



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Марина Милетић-Ковачевић

**Улога галектина 3 у патогенези експерименталног**  
**аутоимунског миокардитиса**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Биљана Љујић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Марина Милетић-Ковачевић
Датум и место рођења: 09. новембар 1984. године у Краљеву
Садашње запослење: асистент
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: <b>Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса</b>
Број страница: 142
Број слика: 10
Број библиографских података: 328
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 14.11.2016. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-374/9 од 05.04.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор- емеритус Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник; Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан; Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Патолошка Физиологија, члан; Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског Факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Имунологија, члан; Проф. др Горан Давидовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор- емеритус Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник; Доц. др Немања Јовичић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Миокардитис је инфламаторно обољење срчаног мишића, које се карактерише дегенерацијом и/или некрозом кардиомиоцита и присуством ћелијског инфилтрата у интерстицијуму миокарда. Миокардитис се може манифестовати као акутно, субакутно или хронично запаљење миокарда, са фокалним или дифузним ћелијским инфилтратом и може прогредирати до фиброзе, ремоделовања ткива и губитка контрактилне функције. Најчешћи узрочници миокардитиса су вируси, бактерије и паразити, међутим бројни докази указују да ово обољење може бити и аутоимунске природе. Експериментални аутоимунски миокардитис (ЕАМ) представља анимални модел постинфективног миокардитиса и дилатационе кардиомиопатије. Галектин 3 (Gal-3) припада фамилији  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина и експримиран је на многим ћелијама имунског система и има важну улогу у регулацији инфламације. Улога Gal-3 је испитивана у различитим аутоимунским и инфламаторним болестима и показано је да Gal-3 може двојачко регулисати имунски одговор, што зависи од више фактора, као што су специфични услови инфламације, врста ткива и ниво експресије овог молекула како у физиолошким тако и у патолошким стањима. Нема података о улози и значају Gal-3 у патогенези ЕАМ код C57BL/6 мишева, који су релативно резистентни на пептидом индуковани ЕАМ.

Да би се утврдило да ли и на који начин делеција гена за Gal-3 утиче на патогенезу ЕАМ коришћени су мишеви чистог соја WT- C57BL/6 и Gal-3КО мишеви. Сви WT и Gal-3КО мишеви имунизовани су МуНС $\alpha_{334-352}$  пептидом 0. и 7. дана. Тежина ЕАМ одређивана је 21-ог дана експеримента, односно приликом жртвовања животиња.

Gal-3КО мишеви су имали значајно већу хипертрофију срца и већи патохистолошки скор у поређењу са WT мишевима 21. дана након имунизације. Gal-3КО мишеви имали су значајно већу инфилтрацију срчаног мишића CD45+ мононуклеарним ћелијама посебно F4/80+ макрофагама и CD3+ Т лимфоцитима, као и већу заступљеност еозинофила у поређењу са WT мишевима. Серумске концентрације Th2 цитокина (IL-4 и IL-33) су биле више у серумима Gal-3КО у поређењу са контролним оболелим WT мишевима. Делеција гена за Gal-3 је индуковала значајно већи инфлукс Th1 и Th2 ћелија у срцу имунизованих Gal-3КО у односу на WT мишеве. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава укупан број F4/80+ ћелија и олакшава алтернативну активацију

макрофага у срцу. У оболелом миокарду Gal-3KO мишева регистрована је значајно већа процентуална заступљеност и укупан број: мијелоидних CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> макрофага; и CD11c<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-13. У миокарду Gal-3KO мишева детектован је већи број IgG позитивних ћелија и већа количина IgG депозита у поређењу са WT мишевима. Делетија гена за Gal-3 повећава број антифибротских ћелија које продукују IL-10 што се манифестује значајно слабијим депоновањем колагена у срцу оболелих мишева.

Делетија гена за Gal-3 повећава оштећење ткива у анималном моделу аутоимунског миокардитиса индукованог апликацијом MuHC $\alpha_{334-352}$  пептида и укида резистенцију C57BL/6 мишева на индукцију болести.

Кључне речи: експериментални аутоимунски миокардитис, галектин 3, тип 2 инфламација.

## ABSTRACT

Myocarditis is an inflammatory heart muscle disease characterized by degeneration and necrosis of cardiomyocytes with presence of cellular infiltrates in the interstitium. Myocarditis can be manifested as acute, subacute or chronic myocardial inflammation with focal or diffuse cell infiltrates, it can progress to fibrosis, tissue remodeling and loss of contractile function. The most common causes of myocarditis are viruses, bacteria and parasites, however numerous evidence suggests that this disease can also be autoimmune. Experimental autoimmune myocarditis (EAM) is an animal model of postinfective myocarditis and dilated cardiomyopathy. Galectin 3 (Gal-3), which belongs to the family of  $\beta$ -galactoside-binding lectins is expressed on many cells of the immune system and plays an important role in regulation of inflammation. The role of Gal-3 was studied in various autoimmune and inflammatory diseases and it has been shown that Gal-3 can have a different effect on the immune response. Its role depends on several factors, such as the specific conditions of inflammation, the type of tissue, and the expression level of this molecule in pathological as well as in physiological conditions. There are no precise data on the role and significance of Gal-3 in the pathogenesis of EAM in C57BL/6 mice, which are relatively resistant to EAM-induced by peptide.

Mice of the pure strain WT-C57BL/6 and Gal-3KO mice were used in order to determine whether and how the deletion of the Gal-3 gene affects the EAM pathogenesis. WT and Gal-3KO mice were immunized with the MyHC $\alpha_{334-352}$  peptide on day zero and day seven. Severity of EAM was determined on the 21st day of the experiment, during the sacrifice of animals.

Gal-3KO mice had significantly higher cardiac hypertrophy and higher histopathological score compared to WT mice on the 21st day after immunization. Gal-3KO mice also had a significantly higher infiltration of heart muscle by CD45<sup>+</sup> mononuclear cells, particularly with F4/80<sup>+</sup> macrophages and CD3<sup>+</sup>T lymphocytes, and higher number of eosinophils compared to WT mice.

Serum concentrations of Th2 cytokine (IL-4 and IL-33) were higher in Gal-3KO mice than in control diseased WT mice. The deletion of the Gal-3 gene also induced significantly higher influx Th1 and Th2 cells at the heart of the immunized Gal-3KO compared to WT mice. The absence of gene expression for Gal-3 significantly increases the total number of F4/80<sup>+</sup> cells and facilitates alternative macrophage activation in the heart. In myocardium of Gal-3KO mice

were significantly higher percentage of distribution and total number of: myeloid CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> macrophages and CD11c+ cells producing IL-13. In the myocardium of Gal-3KO mice were detected a higher number of IgG positive cells and a larger amount of IgG deposits compared to WT mice. The deletion of Gal-3 gene increases the number of antifibrotic cells that produce IL-10, which is manifested by significantly less collagen storage in the heart of diseased mice.

Gal-3 gene deletion increases tissue damage in animal model of autoimmune myocarditis induced by application of the MyHC $\alpha_{334-352}$  peptide and eliminates the resistance of C57BL/6 mice to induction of the disease.

Key words: experimental autoimmune myocarditis, galectin 3, type 2 inflammation.

*Посебну захвалност дугујем свом ментору, проф. др Биљани Љујић, на несебичном ангажовању током израде докторске дисертације, као и на дивној сарадњи, разумевању и подршци.*

*Велику професионалну захвалност за помоћ у експерименталном раду и на корисним саветима и сугестијама дугујем проф. др Миодрагу Лукићу и проф. др Нади Пејновић.*

*Захваљујем се колегама са Катедре за Хистологију и ембриологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.*

*Хвала мојој породици на стрпљењу и безграничној љубави.*

*... мојој деци Викторији и Василију*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
1.1. Миокардитис.....	1
1.1.1. Етиологија миокардитиса.....	2
1.1.2. Епидемиологија миокардитиса.....	4
1.1.3. Класификација миокардитиса.....	5
1.1.3.1. Акутни лимфоцитни миокардити.....	5
1.1.3.2. Хронични лимфоцитни миокардитис .....	6
1.1.3.3. Миокардитис циновских ћелија .....	6
1.1.3.4. Еозинофилни миокардитис .....	7
1.1.3.5. Дилатациона кардиомиопатија.....	7
1.1.3.6. Саркоидотични миокардитис.....	7
1.1.4. Клиничка презентација миокардитиса.....	8
1.1.5. Аутоимуност у инфламаторним срчаним обољењима.....	8
1.1.6. Анимални модели миокардитиса.....	10
1.1.6.1. Експериментални миокардитис индукован коксаки В3 вирусом.....	10
1.1.6.2. Експериментални аутоимунски миокардитис.....	11
1.1.7. Имунопатогенеза миокардитиса.....	13
1.1.8. Улога урођеног имунског одговора у аутоимунском миокардитису.....	14
1.1.9. Улога стеченог имунског одговора у имунопатогенези миокардитиса.....	18
1.1.9.1. Улога Th1 ћелија у аутоимунском миокардитису.....	18
1.1.9.2. Улога Th2 ћелија у аутоимунском миокардитису.....	19
1.1.9.3. Улога Th17 ћелија у аутоимунском миокардитису.....	21
1.1.9.4. Улога T регулаторних ћелија у аутоимунском миокардитису.....	21
1.1.9.5. Улога Th9 ћелија у аутоимунском миокардитису.....	22
1.1.10. Улога хуморалног имунског одговора у аутоимунском миокардитису.....	23
1.2. Галектин 3.....	24
1.3. Класификација галектинских молекула.....	24

---



1.4. Структурне и биохемијске карактеристике галектин 3.....	26
1.4.1. ND терминални домен.....	28
1.4.2. CRD регион.....	29
1.5. Експресија галектина 3.....	30
1.6. Улога галектина 3.....	32
1.6.1. Улога екстрацелуларног галектина 3.....	32
1.6.2. Улога галектина 3 у ћелијској атхезији.....	33
1.6.3. Улога галектина 3 у ћелијској активацији и хемотакси.....	33
1.6.4. Улога интрацелуларног галектина 3.....	34
1.6.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора.....	35
1.6.6. Улога галектина 3 у развоју миокардитиса и срчане фиброзе.....	37
<b>2. ЦИЉ СТУДИЈЕ.....</b>	<b>40</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....</b>	<b>42</b>
3.1. Експерименталне животиње.....	42
3.1.1. Методологија добијања Gal-3КО мишева на C57BL/6 подлози.....	42
3.2. Експериментални модела аутоимунског миокардитиса применом МуНС $\alpha_{334-352}$ пептида.....	44
3.3. Одређивање хипертрофије срца.....	46
3.4. Хистопатолошка процена тежине експерименталног аутоимунског миокардитиса.....	46
3.4.1. Фиксација ткива.....	46
3.4.2. Дехидратација.....	47
3.4.3. Просветљавање ткива у ксилолу.....	47
3.4.4. Импрегнација ткива парафином.....	48
3.4.5. Хематоксилином-еозином бојење.....	49
3.4.6. Sirius red бојење колагених влакана.....	50
3.4.7. Трихромно бојење колагених влакана по Masson-у.....	50
3.4.8. Процена хистолошког скорa.....	51
3.5. Имунофлуоресценција.....	52
3.6. Имунохистохемија.....	53
3.7. Анализа моноклеарних ћелија срца и слезине методом проточне цитометрије.....	55
3.7.1. Изолација моноклеарних ћелија из срца.....	55

---

3.7.2. Изолација моноклеарних ћелија из слезине.....	56
3.8. Фенотипса и функционална анализа популација изолованих моноклеарних ћелија.....	56
3.8.1. Бојење површинских маркера.....	58
3.8.2. Бојење интраћелијских маркера и цитокина.....	59
3.7. Одређивање концентрације цитокина у серуму.....	61
3.10. Статистичка обрада података.....	62
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>63</b>
4.1. Делација гена за Gal-3 значајно повећава хипертрофију миокарда.....	63
4.2. Делација гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису.....	64
4.3. Недостатак гена за Gal-3 значајно мења заступљеност моноцитних/гранулоцитних популација/субпопулација у ткиву срца мишева имунизованих МуНС $\alpha_{334-352}$ пептидом.....	68
4.4. Серумске концентрације Th2 цитокина IL-4 и IL-33 су веће у оболелим Gal-3КО мишевима .....	71
4.5. Одсуство експресије гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева.....	73
4.6. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава укупан број F4/80+ ћелија и олакшава алтернативну активацију макрофага у срцу.....	77
4.7. Делација гена за Gal-3 значајно повећава процентуалну заступљеност и укупан број мијелоидних CD11b+ Ly6C <sup>hi</sup> макрофага.....	80
4.8. У срцу оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+ ћелија које продукују IL-13.....	84
4.9. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца.....	87
4.10. Делација гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу.....	88
4.11. Делација гена за Gal-3 повећава експресију IL-10 у срцу.....	90
4.12. Одсуство експресије гена за Gal-3 промовише поларизацију у M2 макрофаге и мења процентуални однос F4/80+IL-12+/IL-10+, тако што повећава процентуалну заступљеност F4/80+IL-10+ макрофага у слезини.....	91

---

4.13. У слезини оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+IL10+ DCs.....	94
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>97</b>
5.1 Делесија гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису.....	98
5.2. Делесија гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева.....	102
5.3. Одсуство галектина 3 подстиче алтернативну активацију макрофага у срцу након имунизације пептидом миозина MuHC $\alpha_{334-352}$ .....	104
5.4. Дефицијенција галектина 3 је удружена са повећаном инфилтрацијом дендритских ћелија у срцу и слезини.....	105
5.5. Делесија гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу.....	107
5.6. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца.....	108
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>108</b>
<b>СКРАЋЕНИЦЕ.....</b>	<b>110</b>
<b>7. РЕФЕРЕНЦЕ.....</b>	<b>111</b>

---

## 1. УВОД

### 1.1. Миокардитис

Миокардитис је инфламаторно обољење срчаног мишића, које се карактерише дегенерацијом и/или некрозом кардиомиоцита и присуством ћелијског инфилтрата у интерстицијуму миокарда [1, 2]. Миокардитис је први пут описао 1749. године лекар *Jean Baptiste Senac* из Француске у свом раду "*Treatise on Disease of the Heart*". Термин миокардитис дефинитивно уводи лекар *Joseph Freidrich Sobernheim* 1837. године. Међутим, дефиниција миокардитиса обухватала је не само запаљење срчаног мишића већ и исхемичну болест срца, хипертензију, као и кардиомиопатије различите етиологије. Такође, до осамдесетих година двадесетог века, по дефиницији Светске здравствене организације и Федерације Кардиологије, није постојала разлика између миокардитиса и кардиомиопатије различите етиологије. Коначно, 1995. године Светска Здравствена Организација и Федерација Кардиологије, дефинише миокардитис као инфламаторно обољење срчаног мишића, чија се дијагноза поставља према утврђеним хистолошким, имунолошким и имунохистохемијским критеријумима [3].

Недавно је дефиниција миокардитиса допуњена и подразумева прецизне имунохистохемијске критеријуме [4]. Пацијентима чији је миокард инфилтриран са  $\geq 14$  лимфоцита/ $\text{mm}^2$ ,  $\leq 4$  моноцита/ $\text{mm}^2$ ,  $\geq 7$  CD3+ Т лимфоцита/ $\text{mm}^2$ , поставља се дијагноза миокардитиса. Постављање дијагнозе на основу оваквих имунохистохемијских критеријума је ограничено због малог броја пацијената којима је могуће урадити ендомиокардијалну биопсију. Штавише, иако су ови критеријуми за постављање дијагнозе широко прихваћени, на основу њих се не могу добити информације о хетерогености ћелијског инфилтрата, као што су подтипови макрофага (класично/алтеративно активисани), различите класе Т лимфоцита (Th1, Th2, Th17, CD4+FoxP3+ Treg) због чега се не може предвидети профибротички одговор на претходно присутну инфламацију [4-6].

### 1.1.1. Етиологија миокардитиса

Миокардитис се може манифестовати као акутно, субакутно или хронично запаљење миокарда, са фокалним или дифузним ћелијским инфилтратом који може прогредирати до фиброзе, ремоделовања ткива и губитка контрактилне функције. Последња, хронична фаза одговара развоју дилатационе кардиомиопатије (ДЦМ). Етиологија миокардитиса и последичне ДЦМ често је непозната. У 30-50% случајева узрок настанка ДЦМ су генетске мутације које се наслеђују аутозомно доминантно и аутозомно рецесивно. Резултати истраживања су показали да су мутације 20 гена, као што су ген за дистрофин, дезмин,  $\beta$  тежак ланац срчаног миозина, узрок настанка ДЦМ [7, 8]. Такође, миокардитис може бити узрокован широким спектром инфективних агенаса, укључујући вирусе (коксаки вирус В3 (*Coxsackie*) и аденовируси), бактерије, рикетије, хламидију, гљивице и протозое као и неинфективним агенсима као што су физички агенси (зрачење), токсини, хиперсензитивне реакције, као и одређени медикаменти (трициклични антидепресиви, антрациклин) (Схема 1) [9]. Резултати епидемиолошких истраживања су показали да вирусне инфекције имају највећу инциденцу и преваленцу у односу на остале узрочнике миокардитиса [9]. Ћелије миокарда се током вирусне инфекције оштећују цепањем цитоскелетног протеина дистрофина, чиме се нарушава дистрофин-гликопротеински комплекс што омогућава излазак секвестрираних антигена као што су миозин и тропонин [10]. Уколико је оштећење миокарда велико може настати акутна срчана инсуфицијенција. Ипак, код већине пацијената који имају вирусну инфламацију миокарда срчана инсуфицијенција споро прогредира. Брзина развоја срчане инсуфицијенције зависи од секретованих проинфламаторних цитокина, и типа стеченог имунског одговора на претходно оштећено срце [11]. У прилог томе говори и чињеница да код многих пацијената и након елиминације вируса и даље постоји инфламација миокарда. Дакле, поставља се питање у којој мери аутоимунски одговор настао током инфламације доприноси развоју прогресивне кардиомиопатије. Бројна клиничка истраживања, као и резултати експерименталних студија, указују на то да аутоимунски одговор има значајну улогу у патогенези већине миокардитиса са или без ДЦМ [12]. Аутоимунски одговор настао током хроничног миокардитиса може бити ћелијски и/или хуморални што се потврђује присуством аутореактивних Т лимфоцита и аутоантитела у

серуму [10]. Аутоантитела детектована у серуму створена су у одговору на декланширане интрацелуларне антигене као што су тешки ланац миозина, тропонин и митохондријални антигени [13]. Такође, повишене серумске вредности аутоантитела забележене су и код пацијената са акутним инфарктом миокарда, као и код других облика оштећења срчаног мишића [14]. Аутоимунски миокардитис се може јавити као изоловани клинички ентитет, као што је миокардитис циновских ћелија и неки случајеви еозинофилног миокардитиса који нису праћени периферном хипереозинофилијом. Такође, резултати истраживања су показали да се миокардитис чешће развија код пацијената са системским аутоимунским болестима, као што су системски лупус, васкулитис и Сјогренов синдром [15-17]. Примена имуносупресивне терапије је имала позитивне ефекте на срчану функцију код пацијената са миокардитисом невирусне етиологије [18, 19], што је резултирало постављање хипотезе да су инфективни агенси одговорни за развој акутног миокардитиса, док је аутоимунски одговор круцијалан током хроничне инфламације миокарда [20].

Осим генетских мутација и инфективних агенаса за настанак инфламаторних обољења миокарда и ДЦМ неопходна је и генетска предиспозиција. Бројни резултати студија указују на везу између инфламаторних срчаних обољења и HLA система (енг. *human leucocyte antigen complex-HLA*). Показано је да већина пацијената код којих се развила ДЦМ у свом хаплотипу имају HLA-DR4 [21]. Веза између инфламаторне болести миокарда и/или кардиомиопатије са одређеним хаплотиповима снажно подржава хипотезу да имунски систем игра значајну улогу у развој болести. У том контексту, испитивања на разним анималним моделима дала су нове аспекте који су укључени у патогенезу инфламаторне болести срца. Спроведене су бројне студије које указују на значајну корелацију између МНС II молекула и резистенције на индукцију миокардитиса. На пример мишеви соја А/Ј (s, a, и f хаплотип: А/Ј H-2<sup>a</sup>, А.СА H-2<sup>f</sup> и А.СВ H-2<sup>s</sup>) развјају тежак облик миокардитиса, док су мишеви са В10 подлогом (H-2 b, a, s, и хаплотип: С57BL/10Ј, В10.А, В10.С, и В10.РЛ сој) релативно резистентни на индукцију болести [22]. Иако је одређени МНС хаплотип важан за индукцију експерименталног аутоимунског миокардитиса (ЕАМ) значајна је и улога других non-МНС гена [22]. Откривена су два non-МНС локуса на мишјим хромозомима 1 и 6, познати као Eam1 и Eam2, који утичу на развој ЕАМ [23]. Недавно су описана још три генска локуса лоцирана на хромозому 1 и 4, који утичу на развој миокардитиса индукованог коксаки В3 вирусом (*Coxsackie*) [24].



Схема 1. Етиологија миокардитиса

### 1.1.2. Епидемиологија миокардитиса

Миокардитис представља обољење са широким спектром клиничких презентација у распону од асимптоматске болести до фаталног исхода. Ова чињеница, заједно са недостатком неинвазивних специфичних дијагностичких метода и симптомима који су заједнички са другим чешћим кардиоваскуларним обољењима, доводи до тога да се дијагноза миокардитиса често превиди [15]. Глобална преваленца миокардитиса је  $\approx 22$  на 100 000 пацијената годишње, такође учесталост ове болести је већа код особа мушког пола [25, 26]. Мања преваленца и тежина обољења код пацијената женског пола вероватно је резултат протективних ефекта полних хормона [12]. Показало се да естрогени хормони код мишева женског пола имају протективни ефекат током виремије и вирусне инфекције кардиомиоцита [27], као и да снижавају интензитет потенцијално штетног инфламаторног одговора у миокарду [28]. Насупрот њима, тестостерон има штетан ефекат путем инхибиције антиинфламаторног одговора код мишева мушког пола [29]. Иначе, у клиничкој пракси пацијенти женског пола старије животне доби често имају тежу

презентацију болести (погоршање вентрикуларне тахикардије и вентрикуларне фибрилације) [26]. Просечна старост пацијената са миокардитисом циновских ћелија је 42 године [30], док је просечна старост адултних пацијената који болују од других форми миокардитиса према различитим ауторима варира од 20 до 51 година [31, 32].

Епидемиолошке студије су показале да се вирусни миокардитис најчешће јавља код новорођенчади и младих особа [33]. Деца са дијагностикованим акутним миокардитисом имају десетогодишње преживљавање након трансплантације у око 60% случајева [34]. Такође, присуство вирусног генома детектује се код 25-40% пацијената са ДЦМ [35].

Код неких пацијената узрок изненадне срчане смрти може бити миокардитис [36]. Резултати бројних ретроспективних студија су указали на значајну везу између миокардитиса и изненадне срчане смрти у 2-42% случајева [37, 38]. Такође, у око 30% случајева миокардитис може прогредирати до ДЦМ [9].

### **1.1.3. Класификација миокардитиса**

Миокардитис се најчешће класификује према имунопатолошким критеријумима и клиничком току болести на: акутни, субакутни и хронични.

#### **1.1.3.1. Акутни лимфоцитни миокардитис**

На основу састава инфламаторног инфилтрата у срцу, најчешћи облик миокардитиса је лимфоцитни миокардитис. Главни хистолошки знак акутног лимфоцитног миокардитиса је инфилтрација миокарда мононуклеарним ћелијама укључујући CD3+ Т лимфоците, CD68+ макрофаге, дендритске ћелије и урођеноубилачке ћелије [15]. Такође, у овој фази болести могу се детектовати и минимални знаци фиброзе срчаног мишића. Акутни лимфоцитни миокардитис је најчешћи тип миокардитиса и углавном је вирусне етиологије [15]. Код већине пацијената прогредира до ДЦМ.



### **1.1.3.2. Хронични лимфоцитни миокардитис**

Хронични лимфоцитни миокардитис хистолошки се карактерише фиброзом миокарда и леукоцитном инфилтрацијом. Величина фиброзе зависи од типа и дужине трајања инфламаторног процеса [4]. Дијагноза хроничног миокардитиса базирана је на хистолошкој или имунохистохемијској детекцији лимфоцитног инфилтрата у миокарду шест месеци након почетне евалуације болести. Код пацијената са хроничним миокардитисом серумске вредности аутоантитела усмерених према срчаном миозину у директној су корелацији са тежином систолне и дијастолне дисфункције срца [39]. Временски период за прогресију од акутног до хроничног запаљења је непредвидив и променљив.

### **1.1.3.3. Миокардитис циновских ћелија**

Миокардитис циновских ћелија настаје као резултат самосталног аутоимунског одговора и/или у склопу других аутоимунских болести [40]. Најчешће се јавља код старијих жена. Миокардитис циновских ћелија карактерише јединствена хистолошка слика и прогресија ка субакутним и хроничним компликацијама (као што је ДЦМ) које угрожавају живот. Прогресија до ДЦМ јавља се у око 80% случајева [15]. Хистолошку слику овог типа миокардитиса карактерише упадљива леукоцитна инфилтрација (лимфоцити, плазмоцити, макрофаги) и присуство мултинуклеусних циновских ћелија. За разлику од претходно описаних типова миокардитиса поља инфламације су већа а доминантну ћелијску популацију чине мијелоидне ћелије дефинисане као CD68+ ћелије. Врло често у инфилтратима се могу детектовати и еозинофили [41]. Често се уочавају и поља некрозе. Познат је као *Fiedler-ov* миокардитис.

#### **1.1.3.4. Еозинофилни миокардитис**

Главно хистолошко обележје еозинофилног миокардитиса је присуство обимног еозинофилног инфилтрата у интерстицијуму миокарда. Еозинофилни миокардитис се може јавити као посебан клинички ентитет или у склопу са периферном еозинофилијом (примарна идиопатска хипереозинофилија или хронична еозинофилија разне етиологије). Клинички се манифестује конгестивном срчаном инсуфицијенцијом. Најтежи облик еозинофилног миокардитиса је некротизујући еозинофилни миокардитис, који се карактерише акутним почетком, брзом прогресијом, претежно дифузним еозинофилним инфилтратом и великим пољима некрозе. Дугорочна прогноза је лоша и поред примене имуносупресивне терапије [42].

#### **1.1.3.5. Дилатациона кардиомиопатија**

Дилатациона кардиомиопатија се карактерише хроничном дилатацијом леве и десне коморе са нормалном или смањеном дебљином зида леве коморе и поремећајем контрактилности миокарда [43]. ДЦМ је главни узрок срчане инсуфицијенције код особа млађих од 40 година. ДЦМ може настати као компликација миокардитиса изазваног вирусима, бактеријама, међутим клиничке студије су показале да у 60% случајева узрок генетски фактори [44].

#### **1.1.3.6. Саркоидотични миокардитис**

Саркоидоза представља системску, идиопатску аутоимунску болест. Настаје као последица дисфункције антиген презентујућих ћелија и карактерише се хроничним запаљењем ткива и стварањем гранулома у органима као што су срце, бубрези и плућа. Саркоидотични миокардитис се карактерише обимном инфилтрацијом активираних макрофага, што за последицу има хроничну инфламацију и оштећење ткива [4].

#### **1.1.4. Клиничка презентација миокардитиса**

Клиничка презентација миокардитиса је разнолика. Акутни миокардитис може резултирати акутним компликацијама или асимптомтски прогредирати до хроничне срчане инсуфицијенције. Најчешћи клинички знаци миокардитиса су симптоми слични грипу, аритмије, палпитације, вртоглавице и синкопа. Такође и електрокардиографске промене су неспецифичне (ST елевација, блок срчаних грана). Златни стандард за дефинитивну дијагнозу миокардитиса је позитивна ендомиокардијална биопсија. Према *Dallas* критеријумима дијагноза се поставља на основу присуства моноклеарног инфилтрата у интерстицијуму миокарда и величине оштећења кардиомиоцита. Такође, за постављање дефинитивне дијагнозе миокардитиса, у узорку добијеном након биопсије одређују се постојање одређеног HLA хаплотипа [45]. У постављању дијагнозе миокардитиса може помоћи и сцинтиграфија миокарда антимиозинским моноклонским антителима. Међутим, осетљивост ове дијагностичке процедуре је ниска зато што показује некрозу миокарда различите етиологије [46]. У процени степена оштећења миокарда може помоћи и одређивање серумских вредности креатинин киназе, тропонина I и тропонина T [47].

#### **1.1.5. Аутоимуност у инфламаторним срчаним обољењима**

Аутоимунске болести, први пут су описали *Ian Mackay* и *Macfarlane Burnet* као неспособност организма да толерише сопствене ћелије и ткива, што резултира неадекватним имунским одговором и активацијом аутореактивних T лимфоцита и/или аутоантитела [48]. За најмање 15 болести познато је да су настале као последица аутоимунског одговора, док индиректни докази постоје за још преко 80 патолошких стања [49]. Аутоимунске болести могу бити органспецифичне и системске болести. Групи органспецифичних болести припадају: дијабетес мелитус тип I, мултипла склероза, мијастенија гравис, аутоимунски тиреоидитис и аутоимунски миокардитис док системске аутоимунске болести представљају системски лупус, реуматоидни артритис, антифосфолипидни синдром и склеродерма итд [50]. Аутоимунске болести настају након активације аутореактивних T лимфоцита који нису елиминисани негативном селекцијом у

тимусу током сазревања. У оштећењу неких органа и ткива поред аутореактивних Т лимфоцита могу учествовати и аутоантитела.

Постоји неколико хипотеза о томе зашто се развија аутоимуност. У предложеним хипотезама као окидач и покретач аутоимунског одговора наводе се: средински фактори, инфекције, повреде и наследна предиспозиција. Разумевање аутоимунских болести отежано је чињеницом да се и код здравих особа могу наћи аутоантитела као и аутореактивни Т и В лимфоцити [51]. Иако се код неких особа могу детектовати аутореактивни Т лимфоцити и аутоантитела, аутоимунске болести се развијају само код осетљивих тј. предиспонираних особа. Бројни докази упућују на значајну повезаност између аутоимунских болести и инфекција микроорганизама [52, 53]. Једно од могућих објашњења је присуство секвенцијалних хомолога између патогена и протеина организма, што може резултирати унакрсном реакцијом са сопственим антигенима и развојем аутоимунских болести [54, 55]. Овај механизам је познат као молекулска мимикрија. Друго могуће објашњење је да микроорганизми експримирају антигене који активирају ћелије имунског система и покрећу инфламаторни одговор током кога настаје оштећење ткива. Овај механизам је познат под називом "ефекат посматрача" (енг. *bystander*) [12]. Продукција инфламаторних медијатора током инфекције представља једно од могућих разлога за развој аутоимуности након инфекције. Да инфламаторни медијатори имају значајну улогу у развоју аутоимуности показано је индуковањем експерименталног тиреоидитиса, у коме су као не-антигенспецифична стимулација инфекције (адјувантни ефекат) коришћене микобактеријске компоненте комплетног *Freund* адјуванта (CFA). Модификација, ослобађање секвестрираних или неадекватна експресија сопствених антигена или експресија криптичних епитопа је трећи предложени механизам за настанак аутоимунских болести.

Када је реч о улози аутоимуности у инфламаторним обољењима срчаног мишића, резултати клиничких студија и експерименталних истраживања пружају бројне доказе који указују да аутоимуност има значајну патогенску улогу у већини случајева хуманог миокардитиса и ДЦМ [13]. У прилог овим истраживањима говори и податак да кардиомиоцити изоловани из пацијената који болују од миокардитиса и ДЦМ исказују већи ниво експресије МНС молекула I и II класе [56]. Додатно, показано је да се миокардитис чешће јавља код пацијената са системским аутоимунским болестима, као

што су лупус и целијакија [18]. Инциденца миокардитиса код пацијената који болују од лупуса је 3-15%. И без дијагностикованих системских аутоимунских болести аутоантитела на компоненте миокарда детектована су код особа оболелих од миокардитиса. Резултати испитивања показали су присуство специфичних антимиозинских антитела у 59% пацијената са миокардитисом [57]. Такође, *Konstadoulakis* и сарадници, као и *Caforio* су показали да су антитела управљена према срчаном миозину присутна и код 86% пацијената са ДЦМ [58, 59]. Међутим, и код пацијената са другим срчаним обољењима се детектују аутоантитела на миозин. Група истраживача је показала да су клинички симптоми блажи и ејекциона фракција очувана, код пацијената код којих нису детектована антимиозинска антитела у поређењу са групом пацијената код којих постоје миозин специфична аутоантитела [39]. Поред антимиозинских антитела, код 50% пацијената са ДЦМ детектују се антитела на срчани  $\beta 1$  адренергички рецептор [60]. Предности имunosупресивне терапије представљају додатни индиректни доказ о аутоимунском пореклу одређених подтипова миокардитиса. Показано је да примена имunosупресивне терапије код пацијената са миокардитисом циновских ћелија, еозинофилним и лимфоцитним миокардитисом има позитивне ефекте, што говори у прилог хипотези да су неки подтипови миокардитиса аутоимунског порекла [30].

#### **1.1.6. Анимални модели миокардитиса**

Бројна истраживања била су усмерена на испитивање имунолошких механизма који су повезани са иницијацијом, акутном фазом и прогресијом миокардитиса у ДЦМ. Већина доказа да је миокардитис болест посредована аутоимунским механизмима је добијена проучавањем патогенезе ове болести на анималним моделима миокардитиса.

##### **1.1.6.1. Експериментални миокардитис индукован коксаки В3 вирусом**

Експериментални вирусни миокардитис се најчешће индукује инффицирањем осетљивих сојева мишева са коксаки В3 вирусом (*Coxsackie*). Коксаки В3 вирус је ентеровирус из породице *Picornaviridae* и један је од главних узрочника вирусног миокардитиса код људи [61]. Описана су два вирусна анимална модела миокардитиса

индукованих В3 коксаки вирусом. Први модел миокардитиса индукованог В3 коксаки вирусом карактерише се појавом акутног миокардитиса са значајним оштећењем срчаног ткива и изненадном смрти унутар прве недеље од инфекције (70% животиња угине између 4 и 7 дана након инфекције) [61, 62]. Други модел, подразумева индукцију миокардитиса апликацијом срчаног миозина изолованог из ткива срца мишева којима је индукован миокардитис ињектирањем коксаки В3 вируса (енг. *heart-passaged CVB3 virus*). У овом моделу забележен је блажи акутни ток миокардитиса али и прогресија болести до хроничне ДЦМ [63]. Експериментални акутни вирусни миокардитис се може индуковати код осетљивих сојева мишева као што су BALB/с, који развијају болест од 7 до 14 дана након инфекције, док се хронични миокардитис развија између 35. и 56. дана. Релативно резистентни сојеви, као што је C57BL/6, развијају блажи облик акутног миокардитиса и у много мањем проценту болест прогредира до ДЦМ. Пик инфламације у овом моделу вирусног миокардитиса је 9. дана од инфекције и смртност је значајно нижа у поређењу са оболелим мишевима BALB/с соја. На хистопатолошким препаратима ткива срца изолованог из мишева инфицираних *heart-passaged CVB3*, уочавају се фокални ћелијски инфилтрати који се састоје углавном од макрофага, неутрофила, еозинофила, В лимфоцита, CD4+ Т и CD8+ Т лимфоцита, НК и маст ћелија без знакова некрозе и фиброзе кардиомиоцита [64]. Такође, детектује се и значајан ниво IgG антитела, специфичних за срчани миозин. Већина мишева C57BL/6 соја се спонтано опоравља и нема знакова претходног запаљенског процеса. Међутим, осетљиви сојеви мишева као што су BALB/с, А/Ј и SJL/Ј мишеви развијају хронични миокардитис са генерализованим моноклеарним ћелијским инфилтратом праћеним повећаном продукцијом IgG антитела специфичних за срчани миозин [65]. Сви сојеви мишева који развијају другу фазу инфекције имају исти H-2 хаплотип. Ипак, резистенција на миокардитис код релативно резистентних сојева, као што су C57BL/6 мишеви, може се укинути применом LPS, IL-1b или TNF- $\alpha$  [66].

### 1.1.6.2. Експериментални аутоимунски миокардитис

Модел експерименталног аутоимунског миокардитиса (ЕАМ) омогућава испитивање имунопатолошких процеса укључених у патогенезу миокардитиса код мишева, а тиме и посредно аутоимунског миокардитиса код људи. ЕАМ се може успоставити имунизацијом мишева целим срчаним миозином или деловима  $\alpha$ -тешког ланца миозина са комплентним Фројндовим адјувансом (енг. *Freund's Complete Adjuvant, CFA*). Овај начин имунизације стимулише аутоимунски одговор у срцу, што резултира инфилтрацијом миокарда инфламаторним ћелијама, продукцијом миозин специфичних аутоантитела и деструкцијом кардиомиоцита. Хистолошка слика миокарда оболелих мишева је доста слична патохистолошком налазу хуманог миокардитиса. И у експерименталном моделу миокардитиса као и у хуманом миокардитису уочава се моноклеарни ћелијски инфилтрат (80% моноцити и макрофаги, 16% Т лимфоцити и 2% В лимфоцити) праћен едемом, некрозом и фиброзом кардиомиоцита [67]. ЕАМ одговара субакутној фази миокардитиса индукованог В3 коксаки вирусом [66]. Током иницијалне фазе ЕАМ (првих 10 дана након прве имунизације) не уочавају се знаци инфламације у срчаном ткиву и не могу се детектовати специфична аутоантитела на миозин [68]. У субакутној фази ЕАМ, (између 10. и 21. дана након имунизације) у миокарду се јасно уочавају знаци инфламације а у серуму се могу детектовати аутоантитела специфична за миозин. Током касне фазе ЕАМ (21. дана од имунизације) запаљенске промене се постепено смањују и развија се фиброза срчаног мишића [11]. ЕАМ се може индуковати и применом тропонина I у комбинацији са комплетним Фројндовим адјувансом [69]. Оштећење миокарда и патохистолошка слика ЕАМ индукованом применом тропонина I је врло слична ЕАМ који је индукован срчаним миозином.

