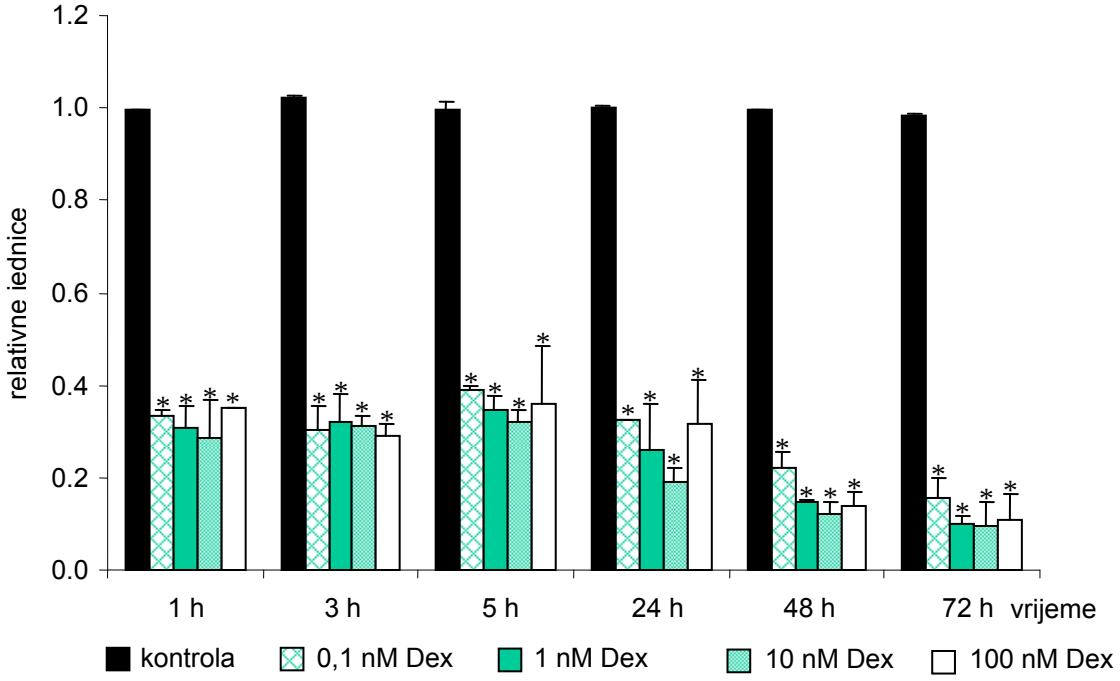
Deksametazon koncentracije 0,1 nM uzrokuje smanjenje razine ekspresije *LGALS3* na 33,4±1,4% početne razine već nakon prvog sata kultiviranja. Daljnjim kultiviranjem do 24. sata ne dolazi do značajnije promjene ekspresije (nakon 3 sata iznosi 30,2±5,3%, nakon 5 sati 38,9±0,8%, a nakon 24 sata kultiviranja 32,3±0,1% početne razine), da bi nakon 48 sati pala na 22,2±3,5% a nakon 72 sata kultiviranja na 15,4±4,6% početne razine.

Sličan učinak ima i deksametazon koncentracije 1 nM: nakon prvog sata kultiviranja količina mRNA za galektin-3 se smanji na 30,7±4,7% početne razine i održava se takvom i nakon 3 sata (31,9±6,3%), 5 sati (34,5±3,1%) i 24 sata inkubiranja (26,1±10% početne razine). Nakon 48 sati količina

mRNA za galektin-3 se ponovno značajnije smanjuje (na 14,7±0,2%) da bi nakon 72-satnog kultiviranja iznosila samo 9,9±1,7% početne razine.

Pad količine mRNA za galektin-3 za 70% (na 28,7±8,3% početne razine) unutar prvog sata inkubiranja uzrokuje i deksametazon koncentracije 10 nM. Trosatno kao ni peterosatno kultiviranje ne uzrokuje daljnju promjenu ekspresije *LGALS3* (nakon 3 sata iznosi 31,4±1,9%, a nakon 5 sati 32,2±2,6% početne razine). Daljnji pad razine primjećuje se nakon 24 sata (na 18,8±3,1%), nakon 48 sati (na 12,3±2,4%) i 72 sata kultiviranja (na 9,7±5,2% početne razine).

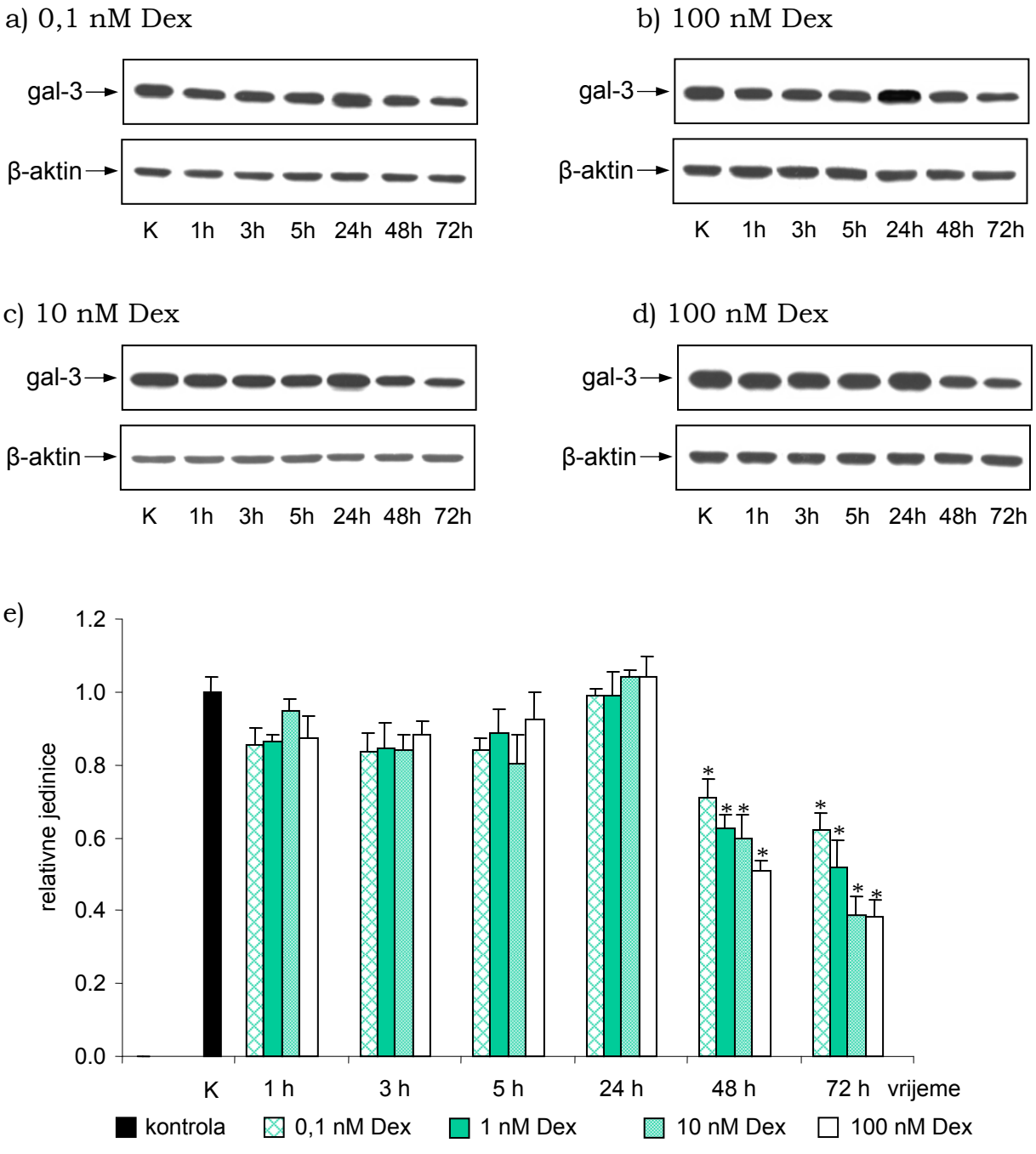
Deksametazon koncentracije 100 nM mijenja ekspresiju *LGALS3* na sličan način i u sličnoj mjeri kao što je primjećeno i kod deksametazona 100 i 1000 puta manje koncentracije. Nakon što se količina mRNA za galektin-3 smanji za ~70% nakon prvog sata kultiviranja (na 34,9±0,3%), održava se na približno jednakoj razini i nakon 3 sata (28,9±2,9%), 5 sati (35,8±12,7%) i 24 sata kultiviranja (kada iznosi 31,8±9,5% početne razine). Međutim, nakon 48 sati iznosi 13,8±2,9%, a nakon 72 sata samo 10,8±5,5% početne razine.



Slika 3.13 Deksametazon inhibira ekspresiju *LGALS3*. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz deksametazon koncentracije 0,1 nM, 1 nM, 10 nM i 100 nM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Crni stupci – kontrola, rebrasti stupci-0,1 nM Dex, tamnozeleni stupci – 1 nM Dex, svjetlozeleni stupci – 10 nM Dex, bijeli stupci – 100 nM Dex. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz deksametazon koncentracija 0,1 nM, 1 nM, 10 nM i 100 nM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka (Slika 3.14).

Obrazac promjene ekspresije galektina-3 uzrokovane djelovanjem deksametazona sličan je kod svih primijenjenih koncentracija deksametazona. Nakon prvog sata kultiviranja uočava se blagi pad razine galektina-3 (za ~15%), no ta promjena nije statistički značajna. Zatim se daljim kultiviranjem količina galektina-3 održava na približno jednakoj razini da bi se nakon 24-satnog kultiviranja ponovno vratila na početnu razinu.
Međutim, nakon 48-satnog kultiviranja razina se ekspresije galektina-3 smanjuje 30-50% i iznosi, ovisno o primijenjenim koncentracijama deksametazona: 71±5,1% (0,1 nM Dex), 62,4±3,8% (1 nM Dex), 59,7±6,7% (10 nM Dex) i 51,1±2,8% (100 nM Dex). Daljnjim kultiviranjem količina galektina-3 se nastavlja smanjivati te nakon 72 sata kultiviranja iznosi: 62,3±4,3% (0,1 nM Dex), 51,7±7,4% (1 nM Dex), 38,7±5% (10 nM Dex) i 38,3±4,7% početne razine (100 nM Dex).



Slika 3.14 Utjecaj deksametazona na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/0,1 nM Dex; b) mediju/1 nM Dex; c) mediju/10 nM Dex; d) mediju/100 nM Dex (5 µg proteina/jažici). e) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x} \pm$ SD). Crni stupac – kontrola, rebrasti stupci-0,1 nM Dex, tamnozeleni stupci – 1 nM Dex, svjetlozeleni stupci – 10 nM Dex, bijeli stupci – 100 nM Dex. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

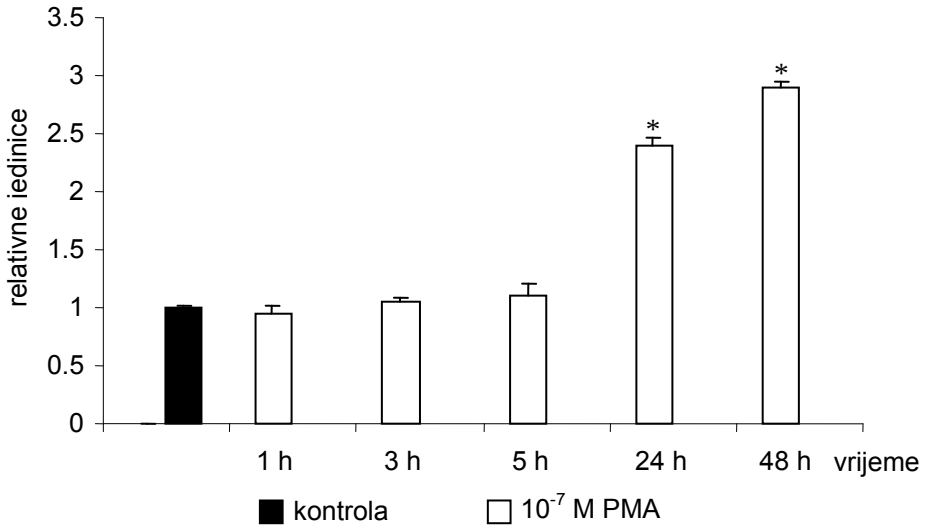
3.6 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 tijekom diferencijacije stanica THP-1 pomoću PMA

Izlaganje stanica monocitne stanične linije THP-1 djelovanju forbol-12-miristat-13-acetata uzrokuje diferencijaciju stanica THP-1 pri čemu one poprimaju karakteristike makrofaga. Stanice THP-1 rastu u suspenziji, a nakon izlaganja djelovanju PMA adheriraju na podlogu.
Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24 ili 48 sati u 10^{-7} M otopini forbol-12-miristat-13-acetata (*engl.* phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila $<10^{-5}$ %.

Postotak neadheriranih stanica u mediju određen je brojanjem stanica pomoću hemocitometra. Rezultati su pokazali da je već nakon sat vremena izlaganja stanica THP-1 PMA koncentracije 10^{-7} M adheriralo 80,2±4,1% stanica. Daljnjim kultiviranjem tijekom 3 i 5 sati postotak adheriranih stanica ostaje približno isti (80,7±2,5%, odnosno 84,1±3,1%) da bi se nakon 24 sata dodatno povećao i iznosio 97,7±2,8%. Nakon 48 sati izlaganja stanica THP-1 PMA koncentracije 10^{-7} M postotak adheriranih stanica je veći od 99%.

Nakon izolacije RNA iz stanica THP-1 tretiranih 10^{-7} M PMA i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u stanicama THP-1 prije tretmana s forbol-12-miristat-13-acetatom.

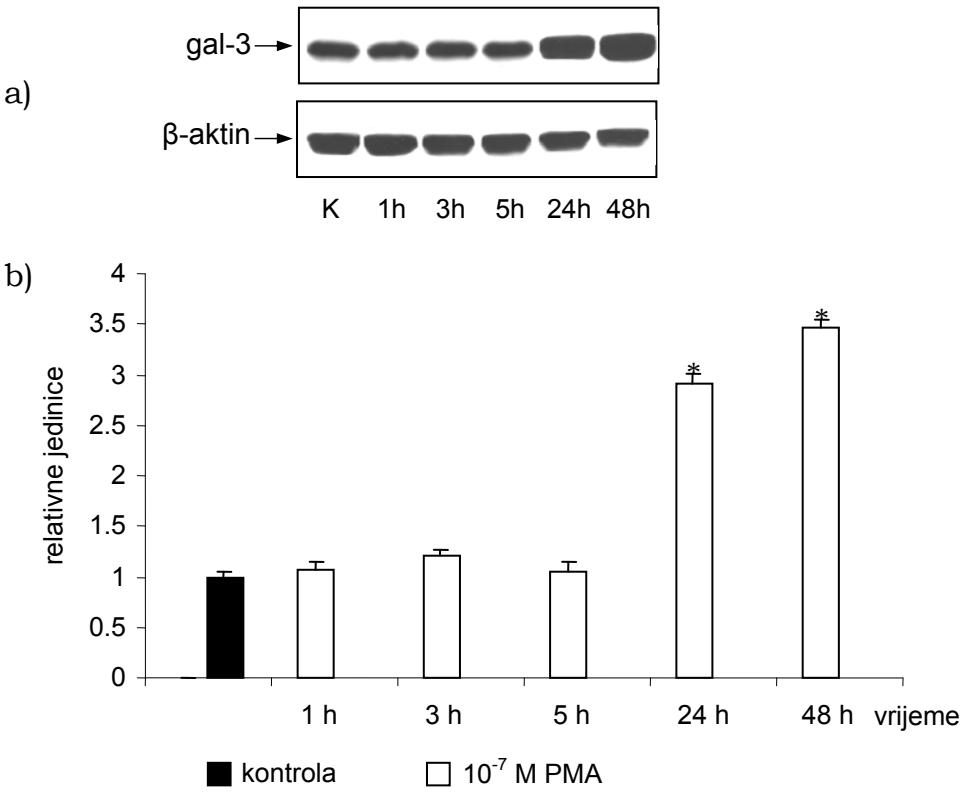
Tijekom prva tri sata kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M količina mRNA za galektin-3 ostaje ista. Nakon jednodnevnog kultiviranja raste 2,4 puta (241±7%) a nakon dvodnevnog gotovo 3 puta (292±5%) u odnosu na početnu količinu mRNA.



Slika 3.15 PMA inducira ekspresiju *LGALS3* u stanicama THP-1. Stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24 ili 48 sati uz PMA koncentracije 10^{-7} M. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Crni stupac – kontrola, bijeli stupci – 10^{-7} M PMA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 tijekom 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24 ili 48 sati. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka.

Izlaganje stanica THP-1 forbol-12-miristat-13-acetatu koncentracije 10^{-7} M tijekom 1, 3 ili 5 sati ne utječe na razinu ekspresije galektina-3. Međutim, količina galektina-3 se nakon 24-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M povećava gotovo 3 puta (292±9%), a nakon 48-satnog kultiviranja 3,5 puta (346±8%) u odnosu na početnu razinu galektina-3 (Slika 3.16).



