



### Општи подаци и протокол истраживања

**Назив Пројекта :** ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ ГАЛЕКТИНА-3 У МЕТАБОЛИЧКОЈ ДИСФУНКЦИЈИ И ИНФЛАМАЦИЈИ У МИШЉЕМ МОДЕЛУ ИНДУКОВАНЕ ГОЈАЗНОСТИ И ТИПА 2 DIABETES MELLITUS-A ПРИМЕНОМ ДИЈЕТЕ СА ВИСОКИМ САДРЖАЈЕМ МАСТИ

**Кључне речи :** Галектин-3, инфламација, гојазност, тип 2 Diabetes mellitus-a, дијета са високим садржајем масти

### Предмет, садржај и циљ истраживања

#### Сажетак

Хронична инфламација у висцералном адипозном ткиву има централну улогу у патогенези гојазности и типа 2 Diabetes mellitus-a и настаје као последица дејства бројних тзв. danger сигнала у условима повећаног енергетског уноса. Поред инфламације у циљним ткивима, гојазност и са њом повезане болести карактерише и системска инфламација ниског степена, која се огледа у повећаном нивоу циркулишућих медијатора запаљења. Са друге стране, најновија истраживања указују на значај инфламације и аутореактивности у процесу прогресивне деструкције  $\beta$  ћелија и развоја инсулинског секреторног дефекта. Најновија истраживања указала су на значај ране активације NLRP3 инфлазома у инфилтришућим макрофагима од стране штетних метаболита и следствене каспаза-1 посредоване продукције IL-1 $\beta$ , као могућег механизма настанка инфламације.

Галектин-3 (Гал-3) је мултифункционални молекул који у зависности од специфичности услова може бити позитиван или негативан регулатор имунског одговора. За разлику од бројних аутоимунских, инфламаторних и малигних болести где испољава проинфламаторни ефекат, новија истраживања су указала на могући протективни ефекат Гал-3 у патогенези гојазности и типа 2 Diabetes mellitus-a захваљујући његовој улози у деградацији и уклањању крајњих продуката метаболизма глукозе и липида у условима енергетског дизбаланса организма.

Планирано истраживање би требало да одговори на питање колика је и каква улога Гал-3 у модификовању метаболичког и имунског баланса циљних ткива и организма у целини, у одговору на ексцесивни унос висококалоричне исхране у мишљем моделу гојазности и типа 2 Diabetes mellitus-a. Током индукције болести применом дијете са високим садржајем масти код Гал-3 дефицијентних мишева и одговарајућих контролних група мишева соја C57BL/6, у трајању од 10-15 недеља, биће праћени метаболички параметри развоја болести у виду мерења телесне масе, гликемије и серумских липида. Изолацијом и фенотипизацијом инфилтришућих мононуклеарних ћелија из циљних ткива као што су висцерално адипозно ткиво, панкреас и слезина, као и праћењем серумских параметара системске инфламације ниског степена, планирано истраживање би окарактерисало улогу Гал-3 у патогенези ових болести, како са



метаболичког, тако и са имунског аспекта. Мерењем експресије крајњих продуката метаболизма глукозе и липида (AGE, ALE), NLRP3 инфлазома и следствене продукције IL-1 $\beta$  планирано истраживање би расветлило могући механизам настанка инфламације и убрзаног развоја болести у одсуству Гал-3.

### **Циљ истраживања**

Основни циљ планираног истраживања је испитивање улоге Гал-3 у патогенези гојазности и инсулинске резистенције, као и дефинисање могућег механизма дејства Гал-3 у модификовању имунског одговора и настанка инфламације ниског степена, како у циљним ткивима, тако и на системском нивоу.

У складу са основним циљем поставили смо експерименталне задатке:

1. Испитати улогу Гал-3 у спектру метаболичких дисфункција насталих као последица индукције гојазности и инсулинске резистенције применом дијете са високим садржајем масти;
2. Испитати системске маркере инфламације одређивањем концентрације CRP-а, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-10, IL-13 у серуму;
3. Дефинисати и описати природу инфламације у висцералном адипозном ткиву експерименталних животиња у присуству или одсуству Гал-3 на две врсте исхране;
4. Испитати имунске параметре инфламације у панкреасним острвцима у процесу прогресивне деструкције  $\beta$  ћелија и настанку типа 2 Diabetes mellitus-a у зависности од присуства или одсуства Гал-3 на две врсте исхране;
5. Испитати улогу крајњих продуката метаболизма глукозе и липида (AGE, ALE) у настанку инфламације у присуству или одсуству Gal-3, мерењем њихове експресије у висцералном адипозном ткиву и острвцима ендокриног панкреаса;
6. Утврдити везу између Gal-3 и активације NLRP3 инфлазома и следствене продукције IL-1 $\beta$ , као могућег механизма настанка инфламације, мерењем експресије NLRP3 инфлазома, каспазе-1 и IL-1 $\beta$  у ткивима *in vivo*, као и *ex vivo* на стимулираним ћелијама;