Осетљивост мишева на индукцију ЕАМ је делимично повезана са МНС хаплотипом. Најосетљивији сојеви мишева на индукцију ЕАМ су А/Ј сој (А/Ј H2<sup>a</sup>, А.ВУ H2<sup>b</sup>, А.СА H2<sup>f</sup> и А.СВ H2<sup>s</sup>), као и ВАLB/c мишеви са H2<sup>d</sup> хаплотипом [22]. Иако су наведени сојеви мишева са различитим хаплотиповима осетљиви на индукцију ЕАМ, постоје значајне разлике у антигену који се користи за имунизацију појединих сојева. Тако, ВАLB/c мишеви развијају ЕАМ имунизацијом МуНС $\alpha_{614-629}$  пептидом, SWXJ мишеви МуНС $\alpha_{406-425}$  и МуНС $\alpha_{1631-1650}$  пептидом, док се код мишева соја А/Ј миокардитис

индукује применом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида као и сТnI $_{105-122}$ . Мишеви соја А/Ј имунизовани тропонином I или миозином, развијају тежак миокардитис са кардиомегалијом, фиброзом, редукованом ејекционом фракцијом и повећаним морталитетом [70]. Много блажи облик миокардитиса и са мањом инциденцом болести развијају имунизовани мишеви соја С57BL/10 Ј (В10.А Н2<sup>а</sup>, В10.С Н2<sup>с</sup> и В10.РL Н2<sup>у</sup>) [71]. Резултати новијих истраживања описују и мишеве који спонтано развијају миокардитис, као што су HLA-DQ8 трансгени NOD мишеви (NOD.DQ8.А $\beta$ о) [72]. У овом експерименталном моделу детектован је већи степен систолне дисфункције, обимнији моноклеарни ћелијски инфилтрат и већа смртност код NOD.DQ8.А $\beta$ о мишева. Резултати ових студија указују на чињеницу да у патогенези експерименталног миокардитиса осим присуства одређеног хаплотипа, важну улогу игра и пол.

### **1.1.7. Имунопатогенеза миокардитиса**

Медијатори имунског одговора играју кључну улогу у патогенези и исходу бројних срчаних обољења, укључујући миокардитис, дилатациону и хипертрофичну кардиомиопатију. У процесу ремоделовања срчаног ткива укључене су ћелије урођеног и стеченог имунског одговора које доприносе разградњи екстрацелуларног матрикса, депоновању колагена, хипертрофији и/или апоптози кардиомиоцита. Већина имунски посредованих механизма који су укључени у настанак дисфункције и срчане инсуфицијенције још увек су непознати. С тога су анимални модели ЕАМ корисни у циљу испитивања патогенезе инфламаторних болести срца.

Студије спроведене на анималним моделима и резултати клиничких студија показују да су активирани аутореактивни CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити главне ефекторске ћелије у аутоимунском миокардитису [73]. Иако су CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити главне ефекторске ћелије, за развој аутоимунског миокардитиса неопходна је и активација других ћелија урођеног и стеченог имунског одговора [74]. Показано је да С3 компонента комплемента има кључну улогу у развоју ЕАМ посебно у иницијалној фази болести. Деплеција С3 компоненте у време иницијације болести али не и у време прогресије, је од суштинске важности за превенцију ЕАМ [75]. Осим С3 компоненте комплемента у иницијалној фази болести значајна је и улога маст ћелије, што је и показано испитивањем активности ових ћелија у



миокардитису индукованим коксаки В3 вирусом [76]. Наиме, показано је да дегранулација резидентних маст ћелија настаје шест сати након инфекције коксаки В3 вирусом. Током акутне фазе ЕАМ неутрофили и еозинофили представљају део инфламаторног инфилтрата и њихов проценат међу укупним инфилтрацијским леукоцитима значајно се повећава са прогресијом болести [77, 78]. За прогресију болести и прелазак из иницијалне тј. акутне у субакутну и хроничну фазу од круцијалног значаја је активација аутореактивних CD4+ Т лимфоцита [73]. Резултати експерименталних студија показују да се ињектирањем дендритских ћелија које су обрадиле срчани миозин (енг. *CM peptide-pulsed*) развија ЕАМ у BALB/с мишевима са доминантним CD4+ Т ћелијским одговором [79].

### **1.1.8. Улога урођеног имунског одговора у аутоимунском миокардитису**

Активација ћелија урођеног имунског одговора игра значајну улогу у патогенези миокардитиса. Главне ћелије урођеног имунског одговора укључене у патогенезу миокардитиса су урођеноубилачке ћелије (енг. *Natural killer, NK*), неутрофили, еозинофили, моноцити/макрофаги и урођене лимфоидне ћелије (енгл. *Innate lymphoid cells-ILCs*) [15].

Популација ћелија које прве инфилтришу миокард након вирусне инфекције су NK ћелије. NK ћелије имају краткотрајну протективну улогу током акутне фазе вирусног миокардитиса [80]. Показано је да мишеви са дефицијенцијом NK ћелија развијају тежи облик вирусног миокардитиса [80]. Такође, протективна улога NK ћелија осим у вирусном миокардитису показана је и у аутоимунском миокардитису. Резултати истраживања патогенезе ЕАМ на анималним моделима су показали да смањење броја NK ћелија резултира већом инфламацијом, фиброзом и губитком срчане функције [81]. NK ћелије осим што ограничавају репликацију вируса, своја протективна дејства остварују и деловањем на срчане фибробласте, мењајући њихову секрецију хемокина. Такође, индукују апоптозу и смањују инфилтрацију миокарда еозинофилима [81].

Током развоја ЕАМ, миокард инфилтришу и неутрофили. Након активације, неутрофили ослобађају протеолитичке ензиме, који могу оштетити кардиомиоците и екстрацелуларни матрикс. *In vitro* студије показале су да неутрофили оштећују кардиомиоците секрецијом слободних радикала и нарушавају њихову контрактилност што

за последицу има поремећај срчане функције [82]. Хемотакса и активација неутрофила у миокарду зависи од присуства IL-17 и GM-CSF (енг. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) [83].

Осим неутрофила и друга субпопулација полиморфонуклеарних ћелија често се детектује у оболелом миокарду и њихов проценат међу укупним инфилтрацијским леукоцитима корелира са интензитетом инфламације током акутне фазе ЕАМ. Еозинофили не представљају ефекторске ћелије само у еозинофилном ЕАМ већ и у осталим моделима аутоимунског миокардитиса. У оболелом миокарду еозинофили се углавном детектују у близини мултинуклеусних гигантских ћелија чије присуство представља још један маркер унапредовале инфламације како код људи тако и код мишева. Присуство еозинофила није ограничено само на акутну фазу миокардитиса. У инфламираном миокарду детектују се еозинофили и након успостављања стеченог имунског одговора [84].

Од ћелија урођене имуности, уз NK ћелије, неутрофиле и еозинофиле у патогенези ЕАМ значајну улогу имају моноцити/макрофаги.

Подаци добијени из експерименталних и клиничких студија показују да се у ткиву оболелог миокарда детектује значајно веће присуство моноклеарних фагоцита тј. моноцита, макрофага и дендритских ћелија. У зависности од патохистолошког процеса ове ћелије модулишу (повећавају или супримирају) способност миокарда да се опорави након оштећења. Интересантно је да и смањен и повећан број макрофага у оштећеном миокарду смањује репарацију ткива. Још увек није у потпуности разјашњено која од субпопулација макрофага промовише инфламацију или репарацију ткива срца [85, 86]. Познато је да је срце један од неколико адултних органа који садрже макрофаге пореклом из жуманчане кесе. Овакве макрофаге називају се резидентне, способне су да се самообнављају и учествују у одржавању ткивне хомеостазе у срцу [87]. Ипак, након оштећења миокарда доминантну популацију чине макрофаги настали из Ly6C моноцита регрутованих из костне сржи и слезине [88, 89]. Макрофаге настале из Ly6C<sup>high</sup> популације моноцита чија је улога уклањање ткивног дегриса насталог од оштећених кардиомиоцита и секреција проинфламаторних цитокина називају се конвенционалне или класично активирание M1 макрофаге. У касним фазама запаљења, када се смањује интензитет инфламације регрутовани Ly6C<sup>high</sup> моноцити могу диференцирати у алтернативно

активирани M2 макрофаге. Према томе Ly6C<sup>high</sup> моноцити могу диференцирати и у M1 и M2 макрофаге [90, 91]. Међутим, Ly6C<sup>low</sup> моноцити регрутовани у касној фази запаљења могу диференцирати само у M2 макрофаге [91]. Хумани CD14<sup>high</sup> моноцити/макрофаги одговарају мишјм Ly6C<sup>high</sup> ћелијама, док су CD14<sup>int</sup> еквивалентни Ly6C<sup>low</sup> макрофагама [92]. Ly6C<sup>high</sup> моноцити се регрутују у оштећен миокард преко CCR2 и диференцирају у M1 макрофаге [93, 94]. M1 макрофаге секретују IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  и исказују фагоцитне, протеолитичке и проинфламаторне функције [95]. M1 макрофаге фагоцитују и уклањају ткивни дебрис у раној фази оштећења срца. У каснијим фазама, Ly6C<sup>low</sup> моноцити се регрутују у миокард преко CX3CR1 и диференцирају у M2 макрофаге који секретују TGF- $\beta$  и IL-12. M2 макрофаге доприносе антиинфламаторном одговору, неоваскуларизацији и активацији миофибробласта током процеса репарације срца [94, 96].

Резултати студија у погледу улоге макрофага су опречни. У неколико студија је показано да макрофаге имају кардиопротективне ефекте. У једној од таквих студија је показано да се деплецијом срчаних макрофага индукује јак CD4<sup>+</sup> Т инфламаторни инфилтрат што за последицу има смањену контрактилност кардиомиоцита [97]. У мишјем моделу оштећења срца показано је да се деплецијом макрофага значајно умањује уклањање ткивног дебриса из миокарда и неоваскуларизација што резултира дилатацијом леве коморе и високом стопом морталитета [98]. Резултати бројних студија указују да макрофаге своју кардиопротективну улогу остварују секрецијом цитокина VEGF-A и TGF- $\beta$  који учествују у одржавању нормалне контрактилности кардиомиоцита и поспешују репарацију након инфаркта миокарда [99-101].

*Cihakova* и сарадници [102] су показали да делеција гена за IL-13 смањује број алтернативно активисаних макрофага, дефинисаних као CD206<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup> ћелије, и повећава број класично активисаних макрофага. Повећан број M1 макрофага у срцима IL-13 *knock-out* мишева је повезан са тежим обликом миокардитиса, већим инфламаторним инфилтратом и смањеном срчаном функцијом у хроничној фази болести.

У студијама у којима је ЕАМ индукован применом тропонина Т показана је значајна улога проинфламаторног HMGB1 молекула (енг. *High-mobility group box 1*) током акутне фазе ЕАМ [103]. HMGB1 молекул представља лиганд за макрофагне рецепторе познате као RAGE (рецептори за крајње продукте гликације) рецептори. Интеракција

између HMGB1 молекула и RAGE индукује поларизацију макрофага ка M1 фенотипу што за последицу има већу инфламацију миокарда [103].

Међутим као што је познато популација макрофага је хетерогена, сложена и још увек није у потпуности стандардизовна. До сада је опште прихваћена функционална бинарна класификација макрофага на M1 и M2 [70]. Бројни резултати указују да ова два фенотипски различита типа макрофага показују различите ефекте на процес ремоделирања ткива након повреде. Такође, макрофаге насељавају и здрав миокард и у зависности од њиховог фенотипа могу учествовати у одржавању ткивне хомеостазе или промоције болести. Тако је у погледу улоге ових ћелија у срчаним обољењима осим њиховог кардиопротективног дејства показана и супротна улога. Наиме, показано је да макрофаге срца продукују IL-10, активирају фибробласте и продукцију и депоновање колагена што за последицу има смањену контрактилност миокарда и умањену дијастолну функцију. Могуће објашњење за овакву улогу макрофага може се наћи у њиховој пластичности фенотипа и динамичним интеракцијама са суседним ћелијама посебно са миофибробластима [104].

Резултати скорашњих студија показују да макрофаги са Ly6C<sup>high</sup> фенотипом, који инфилтришу миокард током ЕАМ, експримирају рецептор за IL-17. На тај начин макрофаги, заједно са неутрофилима учествују у поларизацији ка Th17 имунским одговором. Показано је да IL-17A није од пресудног значаја у раним фазама миокардитиса али је један од кључних фактора за прогресију миокардитиса у ДЦМ [105].

На основу публикованх студија може се закључити да су макрофаги неопходни током акутне фазе миокардитиса али су такође одговорни и за прогресију болести у ДЦМ. У различитим фазама ЕАМ доминантне су различите популације имунских ћелија, па је тако у пику болести доминантну улогу имају CD11b<sup>+</sup> моноцити. CD11b<sup>+</sup> моноцити представљају главну ћелијску популацију у миокарду током акутне фазе инфламације, међутим током хроничне фазе инфламације имају протективну улогу. Заправо, CD11b<sup>+</sup> моноцити представљају највећи део инфилтришућих моноклеара у срцу током пика болести. Међутим, CD11b<sup>+</sup> моноцити су главни негативни регулатори секреције IFN- $\gamma$  који супримира аутореактивне CD4<sup>+</sup> Т лимфоците и значајно смањује тежину ЕАМ [106].

Познато је да урођене лимфоидне ћелије имају значајну улогу у патогенези аутоимунских обољења као што су Кронова болест, псоријаза, дерматитис и бронхијална

астма [107]. Још увек је недовољно истражена њихова улога у миокардитису. Испитивања на анималним моделима су показала значајну улогу ових ћелија у имунском одговору у аутоимунском (ЕАМ модел) и вирусном миокардитису.

### **1.1.9. Улога стеченог имунског одговора у имунопатогенези миокардитиса**

Познато је да је миокардитис CD4<sup>+</sup> зависна аутоимунска болест, посредована цитокинима које ове ћелије секретују [73]. Трансдукција сигнала између ћелија одвија се посредством цитокина, па је стога идентификација цитокина и њихових мета важна у сагледавању патофизиолошких механизма и потенцијалних терапеутских циљева. CD4<sup>+</sup> популација Т лимфоцита у зависности од цитокинског миљеа и антигенпредентујућих ћелија, може да диференцира у субсетове са терминалним фенотипом. До сада је идентификовано неколико субпопулација CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита и то: Th1, Th2, Th17, Treg и Th9 [108, 109].

#### **1.1.9.1. Улога Th1 ћелија у аутоимунском миокардитису**

Као и у другим аутоимунским болестима, активација Th1 лимфоцита, специфичних за сопствене антигене, је један од главних ефекторских механизма [110]. Th1 лимфоцити су дефинисане као CD4<sup>+</sup> ћелије које првенствено продукују IFN- $\gamma$  [111]. Високи нивои IFN- $\gamma$  забележени су у мишевима оболелим од тешког облика вирусног миокардитиса, такође и у серуму пацијената са идиопатском дилатираном кардиомиопатијом [112, 113]. Повећана продукција IFN- $\gamma$  забележена је и код хуманизованих мишева који спонтано развијају миокардитис при чему је детектовано и значајно веће обољевање животиња женског пола чија је инциденца обољевања била у корелацији са високим вредностима IFN- $\gamma$  [114, 115]. Трансгени мишеви који прекомерно експримују ген за IFN- $\gamma$  развијају хронични миокардитис и кардиомиопатију тако што делују као потентни индуцери системских инфламаторних цитокина и то првенствено IL-12 и TNF- $\alpha$  [116, 117]. IL-12 на сличан начин делује као и IFN- $\gamma$ . Мишеви третирани егзогеним IL-12 развијају тежи облик миокардитиса [118, 119]. Међутим, сасвим супротни резултати се добијају применом блокирајућих IFN- $\gamma$  моноклонских антитела или делецијом гена за IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  *knock-out*

(*IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup>) мишеви развијају много теже облике неколико аутоимунских болести као што су експериментални аутоимунски енцефалитис, експериментални реуматоидни артритис [120]. Такође, тежи облик ЕАМ се развија у мишевима који су *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup>, *IFN $\gamma$* *gr*<sup>-/-</sup>, *Tbx21*<sup>-/-</sup> и животињама које су третиране анти-IFN- $\gamma$  моноклонским антителима [118, 119, 121, 122]. Интересантно је да када се *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup> мишеви инфицирају коксаки В3 вирусом, развијају много тежи облик хроничног поствирусног миокардитиса у поређењу са оболелим дивљим типом мишева (енг. *wild type*, *WT*) [123]. Вирусни миокардитис индукован у *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup> мишевима прогредирао је до обимног фиброзног ремоделирања срца, констриктивне и ДЦМ које су се често завршавале смрћу [123, 124]. Могуће објашњење протективне улоге IFN- $\gamma$  може се наћи у резултатима студија које показују да овај цитокин индукује апоптозу аутореактивних Т ћелија [125], односно поседује антипролиферативне и имуносупресивне ефекте на лимфоидне и мијелоидне ћелије [123, 126]. Али највероватније је да IFN- $\gamma$  поседује и патогене и протективне ефекторске функције које зависе од многобројних сигнала из микроокружења.

Осим IFN- $\gamma$  као главног цитокина у Th1 имунском одговору, значајну улогу има и IL-12 као примарни медијатор ових ћелија. Показано је да су IL12R $\beta$ 1 и STAT-4 дефицијентни мишеви отпорни на индукцију миокардитиса, док егзогена примена рекомбинантног IL-12 погоршава тежину ЕАМ [118]. Такође, IL-12 *knock-out* мишеви (*IL12p35*<sup>-/-</sup>) развијају аутоимунски миокардитис, док су *IL12p40*<sup>-/-</sup> резистентни на индукцију ЕАМ [127, 128].

### **1.1.9.2. Улога Th2 ћелија у аутоимунском миокардитису**

Th2 лимфоцити су дефинисане као CD4+ ћелије које првенствено продукују IL-4 [129]. Да је Th2 имунски одговор укључен у патогенезу ЕАМ или вирусних инфекција показују резултати малобројних студија. Између осталог показано је да се IL-4 и остали Th2 цитокини могу детектовати у срцу мишева инфицираних коксаки вирусом В3 односно и код пацијената са миокардитисом и идиопатском кардиомиопатијом [130, 131]. Такође, је показано да развој Th2 одговора зависи од генетске предиспозиције тј. присуства одређеног генотипа. Тако је показано да А/Ј мишеви развијају тежи облик ЕАМ у поређењу са BALB/с мишевима [22]. Разлог зашто А/Ј мишеви развијају тежи облик

миокардитиса се налази у карактеристичном фенотипу који ови мишеви поседују тј. овај сој мишева првенствено развија Th2 одговор што је и потврђено присуством еозинофила и мултинуклеусних гигантских ћелија у ткиву миокарда. Да је Th2 доминантан у патогенези ЕАМ у А/Ј мишева показано је применом антитела која блокирају IL-4. Блокадом IL-4 значајно се смањује инфламација и тежина болести у овом соју мишева [78]. Да су сојне разлике пресудне у патогенези болести показује и истраживање спроведено на *IL-4<sup>-/-</sup>* који због делеције гена за IL-4 развијају болест која је по тежини врло слична ЕАМ у WT BALB/c мишева. Ови резултати указују да блокада или делеција IL-4 покреће механизме болести који су различити између два осетљива соја мишева [102].

За разлику од аутоимунског миокардитиса у инфективним моделима инфламације срца IL-4 супримира антивирусни или антибактеријски имунски одговор, што је и показано апликацијом рекомбинантног IL-4 током инфекције коксаки вирусом В3. Резултати ове студије показују да мишеви којима је апликован рекомбинантни IL-4 имају лакши облик миокардитиса и бољу срчану функцију [132]. Протективна улога IL-4 показана је на мишевима који су IL-4 дефицијентни и инфицирани *Borrelia spirochetes*. Наиме, резултати истраживања су показали да инфициране *IL-4<sup>-/-</sup>* животиње развијају тежи облик миокардитиса у поређењу са контролном групом [133]. Слични резултати добијени су када су *IL-4<sup>-/-</sup>* мишеви инфицирани *Trypanosoma cruzi* [134]. Могуће објашњење се може наћи у чињеници да своје ефекторске функције Th2 ћелије остварују не само секрецијом IL-4 већ и секрецијом IL-13. Да IL-13 има значајну улогу у патогенези ЕАМ показано је испитивањем ове болести на мишевима дефицијентним за IL-13 [102]. Када се вирусни аутоимунски миокардитис и ЕАМ индукују у *IL-13<sup>-/-</sup>* мишевима развија се снажна, тешка инфламација срца праћена фиброзом и прогресијом до ДЦМ [102]. Да IL-13 има протективну улогу у ЕАМ показано је индуковањем болести у *IL-13<sup>-/-</sup>IL-4<sup>-/-</sup>* мишевима који су имали значајно тежи ток болести и инфламацију срца у поређењу са *IL-13<sup>-/-</sup>*, што указује на доминантну улогу IL-13 у односу на IL-4 [102]. Пошто, мишји Т и В лимфоцити не експримују рецептор за IL-13 предпоставља се да овај протективни цитокин вероватно продукују нелимфоидне ћелије у првом реду макрофаге.

### **1.1.9.3. Улога Th17 ћелија у аутоимунском миокардитису**

Експериментални аутоимунски миокардитис илуструје само један од модела за које Th1/Th2 баланс није довољан да би се објаснила патофизиологија болести, нарочито у погледу на парадоксалне протективне функције посредоване IFN- $\gamma$ . Потенцијално решење овог проблема видело се након откривања новог субсета ефекторских CD4<sup>+</sup> ћелија које продукују IL-17A и назване су Th17 лимфоцити [135]. Диференцијација и пролиферација наивних лимфоцита у Th17 ћелије је усмерена цитокинима TGF- $\beta$ , IL-6 и IL-23 [136-139]. Као и у другим аутоимунским болестима и у ЕАМ показано је да Th17 ћелије имају доминантну патогену улогу у односу на Th1 ћелије. Мишеви који су подвргнути адоптивном трансферу Th17 ћелија имали су тежу болест од мишева на којима је извршен адоптивни трансфер Th1 лимфоцита [121]. Међутим, скорашње студије показују да IL-17 није значајан у акутној и субакутној фази болести већ да је његова патогена улога повезана са хроничном фазом миокардитиса [83]. Тако је показано да контролни мишеви и IL-17<sup>-/-</sup> мишеви имају врло сличну инфламацију срца до 21. дана од индукције болести. Тек након 21. дана IL-17<sup>+/+</sup> мишеви су развили значајну фиброзу срца и ДЦМ која у том обиму није детектована у контролној групи. За разлику од аутоимунског миокардитиса IL-17A Th17 ћелије имају протективну улогу настале инфекцијом коксаки вирусом В3 и *T. cruzi* [140, 141]. Такође, постоје докази да од поларизације у правцу Th17 ћелија зависи и осетљивост мишева на индукцију ЕАМ. Наиме, мишеви са различитим *background* стварају Th17 ћелије у већем или мањем броју. Тако је показано да су A.SW мишеви осетљиви на индукцију ЕАМ управо због могућности стварања јаког Th17 одговора. За разлику од њих B10.S мишеви су резистентни на индукцију ЕАМ услед слабе поларизације у правцу Th17 имунског одговора [142].

### **1.1.9.4. Улога T регулаторних ћелија у аутоимунском миокардитису**

Регулаторни T лимфоцити (T<sub>reg</sub>) представљају јединствену субпопулацију T лимфоцита која супримира функцију ефекторских T ћелија и одржава периферну толеранцију [143]. Познато је да је недостатак T<sub>reg</sub> у директној корелацији са тежином бројних аутоимунских болести, међу њима и аутоимунског миокардитиса.



Да број  $T_{reg}$  утиче на индукцију и патофизиологију ЕАМ показано је и на мишевима различитог соја [142]. Мишеви А.СВ  $H2^s$  соја осетљивији су на индукцију ЕАМ у поређењу са В10.С  $H2^s$  мишевима упркос њиховом идентичном  $H2^s$  хаплотипу. Једно од могућих објашњења је да А.СВ мишеви након индукције ЕАМ, у срцу имају значајно мањи број  $T_{reg}$  дефинисаних као  $CD4+CD25+Foxp3+$  Т лимфоцита у односу на В10.С  $H2^s$  мишеве. Резултати овог истраживања показују да број  $T_{reg}$  у срцу корелира са степеном оштећења кардиомиоцита: пораст у броју ових ћелија корелира са мањим оштећењем, а мање присуство  $T_{reg}$  корелира са већом оштећењем кардиомиоцита. У истој студији је показано да број  $T_{reg}$  ћелија зависи од генетске конституције а не од врсте антигена. Што је и потврђено имунизацијом мишева миозином и овалбумином [142].

Осим у аутоимунском миокардитису,  $T_{reg}$  имају протективну улогу и у миокардитису насталом након инфекције коксаки вирусом В3 [144]. Адоптивним трансфером  $CD4+CD25+Foxp3+$   $T_{reg}$ , након индукције вирусног миокардитиса, запажено је значајно мање оштећење миокарда и већи клиренс вируса у односу на контролну групу животиња. Механизам којим  $T_{reg}$  штите кардиомиоците је посредован секрецијом  $TGF-\beta$ . Запажена је значајно већа експресија  $TGF-\beta$  у срцу након трансфера  $T_{reg}$  лимфоцита у коксаки В3 вирусном миокардитису [144].

#### **1.1.9.5. Улога Th9 ћелија у аутоимунском миокардитису**

Скорашње студије показују да у патогенези аутоимунског миокардитиса, осим до сада познатих субпопулација Т лимфоцита, значајну улогу има и новооткривена субпопулација Th9 лимфоцита. Диференцијација наивних Т лимфоцита у Th9 фенотип одиграва се у присуству  $TGF-\beta$  и IL-4. Главни ефекторски цитокин Th9 лимфоцита је IL-9 [145, 146].

Улога Th9 лимфоцита прво је показана на експерименталном моделу ЕАЕ. Адоптивним трансфером Th9 лимфоцита могао се индуковати ЕАЕ који се карактерисао атипичним менингеалним знацима и лезијама периферног нервног система [147]. Осим показане улоге IL-9 у ЕАЕ његов значај забележен је и у експерименталним студијама на мишевима који су имали дефицијенцију саркоендоплазматске ретикуларне  $Ca^{2+}$  АТФ-азе. Код ових мишева високе вредности IL-9 корелирале су са већом срчаном слабошћу [148].

Такође, забележен је и значајно виши ниво IL-9 у серуму пацијената са хроничном срчаном инсуфицијенцијом. У овој студији показано је да серумски нивои IL-9 негативно корелирају са ејекционом фракцијом [149].

#### **1.1.10. Улога хуморалног имунског одговора у аутоимунском миокардитису**

У патогенези аутоимунског миокардитиса осим главних ефекторских ћелија а то су аутореактивни CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, значајну улогу имају и аутоантитела. Створена аутоантитела која се могу детектовати не само у миокардитису већ и у исхемијским болестима срца, усмерена су на антигене који су секвестрирани и нису доступни ћелијама имунског система током негативне селекције у тимусу. Декланширање секвестрираних антигена настаје након оштећења ћелија и ткива срца. Најчешћи антигени на које се стварају аутоантитела су структурне компоненте кардиомиоцита као што су миозин и тропонин [150]. Након ослобађања секвестрираних интрацелуларних протеина прво се активирају аутореактивни Т лимфоцити а потом након „*T-B cross talk*“ интеракције као секундарни догађај генеришу се клонски селекована аутоантитела [151, 152]. Створена аутоантитела су управљена према интрацелуларним антигенима, пре свега тешком ланцу миозина, тропонину I, тропонину T и митохондријалним антигенима. Такође, код пацијената са миокардитисом могу се детектовати и друга аутоантитела као што су антитела усмерена према ламинину, актину и анти-мускаринска антитела [4]. Аутоантитела се у миокардитису не могу детектовати током свих фаза болести посебно не у акутној фази, док је њихово присуство карактеристично за субакутну и хроничну фазу. У прилог томе говоре и резултати студије у којој је показано да две трећине пацијената са акутним миокардитисом нема детектибилних специфичних аутоантитела у тренутку постављања дијагнозе или клиничког почетка болести [152]. Међутим, код 80% пацијената са миокардитисом који прогредира у ДЦМ детектују се аутоантитела специфична за срчане антигене и код 60% пацијената са срчаном инсуфицијенцијом друге етиологије [152]. Од свих аутоантитела најзначајнија су антитела усмерена према  $\alpha$  тешком ланцу срчаног миозина. Показано је да високи нивои анти-МуНС $\alpha$  антитела корелирају са тежином и прогресијом срчане болести док је смањење титра анти-МуНС $\alpha$  антитела у позитивној корелацији са добрим клиничким одговором [152].

## 1.2. Галектин 3

Главни циљ истраживања је испитивање улоге и значаја галектина 3 у патогенези ЕАМ код мишева соја C57BL/6 који је релативно резистентан на индукцију ЕАМ пептидом миозина МуНС $\alpha_{334-352}$ . Зато, у уводном делу детаљно објашњавамо структуру, експресију, биолошке ефекте галектина 3 и описујемо његов значај у регулацији имунског одговора.

## 1.3. Класификација галектинских молекула

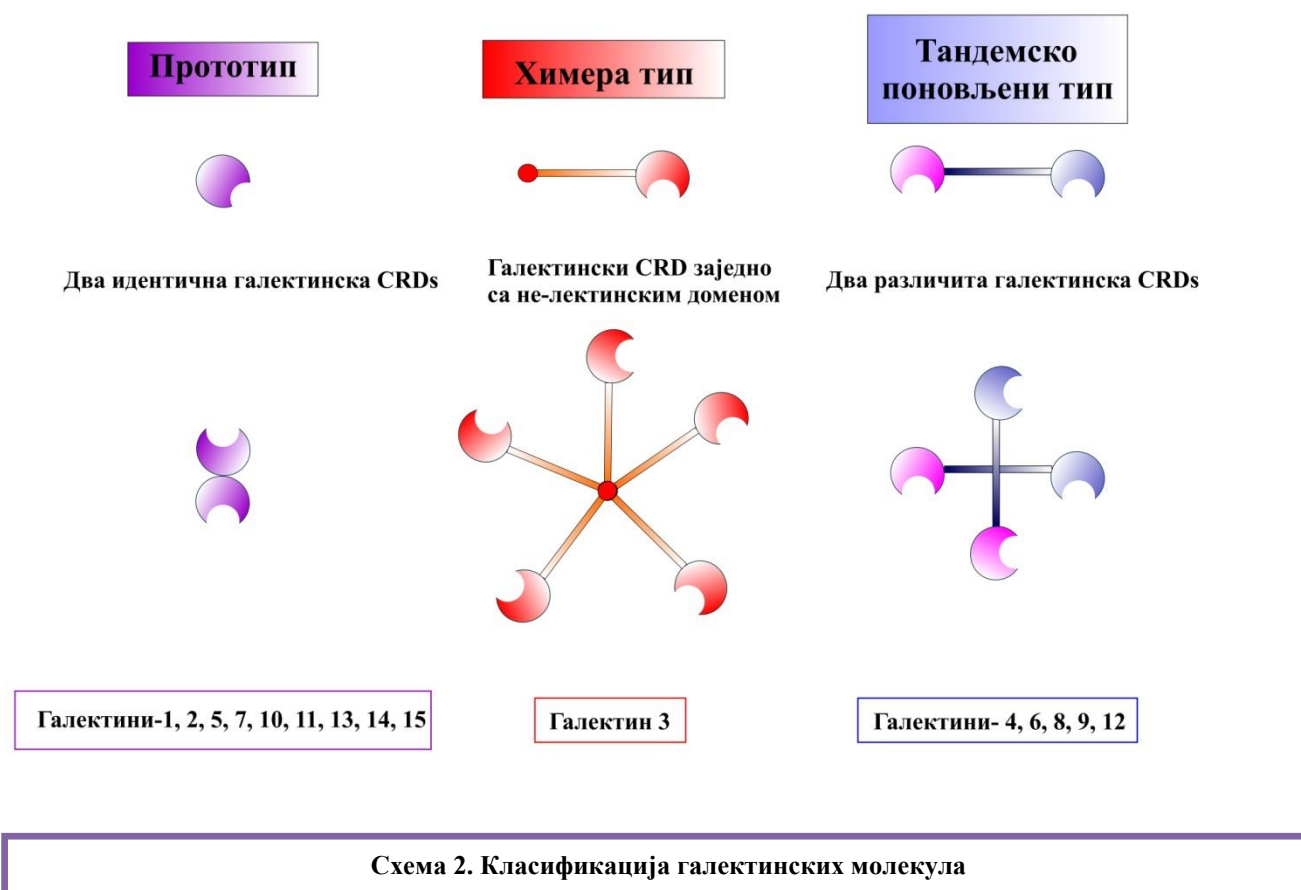
Лектини представљају јединствену групу структурно разноврсних протеина чија је главна карактеристика способност везивања за угљене хидрате. Лектини, на тај начин, могу препознати и везати се за гликолипиде, гликопротеине као и за протеогликане који се налазе на површини ћелијске мембране, као и у екстрацелуларном матриксу. Лектини су подељени у четири фамилије: лектини С- и Р- типа, пентраксини и галектини [153]. Галектини су дефинисани као еволуционо конзервирани протеини који имају способност препознавања  $\beta$ -галактозида на површини ћелије [154]. Представљају групу лектина који су привукли посебну пажњу у области биомедицинских истраживања захваљујући широком спектру функција у интрацелуларном и екстрацелуларном простору. Термин галектини се први пут уводи 1994. године при чему су чланови фамилије галектина морали да испуњавају два услова: афинитет за  $\beta$ -галактозиде и значајну сличност аминокиселинских секвенци на месту за препознавање и везивање угљених хидрата [154]. Чланови породице галектина пронађени су у сунђерима, гљивицама, нематодама, инсектима и кичмењацима укључујући и сисаре, што указује на њихову значајну улогу у различитим ћелијским процесима [155]. До данас је описано 15 различитих молекула галектина, означени бројевима од 1 до 15. Заједничко за све чланове фамилије је присуство еволутивно конзервираних секвенци познате као „региони који препознају угљене хидрате“ или CRD региони (енг. *Carbohydrate-Recognition Domain*) [156]. У саставу CRD региона улази 135 аминокиселинских секвенци [157]. Ови домени су познати као  $\beta$ -сендвич кога формирају две благо савијене  $\beta$ -плоче које се састоје из 6  $\beta$ -ланаца који формирају конкавну страну, и 5  $\beta$ -ланаца који формирају конвексну страну. Конкавна

страна формира жлеб у коме се галектини везују за угљене хидрате [158, 159]. Галектини су детектовани у разним ћелијама и ткивима и приписиване су им бројне улоге. Због разноликости својих функција постали су интригантни истраживачима, не само у области биологије већ и у медицини и фармацији. *Hirabayashi* и *Kasai* [159] су на основу броја и организације CRD региона, галектине класификовали у три групе (**Схема 2**):

**1. Прототип галектина:** поседују један CRD регион који има способност да димеризује. Овој групи припадају галектини 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 и 15.

**2. Тандемско поновљени тип галектина:** изграђени су од једног протеинског ланца дужине од 70 аминокиселина који формира два различита али хомолога CRD региона. Тандемско поновљеном типу галектина припадају галектини 4, 6, 8, 9 и 12.

**3. Химерски тип галектина:** изграђени су од једног протеинског ланца дужине од око 120 аминокиселина који садржи бројне понављајуће секвенце богате пролином и глицином. Овакав ланац спојен је са једним CRD регионом. Једини представник ове групе је галектин 3.



#### 1.4. Структурне и биохемијске карактеристике галектина 3

Без сумње, галектин 3 (енг. *Galectin-3*, *Gal-3*) (29-35- kDa) је један од најбоље проучаваних галектина и једини је химерички тип галектина код кичмењака. Најпре је идентификован као антиген на мембрани макрофага, изолованих из перитонеума мишева, стимулираних тиогликолатом и био је означен као Mac-2 (32-kDa) [160]. Касније је описиван као CBP-35 протеин (35-kDa) (енг. *Carbohydrate-binding protein*, *CBP*) који има способност за везивање угљених хидрата и откривен је на фибробластима мишева [161]; εBP протеин (енг. *ε-binding protein from rat basophilic leukemia cells*, *εBP*) на базофилима пацова оболелих од леукемије [162]; RL-29 величине од 29-kDa (енг. *29-kDa lectin in rat lung tissue*, *RL-29*) у плућном ткиву пацова [163]; HL-29 величине од 29-kDa (енг. *lectin in human lung tissue*, *HL-29*) у хуманом плућном ткиву [164], L-34 лектин величине од 34-kD у онкогенским трансфектованим ембрионским фибробластима пацова [165] и LBP (енг.