Slika 3.16 PMA inducira ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1. a) Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 kultiviranih tijekom 1, 3, 5, 24 ili 48 sati u mediju/10^{-7} M PMA (5 μg proteina/jažici). b) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}\pm$ SD). Crni stupac – kontrola, bijeli stupci – 10^{-7} M PMA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

3.7 Ekspresija *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom kultiviranja

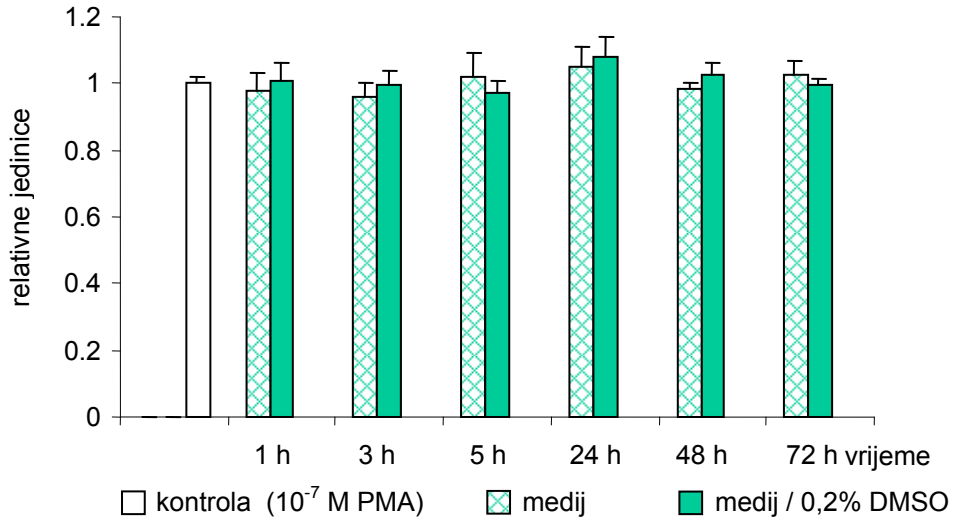
S ciljem određivanja vijabilnosti i metaboličke aktivnosti diferenciranih stanica THP-1, nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M medij je odliven, te su tako dobivene diferencirane stanice THP-1 dodatno kultivirane tijekom 24, 48 ili 72 sata u mediju ili mediju/0,2% DMSO. Pokusi su ponovljeni 2 puta u kvadriplikatu.

Metabolička aktivnost stanica uz 0,2% DMSO i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da prisutnost 0,2% DMSO ne djeluje citotoksično na diferencirane stanice stanične linije THP-1 niti nakon 72 sata kultiviranja te je njihova metabolička aktivnost nepromijenjena (98,4±3,4%) u odnosu na metaboličku aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Relativna razina ekspresije gena *LGALS3*, odnosno relativna količina mRNA za galektin-3 tijekom kultiviranja (nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata) diferenciranih stanica stanične linije THP-1 u mediju ili mediju/0,2% DMSO

određena je nakon izolacije RNA i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom. Količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u stanicama THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M (Slika 3.17).

Rezultati su pokazali da se razina ekspresije *LGALS3* ne mijenja tijekom 72-satnog kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 u mediju, kao niti tijekom 72-satnog kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 u mediju/0,2% DMSO u odnosu na početnu razinu ekspresije *LGALS3*, odnosno na razinu ekspresije u stanicama THP-1 kultiviranih tijekom 48 sati uz PMA koncentracije 10^{-7} M.

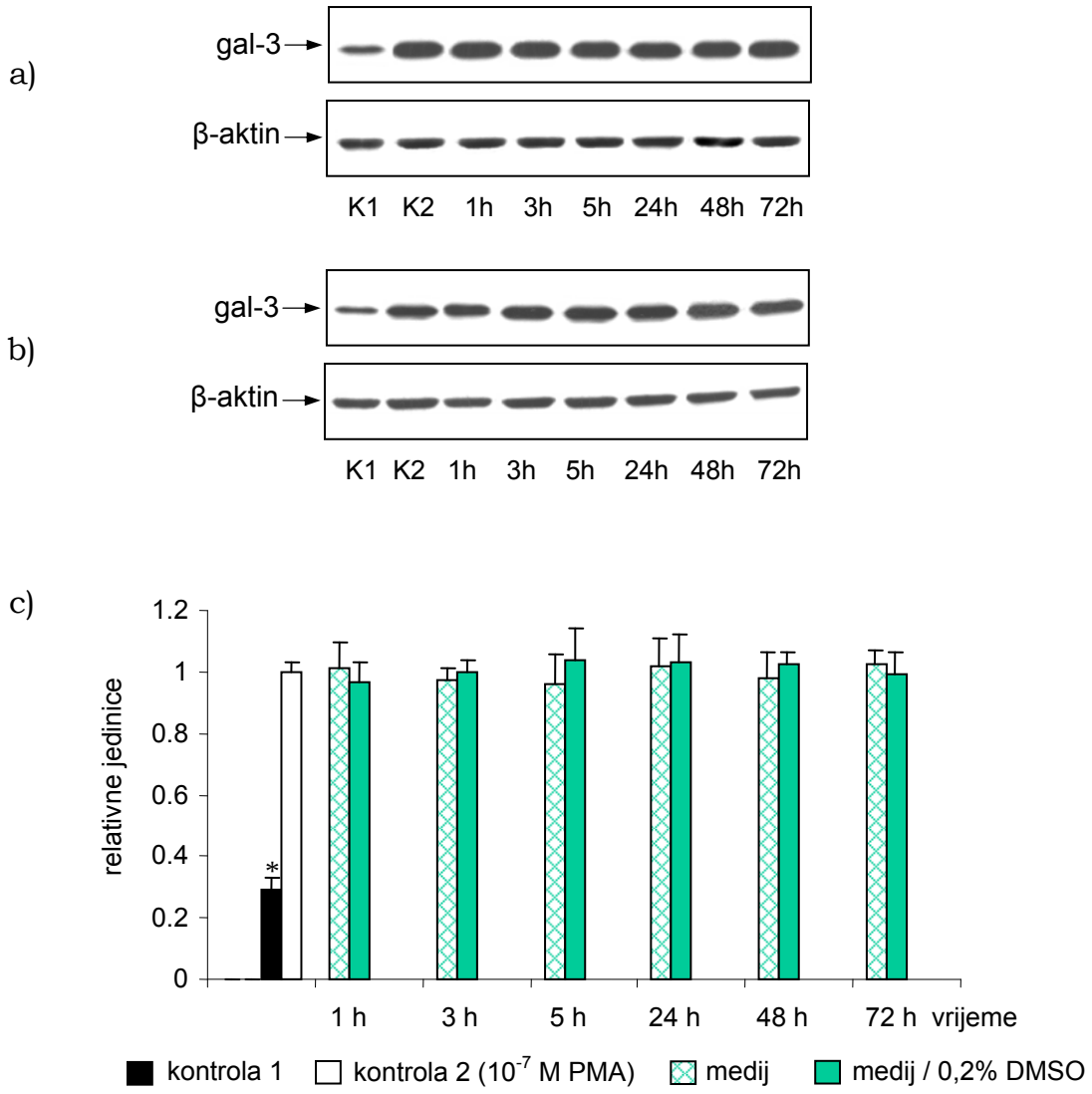


Slika 3.17 U diferenciranim stanicama THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO količina mRNA za galektin-3 se ne mijenja. Stanice THP-1 diferencirane 48-satnim kultiviranjem uz PMA koncentracije 10^{-7} M kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u mediju ili u mediju/0,2% DMSO. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Bijeli stupac – kontrola, rebrasti stupci-kultiviranje u mediju, zeleni stupci – kultiviranje u mediju/0,2% DMSO.

Razina ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1 ispitana je tijekom 72-satnog kultiviranja postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48

ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena ekspresija konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat stanica THP-1 koje su kultivirane u hranidbenom mediju. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka.

Rezultati su pokazali da se količina galektina-3 ne mijenja tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata kultiviranja stanica THP-1 u mediju u odnosu na početnu količinu galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 (odnosno, nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M). Razina ekspresije galektina-3 ostaje ista i kada se stanice kultiviraju tijekom tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata u mediju/0,2% DMSO, te je količina galektina-3 i dalje oko 3,5 puta veća od količine galektina-3 u nediferenciranim stanicama THP-1 (Slika 3.18).



Slika 3.18 Količina galektina-3 ne mijenja se u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1 koje su nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju i b) mediju/0,2% DMSO (5 µg proteina/jažici). c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu 2 ($\bar{x} \pm SD$). Crni stupac – kontrola 1 (nediferencirane stanice THP-1), bijeli stupac – kontrola 2 (diferencirane stanice THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz 10^{-7} M PMA), rebrasti stupci-kultiviranje u mediju, zeleni stupci – kultiviranje u mediju/0,2% DMSO. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 ($p<0,05$).

3.8 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1

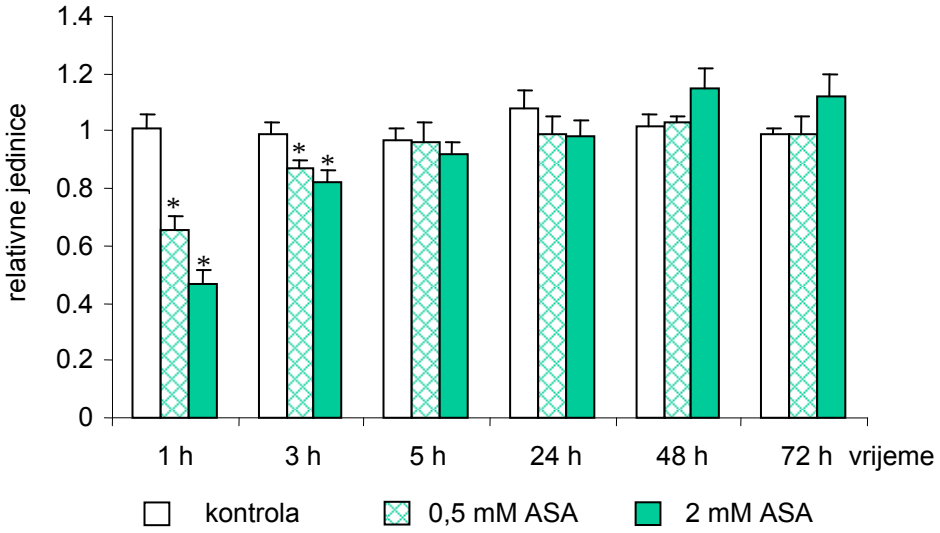
Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz forbol-12-miristat-13-acetat koncentracije 10^{-7} M, medij koji sadrži PMA je odliven, te su diferencirane stanice THP-1 kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 0,5 mM i 2 mM otopini aspirina u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Metabolička aktivnost stanica i citotoksičnost primijenjenih koncentracija aspirina određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da 0,5 mM i 2 mM otopina aspirina statistički značajno ne mijenjaju metaboličku aktivnost stanica u odnosu na diferencirane stanice kultivirane u hranidbenom mediju. Primjenjene koncentracije aspirina nemaju citotoksičan učinak na diferencirane stanice THP-1 obzirom da je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥87% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Nakon izolacije RNA iz tretiranih stanica i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u diferenciranim stanicama THP-1 kultiviranim tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.19).

Kultiviranje diferenciranih stanica THP-1 uz aspirin koncentracije 0,5 mM uzrokuje smanjenje količine mRNA za galektin-3 na 65,4±5,2% nakon prvog sata kultiviranja, a nakon trećeg sata na 87,1±3,5%. Nakon pet sati kultiviranja količina mRNA za galektin-3 približno je jednaka početnoj količini, te se daljnjim kultiviranjem ne mijenja.

Aspirin koncentracije 2 mM uzrokuje smanjenje ekspresije *LGALS3* na 46,7±7,3% početne vrijednosti nakon prvog sata kultiviranja. Daljnjim kultiviranjem povećava se količina mRNA za galektin-3, ali je nakon tri sata još uvijek manja od početne vrijednosti (82,1±4,2%). Peti sat približava se početnoj vrijednosti (92,3±4,3; $p>0,05$), koju doseže nakon 24-satnog kultiviranja. Uočava se daljnji porast količine mRNA za galektin-3 nakon 48 sati (115±7,2) i 72 sata kultiviranja (112,3±8,1), premda te promjene nisu statistički značajne.

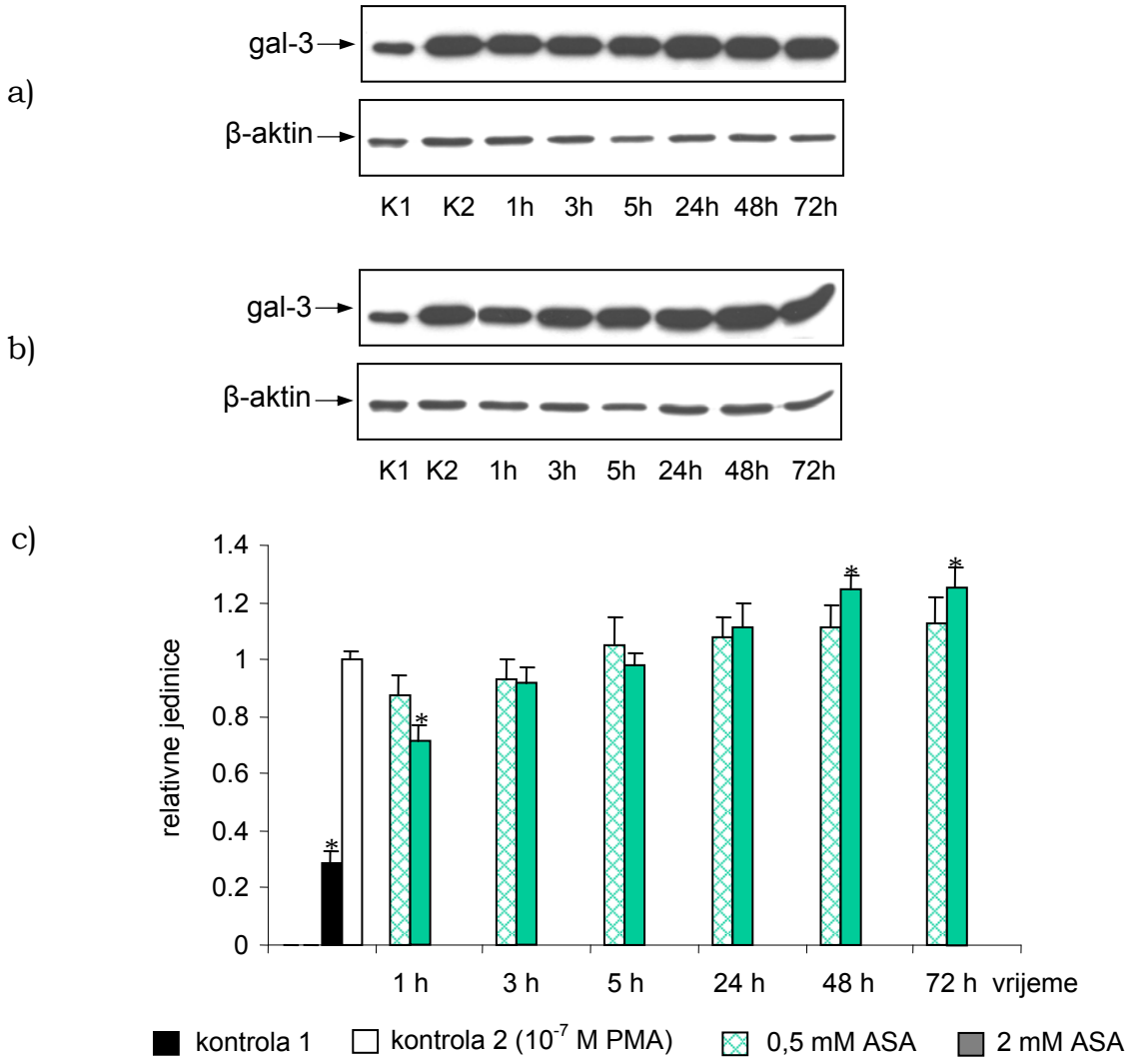


Slika 3.19 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1. Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA (10^{-7} M), diferencirane stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz aspirin koncentracije 0,5 mM i 2 mM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Bijeli stupci – kontrola, rebrasti stupci – 0,5 mM ASA, zeleni stupci – 2 mM ASA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz aspirin koncentracija 0,5 mM i 2 mM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata nakon dodatka medija s aspirinom. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat nediferenciranih stanica THP-1 te stanični homogenat diferenciranih stanica THP-1, dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7}M. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka 2 (diferenciranih stanica THP-1 dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7}M) (Slika 3.20).

Tijekom 72-satnog kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 uz aspirin koncentracije 0,5 mM razina galektina-3 se ne mijenja.

U diferenciranim stanicama THP-1 izloženim djelovanju aspirina koncentracije 2 mM nakon prvog sata kultiviranja količina galektina-3 statistički se značajno smanji za približno 30% (71,2±5,5% početne razine. Zatim raste te je nakon 3 sata nešto manja od početne razine (93,3±7%, p>0,05), a nakon 5 sati odgovara početnoj razini. Nakon 24-satnog kultiviranja počinje se povećavati (111,0±9,0%, p>0,05), nakon 48 sati iznosi 124±5,1%, a nakon 72 sata kultiviranja uz aspirin koncentracije 2 mM iznosi 125±7,2% početne razine.