### Актуелност истраживања

Хронична инфламација у висцералном адипозном ткиву има централну улогу у патогенези гојазности и тип 2 Diabetes mellitus-a и настаје као последица дејства бројних тзв. danger сигнала у условима повећаног енергетског уноса. У нормалним условима, у висцералном адипозном ткиву су присутне бројне ћелије урођеног и стеченог имунског одговора које у међусобној комуникацији одржавају метаболичку хомеостазу (1). Патогенеза гојазности иницијално је повезана са повећаном инфилтрацијом CD8 и CD4 Th1 лимфоцита, као и смањењем броја Т регулаторних лимфоцита, што све заједно индукује поларизацију макрофага у смеру M1 фенотипа (2-4). M1 макрофаги продукују проинфламаторне цитокине интерлеукин (IL)-1 $\beta$  и tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), који имају снажан ефекат на развој инсулинске резистенције (5). Уз то, најновија истраживања су указала на значај мононуклеарне инфилтрације панкреасних острваца у процесу прогресивне деструкције  $\beta$  ћелија (6). Такође, серумски ниво про-инфламаторних цитокина као што су IL-6, IL-1 $\beta$  и C реактивни протеин, корелирају са степеном апоптозе  $\beta$  ћелија, указујући на значај инфламације у панкреасним острвцима у патогенези типа 2 Diabetes mellitus-a (7).

Молекулски механизми настанка инфламације ниског степена у гојазности и типу 2 дијабетеса још увек су недовољно познати. IL-1 $\beta$  се сматра једним од кључних медијатора у нутријентима индукованом оштећењу секреторне функције и следственој апоптози  $\beta$  ћелија (8). Механизми којима нутријенти (глукоза, слободне масне киселине) индукују продукцију IL-1 $\beta$  су комплексни. Најновија истраживања су показала да засићене масне киселине, као један од метаболичких продуката, путем активације NLRP3 (енгл. NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3) инфлазома и последичног ослобађања активне каспазе-1, индукују продукцију активног IL-1 $\beta$  (9). Додатно је показано да NLRP3 дефицијенти мишеви не развијају гојазност и инсулинску резистенцију индукованих применом дијете са високим садржајем масти (10).

Галектин-3 (Гал-3) је члан фамилије  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина, експримиран у бројним ћелијама како имунског система, тако и ћелијама других ткива и органа. У зависности од своје ћелијске локализације (цитоплазматска, нуклеарна, мембранска) испољава своју мултифункционалност у процесима инфламације, апоптозе, канцерогенезе и вероватно различитим процесима регулације метаболичке хомеостазе (11). Досадашњим истраживањима показана је његова проинфламаторна улога у настанку различитих аутоимунских, инфламаторних и малигнух болести као што је Diabetes mellitus тип 1, Con-A индуковани хепатитис, експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (EAE), малигни меланом (12-15). Са друге стране, делеција гена за Гал-3 доведена је у везу са убрзаном прогресијом дијабетесних компликација као што су експериментални гломерулонефритис, атеросклероза и не-алкохолна стеатоза јетре, указујући на могући протективни ефекат Гал-3 у метаболичким дисфункцијама и инфламацији ниског степена која је у основи патогенезе гојазности и типа 2 Diabetes mellitus-a (16-18).

Један од могућих механизма протективног ефекта Gal-3 везан је за његову функцију рецептора за крајње продукте метаболизма глукозе (advanced glycation end-products, AGE) и липида (advanced lipoxidation endproducts, ALE), њиховој деградацији и уклањању из



циркулације у условима повећаног флукса ових метаболита, који настаје као последица енергетског дисбаланса организма (19). Претпоставка је да у одсуству Гал-3 расте ниво ових молекула као тзв. danger сигнала, као и експресија pattern recognition рецептора за AGE (RAGE) који активира ћелије имунског система и подстиче продукцију кључних про-инфламаторних медијатора. Такође је показано да RAGE индукује активацију ћелија адаптивног имунског одговора и контролише поларизацију Т лимфоцита у смеру Th1 имунског одговора (20).