*Non-integrin laminin binding protein, LBP*), ламинин везујући протеин у макрофагама. Испитивањем аминокиселинских и генских секвенци утврђена је висока хомологија између наведених протеина изолованих из различитих врста [166-174]. У складу са номенклатуром уведеном 1994. године, овај протеин је означен као галектин 3 [154]. Анализа структуре Gal-3 указала је да он има јединствену структуру у односу на остале лектинске молекуле у кичмењака [175]. Као и сви чланови лектинске породице, Gal-3 има висок афинитет за везивање галактозида преко свог CRD региона [175]. Као химерни протеин са јединственом структуром, Gal-3 садржи 3 различита структурна домена:

1. NH<sub>2</sub> терминални домен (енг. *N-terminal domain, ND*) који садржи серин фосфорилационо место које је важно за регулацију интрацелуларне сигнализације;
2. понављајући регион, сличан колагену, богат пролином, глицином и тирозином, која се може раздвојити матриксним металопроотеиназама (нпр. MMP2 и MMP9);
3. глобуларни COOH терминални домен који садржи место за препознавање угљених хидрата, CRD регион, и аминокиселинску секвенцу NWGR која је одговорна за антиапоптоличку улогу Gal-3.

Након везивања за мултивалентне угљене хидрате, Gal-3 може олигомеризовати кроз свој ND терминални домен и формирати пентамерну структуру на површини ћелије [176]. На тај начин је укључен у модулацију интрацелуларних сигналних путева који утичу на експресију различитих гена што за последицу има промену функције ћелије (**Схема 3**) [177-179].

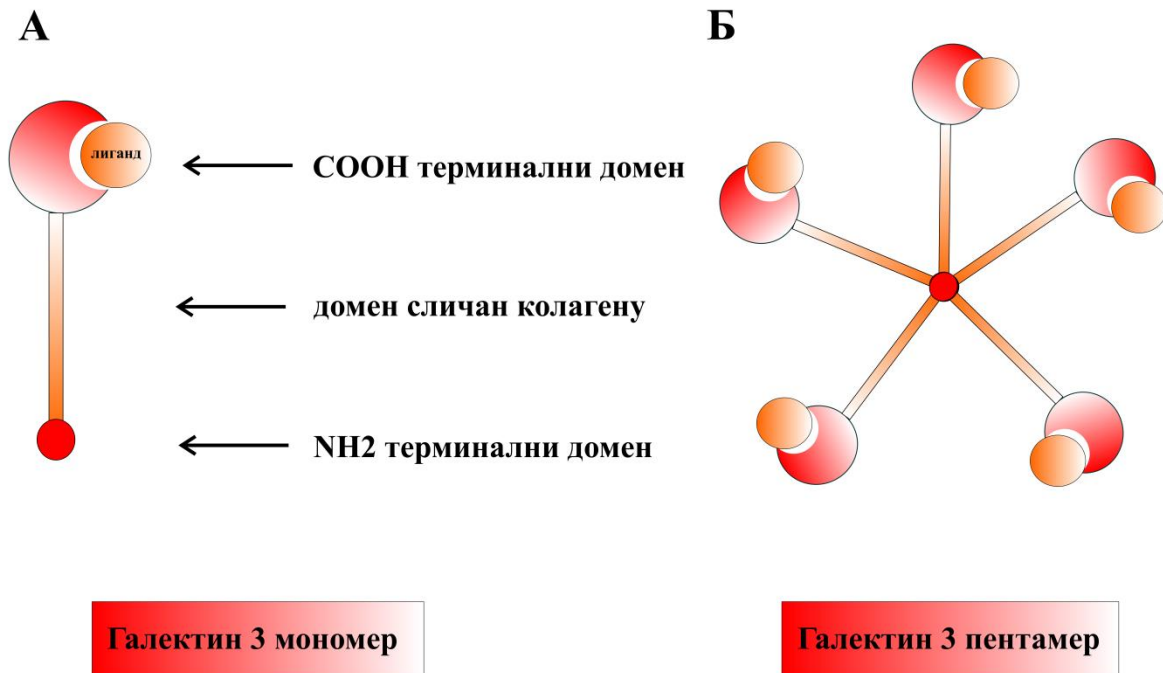


Схема 3. Структура галектина 3

#### 1.4.1. ND терминални домен

У зависности од врсте, ND терминални домен се састоји од 110 до 130 аминокиселина. Ова релативно флексибилна структура садржи више хомологих понављања, од којих свако укључује Pro–Gly–Ala–Tyr–Pro–Gly аминокиселинску секвенцу након чега следе три додатне аминокиселине. ND терминални домен је високо конзервиран међу Gal-3 молекулима изолованих из различитих врста. Такође, аминокиселинска секвенца је око 25% хомологна са одређеним нуклеарним комплексима рибонуклеопротеина (hnRNP), а та хомологост се такође може наћи међу самим једарним hnRNP протеинима [180]. Показано је да ND терминални домен има 33,5% поклапање са колагеном тип 2 у говеђој хрскавици, тако да је ND терминални домен означен и као N терминални домен сличан колагену [181]. Иако је показано да ND терминални домен нема активности са угљеним хидратима, неопходан је за пуну биолошку активност Gal-3 [182].

Додатно, резултати истраживања показали су да ND домен преко Tyr<sup>102</sup> и суседних субјединица учествује заједно са CRD регионом у везивању олигосахарида [183]. ND терминални домен, је такође одговоран за мултимерно формирање и показује позитивну кооперативност приликом везивања лектина за имобилизоване лиганд кластере [183]. Ова његова особина је изгледа биолошки регулисана, јер је ND подложен селективној протеолизи од стране одређених матрикс металопротеиназа (MMP-2 и MMP-9) [184]. Расцеп на позицији Ala<sup>62</sup>-Tyr<sup>63</sup> код хуманог рекомбинантног Gal-3 повећава афинитет CRD-а (очуваног у 22 kDa фрагменту) за карбохидратне лиганде, али умањује агрегацију Gal-3 и на тај начин укида биолошка дејства молекула која зависе од његове мултимеризације. Тако на пример, протеолитичким дејством поцепан Gal-3 показује око 20 пута виши афинитет везивања за ендотелне ћелије хумане умбиликалне вене у поређењу са комплетним протеином [185].

Такође, резултати истраживања су показала да ND терминални домен учествује у секрецији Gal-3 у екстрацелуларни простор [184]. Почетни део ND домена који садржи 12 аминокиселина која претходи домену који је богат пролином и глицином, такође познат као мали ND терминални домен, високо је конзервиран код свих Gal-3 у сисара. Најмање две функционалне карактеристике преписане су ND домену Gal-3, брисање првих 11 аминокиселина блокира секрецију Gal-3, док мутација конзервираног Ser<sup>6</sup> утиче на антиапоптотску активност Gal-3 [185].

#### **1.4.2. CRD регион**

CRD регион Gal-3 састоји се од 130 аминокиселина које формирају глобуларну структуру која је одговорна за учвршћивање везе између Gal-3 и угљених хидрата [186]. Ови налази су додатно потврђени анализом структуре CRD региона, који се састоји из две анти-паралелне β-плоче са по 5-6 β-ланаца који формирају удубљење за везивање угљених хидрата [182]. Међутим, новији резултати добијени анализом нуклеарне магнетне резонанце указују на могуће интеракције између ND терминалног домена и CRD региона [187]. Унутар домена за препознавање угљених хидрата од посебног интереса је аминокиселинска секвенца NWGR; која је практично без изузетка конзервирана у оквиру VN1 домена Vcl-2 фамилије протеина, и доказано је да је одговорна за антиапоптотску



активност Gal-3 [188]. NWGR секвенца је такође укључена у процес агрегације молекула Gal-3 преко CRD региона у одсуству сахаридних лиганда [189]. Заменом триптофана са леуцином (W181L) у оквиру NWGR секвенце обуставља хомодимеризацију Gal-3 преко CRD. Ипак, и поред ове мутације још увек се може везати wild-type Gal-3 путем интеракције са N-терминалним доменима. CRD је такође укључен у угљенохидратно зависну хемофиличну интерреакцију у којој учествује Gal-3 [190]. Остатак једног молекула цистеина у близини NWGR секвенце (Cys186) се показао као неопходна за димеризацију мишијег Gal-3, који у тој форми везује ламинин са вишим афинитетом у односу на мономеричну форму [191]. CRD у поређењу са интактним Gal-3 испољава снажнији афинитет везивања за крајње продукте гликације (AGE), што указује да CRD можда такође садржи главно место везивања за AGE што није могуће код ND код целог молекула Gal-3 [192].

### **1.5. Експресија галектина 3**

Током ембрионалног развоја и диференцијације ћелија мења се експресија галектина. Такође, експресија галектина зависи од различитих физиолошких и патолошких услова. Експресија галектина се први пут детектује четвртог дана гестације и то у ћелијама трофектодерма на стадијуму бластоцисте [193]. Око осмог дана гестације Gal-3 је експримиран на ћелијама нотохорде, где је присутан док нотохорда не ишчезне [194]. Присуство Gal-3 запажа се касније у хрскавици пршљенова, ребрима и костима лица, као и у супрабазалном слоју епидермиса, што указује на потенцијалну улогу у формирању хрскавице и диференцијацији коже [194]. *Colnot* и сарадници [195] су показали да је Gal-3 експримиран на хондроцитима епифизне плоче раста дугих костију код феталних и неонаталних мишева, што указује на потенцијалну улогу Gal-3 током енхондралне осификације. Такође, експресија Gal-3 забележена је и у првом триместру хумане ембриогенезе али је ограничена на епител коже, дигестивног, респираторног и уринарног тракта, затим на ћелијама миокарда, јетре и хондроцита [196]. Сличан образац експресије Gal-3 уочава се и у адултним ткивима као и на бројним ћелијама имунског система. Студија која је анализирала експресију Gal-3 методом *in situ* хибридизације у дигестивном тракту мишева, показала је присуство Gal-3 искључиво у епителним ћелијама

[197]. Међутим, новија истраживања показују да Gal-3 није експримиран само на епителним ћелијама дигестивног тракта, већ и на резидентним макрофагама ламине проприје [198]. Такође, имунохистохемијским бојењем потврђено је присуство Gal-3 позитивних ћелија дуж синусоида јетре уз појаву Купферових ћелија [198]. Плућа мишева се налазе на другом месту у погледу експресије Gal-3 [198]. Присуство Gal-3 је описано у епителним ћелијама бронхиола и резидентним макрофагама [198]. Експресија Gal-3 се значајно повећава током инфекције плућа [199].

Присуство Gal-3 позитивних ћелија детаљно је описано од стране *Kim* и сарадника [198]. У јајнику, Gal-3 је детектован у ћелијама жутог тела и макрофагама строме где има улогу у одржавању и преживљавању лутеалних ћелија током трудноће. У утерусу, Gal-3 је присутан у ендометријалним ћелијама и макрофагама везивног ткива [198]. Gal-3 је највећи β-галактозид везујући лектин експримиран на ћелијама уринарног тракта мишева. Методама имунохистохемије и *in situ* хибридизације утврђено је да је експримиран на ћелијама бубрега и уринарних путева до дисталног дела уретре [200]. Резултати имунохистохемијског бојења срчаног ткива, указали су на присуство Gal-3 позитивних ћелија у интерстицијуму док кардиомиоцити не експримирају Gal-3 [198]. У мозгу, епендимоцити можданих комора експримирају Gal-3 [198]. Заступљеност ћелија које експримирају Gal-3 у слезини је много већи у црвеној него у белој пулпи [198]. Овакав локални феномен се може објаснити већом дистрибуцијом макрофага и дендритских ћелија у црвеној пулпи слезине, док су у белој локализовани Т и В лимфоцити. Експресија Gal-3 код наивни Т лимфоцита у слезини је немерљива, међутим може се повећати након њихове активације [198]. Ћелије које експримирају Gal-3 првенствено су локализоване у медули тимуса, док су само ретке Gal-3 позитивне ћелије присутне у кори. Овај ендогени лектин је углавном пронађен у медули и мањем обиму у кортексу тимуса младих мишева. Ћелије тимуса, као што су епителне ћелије и макрофаги производе, луче и акумулирају велике количине Gal-3 на својој површини, што доприноси модулацији миграције и преживљавања тимоцита [201, 202].

## **1.6. Улога галектина 3**

Галектини су откривени у широком спектру различитих ћелија и ткива где учествују у бројним биолошким процесима, чиме је ова фамилија протеина постала атрактивна у области биомедицинског истраживања [180]. Биолошке функције Gal-3 дефинисане су према његовој интрацелуларној или екстрацелуларној локализацији. Галектин 3 је плеотропан молекул који модулира ћелијску функцију везивањем за различите молекуле у једру, цитоплазми или на површини ћелије.

### **1.6.1. Улога екстрацелуларног галектина 3**

Бројна истраживања потврђују екстрацелуларну локализацију Gal-3. Галектин 3 може бити локализован на ћелијској површини (везан за гликопротеине) или у екстрацелуларном матриксу, биолошким течностима и серуму (у солубилном облику). Познато је да Gal-3 не пролази кроз стандардни процес секреције протеина у ћелији преко ендоплазматичног ретикулума и Голџи апарата јер не садржи класичну сигналну секвенцу. *R. C. Hughes* и сарадници [203] указују на могући алтернативни пут секреције и ослобађања Gal-3 из ћелије преко специфичних везикула. Сходно предложеном механизму секреције спречава се интеракција Gal-3 и његових потенцијалних гликолизованих делова, синтетисаних и излучених преко ендоплазматичног ретикулума и Голџи апарата, пре него што дођу у екстрацелуларни простор. Други могући механизам секреције Gal-3 је преко ексозома од стране дендритских ћелија [204, 205]. Ексозоми су мала везикуларна тела, величине од 60-90nm, која се формирају инвагинацијом ендозомске мембране у лумен ендозома и излучују у екстрацелуларни простор. У оба предложена типа секреције, везикуле егзоцитозом ослобађају Gal-3 који се може везати за површину ћелијске мембране или за компоненте екстрацелуларног матрикса. Алтернативно, везикуле се могу спојити са другим ћелијама и на тај начин преузети Gal-3. Екстрацелуларни Gal-3 остварује бројне аутокрине и паракрине ефекте. Галектин 3 има улогу у ћелијској атхезији, активацији и хемотакси за различите типове ћелија. На тај начин Gal-3 утиче на различите биолошке процесе као што су одржавање ћелијске хомеостазе, имунолошке реакције, органогенеза и ангиогенеза, инвазија тумора и метастазе.

### **1.6.2. Улога галектина 3 у ћелијској адхезији**

Улога Gal-3 у процесима ћелијске адхезије заснива се на његовим мултивалентним особинама и способности да се везује за гликопротеине на површини ћелијске мембране као и за гликозиловане компоненте екстрацелуларног матрикса. Показано је да Gal-3 може да се веже за ламинин, фибронектин, као и за колаген тип 4 и тенасцин-С и -R [206-208]. Поред тога, Gal-3 се везује и за одређене интегрине, главне трансмембранске протеине ћелијске мембране, који су укључени у процес ћелијске адхезије [208]. Резултати истраживања су показала да су  $\alpha\beta 1$  интегрини и  $\alpha$  субјединица  $\alpha M\beta 1$  интегрини, локализовани на површини макрофага, рецептори за Gal-3 [208, 209]. Такође, Gal-3 се може везати за тежак ланац CD98 молекула, који је присутан на мембрани моноцита и макрофага код људи и код мишева као и на мембрани активираних Т лимфоцита, и посредством димеризације CD98 може промовисати активацију интегрини [210]. Галектин 3 може инхибирати или промовисати ћелијску адхезију различитих ћелија за протеине екстраћелијског матрикса; посредује у адхезији хуманих неутрофила за ламинин и ендотелне ћелије [211, 212], и омогућује везу између дендритских ћелија и лимфоцита посредством L-селектина [213]. Међутим, показано је да интрацелуларни Gal-3 [213] може промовисати излазак тимоцита из тимуса на периферију [201]. Показано је да интеракције Gal-3 са бројним гликопротеинима као што су лизозомални мембрански гликопротеин *Lamp-1* и *-2*, *C4.4A* гликопротеин, омогућавају везу између туморских ћелија и протеина екстрацелуларног матрикса [214, 215]. Такође, доказ да површински Gal-3 посредује у хомотипичној ћелијској адхезији уз помоћ повезивања разгранатих лако растворљивих глукокоњугата, истиче његову улогу у агрегацији туморских ћелија у циркулацији током метастазирања [216].

### **1.6.3. Улога галектина 3 у ћелијској активацији и хемотакси**

Познато је да унакрсно повезивање површинских протеинских молекула може проузроковати каскаду бројних сигналних путева и резултирати ћелијском активацијом. Везивање мембранских молекула често је посредовано везивањем њихових гликозилованих делова и мултивалентних лектина, као што је Gal-3. Постоје бројни

докази о улози Gal-3 у активацији различитих врста ћелија, посебно оних који учествују у имунолошким реакцијама. Галектин 3 путем унакрсног повезивања мембранских гликопротеина, може стимулирати продукцију IL-1 и покренути ослобађање супероксидних аниона од стране хуманих неутрофила и моноцита [217, 218]. Додатно, Gal-3 може изазвати респираторни прасак у неутрофилима након одређене стимулације, као што је стимулација липополисахаридом (LPS) [219]. Овакав одговор неутрофила је у директној вези са повећаним везивањем Gal-3 за мембранске рецепторе CD66a и CD66b на мембрани неутрофила [220]. Такође, скорија истраживања су показала да Gal-3 повећава фагоцитну активност и експресију CD66 молекула на мембрани неутрофила [221]. Осим позитивних ефеката, забележена су и супресивна дејства Gal-3. Показано је да Gal-3 инхибише секрецију IL-5 из еозинофила и на тај начин врши супресију мијелоидних ћелија [222]. Показано је *in vitro* и *in vivo* да Gal-3 може индуковати ангиогенезу ендотелних ћелија [223]. Такође, показано је да Gal-3 активира срчане фибробласте [224], и да се његова експресија повећава код фибробласта у синовијалној течности код пацијената који болују од реуматоидног артритиса [225]. Продукција Gal-3 од стране стелатних ћелија јетре, аутокриним механизмом, може индуковати њихову пролиферацију преко протеин киназе C и протеин киназе A [226]. Поред улоге у активацији ћелија, показано је да Gal-3 делује као хемотактички молекул за моноците и макрофаге, као и за алвеоларне макрофаге [227]. Бројне *in vitro* и *in vivo* студије су показале значајну улогу Gal-3 у миграцији ћелија, и да су у ту улогу укључени и ND и CRD терминални домен.

#### **1.6.4. Улога интрацелуларног галектина 3**

Познато је да Gal-3 може бити локализован и у интраћелијском простору, једру или у цитоплазми [228]. У цитоплазми, Gal-3 има улогу у регулацији ћелијске пролиферације и диференцијације везујући се за *K-Ras* протеин или активацијом киназе (PI3K)-Akt сигналног пута [198]. Бројни молекули у цитоплазми су дефинисани као лиганди за Gal-3. Њихове разнолике биолошке улоге укључују Gal-3 у бројне интрацелуларне процесе. Међу првим интрацелуларним молекулима који су идентификовани као лиганд за Gal-3 био је Vcl-2 протеин који је укључен у процес апоптозе [204]. Такође, познато је да Gal-3 остварује интеракцију са рецептором смрти CD95 (*APO-1/Fas*) и на тај начин остварује

своју улогу у процесу апоптозе [205]. Бројна истраживања су потврдила улогу Gal-3 у процесу ћелијске пролиферације, диференцијације, преживљавања и смрти [229, 230]. Када је ћелија изложена апоптотским стимулусима интрацелуларни Gal-3 се депонује у митохондријама [231]. У митохондријама депоновани Gal-3 поседује антиапоптоску активност [231]. У једру, Gal-3 има улогу у регулацији транскрипције гена тако што појачава експресију гена за циклин D<sub>1</sub> [232]. Додатно, у једру се Gal-3 везује за рибонуклеопротеинске комплексе [233]. Показано је да Gal-3 има улогу у регулацији *Wnt/β-catenin* сигналног пута, који је значајан у процесу развоја, ткивне хомеостазе и раста тумора, међутим тачан механизам дејства још увек није познат [234].

### **1.6.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора**

Подаци о функционалним особинама Gal-3 сумиране у бројним истраживањима снажно указују на значај Gal-3 у регулацији имунског одговора и инфламацији. Инфламација има протективну улогу и служи за одржавање хомеостазе и репарације ткива. Међутим, под одређеним околностима инфламација може бити штетна за домаћина и довести до различитих патолошких процеса. Галектин 3 регулише кључне процесе у инфламаторном имунском одговору: адхезија, хемотакса и активација, опсонизација и фагоцитоза. Галектин 3 се детектује на површини бројних ћелија имунског система и регулише инфламацију. Конститутивно је експримиран на моноцитима, макрофагима, дендритским ћелијама, мастоцитима, неутрофилима, еозинофилима, док га Т и В лимфоцити експримирају тек након активације [235]. Бројне ћелије продукују и ослобађају велике количине Gal-3 у одговору на разне инфламаторне стимулусе. Ослобођени Gal-3 може деловати на инфламаторне ћелије аутокриним или паракриним механизмом. Познато је да Gal-3 може да стимулише оксидативни прасак у неутрофилима и моноцитима и да доведе до дегранулације мастоцита. Галектин 3 промовише адхезију и миграцију моноцитно/макрофагне лозе кроз ендотел и делује као хемотрактант за моноците и макрофаге [199, 236]. Студије су показале да делеција гена за Gal-3 значајно редукује инфламацију у анималном моделу перитонитиса, индуковног тиогликонатом, што је потврђено смањеном инфилтрацијом гранулоцита и макрофага у односу на контролну групу животиња [236, 237]. Мишији Gal-3<sup>-/-</sup> макрофаги имају смањену

фагоцитну активност апоптотичних тимоцита или овчијих еритроцита у односу на макрофаге контролних мишева који експримирају овај лектин (Gal-3<sup>+/+</sup>) [238]. Резултати наведених истраживања указују на значајну улогу Gal-3 у процесу фагоцитозе иако тачан механизам још увек није познат. Значај Gal-3 у инфламаторном одговору огледа се у способности препознавања и везивања гликокоњугата на површини *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* [239]. Бројне студије указују на двоструку улогу Gal-3 у активацији макрофага. Код Gal-3 дефицијентних мишева, алтернативна активација макрофага под утицајем IL-4 и IL-13 је редукована у односу на контролну групу животиња, док је класични пут активације под утицајем LPS и IFN- $\gamma$  не измењена [240]. Под утицајем LPS, макрофаги Gal-3<sup>-/-</sup> мишева продукују већу концентрацију проинфламаторних цитокина IL-6, IL-12 и TNF- $\alpha$  него макрофаги Gal-3<sup>+/+</sup> мишева што упућује на антиинфламаторне ефекте Gal-3 [241]. Супротно томе, резултати друге студије указују на проинфламаторну улогу Gal-3 јер овај лектин делујући регулаторно на микроглију слично цитокинима, омогућује фосфорилацију транскрипционих фактора (JAK2, STAT1, STAT3 и STAT5) што појачава каскаду продукције проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ ) [242]. Подаци из литературе указују на значајну улогу Gal-3 у функционисању дендритских ћелија. Показано је да уклањање гена за Gal-3 смањује миграторни потенцијал ових ћелија како *in vivo* тако и *in vitro* [243]. Такође, експресија Gal-3 у дендритским ћелијама утиче на поларизацију имунског одговора [244, 245].

T и B лимфоцити експримирају Gal-3 искључиво након активације. T лимфоцити, почињу да експримирају Gal-3 након активације различитим стимулусима (антитела специфична за CD3 и/или IL-2, IL-4 и IL-7) [246]. Активација B лимфоцита са IL-4 праћена је појачаном експресијом Gal-3, што промовише диференцијацију B лимфоцита у меморијске ћелије [247]. Галектин 3 у лимфном ткиву регулише организацију ниша B220<sup>+</sup> и CD138<sup>+</sup> ћелија [248] и инхибира диференцијацију у плазмоците *in vitro* [247] и *in vivo* у костној сржи, мезентеричним лимфним чворовима и слезини [248]. Поред тога Gal-3 има антиапоптотску улогу у неоплазмама B лимфоцита [249] и одржавању анергије B лимфоцита [250]. Појава Gal-3 дефицијентних мишева омогућила је детаљније студије о имуномодулаторним механизмима Gal-3. Одсуство Gal-3 појачава Th1 или Th2 имунски одговор у зависности од природе патофизиолошког процеса и врсте ткива/органа [251].

Студије су показале да Gal-3 контролише поларизацију Т лимфоцита током имунског одговора и има потенцијалну улогу у регулацији производње антитела [252, 253]. Још увек није детаљно разјашњено којим механизмима Gal-3 регулише аутоимунске процесе, али је јасно да може испољити двоструку улогу. Укратко, Gal-3 може двојако регулисати инфламаторни одговор, зависно од више фактора као што су специфични услови инфламације, врста ћелије или ниво експресије.

#### **1.6.6. Улога галектина 3 у развоју миокардитиса и срчане фиброзе**

Значај Gal-3 показан је у регулацији имунског и инфламаторног одговора, развоју и прогресији тумора, неуронске дегенерације, атеросклерозе, дијабетеса, као и репарације ткива. Gal-3 је откривен у многим пролиферишућим ћелијама као што су туморске ћелије, еозинофили, неутрофили, активисане макрофаге и фибробласти [254-257]. Многи од наведених типова ћелија играју значајну улогу у запаљенском одговору и фиброгенези. Недавне студије показују да, као мултифункционални биомаркер, Gal-3 игра кључну улогу у процесу ремоделације срца учествујући у хомеостази екстраћелијског матрикса и у одговору на инфламацију [258].

Улога Gal-3 у фиброгенези и инфламацији је у многим аспектима разјашњена последњих година али не у потпуности. У здравом ткиву, експресија Gal-3 је одсутна или смањена. Међутим, у патолошким условима, експресија Gal-3 се значајно увећава посебно током инфламације и фиброзе. Оба процеса су од круцијалног значаја у ремоделовању и фибрози срца и бубрега. Методама *in-situ* хибридизације и имунохистохемијске анализе показано је висока експресија Gal-3 у подручју миокарда захваћеног фиброзом [259]. Ова експресија била је у јако позитивној корелацији са заступљеношћу макрофага у срцу. Све већи број експерименталних доказа показао је да је Gal-3 секретован из макрофага повезан са активацијом миофибробласта а касније и са повећаном синтезом и депоновањем колагена. Што указује на његову важну улогу у промени састава екстрацелуларног матрикса у оштећеном ткиву [256, 257, 259-262].

Први докази који указују на значајну улогу Gal-3 у развоју срчане слабости потичу из резултата студије коју су спровели *Sharma* и сарадници [259] и показали су да је Gal-3 потенцијална нова терапеутска мета у лечењу хроничне срчане инсуфицијенције. Такође,



*Henderson* и сарадници [256] су показали да је експресија Gal-3 значајно повећана током прогресивне реналне фиброзе. Истраживања спроведена на Gal-3 дефицијентним животињама показала су мањи обим инфламације у бубрегу и последично мањи профибротички одговор са значајним смањењем продукције и депоновање колагена. Да је Gal-3 добра терапеутска мета у обољењима која се карактеришу фиброзом и ремоделовањем ткива показали су *Kalatjoui* и сарадници [263] у експерименталном моделу фиброзе бубрега. Наиме, применом инхибитора Gal-3 детектована је значајно мања фиброза бубрега.

Поред експерименталних студија, различита клиничка испитивања су такође указала на потенцијалну клиничку корист Gal-3 као биомаркера у прогнози срчане инсуфицијенције. *Van Kimmenade* и сарадници [264] први су одредили прогностичку и предиктивну вредност Gal-3 као биомаркера у акутној срчаној инсуфицијенцији. У предклиничком истраживању, они су затим показали да су високи серумски нивои Gal-3 повезани са већим степеном морбидитета [264]. У наставку истраживања испитиван је значај Gal-3 као самосталног маркера као и његова повезаност са Nt-proBNP као најважнијим маркером срчане слабости [265]. Резултати ове студије су показали да је Gal-3 добар биомаркер али да се не може независно интерпретирати без вредности Nt-proBNP код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом [266].

Укратко, Gal-3 секретован из макрофага утиче на активацију миофибробласта, синтезу и депоновање колагена, играјући централну улогу у патофизиолошком ремоделовању срца и срчаној инсуфицијенцији.

Као што је претходно поменуто, у нормалном срчаном ткиву Gal-3 позитивне ћелије се углавном налазе у интерстицијуму док кардиомиоцити не експримирају Gal-3 [267]. Међутим, у ткиву срца захваћеном инфламацијом повећава се експресија овог молекула [259]. Последњих година значајна улога у патогенези вирусног миокардитиса и срчаном ремоделовању приписује се Gal-3 [268-270]. Резултати до сада објављених студија показују да у експерименталном моделу вирусног миокардитиса постоји већа експресија и продукција Gal-3 из макрофага срца, као и да Gal-3 има значајну улогу у пролиферацији срчаних фибробласта и настанку срчане фиброзе, што за последицу има повећан ризик за развој ДЦМ [268]. Испитивање срчане фиброзе, индуковане ангиотензином 2 или трансверзалном аортном констрикцијом (ТАС), спроведено на Gal-3

дефицијентним мишевима соја C57BL/6J, је показало значајно смањену продукцију колагена из срчаних фибробласта и мању фиброзу [270]. Међутим, недовољно је разјашњена улога овог молекула у патогенези аутоимунског миокардитиса и ДЦМ.

## **2. ЦИЉ СТУДИЈЕ**

Основни циљ истраживања је да се испита улога и значај галектина 3 у патогенези аутоимунског миокардитиса у мишјем моделу ЕАМ индукованог применом пептида миозина МуНС $\alpha_{334-352}$ .

У складу са основним циљем, поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Испитати утицај галектина 3 на развој хипертрофије срца између WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева, одређивањем односа између тежине перфундованог срца и укупне телесне тежине.
2. Испитати утицај галектина 3 на развој дегенерације и некрозе кардиомиоцита код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
3. Испитати утицај галектина 3 на развој инфламаторних промена срца у миокарду хистолошким бојењима код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
4. Испитати утицај галектина 3 на присуство IgG депозита и IgG позитивних ћелија у срцу код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
5. Испитати утицај галектина 3 на степен депоновања колагена у срцу хистолошким бојењима код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
6. Испитати фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у срцу код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
7. Испитати фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији у слезини код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.
8. Испитати вредности проинфламаторних и профиброгених цитокина у системској циркулацији код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева.

**Радна хипотеза испитивања:**

Галектин 3 има протективну улогу у раним инфламаторним фазама ЕАМ, па одсуство галектина 3 чини C57BL/6 мишеве осетљивијим на индукцију болести. Галектин 3 има профиброгену улогу у каснијим фазама ЕАМ које карактерише развој фиброзе срца.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Експериментални мишеви

У студији су коришћени C57BL/6 мишеви мушког пола (енг. *wild type*, WT) и мишеви истог пола и соја (C57BL/6) са делецијом гена за галектин 3 (енг. *knock-out Gal-3KO*). Gal-3KO животиње су добијене из виваријума Универзитета Калифорније (*Professor Daniel K Hsu, University of California Davis, School of Medicine, Department of Dermatology, Sacramento, California, USA*).

Сви експериментални мишеви (WT и Gal-3KO) су под стандардним условима одгајани у одгајалишту за мишеве Факултета медицинских наука, Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Универзитета у Крагујевцу, уз свакодневни приступ води и храни *ad libitum*. У студији су коришћени мишеви просечне староти од 42 до 56 дана.

Студију је одобрила етичка комисија Факултета медицинских наука под називом "Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња" број 01-2630 од 19.03.2014. године.

##### 3.1.1. Методологија добијања Gal-3KO мишева на C57BL/6 подлози

Применом хомологе рекомбинације може се искључити један или више гена и на тај начин добити *knock-out* животиња са циљаном делецијом жељених гена. Хомолога рекомбинација је један од механизма генетске рекомбинације за замену једног дела или комплетног циљног (нормалног) гена нефункционалним (мутираним) геном [271]. Замена функционалног нефункционалним геном остварује се између хомологих секвенци на два ланца ДНК (дезоксирибонуклеинске киселине). Хомологе секвенце на различитим ланцима ДНК имају гене у којима је распоред нуклеотидних секвенци сличан или идентичан. Током хомологе рекомбинације размењују се гени са хомологих секвенци лоцирани на два различита молекула ДНК [272]. Механизмом хомологе рекомбинације постиже се замена WT гена геном чија је експресија онемогућена [271]. Само оне ћелије у којима су WT гени замењени нефункционалним генима се користе у даљем поступку

добиања *knock-out* мишева. За интеграцију добијених фрагмената ДНК која садрже нефункционални ген неопходни су вектори. Вектор у који се уграђује део ланца ДНК која садржи нефункционални ген је садржао и два гена која контролишу рекомбинацију. За контролу рекомбинације коришћени су гени: *Neo* и *TK* гени. Експресијом *Neo*-гена постиже се отпорност на неомицин док је продукт *TK* гена вирусна тимидин киназа [273, 274]. Вектор који садржи секвенцу ДНК са нефункционалним геном, *Neo* и *TK* ген се интегрише у ембрионалне матичне ћелије. Ембрионалне матичне ћелије миша су узгајане у медијуму који је осим стандардних састојака садржао и неомицин и ганцикловир. Вирусна тимидин киназа метаболише неомицин и ганцикловир у продукте који су токсични за све ћелије у којима је интегрисан вектор али у којима се није догодила хомолога рекомбинација. У ћелијама у којима је интегрисан вектор који садржи све поменуте гене и у којима се догодила хомолога рекомбинација биће истовремено резистентне и на неомицин и на ганцикловир, што резултира њиховим преживљавањем у култури [275, 276].

Ген за Gal-3 је изграђен од 6 кодирајућих секвенци [277]. Искључивање гена за Gal-3 постигнуто је делецијом 4, 5 и 6-ог егзона и 4-ог интрона. Егзон 4 и 5 уграђени су у *Poly(A)* вектор проксимално од промотера *TK* гена који је повезан са *Neo* блоком. Егзон 5 и 6 су интегрисани дистално од *Neo* блока, док је у сегменту ДНК између интрона 4 и егзона 5 уметнут *Neo* ген [278]. Овако конструисан вектор интегрисан је у ембрионалне матичне ћелије миша (D3). Селекција ћелија са интегрисаним вектором вршена је помоћу G418. Ћелије резистентне на неомицин и ганцикловир (G418- ћелије) детектоване су PCR методом (енг. *Polymerase Chain Reaction*) као и *Southern blot*-ом. Само у два клона ESC (енг. *Embryonic stem cell*) детектована је хомолога рекомбинација тј. G418 резистенција (4A2 и 9A4 клон). Један од позитивно селектованих клонова ESC је ињектиран у бластоцисту мишева соја C57BL/6. Таква бластоциста је инплантирана у сурогат мајке истог соја мишева. Добииени потомци били су химерични мишеви који су потом упарени са WT C57BL/6 мишевима. Потомци добијени из оваквог спаривања били су хетерозиготи за делетирани Gal-3 ген. Даљим укрштањем хетерозиготних потомака у сродству, у F10 генерацији добијени су хомозиготни потомци, којима су на оба хомолога локуса били искључен гени за Gal-3. [278].

Анализом добијених Gal-3КО мишева и поређењем са WT мишевима нису уочене разлике у величини органа, броју имунских ћелија као и заступљености одређених популација и субпопулација лимфоцита [278].

### **3.2. Експериментални модел аутоимунског миокардитиса применом MyHC $\alpha$ <sub>334-352</sub> пептида**

Као антиген за индукцију ЕАМ коришћен је MyHC $\alpha$ <sub>334-352</sub> пептид (*Shanghai ShineGene Molecular Biotech*). Сви мишеви (WT и Gal-3КО) имунизовани су раствором који је садржао исту количину MyHC $\alpha$ <sub>334-352</sub> пептида и CFA (eng. *Freunds adjuvant complete, Sigma-Aldrich St.Louis, USA*). Сваком мишу је субкутано у пределу бокова, на два места, апликовано 100 $\mu$ g MyHC $\alpha$ <sub>334-352</sub> пептида у 100 $\mu$ l PBS-а (енг. *Phosphate-buffered saline, Gibco<sup>tm</sup>, USA*) и 100 $\mu$ l CFA (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*) са 500 $\mu$ g инактивисаног бацила туберкулозе соја *H37 RA (Difco Laboratories, Detroit, MI*, концентрације 5 mg/ml) 0. и 7. дана. Као контроле коришћени су нетретирани мишеви. За апликацију је коришћен инсулински шприц од 1ml са иглом од 20G. Игла је пажљиво убачена кроз кожу да не би дошло до оштећења перитонеума. Након што је потврђено да је створен вакуум повлачењем клипа шприца, суспензија је пажљиво убризгана и игла је извучена само неколико секунди након убризгавања целе суспензије. Нултог дана мишевима је интраперитонеално апликован растворен *Pertusis toxin* (200ng у 100 $\mu$ l дестиловане воде). *Pertusis toxin* је купљен од *List Biological Laboratories, USA, Campbell*. Растворени *Pertusis toxin* у концентрацији 50 $\mu$ g/ml чуван је на температури од +4 °C. Другог дана мишеви су добили другу дозу *Pertusis toxin*-а. Предвиђено трајање експерименталног аутоимунског миокардитиса је 21 дан.