Slika 3.20 Utjecaj aspirina na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1, koje su nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA (10^{-7} M) kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/0,5 mM ASA; b) mediju/2 mM ASA (5 µg proteina/jažici); c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu 2 ($\bar{x}$±SD). Crni stupac – kontrola 1 (nediferencirane stanice THP-1), bijeli stupac – kontrola 2 (diferencirane stanice THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz 10^{-7} M PMA), rebrasti stupci – 0,5 mM ASA, zeleni stupci – 2 mM ASA. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 (p<0,05).

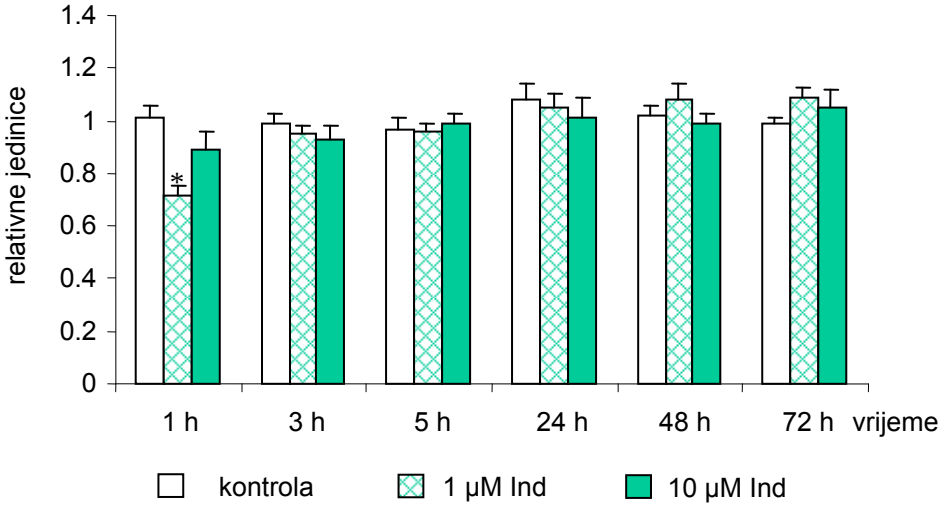
3.9 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1

Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz forbol-12-miristat-13-acetat koncentracije 10^{-7} M, medij koji sadrži PMA je odliven te su diferencirane stanice THP-1 kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 1 μM i 10 μM otopini indometacina u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Metabolička aktivnost stanica uz primijenjene koncentracije indometacina i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da 1 μM i 10 μM otopine indometacina statistički značajno ne mijenjaju metaboličku aktivnost stanica u odnosu na diferencirane stanice kultivirane u hranidbenom mediju. Primjenjene koncentracije indometacina nemaju citotoksičan učinak na diferencirane stanice THP-1 obzirom da je u svim slučajevima metabolička aktivnost bila ≥94% metaboličke aktivnosti stanica kultiviranih u hranidbenom mediju.

Nakon izolacije RNA iz tretiranih stanica i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u diferenciranim stanicama THP-1 kultiviranim tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.21).

Nakon prvog sata kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 uz indometacin koncentracije 1 μM ekspresija *LGALS3* smanjena je na 71,4±3,8%, ali se već nakon petog sata ponovno uspostavlja razina ekspresije jednaka početnoj. Ona se daljnjim kultivirajem tijekom 24, 48 i 72 sata ne mijenja.
Kultiviranje diferenciranih stanica THP-1 tijekom 1, 3, 5, 24, 48 i 72 sata uz indometacin koncentracije 10 μM ne utječe na razinu ekspresije *LGALS3*. Ona je približno jednaka početnoj razini tijekom cijelog perioda inkubiranja, premda se nakon prvog sata može uočiti blago smanjenje količine mRNA za galektin-3 (88,9±7,3; $p>0,05$).

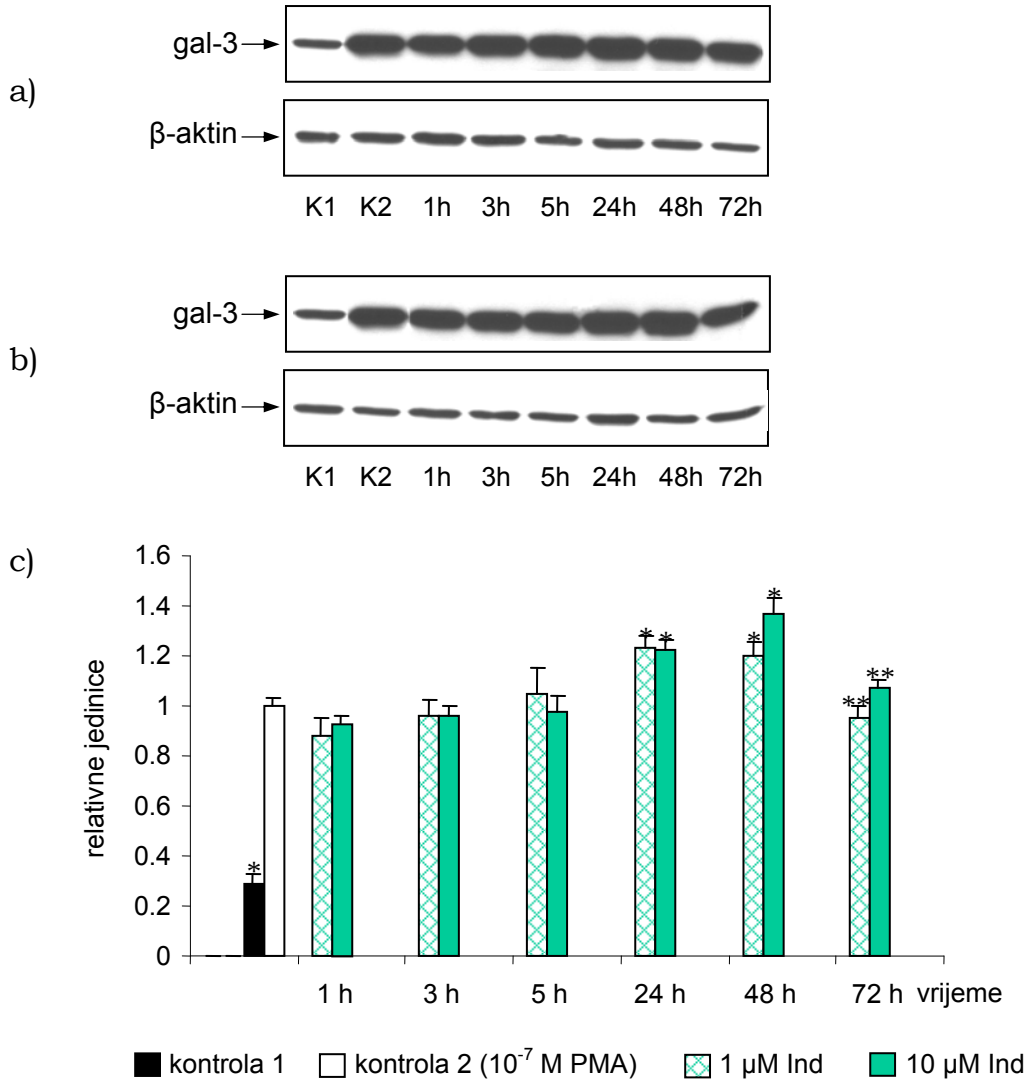


Slika 3.21 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1. Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA (10^{-7} M), diferencirane stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz indometacin koncentracije 1 μM i 10 μM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Bijeli stupci – kontrola, rebrasti stupci – 1 μM Ind, zeleni stupci –10 μM Ind. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz indometacin koncentracija 1 μM i 10 μM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat nediferenciranih stanica THP-1 te stanični homogenat diferenciranih stanica THP-1, dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka 2 (diferenciranih stanica THP-1 dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7}M) (Slika 3.22).

Količina galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 kultiviranim uz indometacin koncentracije 1 μM tijekom prvih pet sati statistički se značajno ne mijenja. Zatim se količina galektina-3 povećava te iznosi 123,3±4,7% nakon 24 sata kultiviranja te 120,2±5,8% nakon 48 sati

kultiviranja, da bi nakon 72-satnog kultiviranja ponovno pala na početnu vrijednost (95,5±4,4%).
Kultiviranje diferenciranih stanica THP-1 uz indometacin koncentracije 10 µM tijekom pet sati ne utječe na razinu ekspresije galektina-3. Jednodnevno pak kultiviranje podiže razinu ekspresije galektina-3 na 122,3±4% početne razine, dvodnevno na 137,2±5,6%, a nakon trodnevnog kultiviranja količina galektina-3 ponovno je jednaka početnoj količini (107,1±3,3%).



Slika 3.22 Utjecaj indometacina na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1, koje su nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/1 µM Ind; b) mediju/10 µM Ind (5 µg proteina/jažici); c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu 2 ($\bar{x}$± SD). Crni stupac – kontrola 1 (nediferencirane stanice THP-1), bijeli stupac – kontrola 2 (diferencirane stanice THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz 10^{-7} M PMA), rebrasti stupci – 1 µM Ind, sivi stupci – 10 µM Ind. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 ($p<0,05$); dvije zvjezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na 48. sat.

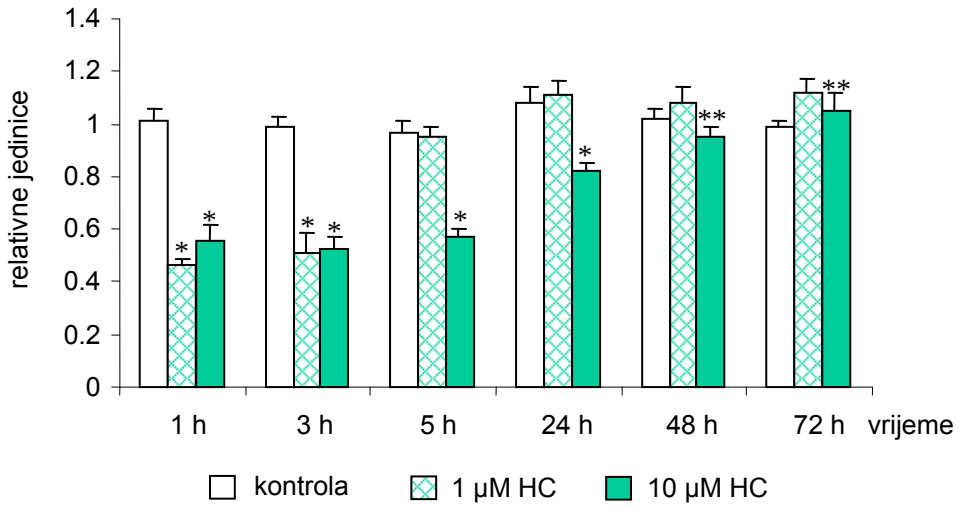
3.10 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1

Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz forbol-12-miristat-13-acetat koncentracije 10^{-7} M, medij koji sadrži PMA je odliven, te su diferencirane stanice THP-1 kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 1 μM i 10 μM otopini hidrokortizona u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Metabolička aktivnost stanica uz primijenjene koncentracije hidrokortizona i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da hidrokortizon koncentracije 1 μM uzrokuje lagano povećanje metaboličke aktivnosti diferenciranih stanica THP-1 (118,6±4,4% kontrolne vrijednosti). Hidrokortizon koncentracije 10 μM uzrokuje povećanje metaboličke aktivnosti diferenciranih stanica THP-1 na 124,9±9,2% kontrolne vrijednosti.

Nakon izolacije RNA iz tretiranih stanica i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u diferenciranim stanicama THP-1 kultiviranim tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.23).

U diferenciranim stanicama THP-1 razina ekspresije *LGALS3* smanjuje se na 46,7±2,3% nakon jednog sata kultiviranja uz hidrokortizon koncentracije 1 μM. Sličan učinak uočava se i nakon tri sata kultiviranja (51,3±7,2%), da bi se nakon petog sata razina ekspresije *LGALS3* vratila na početnu vrijednost (95,1±3,5%). Premda daljnjim kultiviranjem tijekom 24, 48 i 72 sata količina mRNA za galektin-3 pokazuje trend blagog rasta te promjene u usporedbi s količinom u kontrolnim uzorcima nisu statističi značajne (11±5,2%; 108±6,2% odnosno 112±5,2%).
Hidrokortizon koncentracije 10 μM uzrokuje pad količine mRNA za galektin-3 na 55,4±6,2% početne vrijednosti nakon 1 sata kultiviranja. Sličan se učinak uočava i nakon 3 sata (52,3±4,8%) i pet sati kultiviranja, kada razina ekspresije *LGALS3* iznosi 57,1±3,3% početne vrijednosti. Potom se količina mRNA za galektin-3 povećava te nakon 24 sata iznosi 82,1±2,9% početne vrijednosti, da bi nakon 48 sati, kao i nakon 72 sata kultiviranja dosegla početnu razinu.



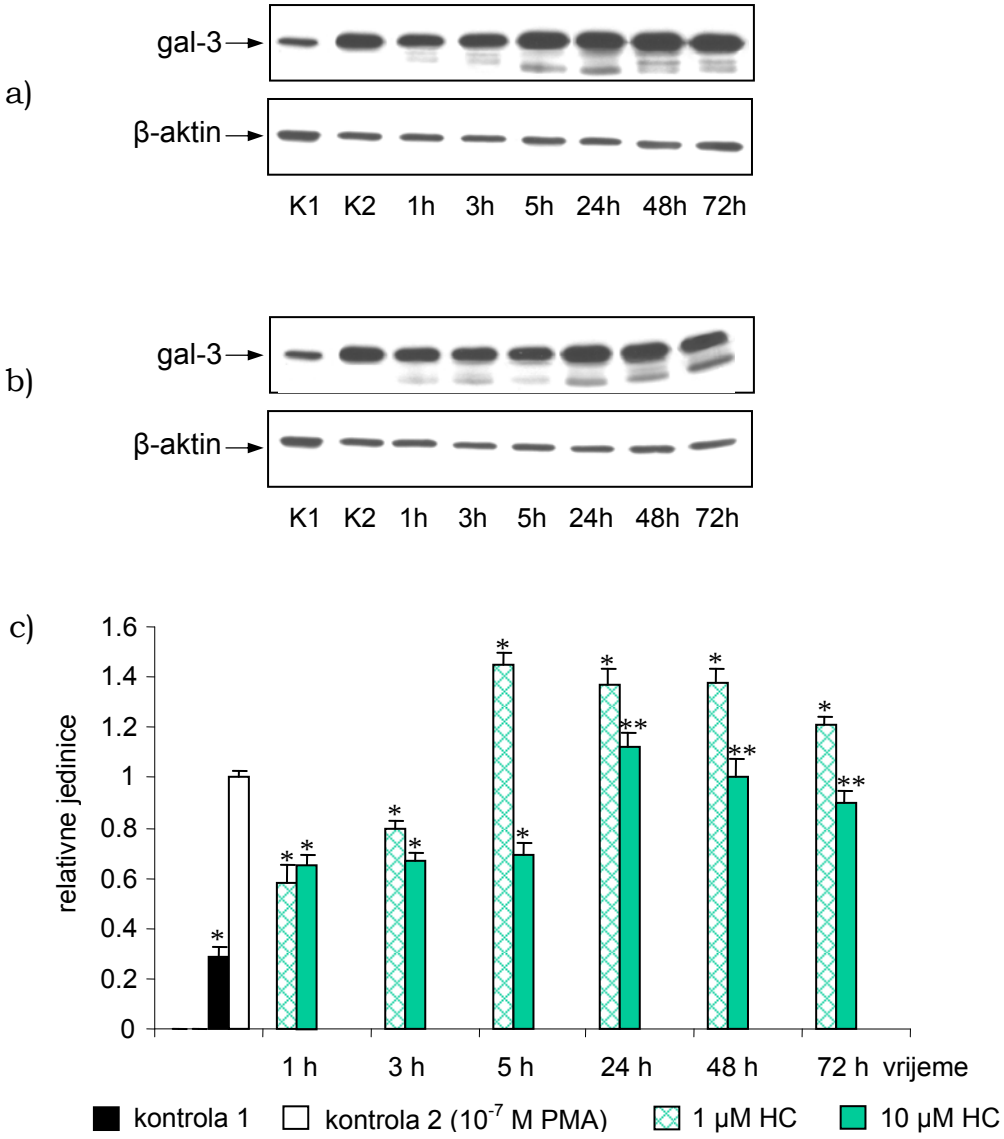
Slika 3.23 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1. Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA (10^{-7} M), diferencirane stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz hidrokortizon koncentracije 1 μM i 10 μM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Bijeli stupci – kontrola, rebrasti stupci – 1 μM HC, zeleni stupci –10 μM HC. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$); dvije zvjezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na 24. sat.

Razina ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz hidrokortizon koncentracija 1 μM i 10 μM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat nediferenciranih stanica THP-1 te stanični homogenat diferenciranih stanica THP-1, dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka 2 (diferenciranih stanica THP-1 dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7}M) (Slika 3.24).