Планираним истраживањем требало би одговорити на питање колика је и каква улога одсуства Гал-3 у модификовању метаболичког и имунског баланса циљних ткива и организма у целини, у одговору на ексцесивни унос висококалоричне исхране, испитивано у мишјем моделу гојазности и Diabetes mellitus-a тип 2.

### **Предмет и опис истраживања:**

**задачи, методологија, очекивани резултати**

### **Експерименталне животиње:**

Планирано истраживање биће спроведено на мишевима соја C57BL/6, и то Галектин-3 knockout (-/-) и wild-type (WT) мужјацима, старости 6 недеља. Све експерименталне и контролне групе животиња садржаће по 20 мишева. Укупан број животиња потребних за реализацију пројекта је 80.

### **Индукција гојазности и Diabetes mellitus-a тип 2:**

Планирани модел индукције гојазности и типа 2 дијабетеса подразумева примену специјалне врсте дијете са високим процентом масти (60% масти, Mucedola, Milano, Italy). Контролне групе животиња биће стављене на исхрану са ниским процентом масти (3% масти, Mucedola, Milano, Italy). Све животиње имаће слободан приступ храни и води. Предвиђено трајање индукције је 10-15 недеља.

Након жртвовања животиња предвиђена је изолација висцералног адипозног ткива из перигонадалних депоа, слезине, панкреаса и пара-панкреатичних лимфних чворова за даљу анализу. Крв ће бити сакупљена након жртвовања, пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум ће се изоловати центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) и замрзнути на -20°C за даљу анализу.

### **Праћење метаболичких параметара:**

Динамика увећања телесне масе и гликемије биће праћена сваке друге недеље. Ниво глукозе у пуној крви, добијене пункцијом репне вене, биће одређиван уз помоћ глукометра (Accu-Chek Performa, Roche, Germany). Серумске концентрације липида (триглицериди, укупни



холестерол, HDL, LDL и acidum uricum) биће мерене употребом Olympus AU600 chemistry immuno analyzer-a (Olympus, Japan).

#### **Одређивање серумских нивоа цитокина:**

Системски нивои IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  и С реактивног протеина (CRP) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) биће мерени у серуму мишева ELISA методом према унапред утврђеном протоколу.

#### **Изолација ћелија за анализу методом проточне цитометрије (Flow cytometry):**

Изолација ћелија стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива:

Висцерално адипозно ткиво, уситњено и опрано у 3ml PBS-а, биће дигестирано у раствору 1mg/ml колагеназе тип 2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) са 2% bovine serum albumin-a (BSA, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у PBS-у, 1h на 37°C, пропуштено кроз ћелијско сито величине 40 $\mu$ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) и центрифугирано 5 минута на 500xg обртаја. Еритроцити у добијеном пелету биће лизирани erythrocyte lyses hypotonic buffer-ом (0.155 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) 3 минута на собној температури. Након лизе ћелије SVF ће бити два пута опране и ресуспендоване у RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% fetal calf serum-a (FCS) за даљу анализу.

Изолација спленоцита:

Механичким пропуштањем ткива слезине кроз ћелијско сито величине 40 $\mu$ m (BD Biosciences San Jose, CA, USA) добиће се једноћелијска суспензија. Након лизе еритроцита erythrocyte lyses hypotonic buffer-ом (0.155 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) 3 минута на собној температури, ћелије ће бити опране и ресуспендоване у RPMI 640 медијуму (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) са 10% FCS за даљу анализу.

Изолација мононуклеара из панкреаса:

Уситњено и опрано ткиво панкреаса биће дигестирано у раствору 2mg/ml колагеназе тип 5 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) у Balanced Salt Solution-у (HBSS, Sigma-Aldrich, Germany), са 10% FCS на 37°C, 15 минута. Дигестирано ткиво ће механички бити пропуштено кроз 40 $\mu$ m-ско ћелијско сито (BD Biosciences San Jose, CA, USA). Након лизирања еритроцита у добијеној суспензији, ћелије ће бити опране два пута и ресуспендоване у HBSS-у са 10% FCS.