Након три недеље експериментални мишеви су жртвовани применом диетилетра (*BETA НЕМ, Београд*). Жртвованим мишевима изоловани су срце и слезина који су коришћени за патохистолошку, имунохистохемијску анализу и анализу фенотипа имунских ћелија проточном цитометријом. За анализу серумских концентрација цитокина коришћена је крв добијена пунктирањем абдоминалне аорте. Бризгалица којом се сакупљала крв из абдоминалне аорте садржала је 2,6% хепарин. Хепанизирана крв је

стајала 30 минута а потом центрифугирана 20 минута на брзини од 3000 грм. Добијена провидна течна фаза тј. серум складиштена је на температури од -20°C (Схема 4).

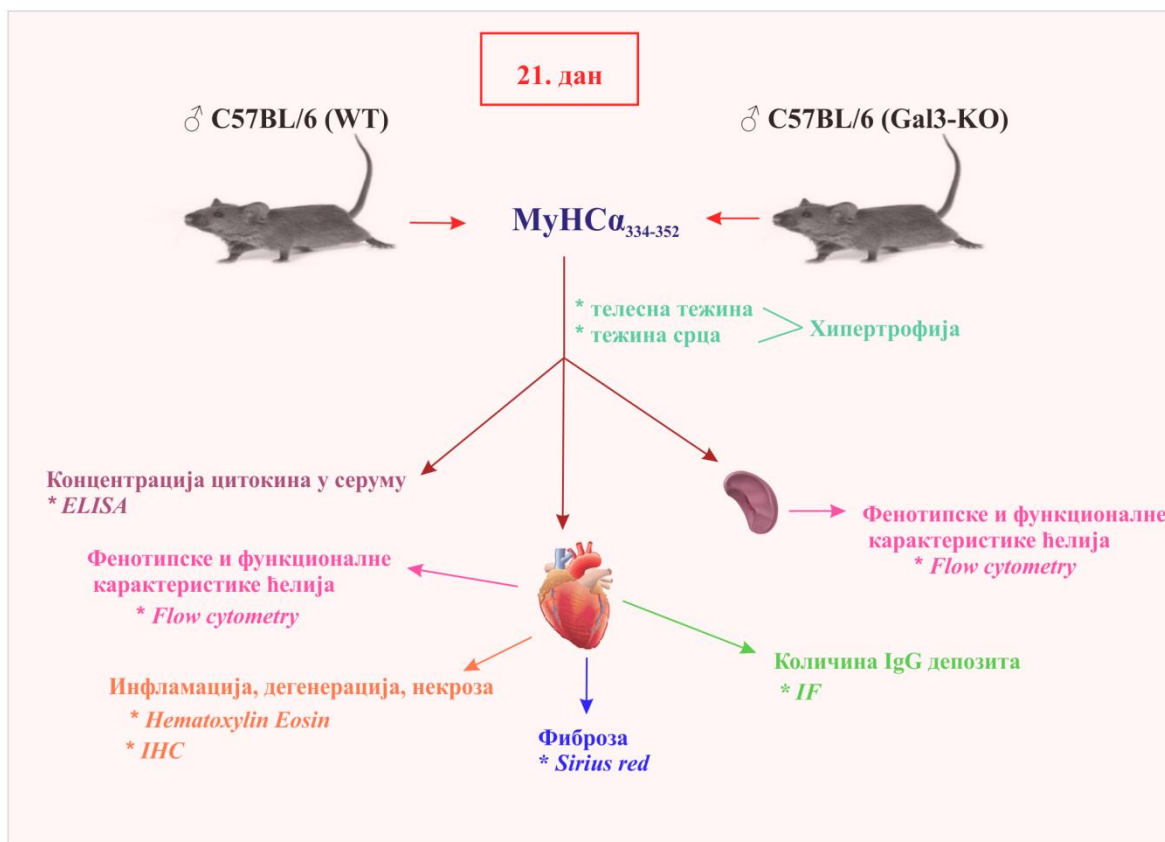


Схема 4. Евалуација ЕАМ у WT и Gal-3КО мишева. Индукција ЕАМ применом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида код C57BL/6 WT мишева и C57BL/6 Gal-3КО мишева.



### **3.3. Одређивање хипертрофије срца**

Степен хипертрофије срца одређиван је 21. дана након индукције болести одређивањем односа између тежине претходно перфундованог срца раствором за перфузију и укупне телесне тежине миша. Раствор за перфузију је припремљен мешањем 400 $\mu$ l хепарина концентрације 2000U са 200ml PBS-а (енг. *Phosphate Buffered Saline*). Након жртвовања мишева, урађена је перфузија срца помоћу апарата за перфузију у трајању од 3 минута по срцу са брзином протока од 10ml/min и притиском од 50mmHg.

### **3.4. Хистопатолошка процена тежине експерименталног аутоимунског миокардитиса**

Након жртвовања мишева коришћени су исечци ткива срца који су претходно фиксирани формалином и укалупљени парафином (енг. *Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE*) у циљу хистопатолошке процене тежине ЕАМ. Након калупљења узорци су сечени микротомом на серијске пресеке дебљине 5 $\mu$ m који су бојени хематоксилином и еозином са циљем да се утврди локализација запаљенског инфилтрата, интензитет запаљенске инфилтрације, као и степен дегенерације и некрозе кардиомиоцита. За одређивање степена фиброзе миокарда ткиво срца бојено је *Sirius red* и *Masson* техником.

#### **3.4.1. Фиксација ткива**

У циљу заустављања разградње ткива под дејством протеолитичких ензима као што је катепсин из лизозома, као и путрифакције ткива коју изазивају ензими сапрофитских бактерија врши се фиксација ткива. Фиксацијом ткива постиже се инактивација лизозомалних ензима, онемогућава њихова дифузија у цитоплазму ћелије и мења пермеабилност ћелијске мембране. Процесом фиксације постиже се стабилност протеина у ћелији, одржава се морфологија ћелије, чува се природни локалитет хемијских супстанци и спречава се контаминација микроорганизама.

Фиксација ткива може бити физичка (топлота-микропропагација, микроталаси-гликосал, замрзавање) и хемијска (потапање у фиксатив, перфузија). Хемијска фиксација

ткива се најчешће спроводи када се препарати посматрају под светлосним микроскопом. Фиксацијом помоћу Буеновог раствора са пикринском киселином или 4% неутралног пуферисаног формалина постиже се хемијска фиксација ткива. Формалин фиксира ткиво унакрсним везивањем протеина, формирањем вишеструких метиленских мостова између молекула формалина и молекула протеина. У експерименталној студији ткива срца фиксирана су у 4% раствору параформалдехида добијеног разблаживањем *Formaldehydum sol.* у концентрацији 37-40%. Узорци ткива срца урођена су у параформалдехид у коме су остављена најмање 24 сата на собној температури.

По завршетку фиксације, ткиво подлеже даљим процесима обраде, који имају за циљ замену воде из ткива парафином. Постфиксациона процедура састоји се од дехидратације, елиминације алкохола ксилолом и импрегнације ткива течним парафином.

### **3.4.2. Дехидратација**

Вода се у ткиву налази у слободном и везаном облику. 97% чини слободна вода, док остала 3% чини вода везана за макромолекуле протеина и угљених хидрата. Дехидратација је процес замене воде у ткиву алкохолом, тј. елиминација слободне воде, док везана вода мора остати у ткиву. Основни циљ дехидратације је припрема ткива за импрегнацију парафином. Пошто се вода и парафин не мешају, неопходно је елиминисати слободну воду из ткива. Поступак дехидратације подразумева потапање ткивних исечака у посуде које су садржале алкохол у концентрацији од 70%, 96% и 100% идући од најмање ка највишој концентрацији.

### **3.4.3. Просветљавање ткива у ксилолу**

На крају дехидратације, вода у ткиву бива замењена алкохолом. Пошто се алкохол и парафин не мешају, алкохол мора бити истиснут из ткива и замењен медијумом који се меша са парафином. То се постиже ксилолом, који је органски растварач и који са парафином припада истој групи органских једињења (група угљоводоника). У том циљу коришћен је ксилол. Ксилол, као органски растварач са високим индексом преламања

светлости, поред елиминације алкохола отапа и један део липида и уља из ткива, тако да ткиво постаје транспарентно.

#### **3.4.4. Импрегнација ткива парафином**

Да би се узорци исекли микротомом на серијске пресеке, ткиво треба прожети парафином. Парафин је угљоводоник који се добија прерадом угља и минералних уља. Парафин омогућава потпору ткивним структурама, као и лако сечење ткива на микротому. Импрегнација ткива парафином се одиграва на температури од 56-60°C при чему не долази до оштећења ткива топлотним и хемијским агенсима. Ткиво срца је калупљено у парафину са растућим концентрацијама 3 пута по 60 минута при температури од 60°C. Парафинизацијом ткива срца постигла се постепена замена импрегнираног ксилота парафином. Дехидрирано, парафинизирано ткиво срца је потом укалупљено у парафинске блокове. Калупљење у парафинске блокове постиже се утискивањем исечака ткива срца у металне посуднице које садрже смешу воска и парафина.

Из укалупљених ткива срца добијени су исечци ткива дебљине 5µm резањем калупа на микротому. Микротом је апарат који служи са сечење екстремно малих пресека ткива ( $\geq 5\mu\text{m}$ ). Користи се за припрему узорака у микроскопији који се посматрају на класичном трансмисионом светлосном, конфокалном или електронском микроскопу. Ткивни исечци су потом четкицом преношени у водено купатило чија је температура била 45°C. Преношењем ткивних пресека у водено купатило постиже се равнање исечака ткива. Плутајући ткивни исечци су потом сакупљани предметним стаклима. Предметна стакла са ткивним исечцима су потом преношена у термостат у којима су се сушила 12 сати на температури од 56°C.

### **3.4.5. Хематоксилин-еозин бојење**

Бојење хематоксилином и еозином (енг. *hematoxylin-eosin, H&E*) представља једну од најчешћих хистолошких бојења. Базофилне структуре (једра) боји плаво, црно или сиво, а ацидофилне структуре (цитоплазма) у розе или црвену боју. Сам хематоксилин није боја. Он се оксидише у хематеин који боји једра. Еозин је кисела боја и боји цитоплазму ћелија.

У циљу депарафинизације ткивних исечака срца добијени препарати били су подвргнути температурном третману који је трајао 45 минута на +56°C. Загрејани исечци су затим преношени у посуде са ксилолом како би се уклонио парафин. Након поступка депарафинизације спроведена је рехидратација ткива. Рехидратација ткива постиже се потапањем исечака у различите концентрације алкохола тако што се ткиво два пута потапа у 100% алкохол а потом једном у 96%, 90%, 70% алкохол у трајању од по пет минута. Након алкохолног третмана ткивни исечци су пет минута потапани у дестилованој води. Рехидрирано ткиво је потом бојено потапањем у *Mayer*-ов раствор хематоксилина (*Sigma Aldrich, USA*) у трајању од десет минута, након чега је уследило петоминутно испирање дестилованом и текућом водом. Хематоксилином обојени ткивни исечци су потом третирани алкохолним еозином у трајању од два минута (*Sigma Aldrich, USA*). *H&E* обојени ткивни исечци су у даљем поступку дехидрирани на следећи начин: шездесет секунди у 85% алкохолу, и по 2 пута у 96% и 100% алкохолу у трајању од по педесет секунди. Просветљавање ткивних исечака био је следећи корак у *H&E* бојењу који је постигнут тако што су ткивни исечци срца урањани у смешу ксилола и алкохола чији је однос био 1:1 у трајању од шездесет секунди. Потом су ткивни исечци пребацивани у две посуде наливене ксилолом и у којима су стајали шездесет секунди.

Последњи корак у бојењу подразумевао је наношење канаде балзама и покривање препарата покровним стаклима (*Canada balsam, Centrohem, Србија*). Ткивни исечци затворени канада балзамом и покровним стаклима сушили су се 24 сата на собној температури. Светлосним микроскопом са *Olympus* дигиталном камером анализирани су и фотографисани ткивни исечци срца (*BX51, Japan*).

#### **3.4.6. Sirius red бојење колагених влакана**

За визуелизацију степена фиброзе срчаног мишћа и селективно доказивање колагених влакана коришћено је *Sirius red* бојење, које колаген боји црвено док се једра боје смеђе до браон. Претходно формалином фиксирани и парафином укалупљени ткивни исечци срца су потом депарафинизирани и рехидрирани по протоколу који је описан у претходним поглављима.

За бојење препарата коришћен је *Weigert*-ов раствор хематоксилина који је садржао исте количине А и Б раствора (енг. *Weigert's Iron hematoxylin Set, Sigma Aldrich*). На тај начин припремљени ткивни исечци срца су потом обојени осмоминутним потапањем у *Weigert*-ов раствор хематоксилина (*Sigma Aldrich, USA*). Обојени препарати су потом испирани десет минута у текућој а затим и у дестилованој води. Водом испирани ткивни исечци су потом обојени раствором *Picro-Sirius red* у трајању најмање од шездесет минута. Раствор *Picro-Sirius red* направљен је растварањем 500mg *Sirius red* боје (енг. *Direct Red 80, Sigma Aldrich*) у 500ml засићене пикричне киселине (енг. *Picric acid Solution, Sigma Aldrich*). Обојени препарати су потом испирани у 0,005% раствору глацијалне сирћетне киселине 2 пута у трајању од по пет минута (*Centrohem, 51 Србија*). Након испирања ткивни исечци су дехидрирани 3 пута у 100% алкохолу а потом су просветљивани петоминутним потапањем у ксилолу. Последњи корак у бојењу подразумевао је наношење канаде балзама и покривање препарата покровним стаклима (*Canada balsam, Centrohem, Србија*). Ткивни исечци затворени канада балзамом и покровним стаклима сушили су се 24 сата на собној температури. Светлосним микроскопом са *Olympus* дигиталном камером анализирани су и фотографисани ткивни исечци срца (*BX51, Japan*).

#### **3.4.7. Трихромно бојење колагених влакана по Masson-у**

За визуелизацију степена фиброзе срчаног мишћа и селективно доказивање колагених влакана коришћено је и бојење по *Masson*-у. Као резултат ове методе колагена влакна су обојена плаво, цитоплазма црвено а једра су пребојена црно. Претходно формалином фиксирани и парафином укалупљени ткивни исечци срца су потом

депарафинизирани и рехидрирани по протоколу који је описан у претходним поглављима. Након депарафинизације и рехидратације приступили смо фиксацији ткивних исечака петнаестоминутним потапањем у Буенов раствор који је претходно био загрејан на 56°C (енг. *Bouins solution, Sigma Aldrich*). Испирање ткивних исечака изведено је прањем у текућој води након чега је уследило бојење *Weigert*-овим хематоксилином по процедури која је описана претходно. Обојени препарати су затим испирани у текућој и дестилованој води у трајању од десет минута. Водом испирани препарати су потом обојени раствором киселог фуксина (енг. *Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, Sigma Aldrich*) у трајању од десет минута и затим поново испирани у дестилованој води. Бојење колагених влакана у плаво постигнуто је потапањем ткивних исечака у раствор који је садржао исте количине фосфотунгстичне киселине и 5% фосфо-молибденске киселине (енг. *Phosphotungstic acid, Phosphomolybdic acid, Sigma Aldrich*). Након тога уследило је бојење ткивних исечака раствором плавог анилина (*Sigma Aldrich*) без претходног испирања у трајању од пет минута. Препарати испрани у дестилованој води су потом потапани од два до пет минута у 1%-ој сирћетној киселини. Након тога препарати су дехидрирани и просветљивани по претходно описаном протоколу. Последњи корак у бојењу подразумевао је наношење канаде балзама и покривање препарата покровним стаклима (*Canada balsam, Centrohem, Србија*). Ткивни исечци затворени канада балзамом и покровним стаклима сушили су се 24 сата на собној температури. Светлосним микроскопом са *Olympus* дигиталном камером анализирани су и фотографисани ткивни исечци срца (*BX51, Japan*).

### **3.4.8. Процена хистолошког скорa**

За дефинисање и квантификовање тежине ЕАМ користили смо скоринг систем предложен од стране *Valaperti*-а 2008. године [106], а микроскопирање су обавила два независна истраживача слепом методом (С.М. и М.М.К.). Скорирање је урађено за локализацију запаљенске инфилтрације, процену интезитета запаљенске инфилтрације, процену степена дегенерације и некрозе кардиомиоцита као и за квантификовање фиброзе. Локализација запаљенске инфилтрације квантификована је следећим скором: 0: без знакова болести; 1: апекс; 2: латерални зид; 3: септум. За процену интезитета запаљенске инфилтрације користили смо следећи скор: 0: нема инфилтрата у видном

пољу; 1: мање од 5 појединачних, сигурних мононуклеара у контакту са сарколемом у видном пољу; 2: 5-20 појединачних, сигурних мононуклеара у контакту са сарколемом у видном пољу; 3: више од 20 појединачних, сигурних мононуклеара у контакту са сарколемом у видном пољу. Процена степена дегенерације и некрозе кардиомиоцита квантификована је коришћењем следећег скорa: 0: без знакова болести; 1: <10% на посматраном пољу; 2: 11-30% на посматраном пољу; 3: 31-50% на посматраном пољу; 4: 51-90% на посматраном пољу; 5: >91% на посматраном пољу. Скорирање фиброзе је урађено следећим скор системом (0: одсутна, 1: обухваћено 25% миокарда, 2: обухваћено 50% миокарда, 3: обухваћено 75% миокарда, 4: обухваћено 100% миокарда). Употребом *ImageJ* (*NIHh, Bethesda, MD*) рачунарског програма извршена је квантификација количине колагена анализом фотомикрографија у овом програму. Софтверски пакет *ImageJ* програма израчунао је процентуалну заступљеност црвено пребојених колагених влакана у односу на укупни проценат видног поља. Добијени проценат колагена израчунао је као средња вредност процентуалне заступљености колагених влакана из десет видних поља за сваки препарат по на особ.

### **3.5. Имунофлуоресценција**

У циљу детекција IgG депозита и IgG позитивних ћелија коришћена је метода имунофлуоресценције. *Frozen section* препарати су коришћени за детекцију IgG депозита и IgG позитивних ћелија. Непосредно након жртвовања експерименталних животиња изоловано ткиво срца стављено је на лед а потом пребачено у криостат у коме је температура била -25°C. Ткива срца су у криостату била од 60-120 секунди након чега су исечена на криотому при чему је пречник исечака био од 5µm до 8µm. Добијени серијски пресеци су за даљу анализу складиштени у коморе у којима је температура била -20°C.

Први корак у овој процедури је фиксација ткива која је извршена наношењем од 500µl до 1000µl ацетона, који је чуван на температури од -20°C, на криостатске ткивне исечке у трајању од 7 минута. Након завршене фиксације уследило је двоструко прање ткивних исечака у PBS-у (енг. *Phosphate Buffered Saline*) у трајању од по пет минута. Након прања на препарате је додато 100µl 1% BSA раствореног у PBS-у (енг. *bovine serum albumin*). На овај начин третирани исечци ткива су инкубирани на собној температури у

трајању од петнаест минута. Након завршене инкубације на препарате је нането 150 $\mu$ l флуорохромом коњугованог и раствореног секундарног антитета: козјег анти-мишјег IgG (*Abcam, Cambridge, UK*) у разблажењу 1:200. Радни раствор секундарног антитета направљен је додавањем 1 $\mu$ l концентрованог антитета у 1% BSA претходно растворен у PBS-у. Након наношења секундарног антитета препарати су положени у влажну комору и инкубирани на собној температури у трајању од шездесет минута. По истеку шездесетоминутне инкубације уследило је двоструко испирање препарата у PBS-у при чему је свако испирање трајало по пет минута. Ткивни исечци који су претходно испрани у PBS-у су потом покривени са 1000 $\mu$ l воденог медијума (*Fluorescent Mounting Medium with DAPI*), за очување флуоресценције ткива, и покривном лјуспицом.

Присуство и локализација IgG депозита и IgG позитивних ћелија су анализирани и усликани посматрањем на конфокалном ласерском микроскопу (Axiovert 200M (LSM 510 Laser Module), Zeiss, увеличање 630x). Квантификација интезитета флуоресценције је урађена анализом фотомикрографија помоћу рачунарског програма *ImageJ* (*NIH, Bethesda, MD*).

### **3.6. Имунохистохемија**

У циљу испитивања фенотипских карактеристика мононуклеарног инфилтрата и процене степена њихове инфилтрације коришћено је имунохистохемијско бојење. У циљу детекције CD45, F4/80, CD3 и IL-10 позитивних ћелија, ткивни исечци срца обојени су имунохистохемијски употребом специфичних антимишјих антитета (*Abcam, Cambridge, UK*).

Пре имунохистохемијског бојења парафински калупи ткива срца су на микротому исечени на серијске пресеке дебљине 5 $\mu$ m. Уследио је поступак депарафинизације у ксилолу, након чега су ткива срца рехидрирана по протоколу који је описан у претходним поглављима. У циљу откривања епитопа ткивни исечци потопљени у Na-цитрату су потом подвргнути температурном третману, а након овог третмана и хлађења ткивних исечака исти су 3 пута испрани у PBS-у. Ради блокирања активности ендогене пероксидазе ткивни исечци су инкубирани у трајању од десет минута којима је претходно додато 100 $\mu$ l *Hydrogen Peroxide Block*-а. По завршеној инкубацији уследило је двоструко испирање



препарата у PBS-у. У даљем поступку а у циљу спречавања неспецифичног бојења ткивни исечци су прекривани са 100µl *Protein Block* и тако третирани препарати су остављани на десетоминутну инкубацију. Након инкубације ткивни исечци срца су испирани кратким потапањем у PBS-у. На овако припремљене исечке ткива срца је сипано 150µl примарног антитела (CD45, *ab10558*; F4/80, *ab15694*; CD3, *sc-20047*; IL-10, *ab33471*). Радни раствор примарних антитела направљен је у PBS-у са 1% BSA (енг. *bovine serum albumin*) концентрације 1:200. Инкубација са примарним антителом трајала је шездесет минута на собној температури а препарати су положени у влажну комору. Након једночасовне инкубације уследило је троструко испирање ткивних исечака у PBS-у који је садржао 0,005% Tween (*Sigma*). Потом је на ткивне исечке стављано 100µl *Streptavidin Peroxidase* након чега је уследила десетоминутна инкубација а потом и троструко испирање у PBS-у. Након троструког испирања у PBS-у на сваки од ткивних исечака додато је по 100µl радног раствора DAB реагенса. Радни раствор DAB реагенса направљен је тако што смо у 1000µl DAB *Substrate* додали 0,02ml DAB *Chromagen*. Радни раствор DAB реагенса се додаје како би реакција примарног антитела са циљним антигеном постала видљива. Инкубација са DAB реагенсом је трајала од 30 секунди до неколико минута у зависности од тога које примарно антитело је коришћено. Време инкубације са DAB реагенсом одређивали смо тако што смо под микроскопом посматрали којом брзином се препарати боје у браон. Чим је уочено да је ткиво срца било браон пребојено инкубација се прекидала троструким испирањем у дестилованој води.

Испирани исечци срца су потом урањани у посуде које су садржале *Mayer*-ов раствор хематоксилина (*Sigma*). Након двоминутног бојења ткивни исечци су опрани у текућој и дестилованој води. Након бојења исечци су дехидрирани и просветљени, као што је претходно описано. На исечке је нанет водени медијум за покривање а препарати су прекривени покровним стаклом. Препарати су покривени покровним стаклом и остављени на собној температури да се суше најмање 48h. Након 48h светлосним микроскопом са *Olympus* дигиталном камером анализирани су и фотографисани ткивни исечци срца (*BX51, Japan*). Током анализирања бројане су само браон пребојене ћелије тј. ћелије за које су се везала примарна антитела за CD45, F4/80, CD3 и IL-10 молекула. Анализа је обављена на 10 различитих непреклапајућих видних поља, увећање x200.

### **3.7. Анализа мононуклеарних ћелија срца и слезине методом проточне цитометрије**

Сви мишеви (*wild type* (WT) и *knock-out* (Gal-3КО)) након три недеље од субкутаног убризгавања MyHC $\alpha_{334-352}$  пептида (*Shanghai ShineGene Molecular Biotech*) жртвовани су употребом диетилетра (*BETA HEM, Београд*). У циљу анализирања процентуалне заступљености, апсолутног броја, фенотипских и функционалних карактеристика различитих ћелијских популација, мононуклеарне ћелије су изоловане из срца и слезине и анализирани методом проточне цитометрије.

#### **3.7.1. Изолација мононуклеарних ћелија из срца**

Након жртвовања мишевима је отворен грудни кош и извршена перфузија срчаних шупљина, као што је претходно описано. Перфундовано и изоловано срце смо затим уситнили маказицама. Уситњено ткиво срца је сипано у епрувете запремине 50ml које су садржале 2,5ml медијума за дигестију. Медијум за дигестију је садржао: 2,24mg колагеназе тип II (*Sigma*) и 7,2 $\mu$ l DNA-зе (*Sigma*) растворених у 2,5ml HBSS-а (*Sigma*). Дигестија ткива је спроведена стављањем узорака у водено купатило (четрдесет и пет минута, 37°C, 100 rpm) са три прекида за ручно мешање. Након завршене дигестије у епрувете је додато 20ml DMEM медијума (*Sigma*) са 5% FBS-ом (*Sigma*) и садржај је пропуштен кроз стрејнер чије су поре биле величин 70 $\mu$ m (*BD Biosciences*) који је потом испран са 2,5ml DMEM медијума (*Sigma*) са 5% FBS-ом (*Sigma*). Добијена ћелијска суспензија је центрифугирана на 400g десет минута. Након одливања супернатанта у епрувете је додато 10ml комплетног DMEM медијума (*Sigma*) са 5% FBS-ом (*Sigma*) и садржај је пропуштен кроз стрејнер са порам од 40 $\mu$ m (*BD Pharmingen*). Добијена ћелијска суспензија центрифугирана је на 400g 7 минута. Након центрифугирања у епрувете је додато по 1ml FACS раствора који је садржао 1% BSA, и 0,1% NaN<sub>3</sub> растворених у PBS-у. Суспензија ћелија добијена овим начином користила се за анализу фенотипа ћелија проточном цитометријом. Вијабилност изолованих ћелија проверавана је бојењем суспензије ћелија бојом *trypan-blue*. За даљу анализу користили смо само узорке који су садржали више од 90% вијабилних ћелија.

### **3.7.2. Изолација мононуклеарних ћелија из слезине**

Након жртвовања експерименталних животиња из свих мишева изоловане су слезине. Изоловане слезине су потом пребачене на стрејнер са порама величине 40 $\mu$ m који се налазио на епрувети запремине 50ml. Притискањем слезина клипом шприца извршена је механичка дигестија слезина. Након механичке дигестије стрејнер на коме се налазила уситњена слезина испран је са 5ml комплетног медијума који је садржао RPMI-1640 и 10% FBS. Потом смо добијену суспензију центрифугирали 5 минута на 1500 rpm. Након центрифугирања из епрувета је одливен супернатант а на преостали талог је сипано 5ml лизинг раствора и потом је уследило петоминутно инкубирање на леду. Радни лизинг раствор направљен је по следећој рецептури: у 200ml dH<sub>2</sub>O сипано је 200mg NaHCO<sub>3</sub>, 8mg EDTA и 1652mg NH<sub>4</sub>Cl. Након петоминутне инкубације сипано је по 5ml комплетног медијума ради заустављања даљег лизирања ћелија. Потом смо добијену суспензију центрифугирали 5 минута на 1500 rpm. Након центрифугирања из епрувета је одливен супернатант а на преостали талог је сипано по 8ml комплетног медијума. Добијени ресуспендовани талог је потом сипан на стрејнер ради одвајања спленоцита од хистиоцита. Суспензија спленоцита добијена овим начином користила се за анализу фенотипа ћелија проточном цитометријом. Вијабилност изолованих спленоцита проверавана је бојењем суспензије ћелија бојом *trypan-blue*. За даљу анализу користили смо само узорке који су садржали више од 90% вијабилних ћелија.

### **3.8. Фенотипска и функционална анализа популација изолованих мононуклеарних ћелија**

Применом методе проточне цитофлуорометрије одређивали смо релативну, односно процентуалну заступљеност различитих субпопулација мононуклеарних ћелија, као и њихове фенотипске и функционалне карактеристике. За анализу су коришћене изоловане ћелије срца и слезине. У циљу одређивања различитих површинских и интрацелуларних молекула коришћена су анти-мишја моноклонска антитела обележена различитим флуоресцентним бојама. За сваку анализу коришћено је 5x10<sup>5</sup> ресуспендованих ћелија у пуферу за бојење (*BD Biosciences*) волумена 50 $\mu$ l. У сваки

узорак ресуспендованих ћелија сипана су моноклонска антитела (Табела 1) или изотипске контроле (Табела 2) у одговарајућим концентрацијама.

**Табела 1. Приказ моноклонских антитела коришћених за бојење површинских и интрацелуларних маркера**

<b>НАЗИВ</b>	<b>КЛОН</b>	<b>ПРОИЗВОЂАЧ</b>
APC Anti mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Anti mouse CD8	eBioH35-17,2	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Anti mouse CD3	17A2	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Anti mouse CD11c	HL-3	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse CD45	30-F11	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE Anti mouse F4/80	CI:A3-1	Biolegend, San Diego, CA, USA
PE Anti mouse CD11b	M1/70	eBiosciences, CA, USA
FITC Anti mouse CD11c	N418	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Per CP Anti mouse Ly6c	HK1.4	eBiosciences, San Diego, CA, USA
APC Anti mouse CD206	15-II	Biolegend, San Diego, CA, USA
PE Anti mouse CD273	TY-25	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FITC Anti mouse IFN- $\gamma$	Rm9001	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PE Anti mouse IL-17	079-289	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Per CP Anti mouse IL-4	11B11	BD Biosciences, CA, USA
FITC Anti mouse IL-12	27537	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
APC Anti mouse IL-10	JES5-16E3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
PE Anti mouse IL-13	eBio13A	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Anti mouse IL-33	RMST2-2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Табела 2. Изотипске контроле**

<b>НАЗИВ</b>	<b>КЛОН</b>	<b>ПРОИЗВОЂАЧ</b>
Pe Rat anti mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype control	eBR2a	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Rat anti mouse IgG <sub>2ak</sub> Isotype control	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC Rat anti mouse IgG <sub>2b</sub> Isotype control	A95-1	eBiosciences, San Diego, CA, USA
FITC Rat anti mouse IgG <sub>2a</sub> isotype control	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

### **3.8.1. Бојење површинских маркера**

За бојење површинских маркера коришћена су моноклонска антитела специфична за одговарајуће епитопе на ћелијама. За бојење површинских маркера користили смо суспензију која је садржала  $3 \times 10^5$  вијабилних ћелија ресуспендованих у укупном волумену од 50 $\mu$ l. У сваку епрувету која је садржала 50 $\mu$ l ћелијске суспензије сипано је по 1ml раствора за бојење. Тако припремљени узорци центрифугирани су 5 минута на 400g. Након центрифугирања одливан је супернатант без додиривања епрувете са убрусом тако да је на дну епрувете остало око 50 $\mu$ l узорка. Потом је у сваки узорак сипано по 50 $\mu$ l претходно направљених комбинација растворених антитела тако да у финалној концентрацији заједно са ћелијама, антитела буду разблажења 1:200. У припреми радног раствора антитела њихово разблажење било је 1:100 на пример: 5 $\mu$ l антитела сипано је у 500 $\mu$ l раствора за бојење и из такве суспензије је узимано по 50 $\mu$ l радног раствора антитела и сипано у узорак волумена од 50 $\mu$ l и на тај начин је добијена финална концентрација 1:200. Након сипања површинских антитела узорци су инкубирани тридесет минута на +4°C (у фрижидеру). По истеку полчасовне инкубације у сваку епрувету са узорцима сипано је по 2ml раствора за бојење, након чега су узорци центрифугирани пет минута на 400g. Из центрифугираних узорака су потом одливени супернатанти а епрувете кратко стављене на убрус тако да је у свакој епрувети остајао само талог обојених ћелија. На ћелијски талог је сипано по 350 $\mu$ l раствора за бојење. На овај начин сви припремљени узорци су анализирани на проточном цитометру унутар једног сата од последњег корака за бојење. Проточни цитометар на коме су анализирани

добијени узорци био је *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). Подаци добијени анализом обојених ћелија на проточном цитометру су даље обрађивани коришћеном софтверског пакета *FlowJo*.

### **3.8.2. Бојење интраћелијских маркера и цитокина**

За бојење интраћелијских маркера и цитокина коришћена су моноклонска антитела специфична за одговарајуће епитопе у ћелијама.

У сваки узорак изолованих ћелија сипано је по 1ml комплетног медијума (DMEM и 10% FBS). Потом је у сваку од епрувета додато по 5µl јономицина (*Sigma*), 5µl РМА (*Sigma*) и 0,8µl *GolgyStop* (*BD Biosciences*) ради активације ћелија. Односно јономицин и РМА се користе као активатори транскрипције гена док је улога *GolgyStop*-а да задржава синтетисане протеине у органелама као што су ендоплазматски ретикулуму или Голџи апарат што доводи до повећане акумулације синтетисаних цитокина а самим тим и веће могућности да се детектују само оне ћелије које прекомерно продукују одговарајуће цитокине [279]. Након додавања активатора и инхибитора транспорта узорци су инкубирани шест сати на температури од 37°C. Након шесточасовне инкубације у све епрувете додато је по 1ml раствора за бојење. Наливене епрувете су центрифугиране пет минута на 400g. Процес прања је у истом трајању и при истој брзини поновљен два пута. Након другог прања ћелија и одливања супернатанта у сваки узорак сипано је по 1ml комплетног медијума. Тако припремљени узорци су остављени у фрижидеру док се правио радни раствор антитела. Обзиром да смо имали пет различитих комбинација антитела из суспензије ћелија волумена 1ml узето је по 200µl ћелијске суспензије и разливено у пет *FACS tube* (епрувете за *FLOW*). Тако да је свака суспензија ћелија садржала  $1 \times 10^6$  вијабилних ћелија. У сваку епрувету је потом сипано по 1ml раствора за бојење и узорци су центрифугирани пет минута на 400g. Након центрифугирања супернатанти су одливени без употребе убруса и додата су разблажена површинска антитела у концентрацији 1:100, тако да финална концентрација буде 1:200. Након сипања површинских антитела узорци су инкубирани тридесет минута на +4°C (у фрижидеру). По истеку полчасовне инкубације у сваку епрувету је додато по 1ml раствора за бојење и сви узорци су центрифугирани пет минута на 400g. Затим је из сваке епрувете одливен

супернатант на убрусу. Потом су епрувете са ћелијским талогом извортексоване и у сваку од њих сипано по 200µl *Cytofix* раствора (*BD Biosciences*) у циљу фиксације и пермеабилитације ћелија. Ради боље фиксације и пермеабилитације узорци су поново вортексовани а потом остављени на двадесетоминутну инкубацију у фрижидеру на +4°C. По истеку инкубације све епрувете наливене су са по 1ml раствора за пермеабилитацију. Раствора за пермеабилитацију направљен је по следећој рецептури: у мензурџу је сипано 20ml FBS и 2ml 10% штока сапонина, потом је уз зид мензуре наливен PBS до укупног волумена до 200ml, тако да је добијена финална концентрација сапонина од 0,1%. Након додавања раствора за пермеабилитацију сви узорци центрифугирани су на 400g пет минута, потом је из сваке епрувете одливен супернатант без употребе убруса. Одливањем супернатанта без убруса у свакој епрувети остаје око 50µl суспензије ћелија. На тај волумен сипана су антитела за интраћелијске маркере претходно растворена у пуферу за пермеабилитацију у концентрацијама специфичним за сваки цитокин по на особ. Након сипања интраћелијских антитела узорци су инкубирани тридесет минута на +4°C (у фрижидеру). По истеку полчасовне инкубације у сваку епрувету са узорцима сипано је по 1ml раствора за пермеабилитацију, епрувете су потом центрифугиране на 400g пет минута, и одливен је супернатант на убрусу. Потом је у сваку епрувету са узорцима сипано по 1ml раствора за бојење, након чега су узорци центрифугирани пет минута на 400g а супернатанти одливени на убрусу. На ћелијски талог је сипано по 350µl раствора за бојење. На овај начин сви припремљени узорци су анализирани на проточном цитометру унутар једног сата од последњег корака за бојење. Проточни цитометар на коме су анализирани добијени узорци био је *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). Подаци добијени анализом обојених ћелија на проточном цитометру су даље обрађивани коришћенем софтверског пакета *FlowJo*.

### **3.9. Одређивање концентрације цитокина у серуму**

Животиње обе експерименталне групе су 21-ог дана експеримента жртвоване у атмосфери засићеној диетилетром (*BETA НЕМ, Београд*) и аспирирана је крв из абдоминалне аорте и центрифугирана у трајању од десет минута при брзини од 300g. Добијена провидна фаза (серум) издвојена је аутоматском пипетом и складиштена у коморе температуре -20°C до даље анализе.

Серумске концентрације IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-33, и IL-10 одређиване су употребом комерцијалних тестова (ELISA) специфичних за цитокине миша (*R&D Systems*).