Smanjenje količine galektina-3 za ~40% uočeno je nakon jednog sata kultiviranja stanica THP-1 uz hidrokortizon koncentracije 1 μM. Tada iznosi 58,3±7,2% početne razine. Daljnje kultiviranje uzrokuje lagani porast

količine galektina-3 – nakon trećeg sata količina galektina-3 je još uvijek manja od početne razine, ali samo za ~20% (79,8±3,1% početne razine). Do petog sata količina galektina-3 značajno raste (za ~50%) u odnosu na kontrolu, odnosno za 82% od razine dostignute nakon 3 sata (145,0±4,8% početne razine). Nakon 24 sata razina galektina-3 iznosi 137,0±6,1%, a nakon 48 sati 138±5,5% početne vrijednosti. Nakon 72-satnog kultiviranja uz hidrokortizon koncentracije 1 μM, diferencirane stanice THP-1 eksprimiraju 121,0±2,9% početne količine galektina-3.

Hidrokortizon koncentracije 10 μM također uzrokuje pad razine ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom prvih pet sati kultiviranja. Nakon jednog sata ona iznosi 65,0±4,4%, nakon trećeg 67,2±3,2%, a nakon petog sata kultiviranja 69,1±5,3% početne razine. Međutim, nakon 24 sata kultiviranja ponovno se uspostavlja razina ekspresije uočena kod kontrolnih uzoraka (112,0±6,1%), što znači da je u odnosu na 5. sat došlo do statistički značajnog porasta razine galektina-3 za ~60%. Daljnjim kultiviranjem (48 i 72 sata) razina galektina-3 ostaje nepromijenjena.



Slika 3.24 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1, koje su nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/1 μM HC; b) mediju/10 μM HC (5 μg proteina/jažici); c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu 2 ($\bar{x}\pm$ SD). Crni stupac – kontrola 1 (nediferencirane stanice THP-1), bijeli stupac – kontrola 2 (diferencirane stanice THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz 10^{-7} M PMA), rebrasti stupci – 1 μM HC, zeleni stupci – 10 μM HC. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 ($p<0,05$). dvije zvjezdice označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na 5. sat.

3.11 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u diferenciranim stanica THP-1

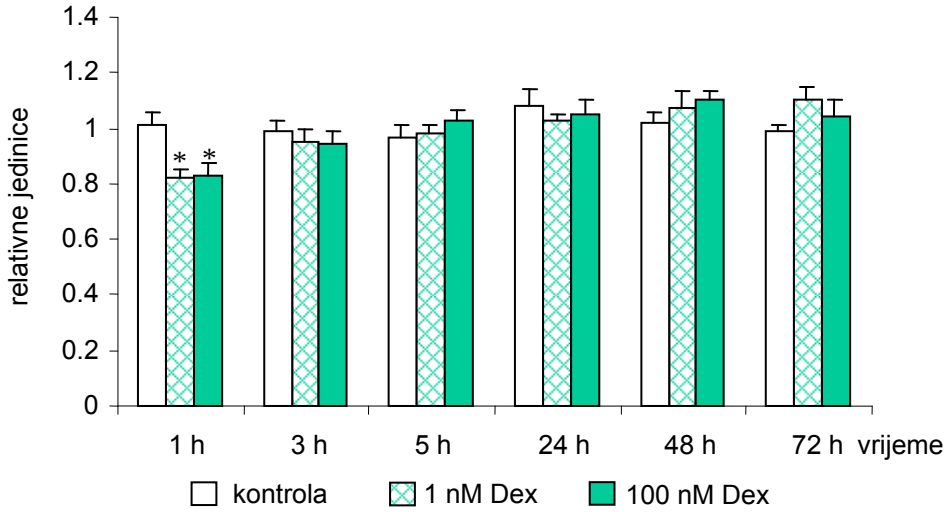
Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz forbol-12-miristat-13-acetat koncentracije 10^{-7} M, medij koji sadrži PMA je odliven, te su diferencirane stanice THP-1 kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u 1 nM i 100 nM otopini deksametazona u hranidbenom mediju, u kojem je istovremeno koncentracija DMSO bila ≤0,2%.

Metabolička aktivnost stanica uz primijenjene koncentracije deksametazona i citotoksičnost određeni su testom MTS (prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.8). Rezultati su pokazali da deksametazon koncentracije 1 nM ne djeluje citotoksično na diferencirane stanice THP-1; čini se da se njihova metabolička aktivnost čak lagano povećava (na 111±5,5% kontrolne vrijednosti, $p>0,05$). Izlaganje diferenciranih stanica THP-1 deksametazonu koncentracije 100 nM povećava njihovu metaboličku aktivnost na 127±8,3% kontrolne razine.

Nakon izolacije RNA iz tretiranih stanica i reverzne transkripcije po čemu je slijedila lančana reakcija polimerazom, količina PCR produkta nastalih umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR određena je analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser uz primjenu programa GeneScan 2.1 software. Relativna količina mRNA za galektin-3 izražena je omjerom površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu. Kontrolom su smatrani omjeri površine *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina dobiveni opisanim načinom u diferenciranim stanicama THP-1 kultiviranim tijekom istih vremena u mediju/0,2% DMSO (Slika 3.25).

Rezultati su pokazali da tijekom prvog sata kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 uz deksametazon koncentracije 1 nM dolazi do smanjenja količine mRNA za galektin-3 na 82,3±3,1%, ali se već nakon tri sata kultiviranja ponovno uspostavlja početna razina ekspresije *LGALS3* (95,4±2,2%). Daljnjim kultiviranjem (tijekom 24, 48, 72 sata) razina ekspresije održava se na približno jednakoj razini.

Gotovo identičan učinak na ekspresiju gena za galektin-3 ima i deksametazon koncentracije 100 nM. I on u diferenciranim stanicama THP-1 uzrokuje smanjenje količine mRNA za galektin-3 na 83±4,3% nakon jednog sata kultiviranja. Nakon 5 sati kultiviranja razina ekspresije *LGALS3* je samo neznatno manja od početne razine (94±4,8%), koja ostaje nepromijenjena nakon 24, 48 i 72 sata kultiviranja.

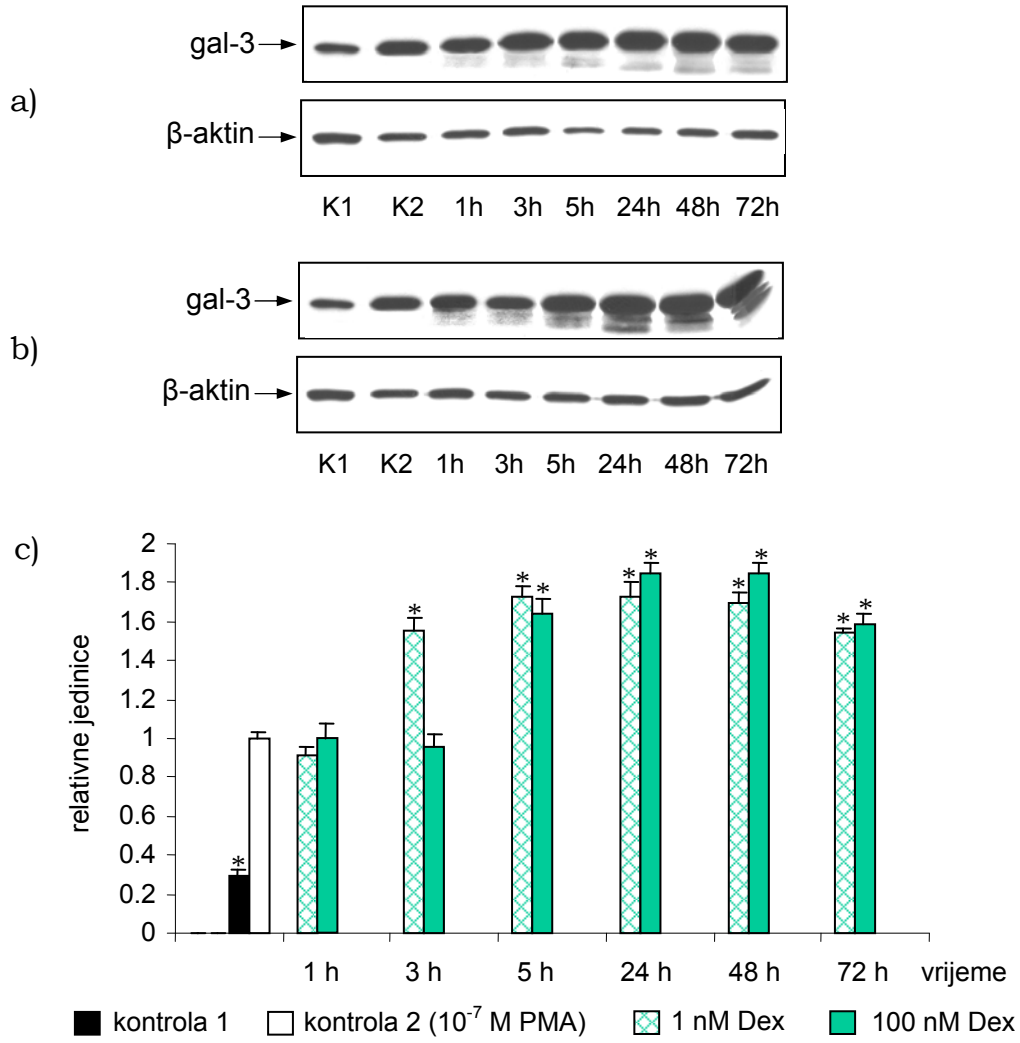


Slika 3.25 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1. Nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M, diferencirane stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz deksametazon koncentracije 1 nM i 100 nM. Nakon izolacije ukupne RNA i reverzne transkripcije, PCR produkti nastali umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 tijekom 21 ciklusa PCR i dijela mRNA za β-aktin tijekom 14 ciklusa PCR su združeni i razdvojeni kapilarnom elektroforezom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser. Rezultati dvaju neovisnih pokusa napravljenih u duplikatu izračunati primjenom programa GeneScan 2.1 software izraženi su kao omjeri površina *peakova* PCR produkata galektina-3 i β-aktina u odnosu na kontrolu ($\bar{x}$±SD). Bijeli stupci – kontrola, rebrasti stupci – 1 nM Dex, zeleni stupci – 100 nM Dex. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$).

Razina ekspresije galektina-3 u diferenciranim stanicama stanične linije THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja uz deksametazon koncentracija 1 nM i 100 nM ispitana je postupkom Western blot uz denzitometrijsku analizu vrpci. Uzorci su sakupljani nakon 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata. U svakom je uzorku istim postupkom određena količina konstitutivno eksprimiranog proteina - β-aktina. Rezultati denzitometrijske analize vrpci galektina-3 normirani su prema rezultatima dobivenim za vrpce β-aktina (za svaki pojedini uzorak). Kako bismo mogli uspoređivati rezultate dobivene za uzorke analizirane na različitim gelovima/membranama na svaki je gel nanijet isti stanični homogenat nediferenciranih stanica THP-1 te stanični homogenat diferenciranih stanica THP-1, dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7} M. Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina pojedinog uzorka u odnosu na relativnu površinu vrpci galektina-3/β-aktina kontrolnog uzorka 2 (diferenciranih stanica THP-1 dobivenih nakon 48-satnog kultiviranja stanica THP-1 uz PMA koncentracije 10^{-7}M) (Slika 3.26).

Tijekom prvog sata kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 uz deksametazon koncentracije 1 nM te 100 nM ekspresija galektina-3 se ne mijenja. U stanicama kultiviranim uz deksametazon koncentracije 1 nM već se treći sat kultiviranja ekspresija galektina-3 povećava za >50%

(155,2±4,5%), a zatim još raste te iznosi: 5 sat-172,4±5,8%, 24 sat-173,2±7,1%, 48 sat – 170,0±5,3%. Nakon 72-satnog kultiviranja iznosi 154,1±2,8% početne razine.
Sličan učinak na ekspresiju galektina-3 ima i deksametazon koncentracije 100 nM. Premda nakon tri sata kultiviranja nema promjene ekspresije galektina-3, peti sat količina galektina-3 iznosi 164,3±7,2% početne razine te nastavlja rasti, pa 24. sat iznosi 184,5±5,8%, a 48. sat 185,2±4,6%. Nakon 72-satnog kultiviranja uz deksametazon koncentracije 100 nM iznosi 158,4±5,4% početne količine.



Slika 3.26 Utjecaj deksametazona na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1. Imunoblot analiza ekspresije galektina-3 u homogenatima stanica THP-1, koje su nakon 48-satnog kultiviranja uz PMA koncentracije 10^{-7} M kultivirane tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata u a) mediju/1 nM Dex; b) mediju/100 nM Dex (5 µg proteina/jažici); c) Rezultati denzitometriranja vrpci iz dva neovisna pokusa napravljena u duplikatu izraženi su kao relativna površina vrpci galektina-3/β-aktina u odnosu na kontrolu 2 ($\bar{x} \pm$ SD). Crni stupac – kontrola 1 (nediferencirane stanice THP-1), bijeli stupac – kontrola 2 (diferencirane stanice THP-1 nakon 48-satnog kultiviranja uz 10^{-7} M PMA), rebrasti stupci – 1 nM Dex, zeleni stupci – 100 nM Dex. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu 2 ($p<0,05$).

RASPRAVA

Galektin-3 je lektin 29-32 kDa, koji specifično prepoznaje β-galaktozidne strukture glikoproteina, a čija točna fiziološka uloga, kao ni mehanizam regulacije, do danas nisu u potpunosti razjašnjeni. Galektin-3 sudjeluje u mnogim biološkim procesima, između ostalog, ima važnu ulogu u modulaciji imunih reakcija i upalnom odgovoru. Prisutan je u izvanstaničnoj tekućini, ima sposobnost aktiviranja brojnih stanica, posreduje u međustaničnim interakcijama te interakcijama između stanica i izvanstaničnog matriksa, kao i homotipskim interakcijama između stanica – sve to čini ga pogodnom molekulom za regulaciju upalnog odgovora. Osim toga, galektin-3 može inhibirati apoptozu, te stoga ekspresija galektina-3 može produljiti opstanak upalnih stanica, a samim time i upalni odgovor. Rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su da galektin-3 djeluje kao jak proinflamatorni signal koji modulira staničnu proliferaciju, staničnu adheziju, kemotaksiju, fagocitozu, aktivaciju mastocita i bazofila, sintezu upalnih medijatora te apoptozu limfocita T.

Upalni odgovor je visokoreguliran fiziološki proces koji je od ključne važnosti za održavanje homeostaze. Precizna fiziološka kontrola upale omogućava brzu reakciju organizma na infekciju ili ozljedu bez pogubnih posljedica za organizam uzrokovanih pretjeranom biokemijskom reakcijom. Signalni putevi kojima se regulira upalni proces su kaskade protein kinaza aktiviranih mitogenima kojima se u konačnici moduliraju aktivnosti brojnih transkripcijskih faktora. Na te signalne puteve, kao i izravno na transkripcijske faktore, utječu i tvari s imunomodulatornim djelovanjem – glukokortikoidi i nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem (NSAIDs). Najznačajniji transkripcijski faktori, ključni za indukciju gena uključenih u upalni odgovor te za nastanak i progresiju bolesti uzrokovanih kroničnom aktivacijom imunog sustava (kao što su primjerice astma i ateroskleroza te autoimune bolesti, primjerice multipla skleroza i reumatoidni artritis) su transkripcijski faktori NF-κB i AP-1. Vezna mjesta za NF-κB i AP-1 prisutna su i u promotorskoj regiji gena za galektin-3 (*LGALS3*), pa je vrlo vjerojatno da tvari s imunomodulatornim djelovanjem utječu i na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.

Zbog česte uporabe ovih tvari u terapijske svrhe te važnosti galektina-3 u fiziologiji stanica monocitno-makrofagne loze, u ovom je radu ispitan utjecaj nesteroidnih (aspirina i indometacina) i steroidnih (hidrokortizona i deksametazona) tvari s imunomodulatornim djelovanjem primijenjenih u različitim terapijskim rasponima na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama monocitno-makrofagne loze.

Kao prvi korak valjalo je izabrati odgovarajuću staničnu liniju. Prema literaturnim podacima, mnoga su istraživanja funkcije, lokalizacije i ekspresije galektina-3 provedena na stanicama promijelocitne stanične linije HL-60 – između ostalog, galektin-3 po prvi je puta izoliran upravo iz tih stanica. Međutim, rezultati naših ispitivanja (koji nisu prikazani u ovom radu) pokazali su da stanice stanične linije HL-60 eksprimiraju izrazito malu, jedva detektabilnu količinu *LGALS3* i galektina-3. Premda naizgled začuđujuće, taj rezultat nije neobjašnjiv. Mnoge stanične linije uzgajaju se u

kulturi već više od 10 godina – stanična linija HL-60 čak gotovo 30 godina. Takve stanice često imaju značajno različite osobine ne samo u odnosu na izvorno tkivo, već i u odnosu na stanice iste stanične linije uzgajane u drugim laboratorijima. Za stanice HL-60 postoje određeni podaci o promjenama njihovih karakteristika, kao što su sposobnost proliferacije i diferencijacije (procesi u kojima sudjeluje i galektin-3), tijekom višegodišnjih kultiviranja [174, 175]. Očigledno je promjena konstitutivne razine galektina-3 jedna od takvih promijenjenih karakteristika, barem u stanicama HL-60 na kojima smo mi proveli istraživanja.