Фенотипизација изолованих ћелија:

Изоловане ћелије стромалне васкуларне фракције из висцералног адипозног ткива, мононуклеарне ћелије из панкреасних острваца и слезине ће бити обележене флуорохром-коњугованим моноклонским анти-мишјим CD3, CD4, CD8, NK1.1, CD44, CD62L, CD25, F4/80, CD11c, CD11b и CD206 антителима (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) или одговарајућим изотипским контролама и инкубиране 30 минута на +4°C. За интрацелуларно бојење изоловане ћелије ће бити инкубиране 5 h на 37°C у присуству 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate-a



(PMA) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA), 1  $\mu\text{g/ml}$  ionomycin-a (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) и Golgi Stop-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након инкубације, ћелије ће бити фиксиране и пермеабилзоване употребом BD Cytotfix/Cytoperm kit-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и обележене одговарајућим анти-мишјим флуорохром-коњугованим моноклонским антителима за FoxP3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-4, IL-10, IL-5 и IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Експресија мембранских и интрацелуларних ћелијских маркера биће анализирана употребом FACSCalibur flow cytometer-a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

#### **Процена степена мононуклеарне инфилтрације панкреасних острваца и висцералног адипозног ткива методом имунохистохемије:**

Дистрибуција инфилтришућих инфламаторних ћелија у циљним ткивима биће праћене микроскопирањем исечака одговарајућих ткива обојених haematoxylin-ом и eosin-ом, употребом светлосног микроскопа (BX51, Olympus, Japan) са припадајућом дигиталном камером. За даље испитивање фенотипских карактеристика инфилтрисаних ћелија користиће се метод двоструког имунохистохемијског бојења. Након инкубације са биотинисаним анти-мишјим F4/80, CD3 и NK1.1 антителима и визуелизације уз помоћ Mouse Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam), ткивни препарати ће бити инкубирани са зечјим анти-мишјим NLRP3, IL-1 $\beta$ , AGE, RAGE и Gal-3 антителима уз визуелизацију помоћу Expose Rb specific HRP/AEC detection IHC Kit-a (Abcam), према препорукама произвођача.

#### **Имунофлуоресценца панкреасних острваца и висцералног адипозног ткива:**

Након пермеабилзације крио и депарафинизованих исечака одговарајућих ткива употребом леденог ацетона у трајању од 5 минута, могуће неспецифично везивање антитела биће блокирано уз помоћ 10% normal goat serum-a у PBS-у. Примарна поликлонска анти-мишја NLRP3, AGE, RAGE и IL-1 $\beta$  антитела (Abcam, Cambridge, MA, USA) биће инкубирана 1h на RT. Након испирања препарата у PBS-у, одговарајуће секундарно анти-IgG антитело PE-Cy 5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ће бити инкубирано 45 минута. Инсулин и про-инсулин, лимфоцитна и макрофагна инфилтрација биће визуелизоване применом одговарајућих флуорохром-коњугованих моноклонских антитела (Abcam, Cambridge, MA, USA). Након испирања, обојени пресеци ће бити прекривени mounting medium-ом који садржи DAPI за визуелизацију нуклеуса (ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Анализа имунофлуоресценце ће бити урађена уз помоћ инвертног микроскопа Nikon eclipse Ti-E са припадајућим софтвером (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

#### **Одређивање концентрације протеина у ткивима Western blot методом:**

Лизати ткива панкреаса биће припремљени у раствору: 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.01% w/v bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 2 mM EDTA, док ће протеини из висцералног адипозног ткива бити изоловани уз помоћ TRIzol реагенса (Genosys, Woodlands, TX, USA). Даља обрада узорака биће урађена према претходно описаном протоколу (21) коришћењем примарних зечјих анти-мишјих ASC (1:500), NLRP3 (1:500), IL-1 $\beta$





(1:2500), Caspase-1 (1:500) антитела (Abcam) са секундарним HRP коњугованим анти-зечјим антителом (1:2500) (GE Healthcare, Buckinghamshire, England).

### **Ћелијска култура и ex vivo стимулација:**

За верификацију активације NLRP3 инфламазома и каспаза-1 зависне продукције IL-1 $\beta$ , макрофаги добијени из перитонеалног испирка хладним PBS-ом биће куливисани у комплетном медијуму (DMEM) са 10% FBS-а на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. Након претретирања LPS-ом у концентрацији 100 ng/ml 4h, ћелије ће бити стимулисане са BSA; палмитат-BSA; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или глукозом (Sigma-Aldrich), у присуству или одсуству 10 $\mu$ M каспаза-1 инхибитора (Z-YVAD-FMK, Bachem AG, Bubendorf, Switzerland), у трајању од 24h. Након инкубације у супернатантима ће бити одређивани IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-12, ELISA методом.