Дан пре анализе у микротитар плочу сипано је по 100 $\mu$ l *Capture* антитела, плоче су затворене и остављене на собној температури 19-18 сати. Након инкубације са *Capture* антителима свако бунарче микротитар плоче је опрано са 250 $\mu$ l *Wash Buffer*-а укупно три пута. Након испирања, само у обележене делове микротитар плоче сипан је *Block Buffer* и то у оне бунарчиће у којима ће се одређивати серумске концентрације IFN- $\gamma$ . У све остале бунарчиће микротитар плоче сипано је по 150 $\mu$ l *Reagent Diluent*-а. Након сипања *Block Buffer*-а и *Reagent Diluent*-а микротитар плоче су прекриване адхезивном фолијом и инкубиране шездесет минута на собној температури. Након прве инкубације микротитар плоче су опране са *Wash Buffer*-ом три пута. У свако прво бунарче прве колоне за сваки цитокин сипано је по 200 $\mu$ l одговарајућег стандарда а у остале бунарчиће прве колоне по 100 $\mu$ l *Reagent Diluent*-а (концентрације стандарда у првом бунарчету: IL-4 и IL-33 конц. 1000 pg/ml; IL-10 и IFN- $\gamma$  конц. 2000 pg/ml). Добијања опадајућих концентрација стандарда изведено је на следећи начин: из првог бунарчета прве колоне у које је сипано 200 $\mu$ l стандарда одговарајуће концентрације узето је 100 $\mu$ l и сипано у друго бунарче исте колоне. Након мешања садржаја другог бунарчета из њега је извађено 100 $\mu$ l у треће бунарче и по истом принципу урађено до седмог бунарчета прве колоне, тако да је осмо бунарче прве колоне сдржало само 100 $\mu$ l *Reagent Diluent*-а. У преостале бунарчиће су сипани узорци серума према унапред утврђеној шеми (укупан волумен који је сипан у свако бунарче био је 100 $\mu$ l који је садржао 20 $\mu$ l серума и 80 $\mu$ l дестиловане воде). Наливене микротитар плоче прекриване су фолијом и инкубиране два сата на собној температури. Након двочасовне инкубације просут је садржај плоче а потом је плоча опрана са по 250 $\mu$ l *Wash Buffer*-а за свако бунарче три пута. Након испирања у свако



бунарче је сипано по 100µl *Detection* антитета, плоче су прекривене фолијом и инкубиране два сата на собној температури. Након двочасовне инкубације присут је садржај плоче а потом је плоча опрана са по 250µl *Wash Buffer*-а за свако бунарче три пута. Након испирања у свако бунарче је сипано по 100µl радног раствора *Streptavidin-HRP*-а (енг. *Streptavidin horseradish peroxidase*), плоче су прекриване фолијом и инкубиране двадесет минута на собној температури у мраку. Након двадесетоминутне инкубације присут је садржај плоче а потом је плоча опрана са по 250µl *Wash Buffer*-а за свако бунарче три пута. Након испирања у свако бунарче је сипано по 100µl раствора који је садржао супстрат А и Б. Микротитар плоче наливене субстратом А и Б инкубиране су око двадесет минута у мраку на собној температури. Дужину инкубације одређивао је интезитет плаве боје. Након инкубације у свако бунарче је сипано по 50µl стоп раствора и све наливене микротитар плоче су стављане на мешалицу подешену на 100 обртаја у трајању од пет минута. Тако припремљене микротитар плоче анализиране су на апарату *Microplate reader* у програму *Zenyth, Anthos* који је подешен да мери апсорбанцу од 450nm.

### **3.10. Статистичка анализа података**

Добијени подаци анализирани су у софтверском програму за статистичку анализу података (SPSS 22.0). За испитивање разлике у средњим вредностима између две различите варијабле које су имале нормалну расподелу коришћен је *Student t* тест док је за тестирање разлика између медијана две различите варијабле које нису имале нормалну расподелу коришћен непараметарски тест *Mann-Whitney*. Провера нормалности расподеле тестирана је употребом *Shapiro-Wilk* или *Kolmogorov-Smirnov* тестова. Све добијене вредности презентоване су као SEM +/- SE или као медијане (5., 25., 75. и 95. перцентил). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између гупа је одређена на  $p < 0.05$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

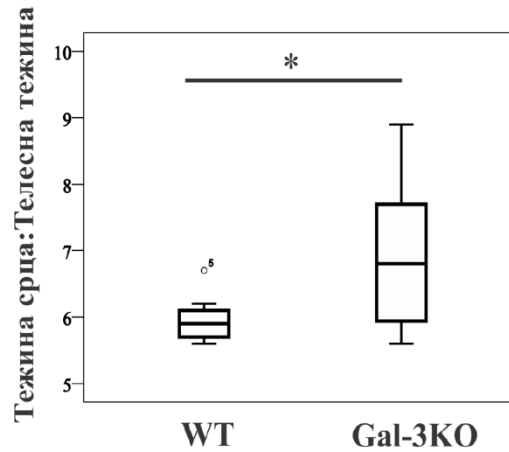
### 4.1. Одсуство гена за Gal-3 значајно повећава хипертрофију срца

У до сада објављеној литератури познато је да експресија гена за Gal-3 утиче на тежину вирусног миокардитиса [268], док је улога овог молекула у патогенези аутоимунског миокардитиса још увек непозната. Познато је и да су мишеви соја C57BL/6 релативно резистентни на пептидом индуковани ЕАМ, а да се осетљивост повећава апликацијом целог тешког ланца миозина [280, 281]. Да би се утврдило да ли и на који начин делеција гена за Gal-3 утиче на патогенезу ЕАМ коришћени су мишеви чистог соја WT- C57BL/6 и Gal-3КО мишеви. Сви WT и Gal-3КО мишеви имунизовани су MyHC $\alpha_{334-352}$  пептидом 0. и 7. дана. Тежина ЕАМ одређивана је 21-ог дана експеримента, односно приликом жртвовања животиња.

Један од параметара који је коришћен за испитивање тежине ЕАМ било је одређивање степена хипертрофије срца. Хипертрофија срца одређивана је према следећој формули:

$$\text{Хипертрофија срца} = \frac{\text{тежина срца}}{\text{телесна тежина}}$$

Приказани резултат показује да имунизовани Gal-3КО мишеви имају статистички значајно већу хипертрофију срца у поређењу са контролним WT мишевима 21-ог дана експеримента ( $p < 0.05$ ; **Графикон 1**).



**Грфикон 1. Одсуство гена за Gal-3 повећава хипертрофију срца након апликације  $MuHC\alpha_{334-35}$  пептида.** Оболели Gal-3KO мишеви имају значајно већу хипертрофију миокарда у односу на WT мишеве ( $5.9889 \pm 0.11235$  vs  $7.0558 \pm 0.43264$ ). Приказани резултати представљају медијане односа тежине срца и телесне тежине за по 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (25. перцентил  $\pm$  медијана  $\pm$  75. перцентил, \* $p < 0.05$ ). Подаци су анализирани је *Mann-Whitney* тестом.

#### 4.2. Делесија гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису

Након што је уочено да одсуство Gal-3 поспешује хипертрофију срца (**Графикон 1**) испитано је да ли одсуство овог молекула утиче на остале показатеље тежине аутоимунског миокардитиса.

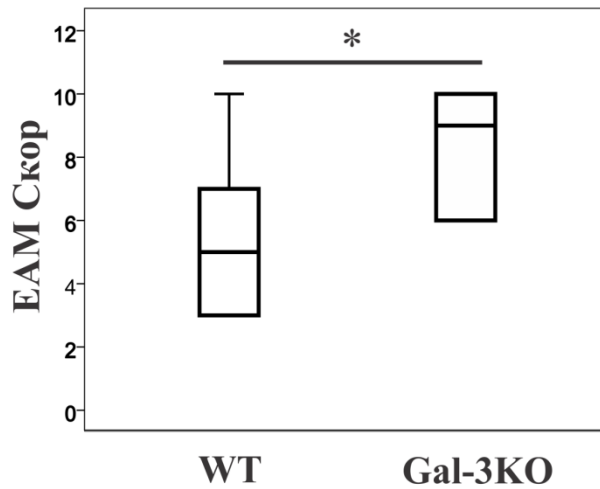
На тежину ЕАМ осим хипертрофије утичу и број, величина и локализација инфилтрата у срцу, као и степен дегенерације и некрозе кардиомиоцита. У том циљу одређиван је хистолошки скор и на основу њега вршена процена тежине ЕАМ. За дефинисање и квантификовање тежине ЕАМ, коришћен је скоринг систем по *Valaperti et al.* [106], коригован и прилагођен експерименталном анималном моделу болести (**Табела 3**).

Табела 3. Квантификација тежине ЕАМ.

(Модификовано према: Valaperti A. et al. *J Immunol.* 2008; 180:2686–95.)

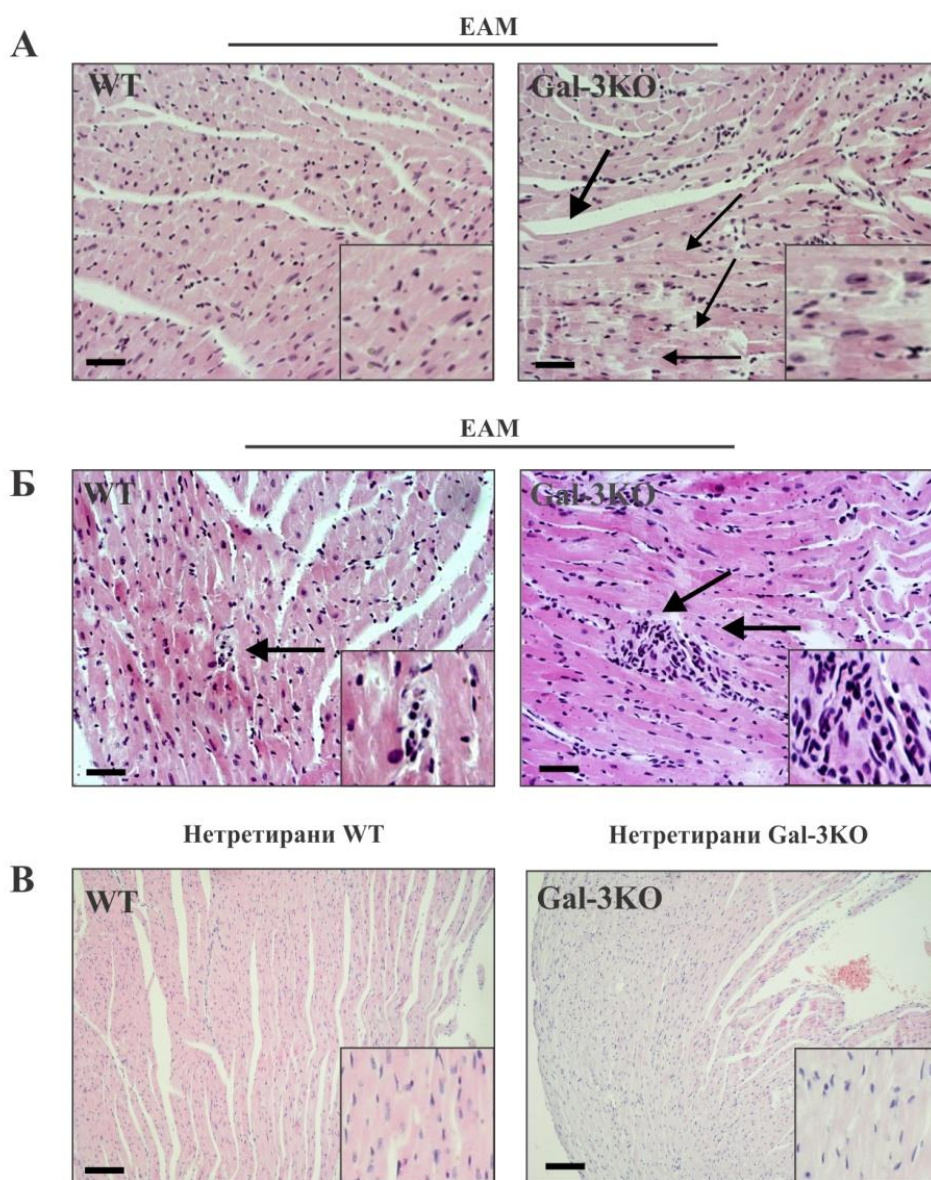
	ЛОКАЛИЗАЦИЈА	ИНТЕЗИТЕТ ЗАПАЉЕНСКЕ ИНФИЛТРАЦИЈЕ	ДЕГЕНЕРАЦИЈА	НЕКРОЗА	
<b>0</b>	Без знакова болести	Без знакова болести	Без знакова болести	Без знакова болести	
<b>1</b>	Апекс	<5 мононуклеара у видном пољу	<10% пп*	<10% пп*	
<b>2</b>	Латерални зид	5-20 мононуклеара у видном пољу	11-30% пп*	11-30% пп*	
<b>3</b>	Септум	>20 мононуклеара у видном пољу	31-50% пп*	31-50% пп*	
<b>4</b>	/	/	51-90% пп*	51-90% пп*	
<b>5</b>	/	/	>91% пп*	>91% пп*	
<b>Скор</b>	<b>0-5</b>	<b>0-5</b>	<b>0-5</b>	<b>0-5</b>	<b>Σ 0-25</b>

Степен тежине миокардитиса одређиван је након бојења ткивних исечака срца хематоксилин-еозином бојом. На основу оцена добијених скорирањем појединачних параметара инфламације одредили смо укупан хистолошки скор за процену тежине ЕАМ. На **Графикону 2** приказана је разлика у ЕАМ скору Gal-3КО и WT мишева где се уочава јасна разлика ( $p < 0.05$ ) у тежини ЕАМ односно Gal-3КО мишеви имају значајно тежу форму ЕАМ у поређењу са контролним WT мишевима.



**Графикон 2.** Хистолошки скор за процену тежине ЕАМ код WT и Gal-3KO мишева три недеље након имунизације МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида. Имунизовани Gal-3KO мишеви имају значајно виши хистолошки скор који обухвата степен инфилтрације миокарда, дегенерације и некрозе кардиомиоцита у поређењу са WT мишевима ( $4,83 \pm 0,7$  vs  $7,78 \pm 2,4$ ). Приказани резултати представљају медијане односа ЕАМ скорa за по 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (25. перцентил  $\pm$  медијана  $\pm$  75. перцентил, \* $p < 0.05$ ). Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney* тестом.

Анализом исечака ткива срца уочено је: значајно веће оштећење миокарда и присуство већег броја дифузно распоређених инфилтрата у ткивним исечцима срца Gal-3KO мишева (Слика 1А). У миокарду Gal-3KO мишева такође је детектована јасно видљива и обимна дегенерација и некроза кардиомиоцита за разлику од WT мишева у чијем миокарду су уочене ретке и појединачне дегенеративне промене. Анализом броја и величине инфламацијских инфилтрата уочено је да у свим деловима миокарда Gal-3KO мишева постоје обимни и дифузно распоређени инфламацијски инфилтрати, док је у миокарду WT мишева детектован мањи број спорадичних и хипоцелуларних инфилтрата (Слика 1Б). Такође је показано да су ткива срца неимунизованих мишева била без знакова дегенерације и некрозе, односно имала су нормалну хистолошку грађу (Слика 1В). До сада приказани резултати јасно показују да недостатак експресије гена за Gal-3 значајно повећава оштећење миокарда индукованог имунизацијом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида.



**Слика 1. Репрезентативни исечци ткива срца након имунизације  $MuH\alpha_{334-352}$  пептида.** Репрезентативни исечци ткива срца обојени стандардним патохистолошким бојењем (увеличање 200x, размера=50 $\mu$ m). На левом панелу (1А и 1Б) приказане су репрезентативне фотографије имунизованих WT, а на десном панелу имунизованих Gal-3KO мишева. На слици 1В су приказани ткивни исечци неимунизованих, контролних WT и Gal-3KO мишева.

#### **4.3. Недостатак гена за Gal-3 значајно мења заступљеност моноцитних и гранулоцитних популација/субпопулација у ткиву срца мишева имунизованих МуНС $\alpha$ <sub>334-352</sub> пептидом**

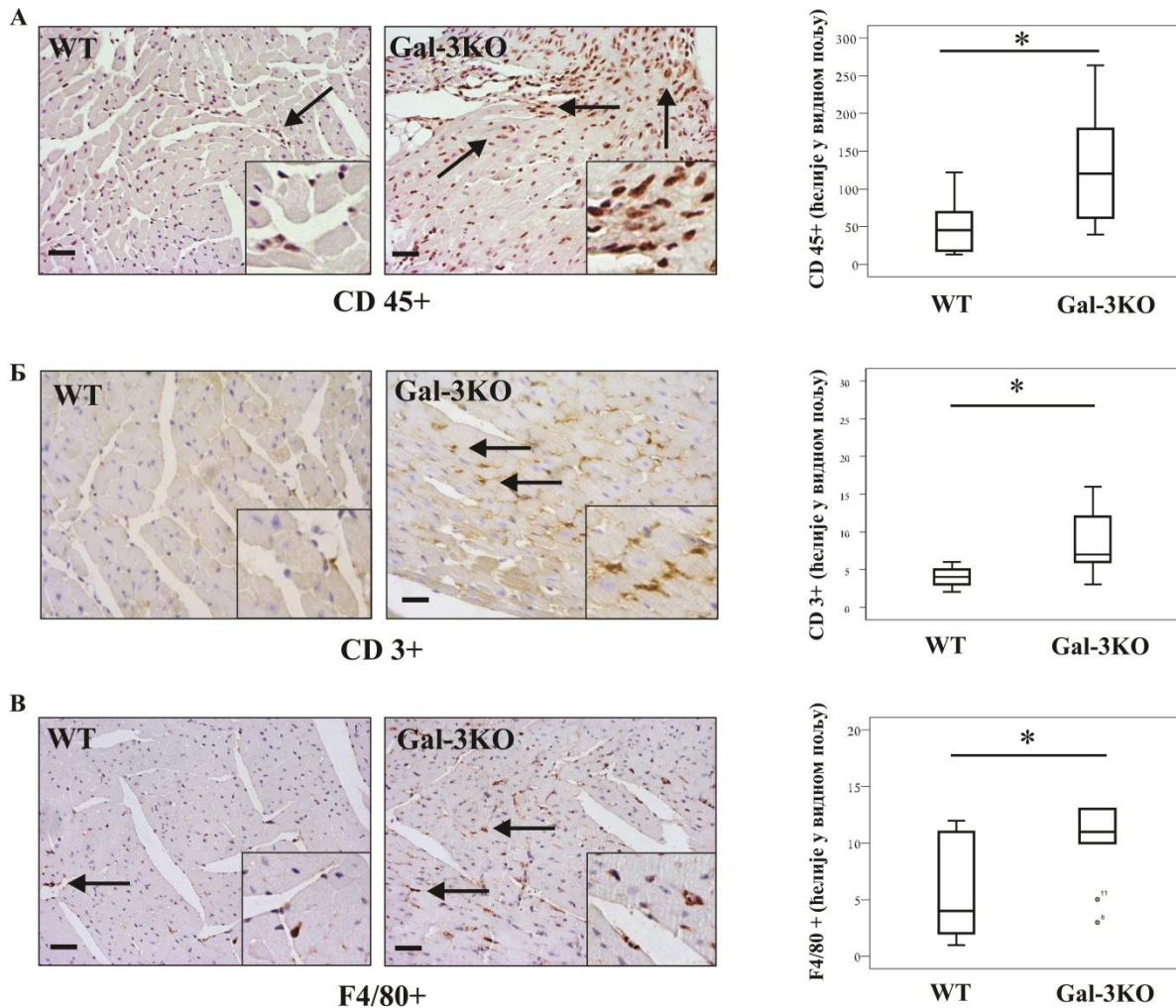
Како је код Gal-3КО мишева уочен већи хистолошки скор (**Графикон 2**), значајно јаче оштећење миокарда са бројнијим инфламацијским ћелијама (**Слика 1**), анализирано је да ли су уочене разлике последица различите заступљености појединих субпопулација моноцита. Познато је да се инфламацијски инфилтрати у ткиву оболелог миокарда углавном састоје од моноцита, гранулоцита и лимфоцита [282]. У циљу испитивања састава моноклеарног инфилтрата користили смо имунохистохемијско бојење уздужних пресека ткива срца обе експерименталне групе животиња. Заступљеност моноклеарних ћелија одређивали смо бројем CD45, F4/80 и CD3 позитивних ћелија по видном пољу и следећим скором: 1- >50, 2- 50-100, 3- <100 позитивних ћелија по видном пољу.

Специфичним имунохистохемијским бојењем су анализирани субпопулације моноцита у ткиву срца.

**CD45+ лимфоцити:** Имунохистохемијском анализом детектован је значајно већи ( $p < 0.05$ ) број CD45+ ћелија у ткиву срца Gal-3КО мишева у поређењу са бројем истих ћелија у ткиву срца WT контролних мишева (**Слика 2А**).

**CD3+ лимфоцити:** Даљом анализом ткивних исечака срца имунизованих мишева детектована је значајна разлика у броју CD3+ ћелија. Резултати анализе показали су да се у миокарду Gal-3КО мишева детектује значајно већа заступљеност CD3+ лимфоцита када се пореди са бројем ових ћелија у ткиву миокарда WT контролних мишева ( $p < 0.05$ ; **Слика 2Б**).

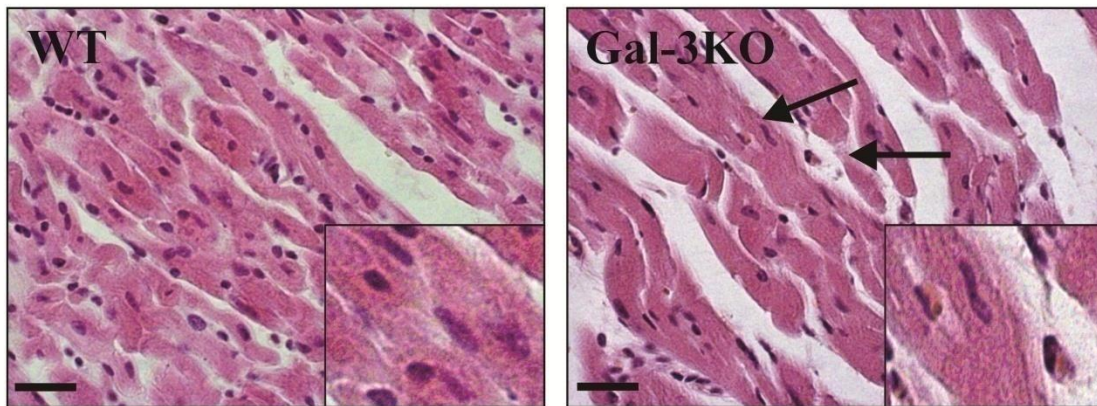
**F4/80+ макрофаги:** Додатна имунохистохемијска бојења на маркере макрофагне популације показала су разлику у експресији и дистрибуцији површинског F4/80 маркера. Анализом експресије овог маркера показана је дифузна дистрибуција и значајно већи ( $p < 0.05$ ) број F4/80+ ћелија у ткиву срца Gal-3КО мишева, у поређењу са појединачним, ретким F4/80+ макрофагима у ткиву срца WT мишева (**Слика 2В**).



**Слика 2. Имунохистохемијско бојење моноцитно/макрофагне популације у ткивним исечцима имунизованих WT и Gal-3KO мишева.** На левој страни слике приказане су репрезентативне фотографије имунохистохемијског бојења имунизованих WT и Gal-3KO мишева (увеличање 200x, размера=50µm). На десној страни слике су графички приказани скор и средња вредност броја CD45+ ( $53,4 \pm 19,8$  vs  $135 \pm 2,1$ ), F4/80+ ( $5,66 \pm 1,9$  vs  $11,11 \pm 1,8$ ) и CD3+ ( $4 \pm 0,5$  vs  $13,77 \pm 5,8$ ) моноцита по видном пољу. Приказани резултати представљају средње вредности броја позитивних ћелија за по 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (25. перцентил  $\pm$  медијана  $\pm$  75. перцентил, \* $p < 0.05$ ). Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney* тестом.



**Еозинофили:** Подаци добијени из клиничких студија су показали да еозинофили представљају најзаступљенију популацију ћелија у инфилтратима миокарда особа оболелих од миокардитиса циновских ћелија и еозинофилног некротизирајућег миокардитиса [41, 42]. Осим резултата клиничких студија и подаци добијени на експерименталним моделима указују на значајну улогу ових ћелија у патогенези ЕАМ. Резултати једне од таквих студија су показали да је заступљеност еозинофила у ткиву оболелог миокарда у позитивној корелацији са тежином аутоимунског миокардитиса индукованог имунизацијом А/Ј мишева [78]. Обзиром да на патогенезу ЕАМ значајно утиче и хаплотип мишева коришћених у експерименту, у наставку истраживања испитивали смо заступљеност еозинофила у ткиву срца имунизованих C57BL/6 мишева хаплотипа H-2<sup>b</sup>. Патохистолошким анализом ткива срца обојених хематоксилин-еозином (H&E), детектовани су еозинофили само у ткиву срца имунизованих Gal-3КО животиња (Слика 3). Еозинофили са тамно црвено пребојеном цитоплазмом уочени су само у ткиву Gal-3КО мишева.



**Слика 3. Хематоксилин-еозин бојење еозинофила у ткивним исечцима имунизованих WT и Gal-3КО мишева.** Репрезентативни исечци ткива срца обојени стандардним патохистолошким бојењем (увеличање 400x, размера=50µm).

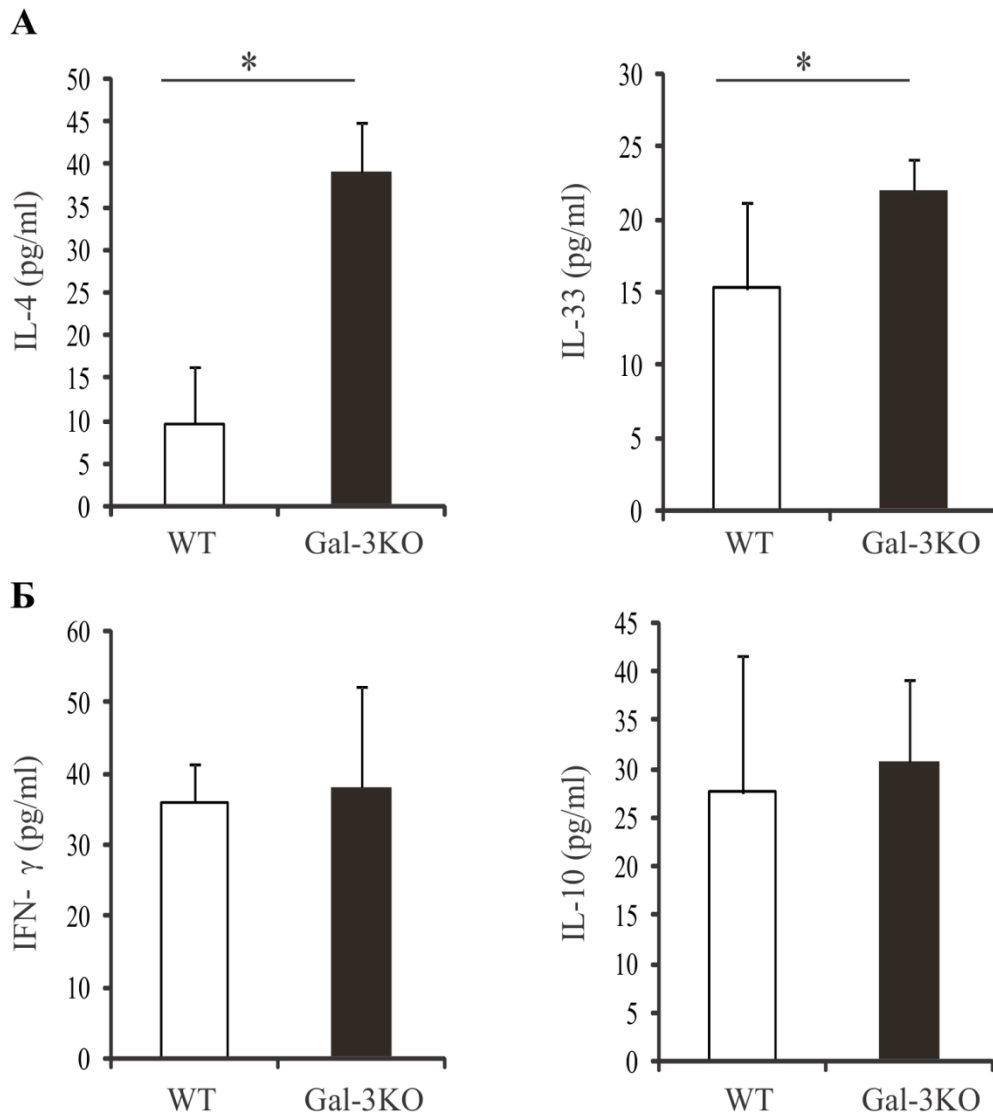
Добијени подаци указују да недостатак експресије гена за Gal-3 утиче на састав инфламцијских инфилтрата у ткиву миокарда тако што мења заступљеност појединих моноцитних и гранулоцитних субпопулација.

#### **4.4. Серумске концентрације Th2 цитокина IL-4 и IL-33 су веће у оболелим Gal-3КО мишевима**

Познато је да у патогенези ЕАМ битну улогу имају Th1 и Th2 цитокини. Резултати досадашњих студија су опречни у погледу улоге и Th1 и Th2 цитокина. Резултати студија показују да су вредности IFN- $\gamma$  више у мишевима који имају тежи облик ЕАМ, супротно од ових резултата показано је да је делеција гена за IFN- $\gamma$  такође повезана са тежим обликом ЕАМ [112, 119]. Слични резултати добијени су и када је испитивана улога Th2 цитокина. Наиме, показано је да недостатак експресије гена за IL-4 атенуише ЕАМ у А/Ј мишевима [78], док је одсуство гена за IL-33 повезано са тежом формом ЕАМ у BALB/с мишевима [283].

Како је код Gal-3КО мишева уочен већи хистолошки скор (**Графикон 2**), значајно јаче оштећење миокарда и већи број инфламаторних ћелија у миокарду Gal-3КО мишева (**Слика 1**) у наставку истраживања испитивано је да ли су уочене разлике настале као последица разлика у секрецији Th1 vs Th2 цитокина. Серумске концентрације испитиваних цитокина мерене су 21-ог дана од индукције ЕАМ, ELISA методом.

Као што је приказано на **Фигури 1А** серумске концентрације (IL-4 и IL-33), односно Th2 цитокина биле су више у анализираним серумима Gal-3КО у поређењу са контролним WT мишевима. Ова разлика достигла је статистичку значајност од  $p < 0.05$ . Истовремено, недостатак експресије гена за Gal-3 није узроковао значајну разлику ( $p > 0.05$ ) у концентрацијама Th1 цитокина (IFN- $\gamma$ ) као ни имunosупресивног цитокина IL-10 (**Фигура 1Б**;  $p > 0.05$ ).



**Фигура 1. Вредности концентрације цитокина у серуму WT и Gal-3KO мишева.** Концентрација IL-4 ( $9,77\pm 6,6$  vs  $39,27\pm 6,6$ ) и IL-33 ( $15,31\pm 5,9$  vs  $22,05\pm 2,15$ ) је статистички значајно већа у серуму Gal-3KO (\* $p < 0,05$ ). Разлика у серумским вредностима IFN- $\gamma$  ( $36,02\pm 5,4$  vs  $38,29\pm 14$ ) и IL-10 ( $27,63\pm 14,1$  vs  $30,75\pm 8,4$ ) није досегла статистичку значајност ( $p > 0,05$ ). Приказани резултати представљају средње вредности серумских концентрација одређиваних цитокина добијене из серума 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов  $t$  тест).

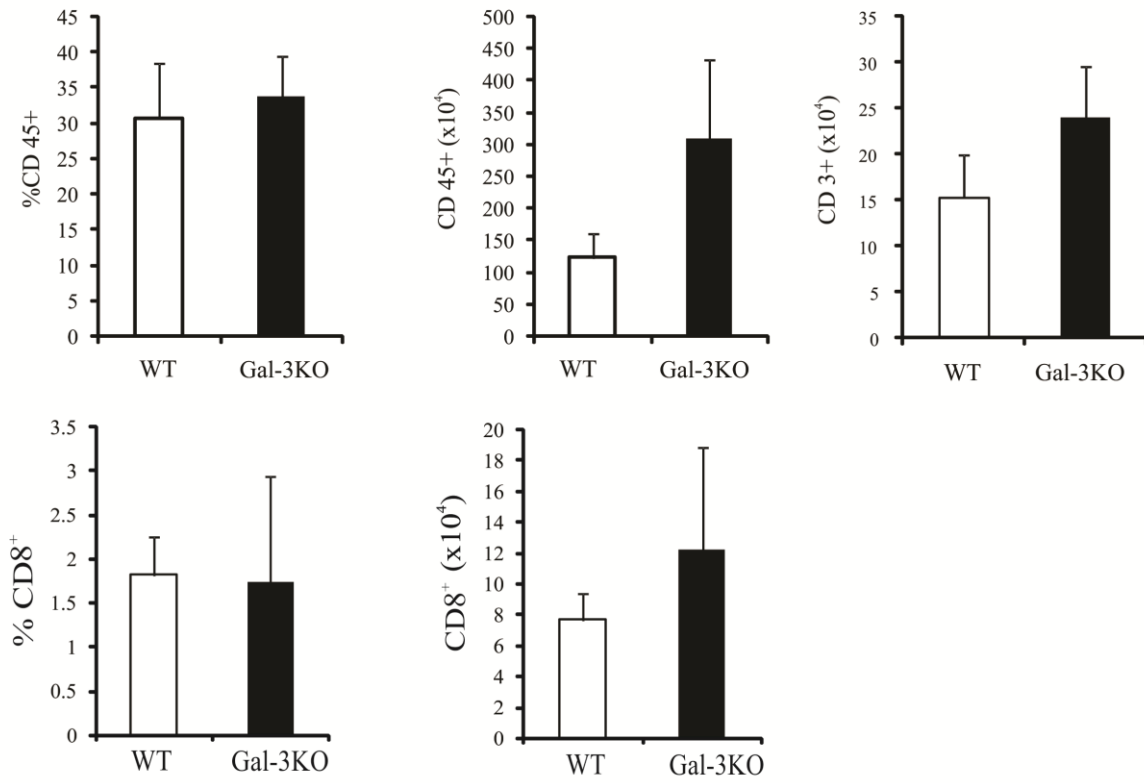
#### **4.5. Одсуство експресије гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева**

Детектовани већи ЕАМ скор (**Графикон 2**) и више концентрације Th2 цитокина у серуму (**Фигура 1А**) оболелих Gal-3КО мишева, посредно су наводили на претпоставку да је повећана инфилтрација инфламаторним ћелијама одговорна за уочене разлике. Из тог разлога је проточном цитометријом одређивана заступљеност и фенотип инфилтришућих моноклеара у срцу имунизованих мишева.

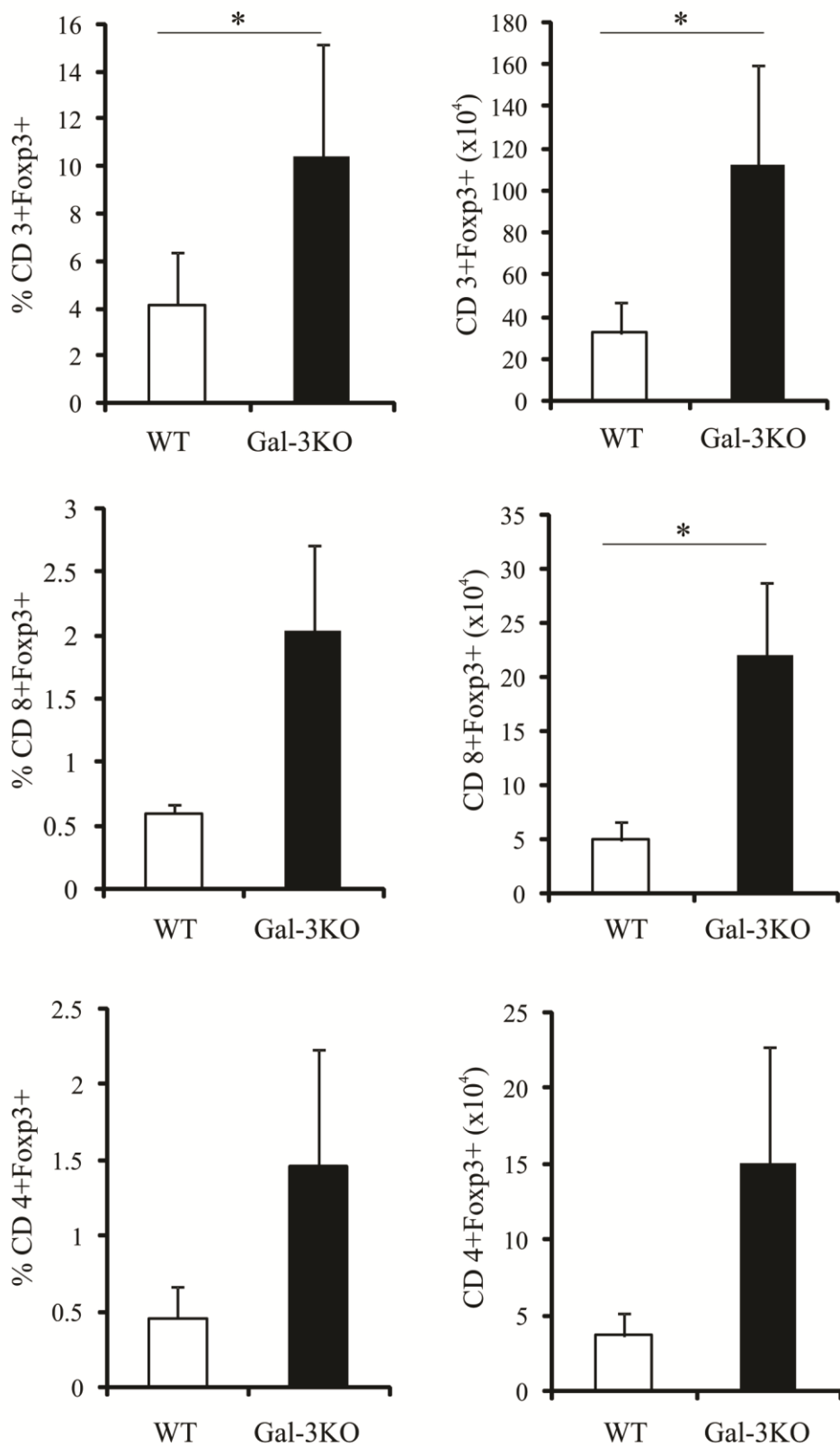
Проточно цитометријском анализом одређивани су и процентуални и нумерички односи моноцитних CD45+, CD3+, CD4+ и CD8+ субпопулација. Детектоване разлике у процентуалној заступљености и апсолутном броју CD45+, CD3+ и CD8+ субпопулација нису досегле статистичку значајност ( $p > 0.05$ ) између оболелих WT и Gal-3КО мишева 21-ог дана експеримента (**Фигура 2А**). Уз то, процентуална заступљеност и апсолутни број регулаторних CD3+Foxp3+ ћелија су били значајно већи у срцу Gal-3КО мишева (**Фигура 2Б**). Уочена разлика досегла је статистичку значајност ( $p < 0.05$ ). Статистички значајна разлика у апсолутном броју детектована је и поређењем CD8+Foxp3+ ћелија тј. значајно већи ( $p < 0.05$ ) број ових ћелија детектован је у изолату срца Gal-3КО мишева (**Фигура 2Б**). Детектована разлика у процентуалној заступљености и апсолутном броју регулаторних CD4+Foxp3+ ћелија није досегла статистичку значајност (**Фигура 2Б**,  $p > 0.05$ ).