Kao zadovoljavajuća stanična linija pokazala se monocitna stanična linija THP-1. Rezultati imunoblot analize uz primjenu specifičnog protutijela M3/38 (koje prepoznaje domenu koja sadrži ponavljajuće sljedove u N-terminalnom dijelu galektina-3) dobiveni kemifluorescentnom detekcijom pokazali su da je konstitutivna razina ekspresije galektina-3 relativno visoka.

Nakon odabira odgovarajuće stanične linije, pristupilo se optimiranju metode za određivanje razine ekspresije *LGALS3*, odnosno količine mRNA za galektin-3 (u rezultatima je prikazan samo konačan rezultat postupka optimiranja). Metoda uključuje izolaciju ukupne RNA iz stanica, reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom te analizu količine PCR produkata na uređaju *AbiPrism 310 Genetic Analyser* uporabom programa *GeneScan Analysis software*. Premda izolacija RNA može često rezultirati raspadnutom RNA, kontaminacijom DNA ili nedovoljnom količinom RNA, rezultati analiza kvalitete i količine izolirane RNA na uređaju *Agilent 2100 bioanalyzer* pokazali su da niti jedan uzorak izolirane RNA ne sadrži primjese DNA, već samo intaktnu RNA, relativno visoke koncentracije (analize su obavljene na svim uzorcima sakupljenim tijekom svih eksperimenata). Lančanom reakcijom polimerazom željelo se umnožiti dijelove mRNA za galektin-3 i dijelove mRNA za konstitutivno eksprimirani β-aktin. Prilikom odabira ishodnica, zadovoljeni su uvjeti važni za učinkovitost umnažanja (najviše tri uzastopna ponavljanja iste baze, približno jednaka duljina ishodnica (20-21 bp), dopušteni udio GC-parova 50-70%, dopušteni raspon T_m 60-75°C, približno jednaka duljina nastalih PCR produkata). Premda smo pokušali umnožiti fragmente mRNA za oba gena u istoj reakcijskoj smjesi tijekom jedne lančane reakcije polimerazom (multipleks PCR), kako bi u najvećoj mogućoj mjeri izbjegli "tube to tube" varijacije, rezultati tih pokušaja nisu bili zadovoljavajući. Naime, konstitutivna razina ekspresije β-aktina je puno veća od konstitutivne razine ekspresije galektina-3. Premda se na uređaju *AbiPrism 310 Genetic Analyser* mogu analizirati i kvantificirati PCR produkti čija se količina razlikuje do 20 puta, u trenutku kada je količina PCR produkata za galektin-3 detektabilna (nakon 21 ciklusa PCR), količina PCR produkata za β-aktin je izrazito velika. Zašto jednostavno ne ponoviti analizu korištenjem razrijeđenih uzoraka i združiti rezultate analize količine PCR produkata za galektin-3 i β-aktin? Nažalost, takav pristup mogao bi navesti na pogrešne zaključke. Naime, ustanovili smo da je nakon 21 ciklusa umnažanja dijela mRNA za β-aktin lančana reakcija polimerazom već dosegnula svoju krajnju

točku, te da količina nastalog produkta više nije proporcionalna početnoj količini mRNA. Stoga smo umnažanje dijelova mRNA za galektin-3 i za β-aktin ipak morali provesti u zasebnim epruvetama, tijekom drukčijih reakcijskih uvjeta (14 ciklusa umnažanja za β-aktin, 21 ciklus za galektin-3). Jedna od prednosti kvantifikacije PCR produkata na uređaju *AbiPrism 310 Genetic Analyser* je što je izrazito osjetljiv, te je moguće kvantificirati vrlo male količine PCR produkata (za usporedbu, na agaroznom se gelu jedva mogu detektirati PCR produkti za galektin-3 nastali tijekom 28 ciklusa umnažanja). Stoga je moguće umnožiti dijelove mRNA i prekinuti lančanu reakciju polimerazom još dok je u svojoj eksponencijalnoj fazi, što je osnovni uvjet za pouzdanu kvantifikaciju PCR produkata. Još jedan od uvjeta pouzdane kvantifikacije je jednaka učinkovitost amplifikacije PCR produkata različitih gena. Provjerena je na taj način što su priređena razrjeđenja cDNA, te su isti volumeni (a različite količine cDNA) podvrgnuti lančanim reakcijama polimerazom tijekom 14 ciklusa (za umnažanje gena za β-aktin) i 21 ciklusa (za umnažanje gena za galektin-3). Rezultati su pokazali da su omjeri PCR produkta za galektin-3 i β-aktin uvijek jednaki, iz čega zaključujemo da se PCR produkti umnažaju jednakom učinkovitošću.

Nakon odabira odgovarajuće stanične linije i optimiranja metoda analize, ispitana je ekspresija *LGALS3* i galektina-3 u nediferenciranim stanicama THP-1 nakon 1, 3, 5, 24, 48 i 72 kultiviranja u kulturi početne gustoće 2 x 10^5 st/ml. Obzirom da stanice THP-1 rastu u suspenziji te su kultivirane kao asinhrona stanična kultura, bilo je za očekivati da se konstitutivna razina ekspresije kako *LGALS3*, tako i galektina-3 održava na jednakoj razini tijekom 72-satnog kultiviranja. Rezultati su pokazali da je pretpostavka točna. Također je utvrđeno da 72-satno kultiviranje ne utječe niti na vijabilnost niti na metaboličku aktivnost stanica, bez obzira na gotovo peterostruko povećanje gustoće stanične linije, čime je već bila gotovo konfluentna.

Stanice monocitne stanične linije THP-1 diferencirane su tijekom 48-satnog izlaganja forbol-12-miristat-13-acetatu (PMA) koncentracije 10^{-7} M.
Već nakon prvog sata kultiviranja uz PMA, ≥80% stanica THP-1 adherira na podlogu (postotak adheriranih stanica sličan je i nakon 3 i 5 sati kultiviranja), ali se količina mRNA za galektin-3 niti galektina-3 ne mijenja značajno. Tijekom prvih pet sati kultiviranja uz PMA, premda u velikom postotku već adherirane na podlogu, stanice THP-1 (promjera 10-15 μm) zadržavaju sferičan oblik. Nakon 24 sata kultiviranja poprimaju ameboidan oblik makrofaga (promjera 30-50 μm). No nama zanimljiviji podatak jest da se nakon 24- i 48-satnog kultiviranja uz PMA podosta povećava razina ekspresije *LGALS3* (2,4 odnosno 2,9 puta) i galektina-3 (2,9 odnosno 3,5 puta).

Koji su mogući mehanizmi regulacije ekspresije *LGALS3* i galektina-3 tijekom diferencijacije stanica THP-1?

Na osnovi strukture promotorskog dijela gena za galektin-3 otkrivene 1998. godine pretpostavljeno je da transkripcija gena za galektin-3 može biti

regulirana transkripcijskim faktorima Sp1, AP-1, NF-κB i CREB. Zaista, rezultati naših prethodnih istraživanja [30] pokazali su da je bazalna razina ekspresije galektina-3 u adherirajućim stanicama A1235 uglavnom regulirana transkripcijskim faktorom AP-1, dok je indukcija njegove ekspresije izazvane UV-zračenjem posredovana transkripcijskim faktorima NF-κB i AP-1. Ekspresija *LGALS3* mijenja se pod utjecajem različitih stimulansa, ali prvu naznaku o mogućim mehanizmima regulacije te ekspresije pružila su nedavna istraživanja Kim i sur., na osnovi kojih se može zaključiti da u regulaciji ekspresije *LGALS3* važnu ulogu ima signalni put Ras-Raf-MKK1/MKK3/p38/AP-1 [32].

Diferencijacija stanica THP-1 inducirana je forbol-12-miristatom-13-acetatom, često rabljenom tvari u pokusima kojima se istražuje stanična diferencijacija, prijenos signala i genska ekspresija. Aktivirajući protein kinazu C, kinazu reguliranu izvanstaničnim signalima (ERK) te c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK), PMA pokreće kaskadu događaja koji rezultiraju aktivacijom transkripcijskih faktora kao što su NF-κB i AP-1 te diferencijacijom određenih staničnih tipova.
Vjerojatno je upravo aktivacija NF-κB i AP-1 uzrok povećanja ekspresije *LGALS3*. Osim povećane količine mRNA za galektin-3, povećanje količine samog galektina-3 može biti posljedica i aktivacije translacije, posebice ako se uzme u obzir da je porast količine mRNA (2,9 puta) nešto manji od porasta količine samog proteina (3,5 puta). Poznato je naime da se faktori inicijacije translacije aktiviraju fosforilacijom koja je potaknuta djelovanjem PMA [176, 177].

Nakon što smo raspravili moguće mehanizme kojima se omogućava povećanje ekspresije galektina-3 tijekom pretvorbe monocitnih stanica u makrofagne, valja se zapitati zašto je stanici potrebna veća količina galektina-3.

Sazrijevanje monocita u makrofage praćeno je promjenom morfologije i fiziologije stanica, što uključuje povećanu ekspresiju membranskih proteina, unutarstaničnih enzima i receptora. Kako monocitne stanice rastu u suspenziji, a makrofagne adherirane na podlogu, prilikom pretvorbe stanice moraju ostvariti interakcije s podlogom. Sudjeluje li možda i galektin-3 u ostvarivanju tih interakcija? Obzirom na to da je poznato da galektin-3 sudjeluje u adheziji stanica na izvanstanični matriks, moguće je da sudjeluje i u ostvarivanju interakcija stanica i podloge *in vitro*. Prema naših prethodnim istraživanjima, presađivanjem adherirajućih stanica podignutih tripsinizacijom s podloge dolazi do promjene (preciznije, smanjenja) količine galektina-3, kako membranskog, tako i citosolnog, ali se nakon jednodnevnog kultiviranja ponovno uspostavlja konstitutivna razina galektina-3 [49]. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da premda je velika većina stanica THP-1 tijekom prvih pet sati kultiviranja uz PMA adherirala, nije došlo do promjene ekspresije galektina-3. To još uvijek ne znači da on ne sudjeluje u procesu adhezije, obzirom na to da monocitne stanice imaju izlučeni galektin-3 vezan na svoje membranske receptore – njegove glikoproteinske ligande. Osim toga, količina galektina-3 poveća se 3 puta

nakon 24-satnog kultiviranja uz PMA, kada je uočeno i trostruko povećanje njihova promjera, a samim time i površine kojom se ostvaruju interakcije s podlogom. No uključenost galektina-3 u ostvarivanje interakcija stanica s podlogom valjalo bi dodatno istražiti.
Galektin-3 u monocitima potiče unos Ca^{2+} te uzrokuje povećanje stvaranja interleukina-1. Djeluje kao kemoatraktant za monocite, ali i za makrofage. No u makrofagima galektin-3 ima i mnoge druge značajne uloge. Osim što izaziva oksidativni prasak u makrofagima, čini se da sudjeluje i u procesu fagocitoze. Veliki kapacitet fagocitoze jedna je od osnovnih karakteristika makrofaga. To je jedan od ključnih procesa u ostvarivanju urođene imunosti ali i u patogenezi autoimunih bolesti. Nedavna saznanja prema kojima je galektin-3 jedna od osnovnih komponenti fagosoma mišje makrofagne stanične linije i egzosoma dendritske stanične linije navode na zaključak da je taj protein uključen u endocitozu i prezentaciju antigena. Sano i sur. su utvrdili da je galektin-3 nužan za učinkovitu fagocitozu IgG-opsoniziranih eritrocita i apoptotskih stanica *in vitro* i *in vivo* [178].
Obzirom na to da nije uočena promjena količine niti mRNA za galektin-3 niti galektina-3 tijekom 72- satnog kultiviranja diferenciranih stanica THP-1 u mediju, zaključujemo da se nakon porasta količine galektina-3 prilikom diferencijacije monocita u makrofage, ukoliko se oni ne izlože nikakvom dodatnom stimulansu, u njima održava uspostavljena konstitutivna razina ekspresije *LGALS3* i galektina-3.

Prilikom izbora koncentracija tvari s imunomodulatornim djelovanjem uz prisutnost kojih će se stanice kultivirati, smjernice su bile terapeutske koncentracije tih tvari u krvi ljudi koji se nalaze pod terapijom (premda i te koncentracije jako variraju ovisno o tipu bolesti). Također se želio pokriti širi raspon terapeutskih koncentracija (odnosno niske, srednje i visoke). Međutim, obzirom da se situacija *in vitro* u mnogočemu razlikuje od situacije *in vivo*, prije no što se pristupilo ispitivanju razine ekspresije *LGALS3* i galektina-3 provjerena je citotoksičnost imunomodulatornih tvari određenih koncentracija te su za daljnje pokuse odabrane samo one koncentracije koje ne djeluju citotoksično niti na nediferencirane niti na diferencirane stanice THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja.

Kada se aspirin koristi kao analgetik, njegove koncentracije u plazmi su oko 0,5 mM, a kada se rabi kao protuupalni lijek do 2,7 mM. Veće koncentracije su toksične. Sukladno tome, rezultati naših pokusa pokazali su da 4 mM aspirin djeluje citotoksično na stanice THP-1 (rezultati nisu prikazani). Stoga su odabrane koncentracije aspirina bile 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM. Indometacin je korišten za pokuse u koncentracijama 0,1 µM, 1 µM, 5 µM i 10 µM, obzirom da je raspon terapeutskih koncentracija 1,3 µM do 8,3 µM. U istim je koncentracijama rabljen i hidrokortizon, dočim su primijenjene koncentracije deksametazona bile 0,1 nM do 100 nM, obzirom da je ustanovljeno da deksametazon u većim koncentracijama djeluje citotoksično na stanice THP-1. Aspirin, indometacin, hidrokortizon i deksametazon u odabranim koncentracijama ne utječu značajno na cjelokupno metaboličko stanje stanice koje bi za posljedicu imalo odumiranje stanice. Štoviše, u diferenciranim stanicama THP-1

hidrokortizon (10 μM) i deksametazon (100 nM) čak blago povećavaju metaboličku aktivnost stanica.

Niti jedna od navedenih tvari nije topljiva u vodi, pa su za potrebe eksperimenata priređene njihove matične otopine u DMSO. Po prirređivanju radnih koncentracija tih tvari, konačne koncentracije DMSO u medijima u kojima su stanice THP-1 inkubirane bile su ≤ 0,2%. Sam DMSO koncentracije 0,2% tijekom 72-satnog kultiviranja nije uzrokovao statistički značajnu promjenu niti jednog ispitivanog parametra (vijabilnosti, metaboličke aktivnosti, ekspresije *LGALS3* i ekspresije galektina-3). To je u suglasju s našim očekivanjima i literaturnim podacima, prema kojima tek 2% DMSO (što je jedan red veličine veća koncentracija od one primijenjene u ovom istraživanju!) ima citotoksičan učinak na stanice. Zaključujemo, također, da DMSO navedene koncentracije ne utječe značajno na mehanizme regulacije ekspresije *LGALS3* i galektina-3.

Tvari s imunomodulatornim djelovanjem čiji je utjecaj na ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u ovom radu ispitan pripadaju dvjema osnovnim skupinama protuupalnih lijekova - nesteroidnim tvarima s imunomodulatornim djelovanjem (NSAIDs) i glukokortikoidima. Oni različitim mehanizmima, koji doduše nisu u potpunosti razjašnjeni, ostvaruju protuupalne učinke.

U nediferenciranim, odnosno monocitnim stanicama THP-1 sve ispitane tvari s imunomodulatornim djelovanjem u svim primijenjenih koncentracijama inhibiraju ekspresiju *LGALS3*, preciznije, uzrokuju smanjenje količine mRNA za galektin-3. Ono se uočava već nakon prvog sata kultiviranja, osim uz najnižu koncentraciju aspirina (0,1 μM), kod koje se tendencija pada primjećuje nakon petog sata kultiviranja, a statistički značajnom postaje nakon jednodnevnog kultiviranja. Postotak inhibicije varira od 66% do čak 96% te je u korelaciji je s vremenom izlaganja tvarima s imunomodulatornim djelovanjem. Također je u korelaciji s primijenjenom koncentracijom aspirina, dok je u slučaju ostalih tvari ta korelacija ne postoji. Koji su mogući mehanizmi kojima tvari s imunomodulatornim djelovanjem ostvaruju inhibiciju ekspresije gena za galektin-3?