### **Искључивање гена за NLRP3 инфламазом методом трансфекције siRNA (енгл. small interfering RNA):**

Ћелије добијене перитонеалним испирањем (1x10<sup>6</sup>) ће бити трансфектоване у медијуму (DMEM) са 5% FBS-а без додатих антибиотика, употребом мишије Cytopurin siRNA за искључивање гена за NLRP3 инфламазом и контролне siRNA (Control siRNA, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) у трансфекционом медијуму (siRNA Transfection Medium, Santa Cruz Biotechnology), 7h. FITC коњугована контролна siRNA ће бити коришћена као позитивна контрола. Након трансфекције, ћелије ће бити култивисане у комплетном медијуму (DMEM) и претретиране LPS-ом у концентрацији 100 ng/ml 4h. После претретирања, ћелије ће бити стимулисане палмитатом у концентрацији 100nM, 18h на 37°C у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Након инкубације, у супернатантима ће бити измерена концентрација продукваног IL-1 $\beta$  ELISA методом.

### **Снага студије и величина узорка**

Величина узорка је израчуната на основу очекиваних вредности гликемије и телесне масе, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући да је  $\alpha=0.05$ , а снага студије 0.8 за независни Т тест, поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G\*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 20 за сваку од група. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакв студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни Т тест или Mann-Whitney тест) између две измерене варијабле, са снагом студије  $\geq 80\%$ .

### **Статистичка обрада података**

Све добијене вредности биће презентоване као средња вредност +/- стандардна девијација. За утврђивање статистичке значајности биће коришћени тестови: анализа варијансе (ANOVA) и независни Т тест, као и Kruscal-Wallis и Mann-Whitney тестови. За тестирање зависности између појединих варијабли користиће се тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање



Pearson-овог коефицијента корелације. За обраду података користиће се статистички пакет SPSS 13.0. Статистичка значајност је одређена на  $p < 0.05$ .

### Значај истраживања

Улога Gal-3 у ефикасном уклањању крајњих продуката метаболизма глукозе и липида представља снажан протективни механизам у настанку инфламације у циљним ткивима као што је висцерално адипозно ткиво и острвца ендокриног панкреаса, која је у основи патогенезе гојазности и Diabetes mellitus-а тип 2. Новија студија је показала да би пораст серумског нивоа Gal-3 код оболелих могао бити дијагностички маркер прогресије болести (22). Ипак улога Gal-3 у настанку ове групе метаболичких поремећаја је далеко комплекснија. Претпоставка је да би дефинисање и разумевање ових механизма, нарочито у раним фазама развоја гојазности и инсулинске резистенције, могли имати истакнут терапијски значај.

### Временски оквир

Планирани временски оквир за реализацију пројекта је две године. Истраживање ће се спровести у Центру за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

### Литература

1. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121(6):2111–2117 doi:10.1172/JCI57132.
2. Nishimura S, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009;15(8):914–920.
3. Feuerer M, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009;15(8):930–939.
4. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112(12):1796–1808.
5. Xu H, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112(12):1821–1830.
6. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev* 2011; 11:98-107.
7. Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1433-1440.
8. Maedler, K. et al. Glucose-induced  $\beta$ -cell production of interleukin-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110: 851–860.
9. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MTH, Brickey WJ, Ting JPY. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011; 12(5): 408-416.
10. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179–188.





11. Dunic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:616–635.
12. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol* 2009 130(1):83-88.
13. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A- induced hepatitis in mice. 2011 Dec 24. doi: 10.1002/hep.25542.
14. Jiang H-R, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu F-T, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 Deficiency Reduces the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis *J Immunol* 2009;182;1167-1173.
15. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis* 2011 Jun;28(5):451-62.
16. Iacobini C, Oddi G, Menini S, Amadio L, Ricci C, Barsotti P, Di Pippo C, Sorcini M, Prizzi F, Pugliese F, Pugliese G. Development of age dependent glomerular lesions in galectin-3/AGE-receptor-3 knockout and wild type mice. *Am J Physiol* 2005;289:F611–F621.
17. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Scipioni A, Sansoni V, Cordone S, et al. Accelerated lipid-induced atherogenesis in Galectin-3-deficient mice : role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, 29:831-836 doi: 10.1161/ATVBAHA.109.186791.
18. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol* 2006 Dec;210(4):469-77.
19. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of Disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Endocrinol Metabol* 2008;4(5):285-293.
20. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. RAGE Ligation Affects T Cell Activation and Controls T Cell Differentiation. *J Immunol* 2008;181;4272-4278.
21. Saksida T, Stosic-Grujicic S, Timotijevic G, Sandler S, Stojanovic I. Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology* 2011; doi: 10.1038/icb.2011.89.
22. Weigert J, Neumeler M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN, Schnitzbauer A, Schaffler A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *JCEM* 2010; 95:1404-1411.