Иако разлика у процентуалној заступљености CD4+ лимфоцита између изолата добијених из испитиваних група није досегла статистичку значајност (**Фигура 2В**,  $p > 0.05$ ) анализом апсолутног броја ових ћелија детектован је статистички значајно већи број CD4+ ћелија у миокарду Gal-3КО мишева него у WT мишевима (**Фигура 2В**,  $p < 0.05$ ). Уз то, нумеричка и процентуална заступљеност CD4+IL-4+ и CD4+IFN- $\gamma$ + ћелија била је статистички значајно већа у срцу Gal-3КО мишева (**Фигура 2В**,  $p < 0.05$ ).

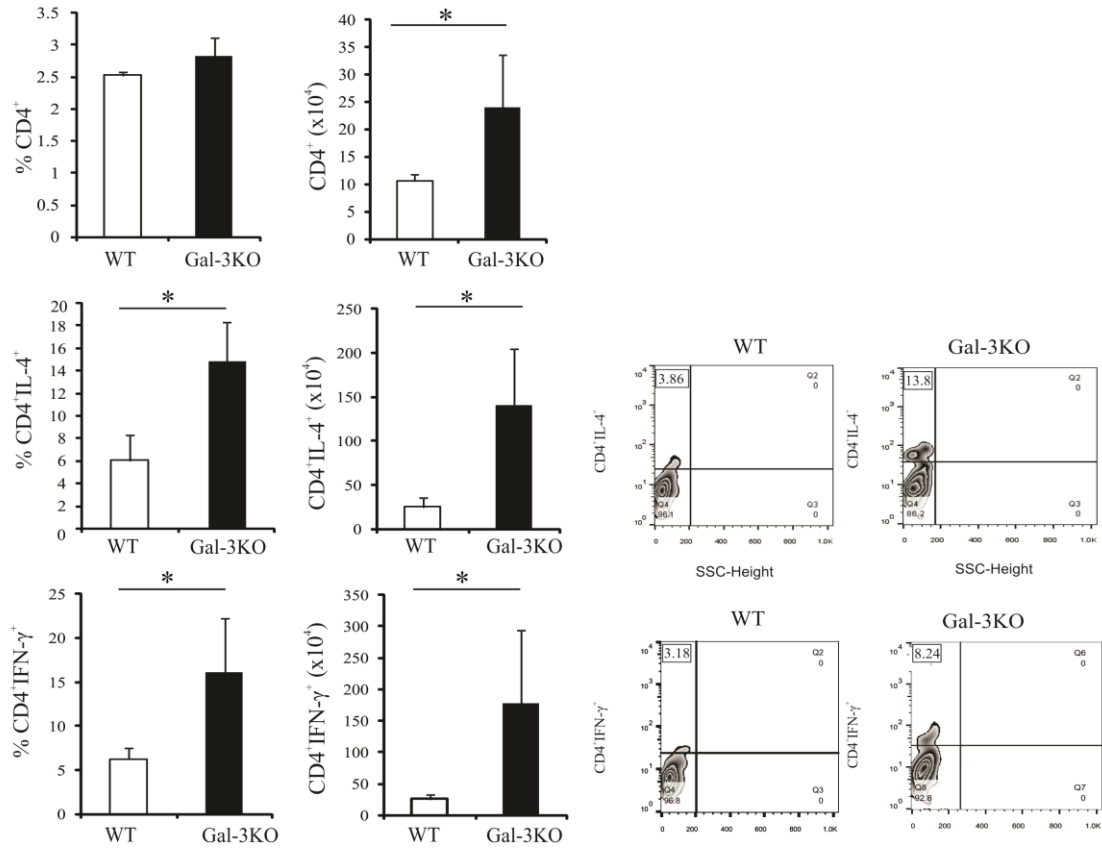
**A**



**Б**



**B**



**Фигура 2.** Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава апсолутни број CD4+, CD3+Foxp3+ и CD8+Foxp3+ ћелија у срцу. **А.** Разлика у процентуалној заступљености и апсолутном броју CD45+ ( $30,76 \pm 7,8\%$  vs  $33,70 \pm 5,8\%$ ;  $123,72 \pm 37,1 \times 10^4$  vs  $310,54 \pm 121,7 \times 10^4$ ), CD3+ ( $15,32 \pm 4,5 \times 10^4$  vs  $23,95 \pm 5,6 \times 10^4$ ) и CD8+ ( $1,81 \pm 0,4\%$  vs  $1,73 \pm 1,2\%$ ;  $7,65 \pm 1,6 \times 10^4$  vs  $12,26 \pm 6,6 \times 10^4$ ) ћелија у ткиву срца оболелих WT и Gal-3KO мишева 21-ог дана експеримента није досегла статистичку значајност. **Б.** Запажен је статистички значајно већа процентуална заступљеност и апсолутни број регулаторних CD3+Foxp3+ ( $4,16 \pm 2,1\%$  vs  $10,43 \pm 4,7\%$ ;  $32,46 \pm 15 \times 10^4$  vs  $112,3 \pm 47,5 \times 10^4$ ) и CD8+Foxp3+ ( $0,6 \pm 0,06\%$  vs  $2 \pm 0,6\%$ ;  $4,98 \pm 1,6 \times 10^4$  vs  $22 \pm 6,8 \times 10^4$ ) ћелија у срцу Gal-3KO у поређењу са WT. Не постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености и апсолутном броју регулаторних CD4+Foxp3+ ( $0,45 \pm 0,2\%$  vs  $1,45 \pm 0,7\%$ ;  $3,67 \pm 1,5 \times 10^4$  vs  $15,03 \pm 7,7 \times 10^4$ ), ћелија између WT и Gal-3KO мишева. **В.** Апсолутни број CD4+ ћелија био је статистички значајно већи у миокарду Gal-3KO у односу на WT ( $10,72 \pm 68 \times 10^4$  vs  $23,95 \pm 5,6 \times 10^4$ ). Нумеричка и процентуална заступљеност CD4+IL-4+ ( $6 \pm 2,3\%$  vs  $14,86 \pm 3,4\%$ ;  $20,99 \pm 10,6 \times 10^4$  vs  $140,98 \pm 62,9 \times 10^4$ ) и CD4+IFN- $\gamma$ + ћелија ( $6,25 \pm 1,2\%$  vs  $16,13 \pm 6\%$ ;  $25,21 \pm 6,4 \times 10^4$  vs  $177,85 \pm 116 \times 10^4$ ) била је значајно већа у срцу Gal-3KO у односу на WT (\* $p < 0.05$ ). Дот плотови приказују процентуалну заступљеност CD4+IL-4+ и CD4+IFN- $\gamma$ + у срцима WT и Gal-3KO мишева. Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов  $t$  тест).

#### **4.6. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава укупан број F4/80+ ћелија и олакшава алтернативну активацију макрофага у срцу**

Резултати претходних студија су показали да Gal-3 може да подстиче или супримира алтернативну активацију макрофага што најчешће зависи од микросредине, природе патофизиолошког процеса и врсте ткива/органа као и од ћелија на којима је Gal-3 експримиран [240].

Налаз значајно израженијих дегенеративних промена у срцу праћених обимним, дифузним инфламацијским инфилтратима (Слика 1) код Gal-3KO посредно су навели на закључак да заступљеност макрофага и њихова поларизација у М1 или М2 правцу могу бити узрок уоченим разликама. Из тог разлога је проточном цитометријом одређивана заступљеност и фенотип инфилтришућих макрофага у срцу имунизованих мишева.

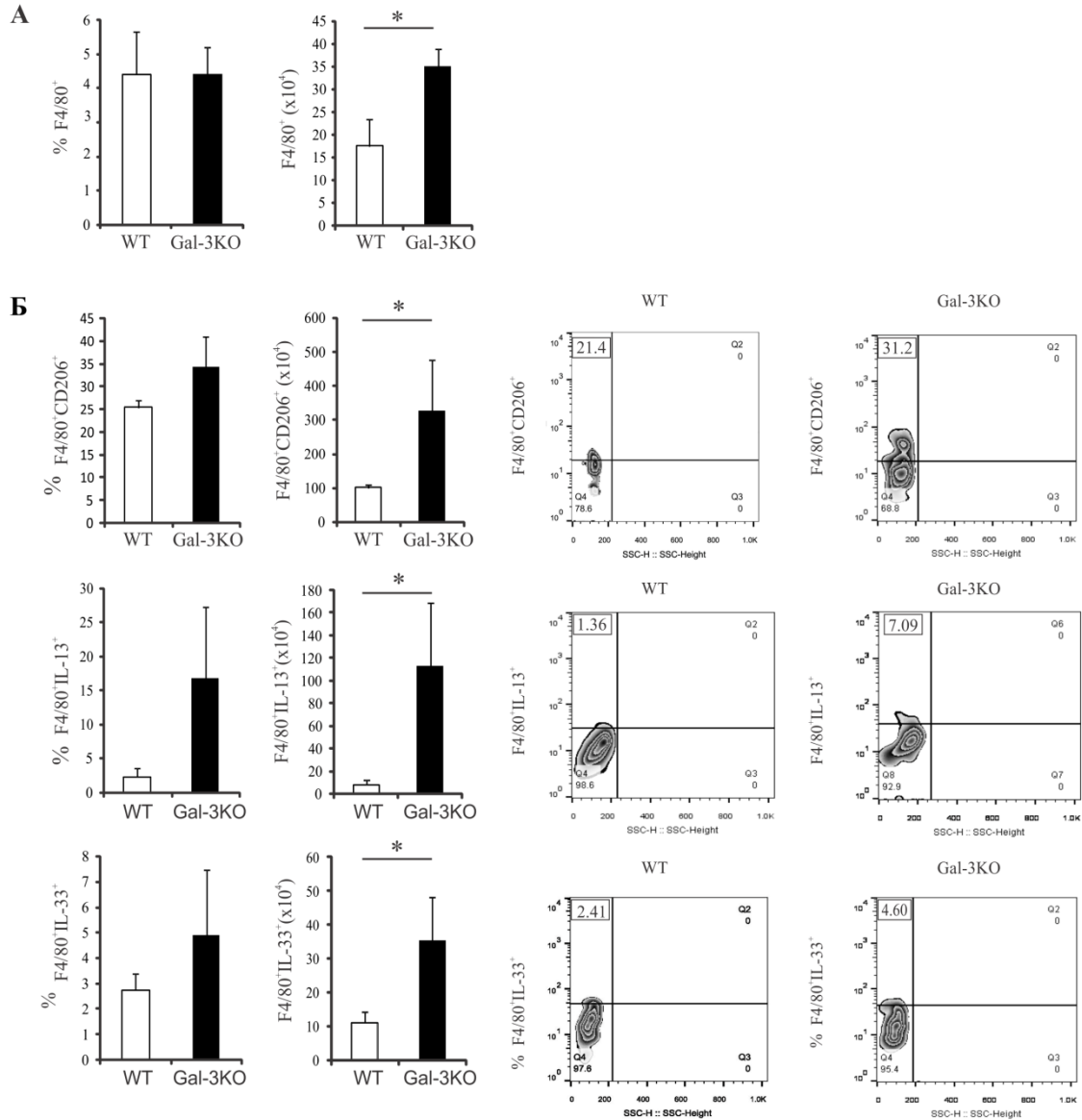
У оболелом миокарду Gal-3KO мишева регистрован је статистички значајно већи ( $p < 0.05$ ) апсолутни број F4/80+ макрофага (Фигура 3А). Уочено значајно повећање броја



F4/80+ макрофага у срцу Gal-3КО мишева посредно је навело на закључак да одсуство експресије гена за Gal-3 утиче на поларизацију макрофага.

Из тог разлога у наставку истраживања анализирана је нумеричка и процентуална заступљеност F4/80+CD206+ (M2), F4/80+IL-13+ и F4/80+IL-33+ алтернативно активисаних макрофага у срцу WT и Gal-3КО мишева. Број M2 макрофага (F4/80+CD206+) као и F4/80+IL-13+ и F4/80+IL-33+ био је значајно већи у ткиву срца Gal-3КО (**Фигура 3Б**,  $p < 0.05$ ). У оквиру анализираних популација F4/80+ ћелија уочава се изразита доминација F4/80+IL-13+ и F4/80+IL-33+ ћелија у срцу Gal-3КО (**Фигура 3Б**).

Резултати добијени анализирањем заступљености и фенотипа макрофага указују на то да одсуство експресије гена за Gal-3 промовише поларизацију макрофага у M2 фенотип у миокардитису индукованом апликацијом MuHC $\alpha_{334-352}$  пептида.



**Фигура 3. Нумеричка и процентуална заступљеност макрофага у срцу WT и Gal-3КО мишева. А.** Запажена је значајно већа нумеричка заступљеност F4/80+ макрофага ( $17,60 \pm 5,7 \times 10^4$  vs  $35,17 \pm 3,6 \times 10^4$ ) у срцу Gal-3КО мишева у поређењу са WT мишевима 21-ог дана након индукције болести. **Б.** Апсолутни број F4/80+CD206+ M2 макрофага ( $100,34 \pm 9,6 \times 10^4$  vs  $328,7 \pm 147,7 \times 10^4$ ), као и F4/80+ макрофага који продукују IL-13 ( $8,30 \pm 4,2 \times 10^4$  vs  $112,89 \pm 56 \times 10^4$ ) и IL-33 ( $2,75 \pm 0,6 \times 10^4$  vs  $4,92 \pm 2,5 \times 10^4$ ) у срцу Gal-3КО био је значајно већи у односу на WT (\* $p < 0.05$ ). Репрезентативни плотови приказују процентуалну заступљеност F4/80+CD206+ M2 ћелија и F4/80+IL-13+ и F4/80+IL-33+ у срцима WT и Gal-3КО мишева. Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов  $t$  тест).

#### **4.7. Делетија гена за Gal-3 значајно повећава процентуалну заступљеност и укупан број мијелоидних CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> макрофага**

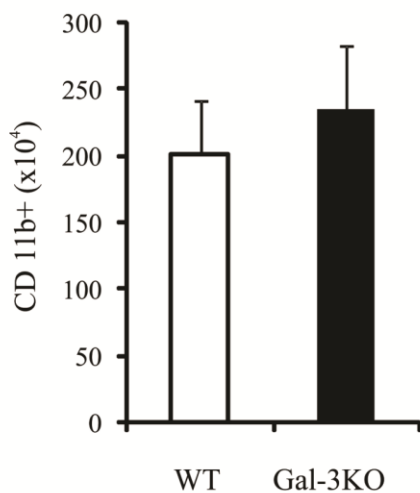
Мијелоидне CD11b+ макрофаге представљају главне ефекторске ћелије у миокарду током акутне фазе инфламације, међутим током хроничне фазе инфламације имају протективну улогу. У акутној фази инфламације Ly6C<sup>high</sup> ћелије могу диференцирати и у M1 и M2 макрофаге, док у хроничној фази инфламације регрутовани Ly6C<sup>high</sup> ћелије првенствено диференцирају у алтернативно активирани M2 макрофаге [90, 91].

Обзиром да су досадашњи резултати показали да оболели Gal-3КО мишеви имају већи број F4/80+ макрофага (**Фигура 3А**) као и алтернативно активираних F4/80+CD206+ макрофага (**Фигура 3Б**), у наставку истраживања испитивали смо заступљеност мијелоидних CD11b+ и CD11b+Ly6C+ ћелија.

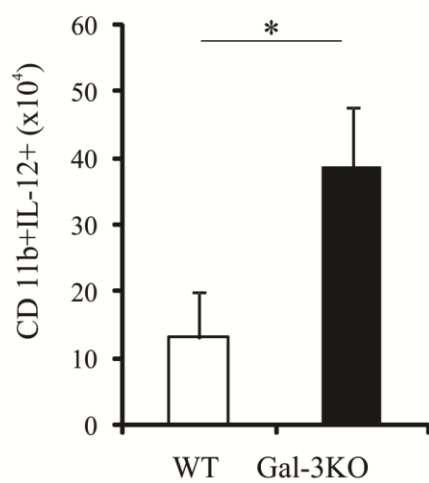
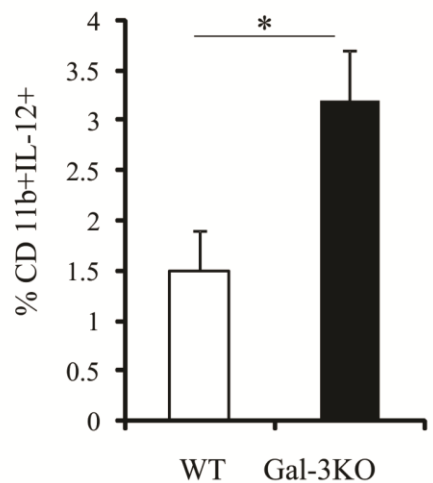
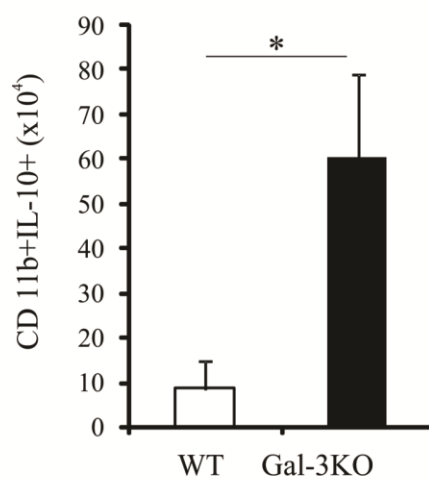
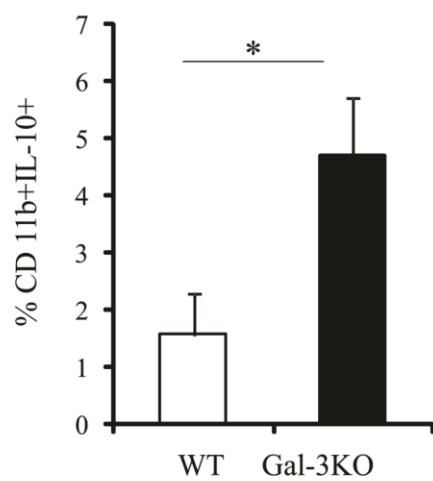
Разлика у апсолутном броју CD11b+ ћелија у ткиву миокарда оболелих WT и Gal-3КО мишева 21-ог дана експеримента није досегла статистичку значајност (**Фигура 4А**,  $p > 0.05$ ). Нумеричка и процентуална заступљеност CD11b+IL-10+ и CD11b+IL-12+ ћелија значајно је већа у ткиву срца Gal-3КО мишева (**Фигура 4Б**,  $p < 0.05$ ).

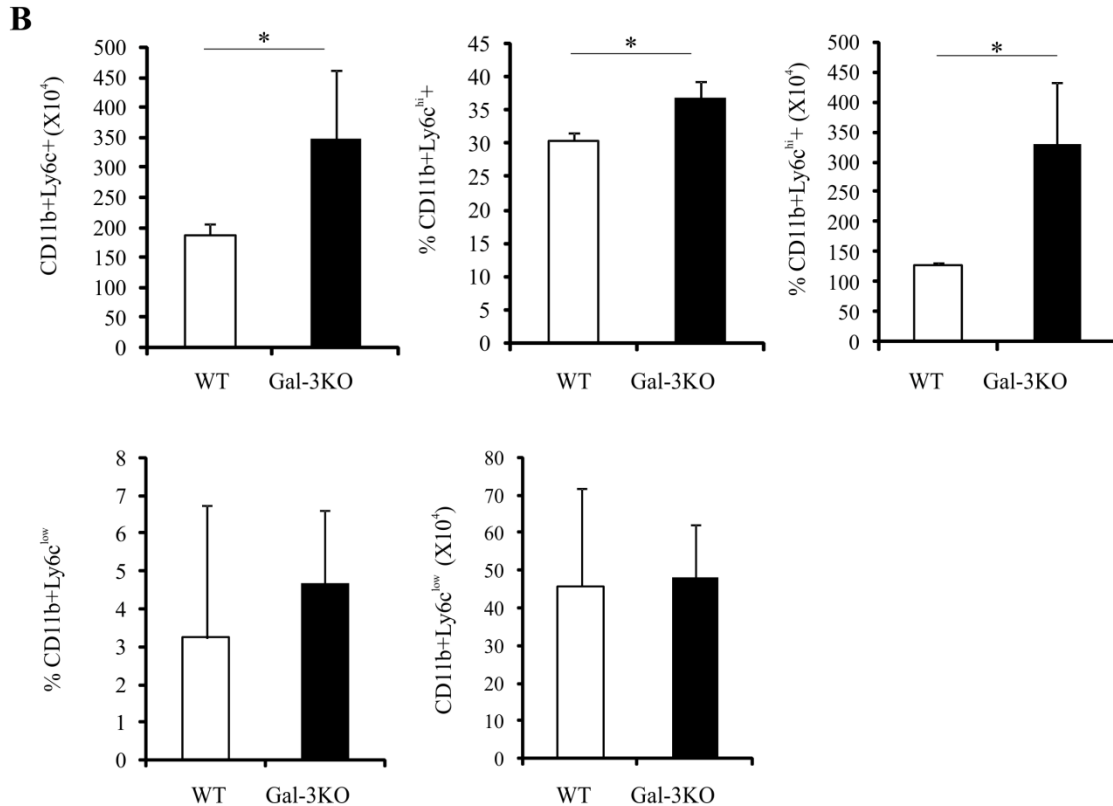
У оболелом миокарду Gal-3КО мишева регистрован је статистички значајно већи ( $p < 0.05$ ) апсолутни број CD11b+Ly6C+ ћелија. Унутар популације CD11b+ Ly6C+ ћелија запажа се статистички значајна доминација ( $p < 0.05$ ) CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> ћелија у Gal-3КО мишева док разлика у заступљености и броју CD11b+Ly6C<sup>low</sup> ћелија није досегла статистичку значајност (**Фигура 4В**,  $p > 0.05$ ).

**A**



**Б**





**Фигура 4. Процентуална и бројчана заступљеност мијелоидних ћелија различитих функционалних фенотипа у срцу WT и Gal-3KO мишева. А.** Није било статистички значајне разлике у заступљености мијелоидних CD11b+ ћелија ( $202,03 \pm 4,02 \times 10^4$  vs  $235,53 \pm 47,9 \times 10^4$ ) оболелих WT и Gal-3KO мишева 21-ог дана након индукције болести. **Б.** Нумеричка и процентуална заступљеност CD11b+IL-10+ ( $4,68 \pm 1\%$  vs  $1,58 \pm 0,7\%$  ;  $8,59 \pm 6,3 \times 10^4$  vs  $60,5 \pm 18,7 \times 10^4$ ) и CD11b+IL-12+ ћелија ( $1,5 \pm 0,3\%$  vs  $3,19 \pm 0,5\%$  ;  $13,19 \pm 6,6 \times 10^4$  vs  $38,8 \pm 8,9 \times 10^4$ ) значајно је већа у миокарду Gal-3KO мишева у односу на WT мишеве, \* $p < 0.05$ .

**В.** Запажен је статистички значајно већи апсолутни број CD11b+Ly6C+ ћелија ( $188,22 \pm 17,6 \times 10^4$  vs  $347,6 \pm 115,1 \times 10^4$ ), и CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> ( $128,97 \pm 3 \times 10^4$  vs  $328,97 \pm 105,7 \times 10^4$ ) у ткиву срца Gal-3KO мишева у односу на WT мишеве, \* $p < 0.05$ . Не постоји статистички значајна разлика у проценту ( $3,25 \pm 3,5\%$  vs  $4,69 \pm 1,9\%$ ) и броју CD11b+Ly6C<sup>low</sup> ћелија ( $45,84 \pm 25,8 \times 10^4$  vs  $48,26 \pm 14 \times 10^4$ ) између WT и Gal-3KO мишева,  $p > 0.05$ . Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов *t* тест).

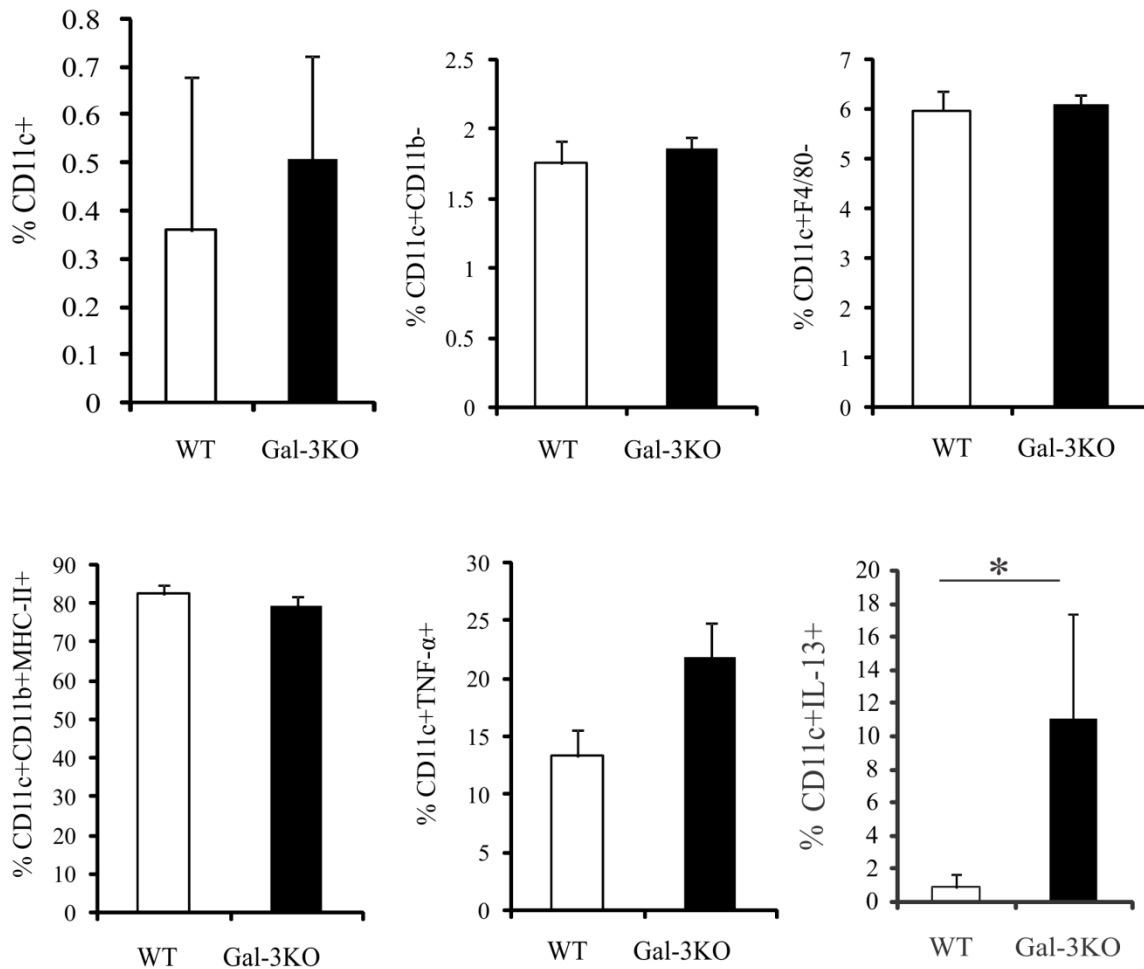
#### **4.8. У срцу оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+ ћелија које продукују IL-13**

Након испитивања улоге макрофага у миокардитису индукованог апликацијом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида, као један од следећих циљева био је анализирање заступљености и фенотипа дендритских ћелија. Из тог разлога је у наставку истраживања у хомогенизованом ткиву миокарда одређивана нумеричка и процентуална заступљеност CD11c+ ћелија, као и заступљеност CD11b+F4/80+, CD11c+CD11b+МНСII+, CD11c+TNF $\alpha$ + и CD11c+ IL-13+.

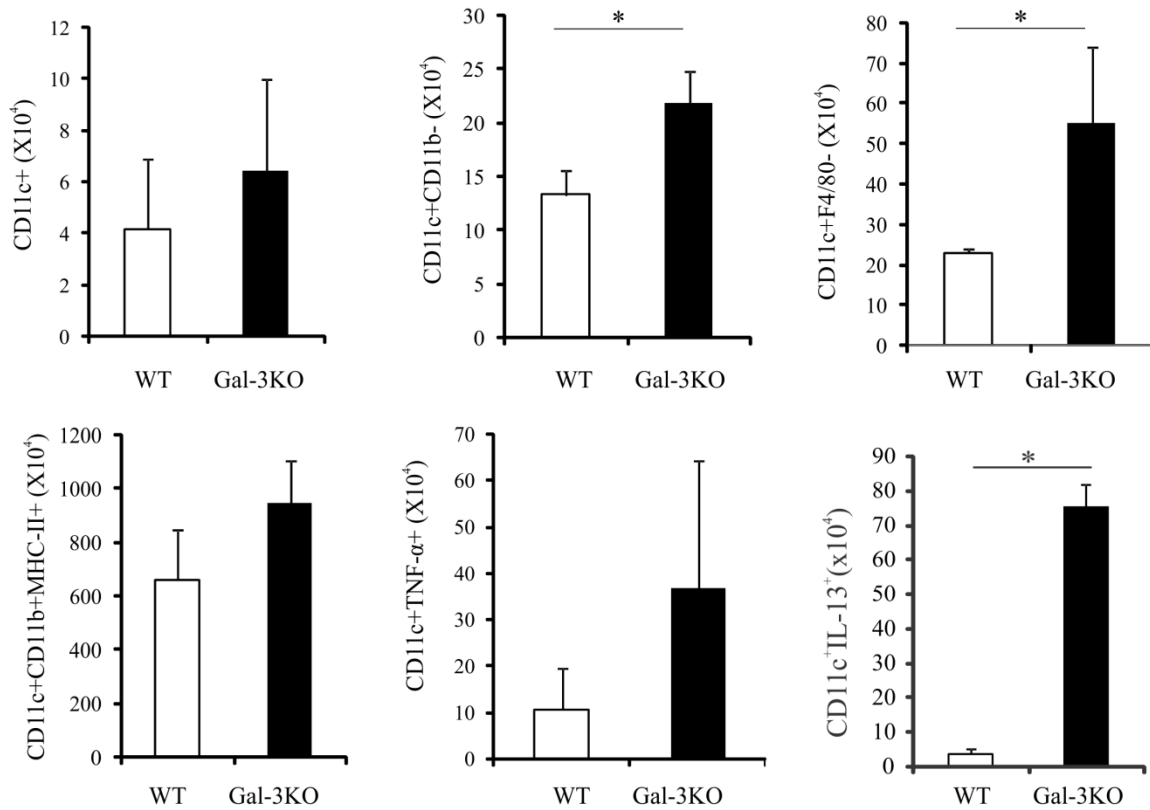
Није детектована значајна разлика у заступљености како укупних CD11c+ ћелија тако и њихових субпопулација које експримирају CD11c+CD11b-, CD11c+F4/80-, CD11c+CD11b+МНСII+ и CD11c+TNF $\alpha$ + између оболелих WT и Gal-3КО (**Фигура 5**,  $p>0.05$ ).

Иако није било разлике у процентуалној заступљености, анализом укупних бројева ћелијских субпопулација издвојених из миокарда забележена је значајна разлика, па је тако број дендритских ћелија које експримирају CD11c+CD11b- и CD11c+F4/80- био је значајно већи у ткиву миокарда Gal-3КО у односу на WT мишеве (**Фигура 6**,  $p<0.05$ ).

Такође су детектовне разлике када је анализирана нумеричка и процентуална заступљеност још једне ћелијске субпопулације издвојене из миокарда, па је тако број дендритских ћелија које продукују IL-13 (CD11c+IL-13+) био значајно већи у ткиву миокарда оболелих Gal-3КО у односу на WT мишевима (**Фигура 6**,  $p<0.05$ ).



**Фигура 5.** Заступљеност дендритских ћелија у миокарду WT и Gal-3KO мишева. Заступљеност CD11c+дендритских ћелија ( $0,85 \pm 0,8\%$  vs  $11,04 \pm 6,3\%$ ) које експримирају IL-13+ значајно је већа у миокарду Gal-3KO у односу на WT мишеве,  $*p < 0.05$ . Није било статистички значајне разлике у проценту CD11c+CD11b-, CD11c+F4/80-, CD11c+CD11b+MHCII+ и CD11c+TNF $\alpha$ + ћелија између оболелих WT и Gal-3KO,  $p > 0.05$ . Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов *t* тест).



**Фигура 6.** Нумеричка заступљеност CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија и субпопулација у оквиру CD11c<sup>+</sup> популације у миокарду WT и Gal-3KO мишева. Нумеричка заступљеност CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија које експримирају IL-13 ( $3,67 \pm 3,6 \times 10^4$  vs  $75,25 \pm 32,7 \times 10^4$ ) као и CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> ( $13,35 \pm 2,3 \times 10^4$  vs  $21,80 \pm 3 \times 10^4$ ) и CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> ћелија ( $23,15 \pm 1 \times 10^4$  vs  $55,28 \pm 18,7 \times 10^4$ ), била је значајно већа у миокарду Gal-3KO у односу на WT мишеве, \* $p < 0.05$ . Није било статистички значајне разлике у броју CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> и CD11c<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup> ћелија између оболелих WT и Gal-3KO,  $p > 0.05$ . Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност ± SE, Student-ов *t* тест).

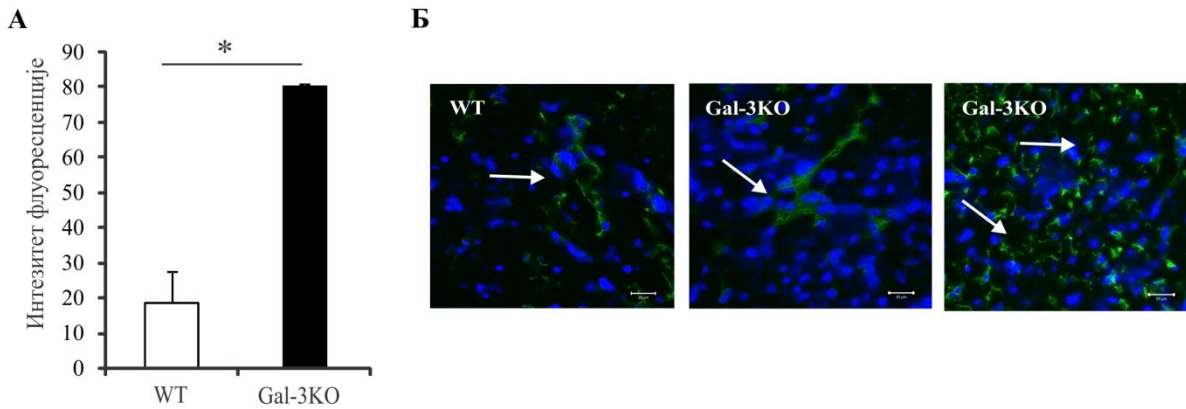


#### **4.9. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца**

Познато је да високе вредности IL-4 корелирају са тежом формом ЕАМ. Један од механизма којим се објашњава ова корелација је да IL-4 утичу на активацију В лимфоцита и промовишу производње аутоантитела [78].

Из до сада приказаних резултата јасно се види да делеција гена за Gal-3 промовише поларизацију имунског одговора у Th2 правцу, што је имплицирало претпоставку да у патогенези аутоимунског миокардитиса осим ћелијског, значајну улогу има и хуморални имунски одговор. Зато су имунофлуоресценцијом, одређивани како број IgG позитивних ћелија тако и количина IgG депозита у срцу оболелих WT и Gal-3КО мишева 21-ог дана експеримента. Квантификовање интензитета флуоресценције је урађено коришћењем рачунарског програма *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD).