Odavno je poznato da aspirin acetiliranjem inhibira aktivnost ciklooksigenaze i vjeruje se da je većina protuupalnih učinaka aspirina posljedica smanjenja aktivnosti tog enzima, ključne molekule biosintetskog puta prostaglandina. Sa priličnom sigurnošću možemo zaključiti da to nije međutim način kojim aspirin inhibira ekspresiju *LGALS3*. No činjenica da je puno veća koncentracija aspirina potrebna za utišavanje upale nego za inhibiciju ciklooksigenaze navela je znanstvenike na istraživanja kojima je utvrđeno da aspirin može modulirati ekspresiju gena i proteina, kao i aktivnost proteina utječući na signalne puteve protein kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK) i/ili na transkripcijske faktore NF-κB, AP-1 i STAT1. Stoga je logično za pretpostaviti da je inhibicija, izravna ili posredna, transkripcijskih faktora NF-κB i/ili AP-1, čija vezna mjesta nalazimo i u

promotorskoj regiji *LGALS3*, odgovorna za smanjenje transkripcije tog gena, a samim time i količine mRNA.
Kao i aspirin, i indometacin ubrajamo u skupinu nesteroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem. Osim njegovog učinka na aktivnost cikooksigenaze, ostala su njegova djelovanja slabo istražena. Utvrđeno je, međutim, da indometacin veže i aktivira PPARγ, nuklearni hormonski receptor koji nakon vezanja hormona djeluje kao transkripcijski faktor. No vezna mjesta za PPARγ ne nalaze se u promotorskoj regiji *LGALS3* (a osim toga, indometacin ne aktivira, već inhibira ekspresiju *LGALS3*). Premda su rezultati nekih istraživanja naveli na zaključak da indometacin ne može inhibirati aktivnost niti transkripcijskog faktora NF-κB niti AP-1, prema drugim istraživanjima utvrđeno je da je takva inhibicija ipak moguća, i to inhibicija NF-κB procesom transrepresije. Stoga možemo zaključiti da je i opaženo smanjenje količine mRNA za galektin-3 posljedica inhibicije NF-κB. Uzimajući u obzir činjenicu da do danas nije pokazano da indometacin može inhibirati transkripcijski faktor AP-1 (što još uvijek ne znači da to nije moguće!) te činjenicu da je inhibitorni učinak terapeutskih koncentracija indometacina sličan, ako ne čak i snažniji od aspirina, može se pretpostaviti da je bazalna razina ekspresije *LGALS3* u monocitnim stanicama regulirana u većoj mjeri transkripcijskim faktorom NF-κB nego AP-1.

Jedan od načina djelovanja steroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem – glukokortikoida (GC), posredovan je njihovim vezanjem na receptore (GR), nakon čega oni djeluju kao transkripcijski faktori. Ukoliko se u promotorskim regijama gena nalaze vezna mjesta za te transkripcijske faktore, posljedično će doći do povećanja ekspresije tih gena. Ako se međutim u promotorskoj regiji nalaze negativni elementi odgovora na GC (nGRE), može doći do utišavanja genske ekspresije. Kako analiza promotorskog dijela gena za galektin-3 nije potvrdila postojanje takvih nGRE, zaključujemo da je inhibicija *LGALS3* ostvarena na drugi način. Literaturni podaci pokazuju da glukokortikoidi (hidrokortizon i deksametazon) mogu inhibirati transkripcijske faktore NF-κB, AP-1, CREB, C/EBPβ, STAT i p53 različitim načinima, kao što su transrepresija, inihicija razgradnje IκB, izravno vezanje na transkripcijske faktore, kompeticija za iste kofaktore i još neki dodatni mehanizmi. Stoga se čini da su ponovno transkripcijski faktori NF-κB i AP-1 odgovorni za smanjenje ekspresije *LGALS3* uočeno u monocitnim stanicama izloženim glukokortikoidima, ali tek podrobnija istraživanja dala bi detaljniji uvid u mehanizme kojima se ta inhibicija ostvaruje. Valja osim toga uzeti u obzir da smanjenje količine mRNA može biti uzrokovano ne samo smanjenom transkripcijom dotičnog gena, već i povećanim stupnjem razgradnje te mRNA.

Kako to da postoji korelacija između intenziteta inhibicije *LGALS3* i primijenjene koncentracije aspirina, ali ne i indometacina, hidrokortizona i deksametazona? Jedno od mogućih objašnjenja je da je u slučaju primjene nižih koncentracija aspirina broj molekula aspirina još uvijek puno manji od broja njegovih receptora. To znači da primjenom većih koncentracija aspirina dolazi do sve većeg zasićenja receptora, te posljedično do pojačavanja učinka te tvari. Čini se međutim da kada se indometacin,

hidrokortizon i deksametazon koriste već i u najnižim koncentracijama dolazi do zasićenja njihovih receptora, te se povećanjem koncentracija tih tvari ne pojačava njihov učinak.

Kako se smanjenje količine mRNA za galektin-3 uzrokovano izlaganjem monocitnih stanica THP-1 tvarima s imunomodulatornim djelovanjem odražava na ekspresiju samog proteina?

Niti jedna od ispitivanih tvari s imunomodulatornim djelovanje niti u jednoj od primijenjenih koncentracija nije uzrokovala promjenu količine galektina-3 tijekom prvih pet sati kultiviranja.
Istovremeno, osim u slučaju najniže primijenjene koncentracije aspirina (0,1 mM), količina mRNA za galektin-3 smanjena je nakon 1, 3 te 5 sati kultiviranja uz sve ispitivane tvari svih koncentracija za 30% do čak 70%. To se može objasniti vremenskim odmakom procesa transkripcije i translacije. Nakon jednodnevnog kultiviranja još uvijek se ne uočava pad količine galektina-3 (osim uz 2 mM aspirin), premda je u gotovo svim slučajevima postotak inhibicije ekspresije *LGALS3* oko 70%. To je možda posljedica povećanja razine translacije i/ili očuvanja postojećih količina galektina-3, odnosno smanjenja stupnja njegove razgradnje. No nakon 48- i 72-satnog kultiviranja za očekivati je da se već dugotrajno i snažno smanjenje ekspresije *LGALS3* mora odraziti na razinu ekspresije tog proteina. Ona je u većini slučajeva zaista i smanjena, ali u puno manjoj mjeri nego ekspresija samog *LGALS3*. Intenzitet smanjenja razine ekspresije galektina-3 u korelaciji je s vremenom izloženosti ispitivanim tvarima te s primijenjenom koncentracijom aspirina, hidrokortizona i deksametazona, dočim je u slučaju indometacina u negativnoj korelaciji s primijenjenom koncentracijom te tvari. Osim toga, to smanjenje nije u korelaciji s razinom smanjenja količine mRNA, s obzirom na to da je u pojedinim slučajevima jači pad razine galektina-3 primjećen u stanicama koje imaju više mRNA za galektin-3. Održanje relativno velike količine galektina-3 u odnosu na količinu pripadajuće mu mRNA teško je objasniti očuvanošću samog proteina (odnosno njegovom ne-razgradnjom) obzirom da je nakon 48-satnog (a posebice 72-satnog) kultiviranja gustoća stanične kulture više nego dvostruko veća. Izlučuju li možda stanice THP-1 znatne količine galektina-3 u izvanstanični prostor, koji tek naknadno mogu vezati na sebe, primjerice ukoliko se pod utjecajem tvari s imunomodulatornim djelovanjem poveća ekspresija i/ili afinitet njegovih membranskih liganada? Moguće, s obzirom na to da je nedavno ustanovljeno da fetuin, serumski glikoprotein kojeg u obilju ima u fetalnom serumu - jednoj od osnovnih komponenti hranidbenog medija, uzrokuje brzu (unutar 1 minute) sekreciju unutarstaničnog galektina-3.
To je jedno od razumnih objašnjenja ovih zanimljivih i možda neobičnih rezultata. Sve u svemu, očigledno je da je ekspresija galektina-3 u monocitnim stanicama THP-1 izloženim djelovanju aspirina, indometacina, hidrokortizona i deksametazona regulirana ne samo na razini transkripcije, već i translacije, a možda i nekim drugim mehanizmima. Čini se da je monocitnim stanicama galektin-3 toliko potreban da pronalaze učinkovite

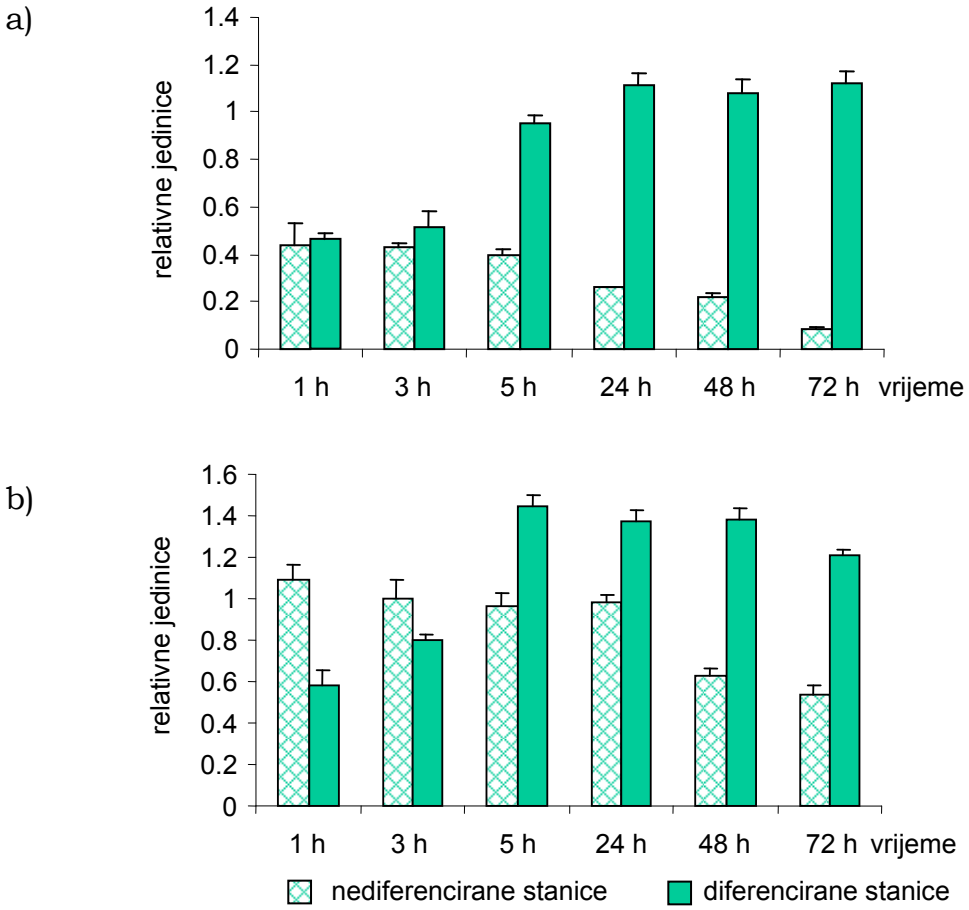
načine održanja njegove proteinske razine bez obzira na drastično smanjenje pripadajuće mu mRNA.

Kako tvari s imunomodulatornim djelovanjem utječu na ekspresiju *LGALS3* i galektina –3 u diferenciranim, odnosno makrofagnim stanicama THP-1?

Dok se u monocitnim stanicama opći obrazac promjene količine mRNA za galektin-3 može opisati kao snažna, vremenski ovisna inhibicija transkripcije gena za galektin-3, u makrofagnima je situacija drukčija. Može se uočiti da sve ispitivane tvari u početku inhibiraju ekspresiju *LGALS3* nakon čega dolazi do uspostave konstitutivne razine mRNA. U slučaju aspirina i hidrokortizona intenzitet je te inhibicije u korelaciji s koncentracijom primijenjene tvari, što kod indometacina i deksametazona nije zamijećeno.

No kako to da kultiviranje uz određenu tvar neke koncentracije ima tako različit učinak na stanice iste loze?

To nije toliko čudno ni neobično. Premda je zapravo riječ o istim stanicama (THP-1), očito je da su zbog djelovanja PMA promijenile mnoge svoje karakteristike. Jedna od njih je i razina ekspresije gena – podsjetimo se da je ekspresija *LGALS3* tri puta veća u diferenciranim nego u nediferenciranim stanicama. To je povećanje vjerojatno rezultat aktivacije transkripcijskih faktora AP-1 i/ili NF-κB. Na tako aktivirane transkripcijske faktore tvari s imunomodulatornim djelovanjem u određenoj koncentraciji imaju očito puno slabiji učinak. To je vrlo jednostavno objašnjenje razlike u stupnju inhibicije ekspresije *LGALS3*. Zanimljivo je osim toga, što postotak inhibicije u nediferenciranim stanicama vremenom raste, a u diferenciranima se vrlo brzo uspostavlja konstitutivna razina ekspresije *LGALS3*. Primjer različitog učinka jednake koncentracije određene tvari tijekom istog vremena na monocitne i makrofagne stanice prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju a) *LGALS3* i b) galektina-3 u nediferenciranim i diferenciranim stanicama THP-1. Nediferencirane i diferencirane stanice THP-1 kultivirane su tijekom 1, 3, 5, 24, 48 ili 72 sata uz hidrokortizon koncentracije 1 μM. a) relativne količine mRNA za galektin-3 (normirane prema β-aktinu) i b) relativne količine galektina-3 (normirane prema β-aktinu) izražene su u odnosu na kontrolu (nediferencirane ili diferencirane stanice kultivirane tijekom istih vremena u mediju)($\bar{x}$±SD).Rebrasti stupci – nediferencirane stanice, zeleni stupci –diferencirane stanice.

Što se istovremeno događa s galektinom-3?

Kultiviranjem makrofagnih stanica THP-1 uz indometacin i deksametazon količina galektina-3 u početku se održava na jednakoj razini, a zatim postupno povećava, sve to 72 sata kada u odnosu na 48 sat blago padne, i to u slučaju indometacina približno na početnu razinu, a u slučaju deksametazona, na razinu koja je još uvijek značajno veća od početne.
Aspirin i hidrokortizon ovisno o primijenjenim koncentracijama, uzrokuju pad količine galektina-3. Nakon pada dolazi do povećanja količine galektina-3 tijekom vremena, čime se ponovno uspostavlja konstitutivna razina ekspresije, koja se potom čak i premašuje. Ako se ti podaci usporede s podacima o razini ekspresije mRNA za galektin-3 u istim stanicama, dolazi se do zaključka da veće koncentracije primjenjivanih tvari uzrokuju jače smanjenje količine mRNA. Ukoliko je ostvaren dovoljan postotak inhibicije

ekspresije *LGALS3*, to se očituje i na proteinskoj razini. Čini se da je u tom razdoblju količina galektina-3 regulirana većinom na razini transkripcije. Prisjetimo se da to nije bio slučaj u monocitnim stanicama, kao i da se u njima puno veći postotak inhibicije ekspresije *LGALS3* nije odražavao na proteinskoj razini. Međutim, uspostavu konstitutivne razine ekspresije *LGALS3* prati daljnje povećanje količine galektina-3. Povećava li se u tom periodu intenzitet translacije postojećih mRNA? Smanjuje li se razgradnja postojećih proteina uz kontinuiranu sintezu novih? Vežu li se veće količine izlučenog galektina-3 na membranu? To su pitanja na koja tek treba naći odgovor. Slični odnosi količine mRNA i proteina primijećeni su i u nekim drugim istraživanjima, primjerice, Andersson i Sundler [179] su pokazali da stanice THP-1 eksprimiraju mRNA za faktor nekroze tumora, ali jedva detektabilnu količinu samog proteina. Nakon stimulacije stanica s PMA, povećava se razina proteina, ali ne i mRNA. Nekoliko je studija pokazalo lošu korelaciju između razine mRNA i stvarne razine ekspresije gena, odnosno količine samog proteina. Primjerice, Lorenz i sur. [180] su utvrdili da od 58 proteina čija je promjena ekspresije utvrđena u pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa u odnosu na oboljele od osteoartritisa samo kod njih 16 (28%) te su promjene u skladu s promjenama na razini transkripcije. Shipp i sur. [181] su detektirali visoku razinu ekspresije mRNA za galektin-3 u difuznim limfomima velikih limfocita T u odnosu na folikularne limfome, ali ona nije korelirala s razinom ekspresije proteina.

Osvrnimo se još na trenutak na rezultate imunoblot analize staničnih homogenata diferenciranih stanica THP-1 izloženih djelovanju hidrokortizona i deksametazona. Uočava se prisutnost dodatnih vrpci neposredno ispod vrpce galektina-3. Obzirom da na istom blotu te vrpce ne postoje ispod vrpce kontrolnih uzoraka, zaključujemo da to nije posljedica sekundarnog obojenja, a vjerojatno niti nespecifičnog vezanja. Odgovaraju li te vrpce možda fosforiliranom galektinu-3? Naime, zna se da galektin-3 može biti fosforiliran na položaju Ser^{6} i Ser^{12}, a nedavna istraživanja su pokazala da galektin-3 možda može biti fosforiliran i na nekom od tirozina. Fosforilacijom se mijenja izoelektrična točka galektina-3 (pI nefosforiliranog oblika iznosi 8,7, a fosforiliranog 8,2), što vjerojatno može promijeniti i njegovu pokretljivost tijekom SDS-PAG elektroforeze. Fosforilirani galektin-3 pokazuje smanjenu lektinsku aktivnost, ali je fosforilacija nužan preduvjet za antiapoptozno djelovanje galektina-3. Da li je povećana metabolička aktivnost diferenciranih stanica izloženih djelovanju hidrokortizona i deksametazona rezultat fosforilacije i antiapoptoznog djelovanja galektina-3? Na to, kao i na mnoga druga pitanja o funkciji galektina-3 tek treba pronaći odgovor.