У ЕАМ индукованим апликацијом MyHC $\alpha_{334-352}$  пептида, делеција гена за Gal-3 узрокује значајно повећање ( $p < 0.05$ ) броја IgG позитивних ћелија (**Слика 4А**). На ткивним препаратима Gal-3КО мишева се уочава значајно већа дифузна инфилтрација IgG позитивних ћелија (**Слика 4Б**; слике са десне стране), у поређењу са бројем ових ћелија у анализираним серијским пресецима срца WT мишева. Такође, у миокарду Gal-3КО мишева детектована је већа количина IgG депозита у поређењу са ткивним препаратима WT мишева у којима су регистровани оскудни IgG депозити (**Слика 4Б**; слика са леве стране).



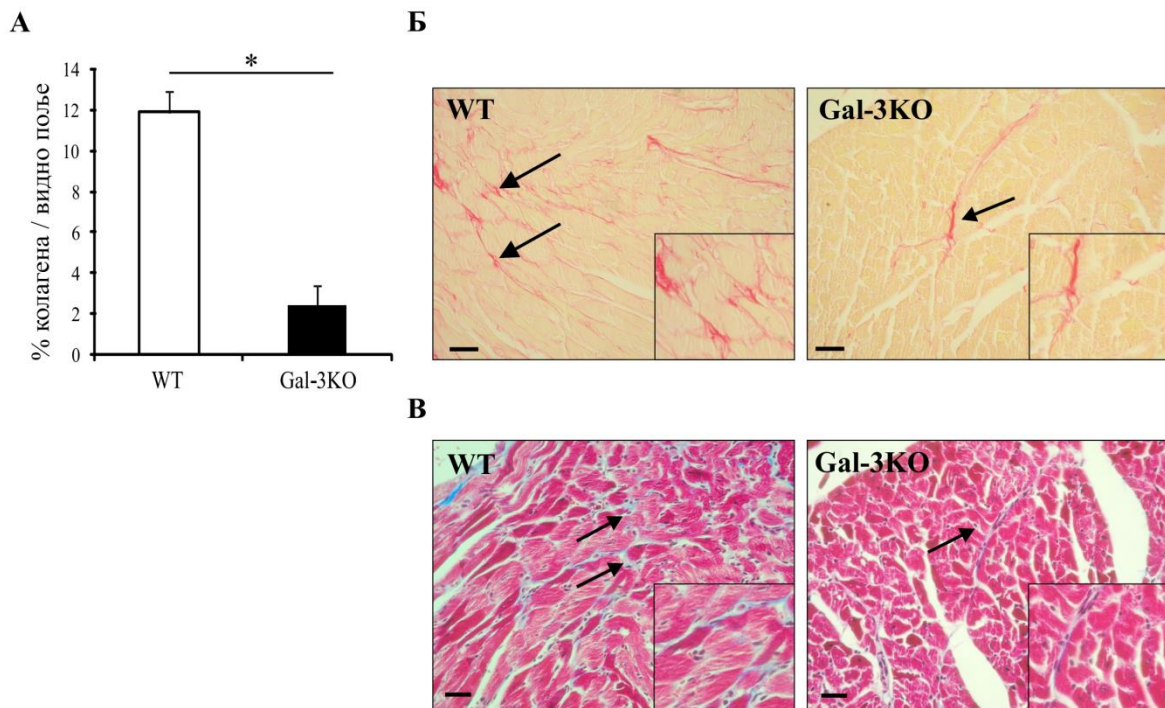
**Слика 4.** Оболели Gal-3KO мишеви имају већу количину IgG депозита и већи број IgG позитивних ћелија у односу на WT мишеве. А. На графикону је приказана SE±SEM интензитета флуоресценције из анализираних видних поља ( $18,52 \pm 8.7$  vs  $80,25 \pm 0.5$ ). Б. Репрезентативне фотографије смрзнутих резова ткива срца имунизованих WT и Gal-3KO мишева обојених техником имунофлуоресценције (увеличање 630х, размера=20 $\mu$ m).

#### 4.10. Делеција гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу

Како би испитали да ли делеција гена за Gal-3 има улогу у депоновању колагена, које може допринети прогресији фиброзе миокарда током ЕАМ, испитивали смо степен депоновања колагена у срцима имунизованих Gal-3KO и WT мишева. Зато је семи-квантитативним методама (селективном хистохемијском техником *Sirius Red* и *Masson* бојење) одређивана количина депонованог колагена у срцу оболелих WT и Gal-3KO мишева 21-ог дана експеримента. Квантификовање интензитета боје је урађено коришћењем рачунарског програма *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD).

Као што се види на **Слици 5** а на основу количине црвено пребојеног колагена региструје се значајно већа ( $p < 0.05$ ) количина депонованог колагена у ткивним препаратима срца WT мишева у поређењу са истим ткивним исечцима из Gal-3KO мишева 21-ог дана након индукције ЕАМ (**Слика 5А**). Као што је приказано на репрезентативним фотографијама ткивних исечака срца обојених селективном хистохемијском техником *Sirius Red*, уочава се значајно мање депоновање колагена у срцима Gal-3KO мишева

(Слика 5Б; слика са десне стране) у поређењу са WT мишевима (Слика 5Б; слика са леве стране). Слични резултати су добијени када су ткива срца обојена трихромним бојењем по *Masson*-у, то јест већи степен депоновања колагена регистрован је у WT мишевима него у Gal-3КО мишева (Слика 5В). Ови налази сугеришу да је мање депоновање колагена у срцу током ЕАМ последица одсуства експресије гена за Gal-3. Такође, приказани резултати указују на то да степен депоновања колагена као маркера срчане фиброзе можда није повезан са већом инфламацијом миокарда код Gal-3КО мишева.

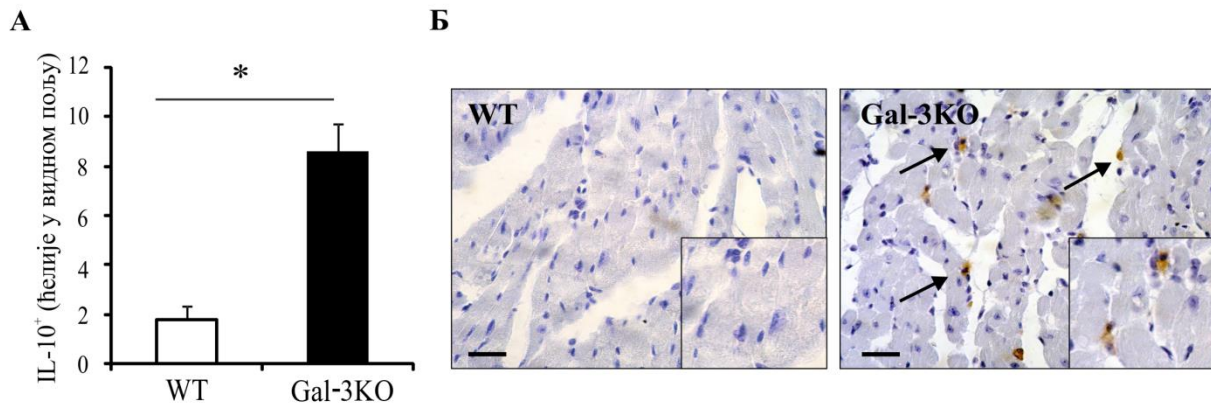


Слика 5. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно смањује депоновање колагена у срцу. А. На графикону су приказане  $SE \pm SEM$  добијене из односа укупна површина видног поља/црвено пребојена површина ( $11,91 \pm 0,6$  vs  $2,43 \pm 0,4$ ). Б. Репрезентативне фотографије парафинских исечака ткива срца имунизованих WT и Gal-3КО мишева обојених Sirius Red техником (увеличање 200х, размера=50 $\mu$ m). В. Репрезентативне фотографије парафинских исечака ткива срца имунизованих WT и Gal-3КО мишева обојених техником по *Masson*-у (увеличање 200х, размера=50 $\mu$ m).

#### 4.11. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IL-10+ ћелија у срцу

Обзиром да је познато да IL-10 има антифибротички ефекат и да утиче на депоновање колагена [284], у наставку истраживања испитивали смо експресију овог цитокина у срцима имунизованих Gal-3КО и WT мишева. Зато је у ткиву срца 21-ог дана експеримента, одређивана експресија IL-10 имунохистохемијском методом.

У ЕАМ индукованим апликацијом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида у Gal-3КО мишевима детектована је већа заступљеност IL-10+ ћелија у миокарду (Слика 6А). У миокарду Gal-3КО мишева детектује се значајно већа ( $p < 0.05$ ) цитоплазматска експресија IL-10 у поређењу са ткивним препаратима WT мишева (Слика 6Б, десни панел). На репрезентативним фотографијама ткивних исечака срца, уочавају се дифузно распоређене IL-10 позитивне ћелије у ткиву срца имунизованих Gal-3КО у поређењу са WT мишевима, где су детектоване ретке IL-10 позитивне ћелије (Слика 6Б, леви панел).



Слика 6. Имунохистохемијско бојење IL-10 позитивних ћелија у ткивним исечцима имунизованих WT и Gal-3КО мишева. А. Графички је приказан скор и  $SE \pm SEM$  броја IL-10+ из анализираних видних поља ( $1,8 \pm 0,6$  vs  $8,6 \pm 1,7$ ). Б. Репрезентативне фотографије имунохистохемијског бојења имунизованих WT и Gal-3КО мишева (увеличање 400х, размера=50 $\mu$ m).

#### **4.12. Одсуство експресије гена за Gal-3 промовише поларизацију у M2 макрофаге и мења процентуални однос F4/80+IL-12+/IL-10+, тако што повећава процентуалну заступљеност F4/80+IL-10+ макрофага у слезини**

Налаз значајно већег броја алтернативно активисаних макрофага у срцу (**Фигура 3Б**) као и веће серумске концентрације Th2 цитокина (**Фигура 1А**) у Gal-3КО мишевима, наметнуло је испитивање ове популације ћелија у слезини и њиховог цитокинског профила.

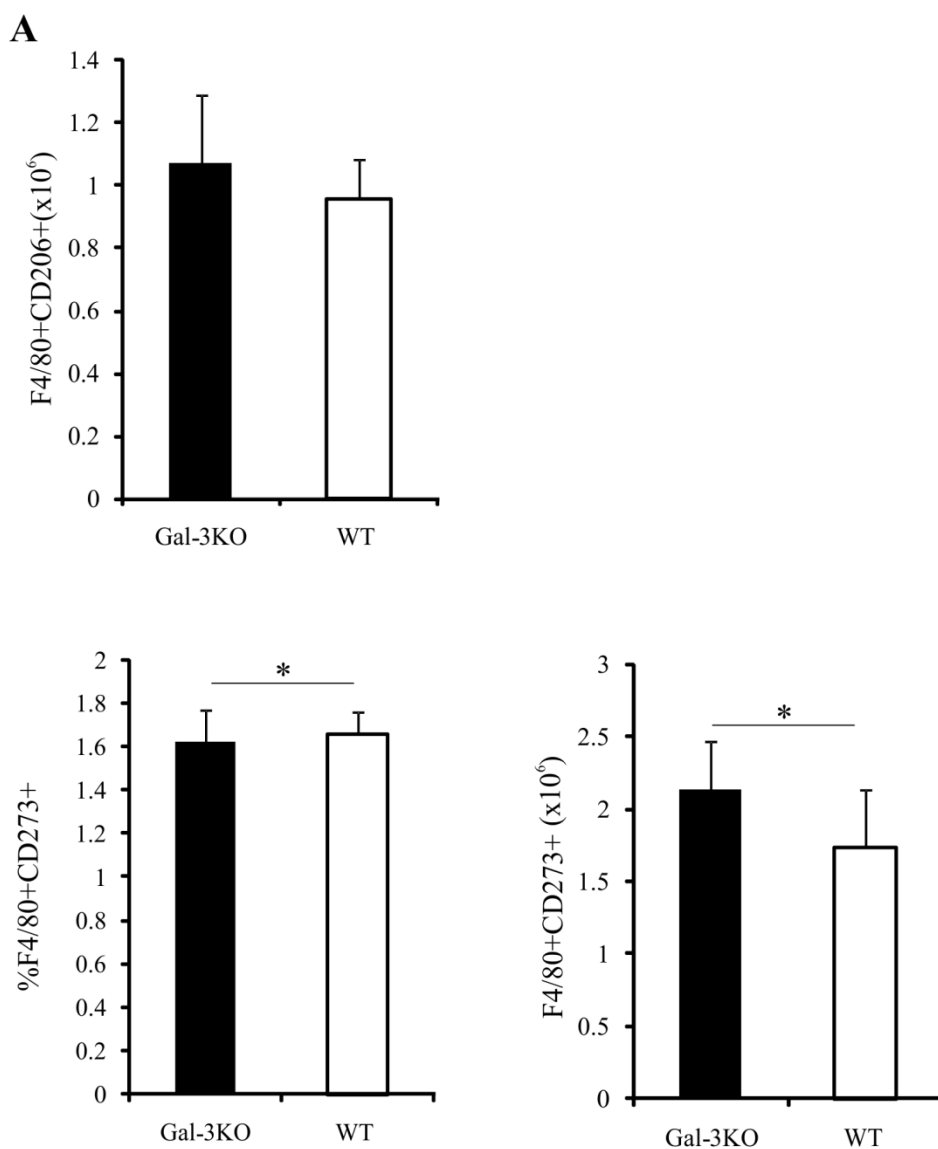
Из тог разлога је у слезини експерименталних животиња, проточном цитометријом одређивана заступљеност алтернативно активисаних макрофага као и њихов цитокински профил.

На **Фигури 7А** приказана је заступљеност F4/80+CD206+ макрофага у слезинама Gal-3КО и WT мишева. Резултати показују да разлика у нумеричкој заступљености F4/80+CD206+ макрофага између Gal-3КО и WT мишева није достигла статистичку значајност (**Фигура 7А**,  $p > 0.05$ ). Осим CD206 молекула као маркера алтернативно активисаних макрофага, често се користи и CD273 такође као маркер M2 макрофага. Из тог разлога у наставку истраживања анализирали смо заступљеност и F4/80+CD273+ субпопулације M2 макрофага. Број и проценат макрофага који експримирају CD273, је већи у слезини у Gal-3КО мишева (**Фигура 7А**,  $p < 0.05$ ).

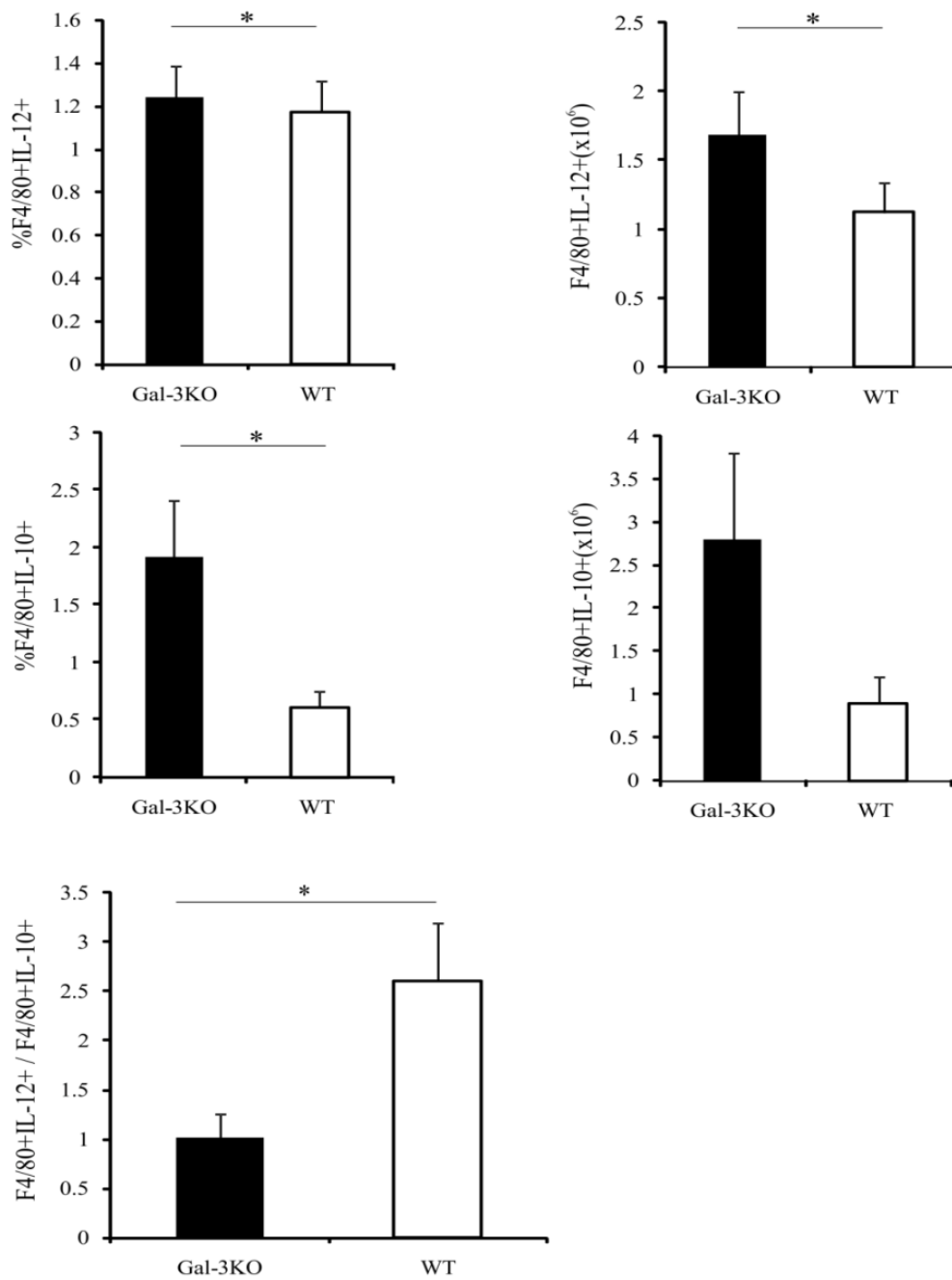
Након што је детектован значајан пораст серумских концентрација Th2 цитокина (**Фигура 1А**) и значајно већи број алтернативно активисаних макрофага у срцу и слезини (**Фигура 3Б** и **Фигура 7А**) Gal-3КО мишева, у наставку истраживања испитивано је да ли су детектоване разлике настале због промене у цитокинском профилу макрофага слезине.

Анализом нумеричке и процентуалне заступљености F4/80+IL-12+ ћелија забележен је значајано већи број ових ћелија у слезинама Gal-3КО (**Фигура 7Б**,  $p < 0.05$ ). Са друге стране, иако није регистрована разлика у апсолутном броју F4/80+IL-10+ ћелија између Gal-3КО и WT мишева ( $p > 0.05$ ), ова разлика добија статистички значај када се упореде процентуалне заступљености. Као што се види на **Фигури 7Б** у слезини оболелих Gal-3КО мишева статистички значајно има више ( $p < 0.05$ ) F4/80+IL-10+ ћелија.

Апсолутни количници IL-12+/IL-10+ макрофага значајно су већи у слезинама WT мишева, очигледно због повећања процентуалне заступљености IL-12+ макрофага у слезини сваког појединачног WT миша (Фигура 7Б,  $p < 0.05$ ).



**Б**



**Фигура 7. Процентуална и бројчана заступљеност макрофага различитих функционалних фенотипа у слезини Gal-3КО и WT мишева. А.** Није детектована разлика у нумеричкој и процентуалној заступљености F4/80+CD206+ макрофага између Gal-3КО и WT мишева,  $p > 0.05$ . Број F4/80+CD273+ макрофага ( $1,73 \pm 0,4 \times 10^4$  vs  $2,14 \pm 0,33 \times 10^4$ ) статистички значајно је већи у слезини Gal-3КО мишева,  $*p < 0.05$ . **Б.** Оболели Gal-3КО мишеви имају значајно већи проценат и апсолутни број F4/80+ IL12+ ћелија ( $1,17 \pm 0,1\%$  vs  $1,24 \pm 0,1\%$  ;  $1,12 \pm 0,2 \times 10^4$  vs  $1,69 \pm 0,3 \times 10^4$ ) у односу на WT мишеве,  $*p < 0.05$ . Оболели Gal-3КО мишеви имају значајно већи проценат F4/80+IL10+ ( $0,61 \pm 0,1\%$  vs  $1,92 \pm 0,5\%$  ;  $0,89 \pm 0,3 \times 10^4$  vs  $2,8 \pm 1 \times 10^4$ ), макрофага у односу на WT мишеве,  $*p < 0.05$ . Апсолутни количници IL-12+/IL-10+ макрофага значајно су већи у слезинама WT мишева,  $*p < 0.05$ . Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов  $t$  тест).

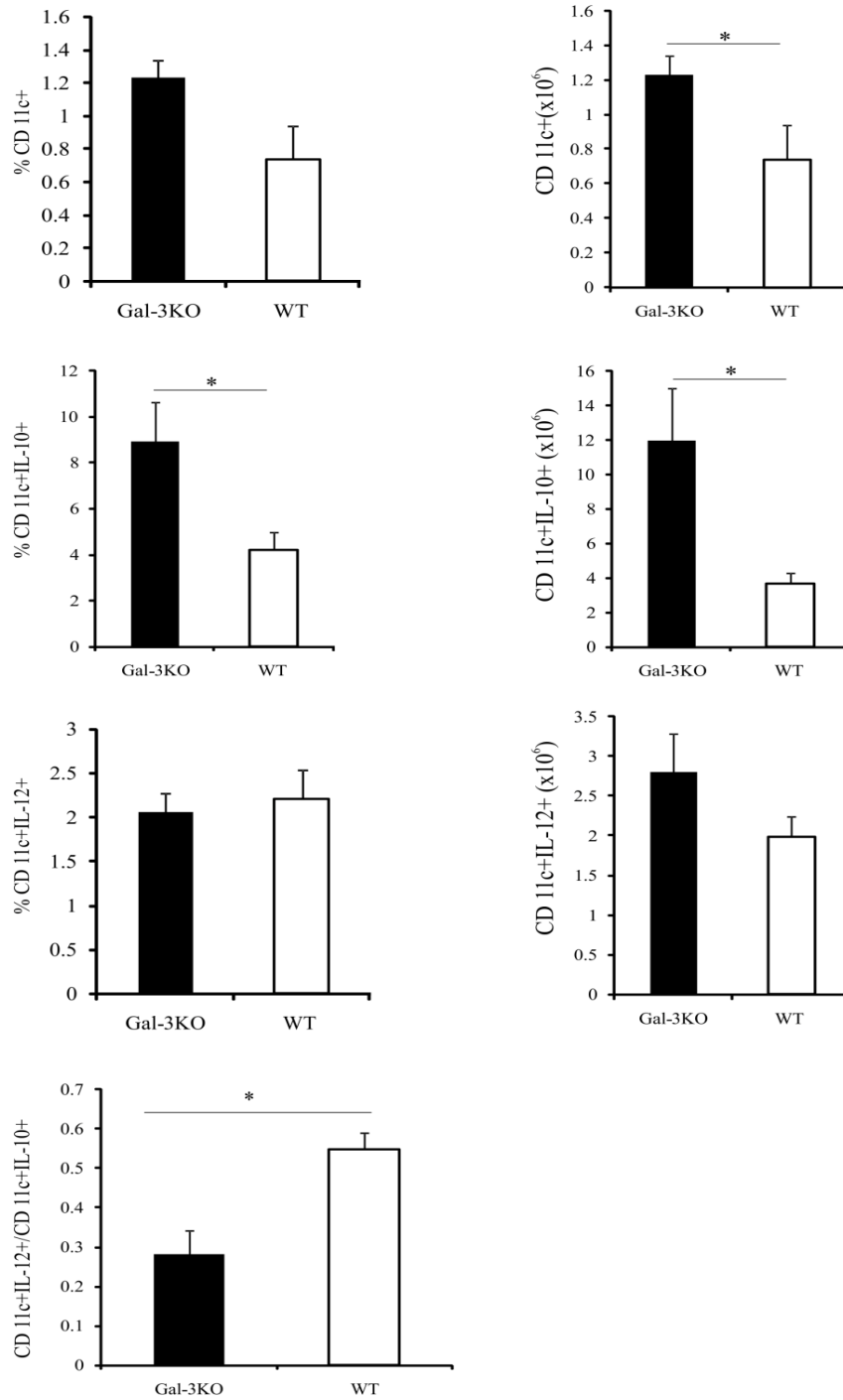
#### 4.13. У слезини оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+IL-10+ DCs

У наставку истраживања у хомогенатима слезине одређивали смо нумеричку, процентуалну заступљеност и цитокински профил CD11c+ дендритских ћелија.

У слезини Gal-3КО мишева детектован је значајно већи апсолутни број укупних CD11c+ ћелија (**Фигура 8**,  $p < 0.05$ ). Разлика у процентуалној заступљености дендритских ћелија између Gal-3КО и WT мишева није досегла статистичку значајност (**Фигура 8**,  $p > 0.05$ ). Међутим, нумеричка и процентуална заступљеност CD11c+IL-10+ ћелија била је значајно већа у слезинама Gal-3КО мишева (**Фигура 8**,  $p < 0.05$ ). Није било разлике у проценту и броју CD11c+IL-12+ ћелија у слезинама Gal-3КО и WT мишева (**Фигура 8**,  $p > 0.05$ ).

Апсолутни количници IL-12+/IL-10+ дендритских ћелија значајно су већи у слезинама WT мишева (**Фигура 8**,  $p < 0.05$ ), очигледно због повећања процентуалне заступљености IL-12+ дендритских ћелија у слезини сваког појединачног WT миша.





**Фигура 8. Проценти и укупни бројеви за популације дендритских ћелија у слезини Gal-3КО и WT мишева.** Оболели Gal-3КО мишеви имају значајно већи укупан број CD11c<sup>+</sup> ћелија ( $0,74 \pm 0,2 \times 10^4$  vs  $1,23 \pm 0,11 \times 10^4$ ) у односу на WT мишеве, \* $p < 0.05$ . Нумеричка и процентуална заступљеност CD11c<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> ћелија ( $4,22 \pm 0,7\%$  vs  $8,94 \pm 1,69\%$  ;  $3,68 \pm 0,6 \times 10^4$  vs  $11,97 \pm 3 \times 10^4$ ) била је значајно већа у слезини Gal-3КО мишева, \* $p < 0.05$ . Није постојала статистички значајна разлика у проценту и броју CD11c<sup>+</sup>IL-12 дендритских ћелија ( $2,2 \pm 0,3\%$  vs  $2,06 \pm 0,2\%$  ;  $1,98 \pm 0,2 \times 10^4$  vs  $2,8 \pm 0,4 \times 10^4$ ) између Gal-3КО и WT мишева,  $p > 0.05$ . Апсолутн количници IL-12<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> дендритских ћелија значајно су већи у слезинама WT мишева, \* $p < 0.05$ . Приказани резултати представљају средње вредности нумеричке и процентуалне заступљености испитиваних ћелија добијених из ткива срца 9 мишева у свакој групи, укупно 27 мишева по групи у три одвојена експеримента (средња вредност  $\pm$  SE, Student-ов  $t$  тест).

## 5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује да делеција гена за Gal-3 повећава инфламацију у експерименталном моделу аутоимунског миокардитиса индукованог апликацијом Mуhса<sub>334-352</sub>.

Експериментални аутоимунски миокардитис представља анимални модел постинфективног миокардитиса и дилатационе кардиомиопатије. Галектин 3 припада фамилији β-галактозид-везујућих лектина и експримиран је на многим ћелијама имунског система и има важну улогу у регулацији инфламације. Улога Gal-3 је испитивана у различитим аутоимунским и инфламаторним болестима и показано је да делеција гена за Gal-3 атенуира или погоршава болест у зависности од природе патофизиолошког процеса и врсте ткива/органа [285, 286]. Тако је показано да делеција гена за Gal-3 атенуира експериментални аутоимунски енцефаломијелитис, тип 1 дијабетеса, инфламацију и фиброзу јетре [244, 253, 287]. Супротно резултатима претходно описаних студија, показана је протективна улога Gal-3 у мишјем моделу примарне билијарне цирозе индуковане апликацијом аутоантигена [286] и у моделу тип 2 дијабетеса индукованог дијетом са високим садржајем масти [288]. Дакле, Gal-3 може двојако регулисати имунски одговор, што зависи од више фактора, као што су специфични услови инфламације, врста ткива и ниво експресије овог молекула како у физиолошким тако и у патолошким стањима.

У до сада објављеним истраживањима, улога и значај Gal-3 у патогенези ЕАМ код C57BL/6 мишева још увек није у потпуности испитана. Резултати нашег истраживања јасно показују да делеција гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима повећава инфламацију у срцу која је праћена повећаним присуством Th2 ћелија и цитокина, алтернативно активисаних макрофага, регулаторних дендритских ћелија, али и Th1 ћелија у поређењу са WT мишевима.

### **5.1. Делација гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису**

Тежина миокардитиса се процењује на основу величине, броја и локализације мононуклеарних инфилтрата, степена дегенерације и некрозе кардиомиоцита, и титра аутоантитела [289]. Такође, хипертрофија срца је један од параметара који се користи за процену тока и исхода миокардитиса [290]. Познато је да су C57BL/6 мишеви релативно резистентни на индукцију ЕАМ апликацијом пептида тешког  $\alpha$  ланца срчаног миозина, али и да се осетљивост повећава апликацијом целог ланца миозина или тропонина [280, 281].

У здравом срчаном ткиву Gal-3 позитивне ћелије се углавном налазе у интерстицијуму док кардиомиоцити не експримирају Gal-3 [267]. Међутим, у ткиву срца захваћеном инфламацијом повећава се експресија овог молекула [259]. Последњих година значајна улога у патогенези вирусног миокардитиса и срчаном ремоделовњу приписује се Gal-3 [268-270]. Резултати до сада објављених студија показују да у експерименталном моделу вирусног миокардитиса постоји већа експресија и продукција Gal-3 из макрофага срца, као и да Gal-3 има значајну улогу у пролиферацији срчаних фибробласта и настанку срчане фиброзе, што за последицу има повећан ризик за развој ДЦМ [268].

Да би се утврдиле разлике у тежини болести и опсежности оштећења ткива срца код ЕАМ изазваног у Gal-3КО и WT мишева, одређивана је хипертрофија срца и патохистолошки скор. Ова студија је, по први пут, показала да делација гена за Gal-3 значајно промовише болест и повећава оштећење ткива изазвано апликацијом Mуhс $\alpha_{334-352}$  пептида: 21-ог дана након апликације Mуhс $\alpha_{334-352}$  пептида, хипертрофија срца Gal-3КО мишева била је значајно већа (**Графикон 1**,  $p < 0.05$ ). Анализирајући хистолошке препарате срца животиња третираних Mуhс $\alpha_{334-352}$  пептидом уочена је дифузна инфилтрација инфламацијским ћелијама, значајна дегенерација и некроза кардиомиоцита у ткиву срца Gal-3КО мишева док су се у ткиву срца WT мишева видели мање целуларни и углавном ограничени инфламацијски инфилтрати и миокард без знакова дегенерације и некрозе, што нам је указало да одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећавала присуство инфламаторних ћелија и оштећење миокарда (**Слика 1**).

Анализе фенотипа инфламацијских ћелија имунохистохемијом и хематоксилин-еозин (H&E) бојењем су потврдиле да одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава број CD45+, F4/80+, CD3+ (Слика 2) и еозинофила у ткиву миокарда (Слика 3). *Afanasyeva* и сарадници [78] су такође показали повећану инфилтрацију инфламацијским ћелијама и еозинофила током субакутне фазе ЕАМ. Повећана заступљеност CD4+, CD8+ ћелија и макрофага у срцу током ЕАМ корелирају са тежином болести [291]. Резултати скорије објављене студије показују да у експерименталном моделу аутоимунског миокардитиса постоји већа заступљеност еозинофила у срцу мишева код којих долази до развоја фаталног еозинофилног миокардитиса [84].

Резултати студија о улози Gal-3 у различитим експерименталним моделима аутоимунских болести су опречни. Тако је показано да недостатак Gal-3 атенуира експериментални аутоимунски енцефаломијелитис [287] и тип 1 дијабетеса [244], а промовише аутоимунски одговор у моделу примарне билијарне цирозе [286]. Резултати ових студија указују на чињеницу да је улога Gal-3 у аутоимунским болестима орган специфична и зависи од типа експерименталног модела болести.

## **5.2. Делесија гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева**

Резултати до сада објављених истраживања, показују да је ЕАМ превасходно посредован аутореактивним CD4+ Т ћелијама [292] и то Th1, Th2 или Th17 лимфоцитима што зависи од фазе болести у којој се мере цитокини продуковани из ових ћелија, као и од хаплотипа миша у којем је болест индукована [22]. Различите фазе и форме миокардитиса су повезане са смањеном или повећаном продукцијом IL-12, IFN- $\gamma$  (Th1), IL-4, IL-13 (Th2) и IL-17A, IL-23 (Th17) цитокина [83, 293].

Одређивања концентрација цитокина у серуму (ELISA техником) као и анализе функционалних фенотипа инфилтришућих ћелија проточном цитометријом су потврдиле да делесија гена за Gal-3 значајно повећава број инфилтришућих имунских ћелија у ткиву срца и следствено томе концентрације цитокина у серуму имунизованих животиња. Анализом експресије мембранских маркера исказаних на или у инфилтришућим ћелијама добијених из миокарда оболелих Gal-3КО мишева уочено је да делесија гена за Gal-3

повећава заступљеност регулаторних CD3+Foxp3+ и CD8+Foxp3+ ћелија (**Фигура 2Б**). Иако је детектована већа заступљеност CD4+Foxp3+ ћелија у миокарду Gal-3КО мишева у поређењу са WT мишевима, та разлика није достигла статистичку значајност (**Фигура 2Б**).

Да су CD4+ Т лимфоцити главне ефекторске ћелије у патогенези ЕАМ показују бројна истраживања [73]. У бројним студијама јасно је показано да миокардитис може бити индукован адоптивним трансфером CD4+ Т лимфоцита специфичних за срчани миозин [73]. Знајући да CD4+ ћелије имају круцијалну улогу у патогенези ЕАМ, у наставку овог истраживања испитивано је да ли одсуство експресије гена за Gal-3 утиче на заступљеност ове популације ћелија оболелих мишева. Као што је приказано на **Фигури 3В**, изолат из Gal-3КО мишева има значајно већи број CD4+ ћелија.

Будући да је познато да је интрацелуларни Gal-3 негативни регулатор активације CD4+ лимфоцита и да CD4+ Т лимфоцити изоловани из Gal-3КО мишева у *in vitro* условима повећано продукују IFN- $\gamma$  и IL-4 [294], проверено је да ли делеција гена за Gal-3 утиче на заступљеност CD4+IFN- $\gamma$ + и CD4+IL-4+ Т лимфоцита у срцу Gal-3КО мишева којима је индукован ЕАМ.

Анализом CD4+ популације, односно њиховог цитокинског профила забележена је статистички значајно већа процентуална и бројчана заступљеност CD4+IL-4+ и CD4+IFN- $\gamma$ + ћелија у ткиву срца оболелих Gal-3КО мишева у поређењу са WT мишевима (**Фигура 3В**). Овде приказани резултати, веће заступљености CD4+IL-4+ и CD4+IFN- $\gamma$ + ћелија у изолатима Gal-3КО мишева, су сагласни са претходно наведеним резултатима студије у којој је показано да CD4+ Gal-3<sup>-/-</sup> ћелије повећано продукују IL-4 и IFN- $\gamma$  [294].

Како је ово истраживање недвосмислено показало да делеција гена за Gal-3 повећава број Т регулаторних лимфоцита у срцу, CD4+IL-4+ ћелија, предпостављено је да је могуће објашњење поларизација Th1 у Th2 одговор. Из тог разлога утврђиван је утицај делеције гена за Gal-3 на концентрацију Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-33) и имunosупресивног IL-10 цитокина. Показано је да недостатак експресије гена за Gal-3 битно повећава продукцију IL-4 и IL-33, док ефекат делеција гена за Gal-3 на концентрације IFN- $\gamma$  и IL-10 није детектован (**Фигуре 1А и 1Б**). Дизбаланс у концентрацијама мерених цитокина у серуму јасно указује да делеција гена за Gal-3 узрокује снажну поларизацију на страну Th2 имунског одговора.

Када је реч о улози Th17 ћелија и IL-17A у патогенези ЕАМ показано је да овај тип имунског одговора нема доминантну улогу у иницијалној фази инфламације али да је утицај IL-17A од кључног значаја за прогресију ЕАМ у ДЦМ [83]. Имајући у виду да је улога IL-17 у настанку и патогенези бројних аутоимунских болести добро документована [295, 296], међу њима и у ЕАМ [83], одређиван је и ниво IL-17 (**резултати нису приказани**). Међутим утицај делеција гена за Gal-3 на концентрацију овог цитокина није регистрован.