ZAKLJUČCI

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

1. Aspirin u koncentracijama ≤ 2 mM, indometacin u koncentracijama ≤10 μM, hidrokortizon u koncentracijama ≤ 10 μM, deksametazon u koncentracijama ≤ 100 nM, kao ni DMSO koncentracije 0,2%, ne djeluju citotoksično niti na nediferencirane niti na diferencirane stanice THP-1.
2. Kultiviranjem nediferenciranih stanica tijekom 72 sata u standardnim uvjetima razina ekspresije *LGALS3* kao ni galektina-3 se ne mijenja.
3. DMSO koncentracije 0,2% ne utječe na ekspresije *LGALS3* i galektina-3 niti u nediferenciranim niti u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja.
4. Diferencijacija stanica THP-1 iz monocitnih u makrofagne stanice potiče ekspresiju *LGALS3* i galektina-3.
5. Razina ekspresije *LGALS3* i galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1 ovisi o diferencijacijskom stupnju stanica.
6. Nakon diferencijacije stanica THP-1 iz monocitnih u makrofagne, daljnje kultiviranje stanica u standardnim uvjetima tijekom 72 sata ne mijenja uspostavljenu razinu ekspresije *LGALS3* i galektina-3.
7. Tvari s imunomodulatornim djelovanjem (aspirin, indometacin, hidrokortizon i deksametazon) mijenjaju ekspresiju *LGALS3* i galektina-3 u stanicama stanične linije THP-1, a promjene ovise o vrsti i koncentraciji primijenjene tvari, vremenu izloženosti stanica istima te diferencijacijskom stupnju stanica.
8. Učinak svake pojedine tvari s imunomodulatornim djelovanjem u pojedinoj koncentraciji na razinu galektina-3 u kvalitativnom se i kvantitativnom smislu razlikuje u odnosu na njezin učinak na razinu mRNA za galektin-3 u stanicama monocitne kao i u stanicama makrofagne stanične linije THP-1:
   - sve tvari u primijenjenim koncentracijama u monocitnim stanicama THP-1 inhibiraju ekspresiju *LGALS3* i galektina-3. Stupanj inhibicije na razini mRNA ovisi o koncentraciji imunomodulatornih tvari i u korelaciji je s vremenom izloženosti stanica njihovom djelovanju. Inhibitorni je učinak na proteinskoj razini u odnosu na inhibitorni učinak na razini mRNA vremenski odgođen.
   - u diferenciranim stanicama aspirin, indometacin, hidrokortizon i deksametazon u početku djeluju inhibitorno na ekspresiju *LGALS3* nakon čega dolazi do uspostave konstitutivne razine mRNA.
   - učinak slabih imunomodulatornih tvari - aspirina i hidrokortizona na razinu galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1 razlikuje se od učinka jakih imunomodulatornih tvari – indometacina i deksametazona; iako dugotrajnijim izlaganjem objema vrstama tvari razina galektina-3 raste, slabe imunomodulatorne tvari u početku na razinu galektina-3 djeluju inhibitorno.

LITERATURA

1. Fred Brewer, C., *Binding and cross-linking properties of galectins.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): 255-62.
2. Cooper, D.N., *Galectinomics: finding themes in complexity.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): 209-31.
3. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.* Cell, 1994. **76**(4): 597-8.
4. Hsu, D.K. and F.T. Liu, *Regulation of cellular homeostasis by galectins.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): 507-15.
5. Roff, C.F. and J.L. Wang, *Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts.* J Biol Chem, 1983. **258**(17): 10657-63.
6. Ho, M.K. and T.A. Springer, *Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies.* J Immunol, 1982. **128**(3): 1221-8.
7. Cerra, R.F., M.A. Gitt, and S.H. Barondes, *Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins.* J Biol Chem, 1985. **260**(19): 10474-7.
8. Raz, A., et al., *Cloning and expression of cDNA for two endogenous UV-2237 fibrosarcoma lectin genes.* Exp Cell Res, 1987. **173**(1): 109-16.
9. Woo, H.J., et al., *The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2).* J Biol Chem, 1990. **265**(13): 7097-9.
10. Liu, F.T. and N. Orida, *Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in Xenopus oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells.* J Biol Chem, 1984. **259**(17): 10649-52.
11. Gong, H.C., et al., *The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells.* Cancer Res, 1999. **59**(24): 6239-45.
12. Huflejt, M.E., et al., *L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I.* J Biol Chem, 1993. **268**(35): 26712-8.
13. Tsay, Y.G., et al., *Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts.* Exp Cell Res, 1999. **252**(2): 250-61.
14. Yoshii, T., et al., *Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest.* J Biol Chem, 2002. **277**(9): 6852-7.
15. Takenaka, Y., et al., *Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): 4395-406.
16. Hadari, Y.R., et al., *Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis.* J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 13)**: 2385-97.
17. Mazurek, N., et al., *Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): 36311-5.
18. Openo, K.P., et al., *Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts.* Exp Cell Res, 2000. **255**(2): 278-90.
19. Herrmann, J., et al., *Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase.* J Biol Chem, 1993. **268**(35): 26704-11.
20. Ahmad, N., et al., *Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes.* J Biol Chem, 2004. **279**(12): 10841-7.
21. Rini, J.M. and Y.D. Lobsanov, *New animal lectin structures.* Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): 578-84.

22. Hughes, R.C., *Galectins as modulators of cell adhesion.* Biochimie, 2001. **83**(7): 667-76.
23. Yang, R.Y., et al., *Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3.* Biochemistry, 1998. **37**(12): 4086-92.
24. Kuklinski, S. and R. Probstmeier, *Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain.* J Neurochem, 1998. **70**(2): 814-23.
25. Kadrofske, M.M., K.P. Openo, and J.L. Wang, *The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter.* Arch Biochem Biophys, 1998. **349**(1): 7-20.
26. Cherayil, B.J., S.J. Weiner, and S. Pillai, *The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE.* J Exp Med, 1989. **170**(6): 1959-72.
27. Raz, A., G. Pazerini, and P. Carmi, *Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein.* Cancer Res, 1989. **49**(13): 3489-93.
28. Gorski, J.P., et al., *New alternatively spliced form of galectin-3, a member of the beta-galactoside-binding animal lectin family, contains a predicted transmembrane-spanning domain and a leucine zipper motif.* J Biol Chem, 2002. **277**(21): 18840-8.
29. Guittaut, M., et al., *Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3.* J Biol Chem, 2001. **276**(4): 2652-7.
30. Dumic, J., G. Lauc, and M. Flogel, *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB.* Cell Physiol Biochem, 2000. **10**(3): 149-58.
31. Liu, L., et al., *Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling.* Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): 31-41.
32. Kim, K., E.P. Mayer, and M. Nachtigal, *Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1641**(1): 13-23.
33. Rabinovich, G.A., N. Rubinstein, and M.A. Toscano, *Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): 274-84.
34. Davidson, P.J., et al., *Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm.* Glycobiology, 2002. **12**(5): 329-37.
35. Wang, J.L., et al., *Nucleocytoplasmic lectins.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1673**(1-2): 75-93.
36. Paron, I., et al., *Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): 545-53.
37. Yu, F., et al., *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**(18): 15819-27.
38. Garin, J., et al., *The phagosome proteome: insight into phagosome functions.* J Cell Biol, 2001. **152**(1): 165-80.
39. Thery, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.* J Immunol, 2001. **166**(12): 7309-18.
40. Sato, S. and R.C. Hughes, *Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines.* Eur J Immunol, 1994. **24**(1): 216-21.
41. Sato, S., I. Burdett, and R.C. Hughes, *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**(1): 8-18.

42. Lindstedt, R., et al., *Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway.* J Biol Chem, 1993. **268**(16): 11750-7.
43. Hughes, R.C., *Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): 172-85.
44. Craig, S.S., et al., *Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils.* Anat Rec, 1995. **242**(2): 211-9.
45. Ochieng, J., V. Furtak, and P. Lukyanov, *Extracellular functions of galectin-3.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): 527-35.
46. Sorme, P., et al., *Low micromolar inhibitors of galectin-3 based on 3'-derivatization of N-acetyllactosamine.* Chembiochem, 2002. **3**(2-3): 183-9.
47. Barboni, E.A., S. Bawumia, and R.C. Hughes, *Kinetic measurements of binding of galectin 3 to a laminin substratum.* Glycoconj J, 1999. **16**(7): 365-73.
48. Rabinovich, G.A., et al., *Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): 313-20.
49. Dumic, J., et al., *Transfer to in vitro conditions influences expression and intracellular distribution of galectin-3 in murine peritoneal macrophages.* Z Naturforsch [C], 2000. **55**(3-4): 261-6.
50. Dumic, J., et al., *Galectin-3 decreases in mice exposed to immobilization stress.* Stress, 2000. **3**(3): 241-6.
51. Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): 263-73.
52. Akahani, S., et al., *Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family.* Cancer Res, 1997. **57**(23): 5272-6.
53. Park, J.W., et al., *Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(17): 3595-602.
54. Seve, A.P., et al., *Evidence for a lactose-mediated association between two nuclear carbohydrate-binding proteins.* Glycobiology, 1993. **3**(1): 23-30.
55. Menon, R.P., M. Strom, and R.C. Hughes, *Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate-independent manner.* FEBS Lett, 2000. **470**(3): 227-31.
56. Goletz, S., F.G. Hanisch, and U. Karsten, *Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 14)**: 1585-96.
57. Ochieng, J. and P. Warfield, *Galectin-3 binding potentials of mouse tumor EHS and human placental laminins.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(2): 402-6.
58. Wang, J.L., et al., *Nuclear and cytoplasmic localization of a lectin-ribonucleoprotein complex.* Biochem Soc Trans, 1992. **20**(2): 269-74.
59. Ochieng, J., M.L. Leite-Browning, and P. Warfield, *Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): 788-91.
60. Matarrese, P., et al., *Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties.* Int J Cancer, 2000. **85**(4): 545-54.
61. Sato, S. and R.C. Hughes, *Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin.* J Biol Chem, 1992. **267**(10): 6983-90.
62. Hikita, C., et al., *Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3.* J Cell Biol, 2000. **151**(6): 1235-46.

63. Ochieng, J., et al., *Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin.* J Cell Biochem, 1999. **75**(3): 505-14.
64. Sasaki, T., et al., *Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin.* Embo J, 1998. **17**(6): 1606-13.
65. Inohara, H., et al., *Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion.* Cancer Res, 1996. **56**(19): 4530-4.
66. Crider-Pirkle, S., et al., *Cubilin, a binding partner for galectin-3 in the murine utero-placental complex.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): 15904-12.
67. Gonen, T., et al., *MP20, the second most abundant lens membrane protein and member of the tetraspanin superfamily, joins the list of ligands of galectin-3.* BMC Cell Biol, 2001. **2**(1): 17.
68. Bresalier, R.S., et al., *Colon cancer mucin: a new ligand for the beta-galactoside-binding protein galectin-3.* Cancer Res, 1996. **56**(19): 4354-7.
69. Ohannesian, D.W., et al., *Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells.* Cancer Res, 1995. **55**(10): 2191-9.
70. Zhu, W.Q. and J. Ochieng, *Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin.* Cancer Res, 2001. **61**(5): 1869-73.
71. Pricci, F., et al., *Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products.* Kidney Int Suppl, 2000. **77**: S31-9.
72. Andre, S., et al., *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**(8-9): 461-74.
73. Springer, T., et al., *Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody.* Eur J Immunol, 1979. **9**(4): 301-6.
74. Dong, S. and R.C. Hughes, *Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen).* Glycoconj J, 1997. **14**(2): 267-74.
75. Feuk-Lagerstedt, E., et al., *Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils.* J Immunol, 1999. **163**(10): 5592-8.
76. Dong, S. and R.C. Hughes, *Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca2+ in human Jurkat T-cells.* FEBS Lett, 1996. **395**(2-3): 165-9.
77. Joo, H.G., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): 555-64.
78. Cortegano, I., et al., *Interaction between galectin-3 and FcgammaRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence IL-5REIII.* Glycobiology, 2000. **10**(3): 237-42.
79. Yamaoka, A., et al., *A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils.* J Immunol, 1995. **154**(7): 3479-87.
80. Probstmeier, R., D. Montag, and M. Schachner, *Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules.* J Neurochem, 1995. **64**(6): 2465-72.
81. Zuberi, R.I., L.G. Frigeri, and F.T. Liu, *Activation of rat basophilic leukemia cells by epsilon BP, an IgE-binding endogenous lectin.* Cell Immunol, 1994. **156**(1): 1-12.
82. Frigeri, L.G., R.I. Zuberi, and F.T. Liu, *Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells.* Biochemistry, 1993. **32**(30): 7644-9.

83. Sarafian, V., et al., *Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells.* Int J Cancer, 1998. **75**(1): 105-11.
84. Gupta, S.K., et al., *Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins.* Infect Immun, 1997. **65**(7): 2747-53.
85. Almkvist, J. and A. Karlsson, *Galectins as inflammatory mediators.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): 575-81.
86. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.* J Immunol, 1996. **156**(10): 3939-44.
87. Sato, S., et al., *Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia.* J Immunol, 2002. **168**(4): 1813-22.
88. Sano, H., et al., *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages.* J Immunol, 2000. **165**(4): 2156-64.
89. Liu, F.T., et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages.* Am J Pathol, 1995. **147**(4): 1016-28.
90. Karlsson, A., et al., *Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils.* Blood, 1998. **91**(9): 3430-8.
91. Jeng, K.C., L.G. Frigeri, and F.T. Liu, *An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes.* Immunol Lett, 1994. **42**(3): 113-6.
92. Cortegano, I., et al., *Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types.* J Immunol, 1998. **161**(1): 385-9.
93. Nangia-Makker, P., et al., *Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis.* Am J Pathol, 2000. **156**(3): 899-909.
94. Sato, S. and J. Nieminen, *Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): 583-91.
95. Demetriou, M., et al., *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation.* Nature, 2001. **409**(6821): 733-9.
96. Krugluger, W., et al., *Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription.* Immunobiology, 1997. **197**(1): 97-109.
97. Dennis, J.W., et al., *UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1573**(3): 414-22.
98. Ohshima, S., et al., *Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): 2788-95.
99. Harjacek, M., et al., *Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis.* J Rheumatol, 2001. **28**(8): 1914-22.
100. Lim, Y., et al., *Identification of autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(1): 119-24.
101. Jensen-Jarolim, E., et al., *Anti-Galectin-3 IgG autoantibodies in patients with Crohn's disease characterized by means of phage display peptide libraries.* J Clin Immunol, 2001. **21**(5): 348-56.
102. Takenaka, Y., T. Fukumori, and A. Raz, *Galectin-3 and metastasis.* Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): 543-9.
103. Warfield, P.R., et al., *Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3.* Invasion Metastasis, 1997. **17**(2): 101-12.
104. Furtak, V., F. Hatcher, and J. Ochieng, *Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(4): 845-50.

105. Kim, H.R., et al., *Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells.* Cancer Res, 1999. **59**(16): 4148-54.
106. Glinsky, V.V., et al., *Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells.* Cancer Res, 2000. **60**(10): 2584-8.
107. Inohara, H. and A. Raz, *Identification of human melanoma cellular and secreted ligands for galectin-3.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(3): 1366-75.
108. Gillenwater, A., et al., *Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma.* Head Neck, 1996. **18**(5): 422-32.
109. Lotan, R., et al., *Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas.* Int J Cancer, 1994. **56**(4): 474-80.
110. Konstantinov, K.N., B.A. Robbins, and F.T. Liu, *Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, is a marker of anaplastic large-cell lymphoma.* Am J Pathol, 1996. **148**(1): 25-30.
111. Bresalier, R.S., et al., *Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system.* Cancer, 1997. **80**(4): 776-87.
112. Xu, X.C., A.K. el-Naggar, and R. Lotan, *Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications.* Am J Pathol, 1995. **147**(3): 815-22.
113. Schoeppner, H.L., et al., *Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon.* Cancer, 1995. **75**(12): 2818-26.
114. Iurisci, I., et al., *Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): 1389-93.
115. Castronovo, V., et al., *Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer.* J Pathol, 1996. **179**(1): 43-8.
116. Pacis, R.A., et al., *Decreased galectin-3 expression in prostate cancer.* Prostate, 2000. **44**(2): 118-23.
117. Lee, E.C., et al., *Carbohydrate-binding protein 35 is the major cell-surface laminin-binding protein in colon carcinoma.* Arch Surg, 1991. **126**(12): 1498-502.
118. Lotz, M.M., et al., *Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): 3466-70.
119. Saklatvala, J., J. Dean, and A. Clark, *Control of the expression of inflammatory response genes.* Biochem Soc Symp, 2003(70): 95-106.
120. Tibbles, L.A. and J.R. Woodgett, *The stress-activated protein kinase pathways.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(10): 1230-54.
121. Kracht, M. and J. Saklatvala, *Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation.* Cytokine, 2002. **20**(3): 91-106.
122. Dean, J.L., et al., *The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation.* Cell Signal, 2004. **16**(10): 1113-21.
123. Clark, A.R., J.L. Dean, and J. Saklatvala, *Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38.* FEBS Lett, 2003. **546**(1): 37-44.
124. Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh, *Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades.* Gene, 2003. **320**: 3-21.

125. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature, 2001. **410**(6824): 37-40.
126. Hood, J.K. and P.A. Silver, *In or out? Regulating nuclear transport.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): 241-7.
127. Gianni, M., et al., *Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation.* Embo J, 2002. **21**(14): 3760-9.
128. Shen, T., K.B. Horwitz, and C.A. Lange, *Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): 6122-31.
129. Stefanovsky, V.Y., et al., *An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF.* Mol Cell, 2001. **8**(5): 1063-73.
130. Li, Q.J., et al., *MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300.* Embo J, 2003. **22**(2): 281-91.
131. Zhao, J., et al., *ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth.* Mol Cell, 2003. **11**(2): 405-13.
132. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: 621-63.
133. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression.* Endocr Rev, 2003. **24**(4): 488-522.
134. Wisdom, R., *AP-1: one switch for many signals.* Exp Cell Res, 1999. **253**(1): 180-5.
135. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): 240-6.
136. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 1995. **270**(28): 16483-6.
137. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.* Cell, 2000. **103**(2): 239-52.
138. Bannister, A.J., et al., *Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro.* Oncogene, 1995. **11**(12): 2509-14.
139. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death.* Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): E131-6.
140. Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang, *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development.* Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(1): 17-26.
141. Rothwarf, D.M. and M. Karin, *The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus.* Sci STKE, 1999. **1999**(5): RE1.
142. Ruland, J. and T.W. Mak, *Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB.* Immunol Rev, 2003. **193**: 93-100.
143. Hinz, B. and K. Brune, *Cyclooxygenase-2--10 years later.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(2): 367-75.
144. Barrios-Rodiles, M., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit cyclooxygenase-2 enzyme activity but not mRNA expression in human macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(3): 896-900.
145. Hull, M.A., S.H. Gardner, and G. Hawcroft, *Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer.* Cancer Treat Rev, 2003. **29**(4): 309-20.

146. Kim, T.I., et al., *The role of mitogen-activated protein kinases and their relationship with NF-kappaB and PPARgamma in indomethacin-Induced apoptosis of colon cancer cells.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: 241-5.
147. Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors.* Faseb J, 2001. **15**(12): 2057-72.
148. van der Ouderaa, F.J., M. Buytenhek, and D.A. van Dorp, *Characterization of prostaglandin H2 synthetase.* Adv Prostaglandin Thromboxane Res, 1980. **6**: 139-44.
149. DeWitt, D.L., et al., *The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases.* J Biol Chem, 1990. **265**(9): 5192-8.
150. Dong, Z., et al., *Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin.* J Biol Chem, 1997. **272**(15): 9962-70.
151. Chen, L.C., et al., *Salicylate-enhanced activation of transcription factors induced by interferon-gamma.* Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: 503-7.
152. Pillinger, M.H., et al., *Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): 14540-5.
153. Lehmann, J.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs.* J Biol Chem, 1997. **272**(6): 3406-10.
154. Shimada, T., et al., *PPARgamma mediates NSAIDs-induced upregulation of TFF2 expression in gastric epithelial cells.* FEBS Lett, 2004. **558**(1-3): 33-8.
155. Adcock, I.M. and G. Caramori, *Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids.* Immunol Cell Biol, 2001. **79**(4): 376-84.
156. Saklatvala, J., *Glucocorticoids: do we know how they work?* Arthritis Res, 2002. **4**(3): 146-50.
157. Belgi, G. and P.S. Friedmann, *Traditional therapies: glucocorticoids, azathioprine, methotrexate, hydroxyurea.* Clin Exp Dermatol, 2002. **27**(7): 546-54.
158. Adcock, I.M., *Glucocorticoid-regulated transcription factors.* Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(3): 211-9.
159. Lewis, A.J. and A.M. Manning, *New targets for anti-inflammatory drugs.* Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**(4): 489-94.
160. Almawi, W.Y. and O.K. Melemedjian, *Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor.* J Leukoc Biol, 2002. **71**(1): 9-15.
161. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis.* Science, 1995. **270**(5234): 286-90.
162. Newton, R., et al., *Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells.* Eur J Biochem, 1998. **254**(1): 81-9.
163. Hart, L., et al., *Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor kappaB in asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): 224-31.
164. Nissen, R.M. and K.R. Yamamoto, *The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain.* Genes Dev, 2000. **14**(18): 2314-29.
165. Bailey, S., et al., *The role of AP-1 in glucocorticoid resistance in leukaemia.* Leukemia, 2001. **15**(3): 391-7.
166. Pearce, D., et al., *Glucocorticoid receptor transcriptional activity determined by spacing of receptor and nonreceptor DNA sites.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): 30081-5.

167. Herrlich, P., *Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1.* Oncogene, 2001. **20**(19): 2465-75.
168. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(8): 1222-34.
169. Ayroldi, E., et al., *Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB.* Blood, 2001. **98**(3): 743-53.
170. Franklin, C.C. and A.S. Kraft, *Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(27): 16917-23.
171. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): 76-85.
172. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(259): 680-5.
173. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): 4350-4.
174. Collins, S.J., R.C. Gallo, and R.E. Gallagher, *Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.* Nature, 1977. **270**(5635): 347-9.
175. Macfarlane, D.E., D. Gailani, and K. Vann, *A phorbol ester tolerant (PET) variant of HL-60 promyelocytes.* Br J Haematol, 1988. **68**(3): 291-302.
176. Morley, S.J., *Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells.* FEBS Lett, 1997. **418**(3): 327-32.
177. Miyamoto, S., S.R. Kimball, and B. Safer, *Signal transduction pathways that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1494**(1-2): 28-42.
178. Sano, H., et al., *Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages.* J Clin Invest, 2003. **112**(3): 389-97.
179. Andersson, K. and R. Sundler, *Signalling to translational activation of tumour necrosis factor-alpha expression in human THP-1 cells.* Cytokine, 2000. **12**(12): 1784-7.
180. Lorenz, P., et al., *From transcriptome to proteome: differentially expressed proteins identified in synovial tissue of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an initial screen with a panel of 791 antibodies.* Proteomics, 2003. **3**(6): 991-1002.
181. Shipp, M.A., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning.* Nat Med, 2002. **8**(1): 68-74.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AP-1	protein aktivator 1 *engl.* activator protein 1
ASA	aspirin, acetil-salicilna kiselina *engl.* aspirin, acetyl-salicylic acid
BCA	bicinkoninična kiselina *engl.* bicinchoninic acid
bp	bazni par
BSA	goveđi serumski albumin *engl.* bovine serum albumin
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat
C/EBPβ	*engl.* CCAAT-enhancer-binding protein β
COX-1	ciklooksigenaza 1 *engl.* cyclooxygenase 1
COX-2	ciklooksigenaza 2 *engl.* cyclooxygenase 2
CRD	domena koja prepoznaje ugljikohidrate *engl.* carbohydrate recognition domain
CRE	elementi odgovora na cAMP *engl.* cAMP responsive elements
CREB	protein koji se veže na element odgovora na cAMP *engl.* cAMP-response element binding factor
Da	Dalton ($gmol^{-1}$)
dATP	deoksiadenozin-trifosfat *engl.* deoxyadenosine-triphosphate
dCTP	deoksicitidin-trifosfat *engl.* deoxycytidine-triphosphate
DEPC	dietil-pirokarbonat *engl.* diethyl-pirocarbonate
Dex	deksametazon *engl.* dexamethasone
dGTP	deoksigvanozin-trifosfat *engl.* deoxyguanosine-triphosphate
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina *engl.* deoxyribonucleic acid
dNTP	deoksinukleozid-trifosfat *engl.* deoxynucleoside-triphosphate
dTTP	deoksitimidin-trifosfat *engl.* deoxythymidine-triphosphate
EDTA	etilen-diamin-tetraoctena kiselina *engl.* ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplazmatski retikulum
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima *engl.* extracellular-signal-regulated kinase
6-FAM	6-karboksifluorescein

Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
gal-3	galektin-3
GalNac	N-acetilgalaktozamin
GC	glukokortikoidi
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GM-CSF	faktor koji stimulira granulocitne i makrofagne kolonije *engl.* granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GR	glukokortikoidni receptori
GRE	elementi odgovora na glukokortikoide *engl.* GC-response elements
HAT	histon-acetiltransferaza *engl.* histone acetyltransferase
HC	hidrokortizon, kortizol *engl.* hydrocortisone, cortisol
hnRNP	heterogeni nuklearni ribonukleoproteini
Hsp	proteini toplinskog šoka *engl.* heat-shock proteins
IFN	interferon
IKK	kinaza IκB
IL	interleukin
Ind	indometacin *engl.* indomethacin
IκB	inhibitor NF-κB
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza, drugim imenom SAPK *engl.* c-Jun-N-terminal kinase
kb	kilobaza
Lac	laktoza
LacNAc	N-acetillaktozamin
LGALS3	gen za galektin-3 *engl.* lectin, galactoside-binding, soluble
LPS	lipopolisaharid
Man-6-P	manoza-6-fosfat
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenima *engl.* mitogen-activated protein kinase
MAPKK	kinaza protein kinaze aktivirane mitogenima *engl.* mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	kinaza kinaze protein kinaze aktivirane mitogenima *engl.* mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Mgat5	β1,6 N-acetilglukozaminiltransferaza V *engl.* β1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V
MKP-1	fosfataza protein kinaze aktivirane mitogenima *engl.* MAPK phosphatase 1

MMP	metaloproteinaza matriksa *engl.* matrix metalloproteinase
Mr	relativna molekulska masa
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina *engl.* messenger ribonucleic acid
MTS	tetrazolijeva sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij-bromid
NF-κB	nuklearni faktor κB *engl.* nuclear factor kappa B
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih stanica T *engl.* nuclear factor of activated T cells
nGRE	negativni elementi odgovora na glukokortikoide *engl.* negative GC-response elements
NSAIDs	nesteroidne tvari s imunomodulatornim djelovanjem *engl.* non-steroidal antiinflammatory drugs
nt	nukleotid
PAG	poliakrilamidni gel *engl.* polyacrylamide gel
PBS	fiziološka otopina (154 mM NaCl) puferirana fosfatnim puferom (Na_2HPO_4/KH_2PO_4), pH 7,4 *engl.* phosphate buffered saline
PCR	lančana reakcija polimerazom *engl.* polymerase chain reaction
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat *engl.* phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid *engl.* phenyl-methyl-sulphonyl-fluorid
PPARγ	receptor γ aktiviran proliferatorom peroksisoma *engl.* peroxisome proliferator-activated receptor γ
PVDF	poliviniliden-difluorid *engl.* polyvinylidene difluoride
RNA	ribonukleinska kiselina *engl.* ribonucleic acid
SAPK	protein kinaza aktivirana stresom, drugim imenom JNK *engl.* stress-activated-protein-kinase
SDS	natrijev dodecilsulfat *engl.* sodium dodecylsulphate
Sp-1	transkripcijski faktor Sp1
STAT	molekule koje provode signale i aktiviraju transkripciju *engl.* signal transducer and activator protein 1
TAMRA	karboksitetrametilrodamin
TBS	puferirana otopina tris(hidroksimetil)aminometana *engl.* tris(hydroxymethy)aminomethane buffered saline
TCR	receptori na limfocitima T *engl.* T-cell receptors

Temed	N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamin *engl.* N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine
TF	transkripcijski faktor
T_m	temperatura mekšanja
TNF	faktor nekroze tumora *engl.* tumour necrosis factor
TREs	elementi odgovora na forbol-12-O-tetradekanoat-13-acetat *engl.* phorbol-12-O-tetradecanoate-13-acetate response elements
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan *engl.* tris(hydroxymethy)aminomethane
Tween-20	polioksietilen sorbitan monolaurat *engl.* polyoxyethylenesorbitan monolaurate

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1.1 Strukture galektina
Slika 1.2 Struktura galektina-3
Slika 1.3 Slijed nukleotida promotorske regije ljudskog *LGALS3*
Slika 1.4 Shema trokomponentnog modela aktivacije MAPK
Slika 1.5 Regulacija aktivnosti TF signalnim putem MAPK
Slika 1.6 Shematski prikaz aktivacije NF-κB
Slika 1.7 Shematski prikaz signalnih puteva i mehanizama regulacije gena uključenih u upalni odgovor
Slika 1.8 Učinak nesteroidnih tvari s imunomodulatornim djelovanjem na pojedine komponente signalnih puteva
Slika 1.9 Struktura aspirina
Slika 1.10 Struktura indometacina
Slika 1.11 Struktura hidrokortizona
Slika 1.12 Struktura deksametazona
Slika 2.1 Analiza ukupne RNA na uređaju Agilent 2100 bioanalyser
Slika 3.1 Metabolička aktivnost stanica THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju/0,2% DMSO se ne mijenja
Slika 3.2 Elektroforeza PCR produkata
Slika 3.3 Nukleotidni slijed PCR produkta nastalog umnažanjem dijela mRNA za galektin-3 određen analizom na uređaju AbiPrism 310 Genetic Analyser
Slika 3.4 GeneScan® elektroforetogram razdvojenih PCR produkata
Slika 3.5 U stanicama THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO količina mRNA za galektin-3 se ne mijenja
Slika 3.6 Količina galektina-3 u stanicama THP-1 tijekom kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO se ne mijenja
Slika 3.7 Aspirin inhibira ekspresiju *LGALS3*
Slika 3.8 Utjecaj aspirina na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1
Slika 3.9 Indometacin inhibira ekspresiju *LGALS3*
Slika 3.10 Utjecaj indometacina na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1
Slika 3.11 Hidrokortizon inhibira ekspresiju *LGALS3*
Slika 3.12 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1
Slika 3.13 Deksametazon inhibira ekspresiju *LGALS3*
Slika 3.14 Utjecaj deksametazona na ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1
Slika 3.15 PMA inducira ekspresiju *LGALS3* u stanicama THP-1
Slika 3.16 PMA inducira ekspresiju galektina-3 u stanicama THP-1
Slika 3.17 U diferenciranim stanicama THP-1 tijekom 72-satnog kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO količina mRNA za galektin-3 se ne mijenja
Slika 3.18 Količina galektina-3 ne mijenja se u diferenciranim stanicama THP-1 tijekom kultiviranja u mediju ili u mediju/0,2% DMSO
Slika 3.19 Utjecaj aspirina na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.20 Utjecaj aspirina na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.21 Utjecaj indometacina na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.22 Utjecaj indometacina na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.23 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1

Slika 3.24 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.25 Utjecaj deksametazona na ekspresiju *LGALS3* u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 3.26 Utjecaj deksametazona na ekspresiju galektina-3 u diferenciranim stanicama THP-1
Slika 4.1 Utjecaj hidrokortizona na ekspresiju a) *LGALS3* i b) galektina-3 u nediferenciranim i diferenciranim stanicama THP-1

Tablica 1.1 Obitelji životinjskih lektina
Tablica 1.2 Utjecaj različitih tvari na sekreciju galektina-3
Tablica 1.3 Relativni afiniteti vezanja galektina-3 na glikoligande
Tablica 1.4 Ligandi galektina-3
Tablica 1.5 Funkcije galektina-3 u imunom odgovoru
Tablica 2.1 Sastav reakcijskih smjesa za reverznu transkripciju
Tablica 2.2 Sastav reakcijskih smjesa za lančanu reakciju polimerazom
Tablica 2.3 Ishodnice za lančanu reakciju polimerazom

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5. srpnja 1973. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Godine 1992. upisala sam studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 1994. dodijeljena mi je dvogodišnja stipendija grada Zagreba za 50 najboljih studenata. Dobitnica sam Rektorove nagrade za godinu 1994. i 1996. Diplomirala sam 1996. godine s izvrsnim uspjehom. Sljedeće sam godine upisala poslijediplomski studij Molekularne i stanične biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Od 1997. godine radim kao znanstvena novakinja na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tri mjeseca (od 18. siječnja 1999. do 7. ožujka 1999. godine, te od 31. siječnja 2000. do 6. ožujka 2000. godine) provela sam na studijskom boravku u Department of Pharmacology and Neuroscience, University of Dundee, u Dundeeju, Škotska, Velika Britanija, u sklopu ostvarivanja znanstvene suradnje. Akademski stupanj magistra prirodnih znanosti iz područja biologije stekla sam 17. studenog 2000. godine.
Sudjelovala sam na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima i tečajevima. Članica sam Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Autor sam sljedećih znanstvenih radova citiranih u *CC/SCI*:

1. Dumić J., **Dabelić S.** and Flögel M. (2004) Sweet attachment to molecular biology. *Period. biol.* **106**(2): 127-133.
2. **Dabelić S.**, Flögel M., Maravić G. and Lauc G. (2004) Stress Causes Tissue-Specific Changes in the Sialyltransferase Activity. *Z. Naturforsch.* **59**:276-280.
3. Dumić J., **Dabelić S**. and Flögel M. (2002) Curcumin – a Potent Inhibitor of Galectin-3 Expression. *Food Technol. Biotechnol.* **40**: 281-287.
4. Lauc G., Peter-Katalinić J., **Dabelić S**. and Flögel M. (1999) Purification and MALDI-MS characterization of a stress - associated glycoprotein from sera of professional soldiers. *Biol. Chem.* **380**:443-450.
5. Lauc G., **Dabelić S**., Šupraha S., and Flögel M. (1998) Glycobiology of stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **851**:397-403.
6. Lauc G., **Dabelić S**., Dumić J. and Flögel M. (1998) Stressin and natural killer cell activity in professional soldiers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **851**:526-530.