Ранија истраживања су показала да ЕАМ није стриктно посредован ни Th1 ни Th2 имунским одговором. Мишеви код којих је умањена или одсутна поларизација у Th1 правцу, као што су *IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>* и *Tbx21<sup>-/-</sup>* мишеви, развијају још тежи облик болести у поређењу са WT мишевима [118, 119, 121]. Поред тога, тежина ЕАМ код мишева IL-12a<sup>-/-</sup> може бити упоредива са тежином болести у WT мишевима [118]. Резултати претходно наведених студија показују да Th1 поларизација није неопходна за развој ЕАМ. Постоје опречни резултати о улози IFN- $\gamma$  у патогенези аутоимунских болести. Поједини аутори указују на патогену улогу IFN- $\gamma$  [297], док друга група аутора сугерише, да упркос његовој проинфламаторној улози, IFN- $\gamma$  има могућност да умањи тежину аутоимунских обољења [120]. У ЕАМ индукованим срчаним миозином у A/J мишевима, показана је протективна улога IFN- $\gamma$  [78]. Могућа објашњења протективне улоге IFN- $\gamma$  су: супресија секреције IL-4 из активисаних В лимфоцита, инхибиција хемотаксе еозинофила и Th2 ћелија у поље инфламације и супресија пролиферације Th2 ћелија [298-300]. Такође, описано је да IFN- $\gamma$  повећава апоптозу CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у ЕАМ индукованим пептидом миозина. Међутим, испитивањем ЕАМ у мишевима са делецијом гена за IFN- $\gamma$  и IL-17A, показано је да мишеви који су били дупли нокауту развијају фатални еозинофилни мокардитис, који се карактерише јаком еозинофилном инфилтрацијом и некрозом кардиомиоцита, са јасном поларизацијом имунског одговора у Th2 правцу. Поменута студија, указује на синергистичко дејство IFN- $\gamma$  и IL-17A у супресији продукције IL-4 и IL-13, односно патогеног Th2 имунског одговора [84]. У погледу улоге Th2 ћелија и њихових цитокина, резултати ранијих студија показују да делеција гена за IL-4 атенуише ЕАМ у A/J али не и BALB/c мишевима [78]. Међутим, показано је и да IL-13 има протективну улогу у ЕАМ индукованом у BALB/c мишевима [102].

Овде приказани резултати, повећане продукције IL-4 и IL-33 у серуму Gal-3КО мишева, су у корелацији са резултатима студија који указују на патогене ефекте Th2 ћелија и цитокина секретованих из њих.

### **5.3. Одсуство галектина 3 подстиче алтернативну активацију макрофага у срцу након имунизације пептидом миозина MuHC<sub>α334-352</sub>**

Резултати добијени у овој студији показују да одсуство Gal-3 поларизује имунски одговор тако што фаворизује алтернативну активацију макрофага. Анализом експресије мембранских маркера исказаних на или у инфилтришућим ћелијама добијеним из миокарда оболелих Gal-3КО мишева уочено је да делеција гена за Gal-3 повећава нумеричку заступљеност F4/80+ макрофага (**Фигура 3А**). Даљом анализом мембранских маркера F4/80+ популације макрофага регистровано је значајно повећање апсолутног броја макрофага који експримирају молекулу CD206 у изолату Gal-3КО мишева (**Фигура 3Б**). Испитивањем маркера исказаних у F4/80+ популацији забележено је значајно повећање броја F4/80+ ћелија које продукују IL-13 и IL-33 у оболелим Gal-3КО мишевима (**Фигура 3Б**). Повећана нумеричка заступљеност алтернативно активисаних макрофага је очигледно последица одсуства Gal-3.

У студији *Iacobini* и сарадника [301] показано је да је инфламација јетре у моделу експерименталног стеатохепатитиса значајно мања код Gal-3КО мишева и то као директна последица повећане поларизације макрофага у M2 фенотип. Слично нашим резултатима *Volarevic* и сарадници [253] су показали већу заступљеност алтернативно активисаних макрофага у Gal-3 дефицијентним мишевима оболелим од хепатитиса изазваног конкавалином А. Такође је у експерименталним моделима вирусног миокардитиса и експерименталног колитиса показано да Gal-3 промовише поларизацију макрофага у M2 фенотип [240, 302]. Такође, *Cihakova* и сарадници [102] су показали да је одсуство IL-13 повезано са мањом заступљеношћу M2 макрофага током акутне фазе ЕАМ.

Ly6C ћелије чине 2% укупних макрофага у срцу. Током различитих патолошких и инфламаторних стања, у срцу се значајно повећава популација макрофага и то кроз локалну пролиферацију и/или диференцијацијом моноцита из костне сржи [303]. Популација Ly6C ћелија може поларизовати у Ly6C<sup>hi</sup> или Ly6C<sup>lo</sup> фенотип. Субпопулација



Ly6C<sup>lo</sup> диференцира искључиво у М2 макрофаге, док Ly6C<sup>hi</sup> могу диференцирати у М1 или М2 макрофаге [90, 91]. Поларизацију Ly6C<sup>hi</sup> ћелија у М2 макрофаге фаворизује IL-4 продукован из полиморфонуклеара [304].

Макрофаге могу настати из мијелоидних ћелија и карактеришу се присуством мембранског CD11b маркера. У неким студијама показано је да недостатак експресије гена за Gal-3 мења заступљеност CD11b<sup>+</sup> макрофага и њихових субпопулација (CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup> и CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>lo</sup>) у инфламираном ткиву [305]. Резултати ове студије показују да Gal-3КО мишеви имају значајно већу заступљеност CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>hi</sup> макрофага (**Фигура 4В**) али и CD11b<sup>+</sup> макрофага које продукују IL-10 и IL-12 (**Фигура 4Б**). Регистровано значајно повећање броја и процента макрофага који продукују IL-10 и IL-12 у оболелих Gal-3КО мишева је очигледно последица одсуства овог молекула.

Резултати студија о улози Gal-3 у поларизацији макрофага су опречни. Супротно нашим резултатима *Dragomir* и сарадници [305] су показали већу заступљеност CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>lo</sup> макрофага у Gal-3 дефицијентним мишевима оболелим од хепатитиса изазваног ацетаминофеном (енг. *Acetaminophen*, АРАР).

Обзиром да је у овој студији показано да Gal-3КО мишеви имају већу заступљеност М2 макрофага у срцу (**Фигура 3Б**) и виши ниво Th2 цитокина у серуму (**Фигура 1А**) анализирана је заступљеност и функционални фенотип М2 макрофага у слезини као главном извору серумских цитокина.

Овде приказаном студијом је показано да недостатак експресије гена за Gal-3 осим у срцу олакшава и алтернативну активацију макрофага у слезини. Анализом функционалних фенотипова спленоцита је показано да недостатак експресије гена за Gal-3 значајно повећава процентуалну и бројчану заступљеност F4/80+CD273<sup>+</sup> (М2) макрофага (**Фигура 7А**) и смањује процентуални однос F4/80+IL-12<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>, тако што повећава процентуалну заступљеност F4/80+IL-10<sup>+</sup> макрофага у слезини (**Фигура 7Б**). Слично нашим резултатима *Volarevic* и сарадници [253] су показали већу заступљеност F4/80+CD273<sup>+</sup> макрофага у Gal-3 дефицијентним мишевима оболелим од хепатитиса изазваног конкавалином А.

#### **5.4. Дефицијенција галектина 3 је удружена са повећаном инфилтрацијом дендритских ћелија у срцу и слезини**

Дендритске ћелије су професионалне антиген-презентујуће ћелије које имају централну улогу у имунском систему тако што утичу на активацију Т лимфоцита и поларизацију Т ћелијског одговора. Интрацелуларни Gal-3 у дендритским ћелијама има улогу у одржавању хомеостазе и регулације имунског одговора. До сада објављени резултати студија у погледу улоге интрацелуларног Gal-3 и дендритских ћелија у поларизацији имунског одговора су опречни. У неким анималним моделима показано је да Gal-3 дефицијентни мишеви различито поларизују Th ћелије (фаворизујући Th1 и Th17 фенотип) у поређењу са WT мишевима [306-309]. Резултати неких студија показују да за поларизацију Th ћелија у Gal-3 дефицијентним мишевима кључну улогу имају дендритске ћелије [306]. *Nomoto* и сарадници [310] су показали да недостатак Gal-3 на дендритским ћелијама усмерава ћелијски имунски одговор у Th1 правцу. Такође, *Bellinghausen* и сарадници [311] су показали да Gal-3<sup>+/+</sup> дендритске ћелије које продукују IL-13 фаворизују поларизацију у Th2 имунски одговор. Међутим, *Breuilh* и сарадници [312] су показали да недостатак Gal-3 у дендритским ћелијама има улогу у активацији Т лимфоцита али не у поларизацији Th1/ Th2 имунског одговора.

Дендритске ћелије чине 1–2% укупне популације имунских ћелија у ткиву срца и приближно 20–25% свих CD45<sup>+</sup> ћелија. *Ericsson* и сарадници [79] су указали на кључну улогу дендритских ћелија у индукцији ЕАМ, тако што су показали да се адоптивним трансфером дендритских ћелија које су претходно стимулисане срчаним миозином може индуковати ЕАМ што је и потврђено бројним инфилтратима аутореактивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита.

Резултати овде приказане студије показују да недостатак експресије гена за Gal-3 повећава број CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> и CD11c<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> ћелија у срцу (**Фигура 6**). Такође, у овој студији је анализом површинских и интрацелуларних маркера дендритских ћелија показано да у слезини Gal-3КО мишева има значајно више CD11c<sup>+</sup> и регулаторних CD11c<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> ћелија (**Фигура 8**). Слично резултатима приказаним у овој студији, *Volarevic* и сарадници [313] су показали да делеција гена за Gal-3 или селективна

инхибиција Gal-3 поспешује толерогени фенотип дендритских ћелија, као и оних које продукују IL-10.

### **5.5. Делетија гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу**

Макрофаге и миофибробласти су кључне ћелије у процесу стварања колагених влакана и депоновању екстрацелуларног матрикса. Познато је да Gal-3 у различитим патолошким условима, активира бројне профибротске факторе као што су bFGF (енг. *basic fibroblast growth factor*) и TGF- $\beta$ , који стимулишу продукцију и депоновање колагена [314]. Gal-3 не само да је важан у активацији већ је и неопходан за пропацију сигнала у ћелији за бројне цитокине и профибротске факторе. *Henderson* и сарадници [257] су показали да и у стањима када постоји прекомерна продукција TGF- $\beta$ , главног профибротског фактора, фиброза је одсутна или јако смањена у Gal-3 дефицијентним мишевима. Исти аутори су показали да TGF- $\beta$  и други профибротски цитокини не могу испољити свој ефекат у одсуству Gal-3 [257].

У погледу улоге Gal-3 у процесу фибриногенезе резултати студија изведених на различитим анималним моделима болести су опречни. Тако су *Jeftic* и сарадници [315] показали да Gal-3 дефицијентни мишеви у експерименталном стеатохепатитису имају мање степен фиброзе. Супротно, *Arsenijevic* и сарадници [286] су показали да Gal-3 КО мишеви имају већи степен фиброзе јетре у анималном моделу примарног билијарног холангитиса.

Улога Gal-3 у болестима срца је добро документована. Мерење нивоа Gal-3 користи се као прогностички биомаркер код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом [316]. Високи нивои серумског Gal-3 су у позитивној корелацији са тежином срчане инсуфицијенције [316]. Међутим, резултати експерименталних студија о улози Gal-3 у ремоделовању срца у анималним моделима су опречни. У експерименталном моделу прекомерног оптерећења леве коморе показано је да одсуство Gal-3 није утицало на преживљавање, систолну и дијастолну функцију и фиброзу срца у C57BL/6 мишевима [317]. Супротно, *Jaquenod* и сарадници [318] су показали да већа експресија Gal-3 на макрофагама срца и повећана продукција овог молекула значајно повећавају пролиферацију срчаних фибробласта, степен фиброзе и ризик од развоја срчане

инсуфицијенције у експерименталном моделу вирусног миокардитиса. Такође, *González* и сарадници [319] су показали да делеција гена за Gal-3 смањује инфламацију и фиброзу у срцу. У складу са подацима из претходно наведене студије су и резултати овде приказане студије који јасно документују да се у срцима Gal-3 дефицијентних мишева имунизованих МуНС $\alpha_{334-352}$  пептидом детектује значајно мањи степен депоновања колагена у поређењу са WT мишевима 21-ог дана експеримента (**Слика 5**). Овде приказани резултати су у складу са резултатима претходно наведених студија у којима је показано да Gal-3 дефицијентни мишеви развијају мању фиброзу. Резултати добијени у овој студији могу се објаснити значајно израженијом продукцијом Th2 цитокина у серуму (**Фигура 1**), већом заступљеношћу M2 макрофага (**Фигура 3Б**) и ћелија које експримирају IL-4 и IL-13 у срцима Gal-3КО мишева (**Фигуре 2В и 3Б**).

Одсуство Gal-3 је повезано са смањеном фиброзом али и смањеном продукцијом Th1 цитокина [253]. Познато је да на степен фиброзе осим Gal-3 утиче и повећана продукција имуносупресивних и антиинфламаторних цитокина. Бројне студије указују на значајну улогу IL-10 у редукцији фиброзе јетре, плућа и панкреаса [320-322]. Показано је да интравенском апликацијом CD11b<sup>+</sup> макрофага које прекомерно експримирају IL-10 значајно редукују фиброзу срца у мишјем моделу аутоимунског миокардитиса [284]. У складу са наведеним подацима су и резултати овде приказане студије који јасно документују да је апсолутни број IL-10<sup>+</sup> ћелија у срцима Gal-3КО мишева значајно већи од броја IL-10<sup>+</sup> ћелија у срцима WT мишева (**Слика 6**). Резултати добијени у овој студији могу се објаснити значајно израженијим бројем IL-10<sup>+</sup> ћелија, али и претходно приказаним резултатима веће заступљености ћелија које продукују IL-33 у срцима Gal-3КО мишева (**Фигура 3Б**), као и вишим серумским вредностима IL-33 у Gal-3КО мишевима (**Фигура 1**). Овде приказани резултати су у складу са резултатима студије у којој је показано да IL-33 има протективну улогу у развоју фиброзе срца [323].

## **5.6. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца**

Методом имунофлуоресценције показали смо присуство значајно већег броја IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца Gal-3КО мишева у поређењу са WT мишевима (Слика 4). У складу са нашим резултатом је и налаз раније публиковане студије, која указује да интрацелуларни Gal-3 ихибира диференцијацију В лимфоцита у плазмоците [324, 325] и тиме се објашњава да је недостатак Gal-3 праћен појачаном продукцијом антитела [326]. Такође је показано да у појединим сојевима мишева миокардитис може бити индукован апликацијом антитела IgG класе [73]. IgG депозити имају значајну улогу у оштећењу кардиомиоцита својим везивањем за Fc $\gamma$ -RIII на NK ћелијама и последично интеракцијом ових ћелија са кардиомиоцитима [327]. Такође, показано је да везивање IgG за еозинофиле узрокује дегранулацију ових ћелија чији продукти оштећују кардиомиоците [328].

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

На основу свих приказаних резултата очигледно је да делеција гена за Gal-3 повећава оштећење ткива у моделу мишјег аутоимунског миокардитиса индукованог апликацијом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида и укида резистенцију C57BL/6 мишева на индукцију ЕАМ. Делеција гена за Gal-3 значајно повећава тип 2 инфламације у срцу током субакутне фазе ЕАМ. Недостатак Gal-3 повећава присуство антиинфламацијских (M2) макрофага у срцу оболелих мишева што повећава инфлукс регулаторних дендритских ћелија и антифибротских ћелија које продукују IL-10 што се манифестује значајно слабијим депоновањем колагена.

Закључак је изведен на основу следећих резултата добијених индукцијом ЕАМ у Gal-3КО и WT мишевима:

1. Одсуство галектина 3 чини C57BL/6 мишеве осетљивијим на индукцију ЕАМ након имунизације пептидом мозина МуНС $\alpha_{334-352}$ , па они развијају већу хипертрофију срца и имају већи патохистолошки скор.
2. Повећање параметара оштећења срца регистровано у Gal-3КО мишева, последица је повећане тип 2 инфламације у срцу Gal-3КО мишева.
3. Повећање системских вредности Th2 цитокина регистровано у Gal-3КО мишева, последица је повећане заступљености антиинфламацијских (M2) макрофага и регулаторних дендритских ћелија у срцу и слезини Gal-3КО мишева.
4. Одсуство Gal-3 узрок је веће дифузне инфилтрације IgG позитивних ћелија и веће количине IgG депозита у инфламираном срцу.
5. Делеција гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцима оболелих Gal-3КО мишева.

СКРАЋЕНИЦЕ

BSA	албумин телећег серума (енг. <i>bovine serum albumin</i> )
CFA	комплетни Фројндов адјуванс (енг. <i>Freund's Complete Adjuvant</i> )
CD	енг. <i>cluster of differentiation</i>
CRD	домен за препознавање угљених хидрата (енг. <i>carbohydrate recognition domain</i> )
cDNA	комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина (енг. <i>complementary DNA</i> )
ConA	конкавалино А (енг. <i>concanavalin A</i> )
ДЦМ	дилатациона кардиомиопатија
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина (енг. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DMEM	енг. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EAM	експериментални аутоимунски миокардитис
ELISA	енг. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FoxP3	енг. <i>forkhead box P3</i>
FBS	енг. <i>Fetal Bovine Serum</i>
FIAU	енг. <i>1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil</i>
FSC/SSC	енг. <i>Forward scattered light/Side-scattered light</i>
GM-CSF	енг. <i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>
Gal-3	Галектин 3 (енг. <i>Galectin-3</i> )
HLA	енг. <i>human leucocyte antigen complex</i>
HMGB1	енг. <i>High-mobility group box 1</i>
HBSS	енг. <i>Hank's balanced salt solution</i>
IL	интерлеукин (енг. <i>interleukin</i> )
IFN-γ	интерферон- γ (енг. <i>Interferon-γ</i> )
LPS	енг. <i>lipopolysaccharide</i>
MHC	енг. <i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	енг. <i>messenger RNA</i>
NK ћелије	урођено убилачке ћелије (енг. <i>Natural killer cells</i> )

NKT ћелије	NKT ћелије Урођено убилачке ћелије Т ћелије (енг. <i>Natural killer T cells</i> )
PAMPs	енг. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PMA	енг. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PBS	енг. <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	енг. <i>Polimerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (енг. <i>Quantitative Real Time-PCR</i> )
RAGE	рецептори за крајње продукте гликације (енг. <i>Receptor for advanced glycation endproducts</i> )
RPMI	енг. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
STAT 3	енг. <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Streptavidin-HRP	енг. <i>Streptavidin horseradish peroxidase</i>
SE	стандардна грешка (енг. <i>standard error</i> )
TNF- $\alpha$	енг. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TAC	трансверзална аортна констрикција
Th	помагачки Т лимфоцити (енг. <i>T helper</i> )
TNF- $\alpha$	фактор некрозе тумора- $\alpha$ (енг. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
TGF- $\beta$	трансформишући фактор раста- $\beta$ (енг. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TLRs	рецептори слични Toll -у (енг. <i>Toll-like receptors</i> )
WT	мишеви дивљег соја



## **7. РЕФЕРЕНЦЕ:**

1. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human pathology* 1987; 18:619-624.
2. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *The American journal of cardiovascular pathology* 1987; 1:3-14.
3. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841-842.
4. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal* 2013; 34:2636-2648.
5. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal* 2008; 29:270–276.
6. Maron BJ, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, et al. American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113:1807-1816.
7. Kamisago M, Sharma SD, DePalma, SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343:1688-1696.
8. Karkkainen S, and Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Annals of Medicine* 2007; 39:91-107.

9. Kindermann I, Christine B, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, et al. Journal of the American College of Cardiology 2012; 59:779-792.
10. Badorff C, GH Lee, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. Nature Medicine 1999; 5:320-326.
11. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, and Rose NR. From infection to autoimmunity. Journal of Autoimmunity 2001; 16:175-186.
12. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. European Heart Journal 2007; 28:1326-1333.
13. Rose NR, and Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. Clinical Immunology and Immunopathology 1996; 80:92-99.
14. Mackay I, and Rose NR. Myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Rose NR, Mackay IR, eds. The Autoimmune Diseases. Boston, Massachusetts, USA: Academic Press 2006; 875-888.
15. Cihakova D, and Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. The Journal of Immunology 2008; 99:95-114.
16. Busteed S, Sparrow P, Molloy C, and Molloy MG. Myocarditis as a prognostic indicator in systemic lupus erythematosus. Postgraduate Medical Journal 2004; 80:366-367.
17. Levin MD, Zoet-Nugteren SK, and Markusse HM. Myocarditis and primary Sjogren's syndrome. Lancet 1999; 354:128-129.
18. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, and Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. Circulation 2003; 107:857-863.
19. Frustaci A, Pieroni M, and Chimenti C. Immunosuppressive treatment of chronic non-viral myocarditis. Ernst Schering Research Foundation workshop 2006; 343-351.
20. Eriksson U, and Penninger JM. Autoimmune heart failure: new understandings of pathogenesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005; 37:27-32.
21. Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Alvarez-León E, Martínez-Rodríguez N, Gallardo GJ, Inés-Real S, et al. MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Experimental and Molecular Pathology 2007; 82:49-55.

22. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, and Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *The Journal of Immunology* 1987; 139:3630-3636.
23. Guler ML, Ligons DL, Wang Y, Bianco M, Broman KW, and Rose NR. Two autoimmune diabetes loci influencing T cell apoptosis control susceptibility to experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 2005; 174:2167-2173.
24. Aly M, Wiltshire S, Chahrour G, Osti JC, and Vidal SM. Complex genetic control of host susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Genes Immun* 2007; 8:193-204.
25. Forouzanfar MH, and Anderson HR. A systematic analysis for the global burden of disease study. *Lancet* 2015; 386:743-800.
26. Kyto V, Sipila J, Rautava P. Gender differences in myocarditis: A nationwide study in Finland. *European Heart Journal* 2013; 34:644.
27. Lyden DC, Olszewski J, Feran M, Job LP, and Huber S. Coxsackievirus B-3- induced myocarditis. Effect of sex steroids on viremia and infectivity of cardiocytes. *The American Journal of Pathology* 1987; 126:432-438.
28. Schwartz J, Sartini D, and Huber S. Myocarditis susceptibility in female mice depends upon ovarian cycle phase at infection. *Virology* 2004; 330:16-23.
29. Frisancho-Kiss S, Coronado MJ, Frisancho JA, Lau MV, Rose NR, Klein SL, et al. Gonadectomy of male BALB/c mice increases Tim-3(+) alternatively activated M2 macrophages, Tim-3(+) T cells, Th2 cells and Treg in the heart during acute coxsackievirus-induced myocarditis. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009; 23:649-657.
30. Cooper LT, Berry GJ, and Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336:1860-1866.
31. Fenoglio Jr JJ, Ursell PC, Kellogg CF, Drusin RE, and Weiss MB. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *The New England Journal of Medicine* 1983; 308:12-18.
32. Kyto V, Saukko P, Lignitz E, Schwesinger G, Henn V, Saraste A, et al. Diagnosis and presentation of fatal myocarditis. *Human Pathology* 2005; 36:1003-1007.

33. Saji T, Hiroyuki M, Hasegawa K, Nishikawa T, Yamamoto E, Ohki H, et al. Comparison of the clinical presentation, treatment, and outcome of fulminant and acute myocarditis in children. *Circulation Journal* 2012; 76:1222-1228.
34. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA* 2006; 296:1867-1876.
35. Cooper L. Molecular biologic detection of virus infection in myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Cooper LT., editor. *Myocarditis: from bench to bedside*. Humana Press 2002; 295-324.
36. Fabre A, and Sheppard M. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006; 92:316-320.
37. Basso C, Calabrese F, Corrado D, and Thiene G. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovascular Research* 2001; 50:290-300.
38. Gore I, and Saphir O. Myocarditis; a classification of 1402 cases. *American Heart Journal* 1947; 34:827-830.
39. Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, Strauer BE, and Schultheiss HP. Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35:11-18.
40. Cooper LT, Berry GJ, Rizeq M, and Schroeder JS. Giant cell myocarditis. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 1995; 14:394-401.
41. Ekstrom K, Lehtonen J, Kandolin R, Raisanen-Sokolowski A, Salmenkivi K, and Kupari M. Long-term outcome and its predictors in giant cell myocarditis. *European Journal of Heart Failure* 2016; 18:1452-1458.
42. Cooper LT Jr. Myocarditis. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360:1526-1538.
43. Daubeney PE, Nugent AW, Chondros, P, Carlin JB, Colan SD, Cheung M, et al. Clinical features and outcomes of childhood dilated cardiomyopathy: Results from a national population-based study. *Circulation* 2006; 114:2671-2678.
44. Pérez-Serra A, Sarquella-Brugada TR, de Gonzalo-Calvo D, Cesar S, Carro E, Llorente-Cortes V, et al. Genetic basis of dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* 2016; 224:461-472.

45. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50:1914-1931.
46. Bergler-Klein J, Sochor H, Stanek G, Globits S, Ullrich R, and Glogar D. Indium 111-monoclonal antimyosin antibody and magnetic resonance imaging in the diagnosis of acute Lyme myopericarditis. *Archives of Internal Medicine* 1993; 153:2696-2700.
47. Magnani JW, and Dec GW. Myocarditis: Current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006; 113:876-890.
48. Mackay IR, and Burnet FM. *Autoimmune Diseases, Pathogenesis, Chemistry and Therapy*. Thomas, Springfield III 1963.
49. Fairweather D, and Rose NR. Women and autoimmune diseases. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10:2005-2011.
50. Mosca M, Carli L, A d'Ascanio, Tani C, Talarico R, Baldini C, Bazzichi L, et al. Occurrence of organ-specific and systemic autoimmune diseases among the first- and second-degree relatives of Caucasian patients with connective tissue diseases: report of data obtained through direct patient interviews. *Clinical Rheumatology* 2008; 27:1045-1048.
51. Rose NR, and Hill SL. Mechanisms of autoimmunity. *Seminars in Liver Disease* 2002; 22: 387-394.
52. Fairweather D, and Rose NR. Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nature Immunology* 2002; 3:338-340.
53. Wucherpfennig KW. Structural basis of molecular mimicry. *Journal of Autoimmunity* 2001; 16:293-302.
54. Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, and Penninger JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999; 283:1335-1339.
55. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, and Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature Medicine* 1998; 4:781-785.

56. Feldman AM, and McNamara D. Myocarditis. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343:1388-1398.
57. Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, and Herskowitz A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 1990; 16:839-846.
58. Konstadoulakis MM, Kroumbouzou H, Tsiamis E, Trikas A, and Toutouzas P. Clinical significance of antibodies against tropomyosin, actin and myosin in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology* 1993; 40:61-67.
59. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, et al. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 85:1734-1742.
60. Limas CJ, Goldenberg IF, and Limas C. Influence of anti-beta-receptor antibodies on cardiac adenylate cyclase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *American Heart Journal* 1990; 119:1322-1328.
61. Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M, et al. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 2005; 112:2276-2285.
62. Huber SA, Gauntt CJ, and Sakkinen P. Enteroviruses and myocarditis: Viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity. *Advances in Virus Research* 1998; 51:35-80.
63. Fairweather D, and Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: A model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. *Methods* 2007; 41:118-122.
64. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Steele RA, et al. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *The Journal of Immunology* 2005; 174:261-269.
65. Afanasyeva M, and Rose NR. Viral infection and heart disease: Autoimmune mechanisms. In "Infection and Autoimmunity" (Y. Shoenfeld, and N. R. Rose, Eds.). Elsevier 2004:299-318.

66. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, and Rose NR. Viruses as adjuvants for autoimmunity: Evidence from coxsackievirus-induced myocarditis. *Reviews in Medical Virology* 2005; 15:17-27.
67. Pummerer CL, Luze K, Grassl G, Bachmaier K, Offner F, Burrell SK, et al. Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97:2057-2062.
68. Cihakova D, Sharma RB, Fairweather D, Afanasyeva M, and Rose NR. Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis. *Methods in Molecular Medicine* 2004; 102:175-193.
69. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, and Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997; 95:163-168.
70. Goerger S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, et al. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation* 2006; 114:1693-1702.
71. Li HS, Davinna L, and Rose NR. Genetic complexity of autoimmune myocarditis. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7:168-173.
72. Veena T, Behrens M, Cooper LT, Satsuki Y, Hirohito K, Redfield MM, et al. Spontaneous myocarditis mimicking human disease occurs in the presence of an appropriate MHC and non-MHC background in transgenic mice. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* 2007; 42:1054-1064.
73. Smith SC, and Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *The Journal of Immunology* 1991; 147:2141-2147.
74. Mackay IR, Leskovsek N, and Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *Journal of Autoimmunity* 2008; 30:5-11.
75. Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, Dohmen KM, Schlichting J, Tretter T, et al. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nature Immunology* 2001; 2:739-745.
76. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Gatewood S, Njoku D, Steele R, Barrett M, et al. Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following coxsackievirus B3 infection. *Autoimmunity* 2004; 37:131-145.

77. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, Ramsundar AC, Barin JG, Kass DA, et al. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *The American Journal of Pathology* 2004; 164:807-815.
78. Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, et al. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *The American Journal of Pathology* 2001; 159:193-203.
79. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nature Medicine* 2003; 9:1484-1490.
80. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, and Huber SA. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *The American Journal of Pathology* 1987; 128:455-463.
81. Ong S, Ligons DL, Barin JG, Wu L, Talor MV, Diny N, et al. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. *The American Journal of Pathology* 2015; 185:847-861.
82. Barin JG, and Cihakova D. Control of inflammatory heart disease by CD4+ T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013; 1285:80-96.
83. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circulation Research* 2010; 106:1646-1655.
84. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Fairweather D, et al. Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN-gamma and IL-17A. *The Journal of Immunology* 2013; 191:4038-4047.
85. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, et al. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *Journal of the American College Cardiology* 2010; 55:1629-1638.
86. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine* 2007; 204:3037-3047.



87. Schulz C, Gomez PE, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 2012; 336:86-90.
88. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009; 325:612-616.
89. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, and Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656-661.
90. Fujiu K, Manabe I, and Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2011; 121:3425-3441.
91. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupher ML, and Duffield JS. Bone marrow Ly6c<sup>high</sup> monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *The Journal of Immunology* 2009; 183:6733-6743.
92. Barin JG, Rose NR, and Cihakova D. Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review. *Immunobiology* 2012; 217:468-475.
93. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, and Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656-661.
94. Nahrendorf M, Swirski F, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine* 2007; 204:3037-3047.
95. Yulong H, Hanwen Z, Yan L, Hui B, Yiming X, Xudong Z, et al. Class a scavenger receptor attenuates myocardial infarction-induced cardiomyocyte necrosis through suppressing M1 macrophage subset polarization. *Basic Research Cardiology* 2011; 106:1311-1328.
96. Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, et al. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13:3485-3496.
97. Zandbergen HR, Sharma UC, Gupta S, Verjans JW, van den Borne S, Pokharel S, et al. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2009; 14:68-75.
98. van Amerongen MJ, Martin C, van Rooijen N, Petersen AH, and van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American Journal of Pathology* 2007; 170:818-829.

99. RenW ZR, Markel DC, Wu B, Peng X, Hawkins M, Wooley P. Blockade of vascular endothelial growth factor activity suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis. *The Journal of Rheumatology* 2007; 34:27-35.
100. Nacu N, Luzina IG, Highsmith K, LockatellV, Pochetuhen K, Cooper ZA, et al. Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-Ig-H3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts. *The Journal of Immunology* 2008; 180:5036-5044.
101. Yan D, Li D, LiuW, Li M, Qu Z, and Ruan Q. Macrophages overexpressing VEGF target to infarcted myocardium and improve neovascularization and cardiac function. *International Journal of Cardiology* 2013; 164:334-338.
102. Cihakova D, Barin JG, Afanasyeva M, Kimura M, Fairweather D, Berg M, et al. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *The American Journal of Pathology* 2008; 172:1195-1208.
103. Bangert A, Andrassey M, Muller AM, Bockstahler M, Fischer A, Volz CH, et al. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proceedings of the National Academy Sciences* 2016; 113:E155-64.
104. Hulsmans M, Hendric B, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, Iwamoto Y, et al. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *The Journal of Experimental Medicine* 2018; 215:423-440.
105. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Quader F, et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *European Journal of Immunology* 2012; 42:726-736.
106. Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, Dirnhofer S, et al. CD11b<sup>+</sup> monocytes abrogate Th17 CD4<sup>+</sup> T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 2008; 180:2686-2695.
107. Artis D, and Hergen S. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015; 517:293-301.
108. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 1986; 136:2348-2357.
109. Kleinewietfeld M, and Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Seminars in Immunology* 2013; 25:305-312.

110. Damsker JM, Hansen AM, and Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; 1183:211-221.
111. Billau A. Interferon-gamma: biology and role in the pathogenesis. *Advances in Immunology* 1996; 62:61-130.
112. Schmidtke M, Gluck B, Merkle P, Hofmann P, Stelzner A, and Gemsa D. Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *Journal of Medical Virology* 2000; 61:518-526.
113. Luppi P, Rudert W, Licata A, Riboni S, Betters D, Cotrufo M, et al. Expansion of specific alphabeta+ T-cell subsets in the myocardium of patients with myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy associated with Coxsackievirus B infection. *Human Immunology* 2003; 64:194-210.
114. Veena T, and Chella SD. Spontaneous autoimmune myocarditis and cardiomyopathy in HLA-DQ8.NODAb0 transgenic mice. *Journal of Autoimmunity* 2009; 33:260-269.
115. Veena T, Behrens M, Cooper LT, Yamada S, Kita H, Redfield MM, et al. Spontaneous myocarditis mimicking human disease occurs in the presence of an appropriate MHC and non-MHC background in transgenic mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42:1054-1064.
116. Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Kuuper I, et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *The American Journal of Pathology* 2007; 171:463-472.
117. Torzewski M, Wenzel P, Kleinert H, Becker C, El-Marsi J, Wiese E, et al. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon gamma-overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *The American Journal of Pathology* 2012; 180:73-81.
118. Afanasyeva M, Wang J, Kaya Z, Stafford EA, Dohmen KM, Sadighi Akha AA, et al. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway. *Circulation* 2001; 104:3145-3151.
119. Eriksson U, Kurrer MO, Sebald W, Brombacher F, and Kopf M. Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN-gamma. *The Journal of Immunology* 2001; 167:5464-5469.

120. Caspi RR, Chan CC, Grubbs BG, Silver PB, Wiggert B, Parsa CF, et al. Endogenous systemic IFN-g has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *The Journal of Immunology* 1994; 152:890-899.
121. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dinhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *The Journal of Experimental Medicine* 2006; 203:2009-2019.
122. Eriksson U, Kurrer MO, Bingisser R, Eugster HP, Saremaslani P, Follath F, et al. Lethal autoimmunemyocarditis in interferon-gamma receptor-deficient mice: enhanced disease severity by impaired inducible nitric oxide synthase induction. *Circulation* 2001; 103:18-21.
123. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Gatewood SJ, et al. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *The American Journal of Pathology* 2004; 165:1883-1894.
124. Afanasyeva M, Gaorgakopoulos D, Belardi DF, Bedja D, Fairweather D, Wang Y, et al. Impaired up-regulation of CD25 on CD4+ T cells in IFN-gamma knockout mice is associated with progression of myocarditis to heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2005; 102:180-185.
125. Barin JG, Talor MV, Baldeviano GC, Kimura M, Rose NR, and Cihakova D. Mechanisms of IFN gamma regulation of autoimmune myocarditis. *Experimental and Molecular Pathology* 2010; 89:83-91.
126. Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, and Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 192:117-122.
127. Pope RM, and Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2013; 9:252-256.
128. Sonderegger I, Rohn TA, Kurrer MO, Iezzi G, Zoou Y, Kastelein RA, et al. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *The European Journal of Immunology* 2006; 36:2849-2856.
129. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* 2002; 17:7-17.

130. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, and Yazaki Y. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *The Journal of Pathology* 1997; 183:105-108.
131. Han RO, Ray Pe, Baughman KL, and Feldman AM. Detection of interleukin and interleukin-receptormRNA in human heart by polymerase chain reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 181:520-523.
132. Li J, Leschaka S, Rutschow S, Schwimbeck PL, Husmann L, Noutsias M, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *European Journal of Pharmacology* 2007; 554:60-68.
133. Satoskar AR, Elizondo J, Monteforte GM, Stamm LM, Bluethmann H, Katavolos P, et al. Interleukin-4-deficient BALB/c mice develop an enhanced Th1-like response but control cardiac inflammation following *Borrelia burgdorferi* infection. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 183:319-325.
134. Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellinati MC, Pontes-de-Carvalho L, and Ribeiro-dos-Santos R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *The American Journal of Pathology* 2001; 159:703-709.
135. Kolls JK, and Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21:467-476.
136. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 2005; 6:1123-1132.
137. Park H, Li Z, Yang XO, Chang CH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* 2005; 6:1133-1141.
138. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, and Stockinger B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179-189.
139. McGeachy MJ, Chen J, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* 2009; 10:314-324.

140. Jing Y, Miao Y, Qiong-Wen L, Ai-Lin C, Xian Y, Ji-Hua D, et al. Th17 cells contribute to viral replication in coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis. *The Journal of Immunology* 2010; 185:4004-4010.
141. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Neglect Trop Dis* 2010; 4:e604.
142. Chen P, Baldeviano GC, Ligons DL, Talor MV, Barin JG, Rose NR, et al. Susceptibility to autoimmune myocarditis is associated with intrinsic differences in CD4(+) T cells. *Clinical and Experimental Immunology* 2012; 169:79-88.
143. Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1106.
144. Shi Y, Fukuoka M, Li G, Liu Y, Chen M, Konviser M, et al. Regulatory T cells protect mice against coxsackievirus-induced myocarditis through the transforming growth factor beta-coxsackie-adenovirus receptor pathway. *Circulation* 2010; 121:2624-2634.
145. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobei RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* 2008; 9:1347-1355.
146. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Sinck J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 2008; 9:1341-1346.
147. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2009; 106:12885-12890.
148. Vistnes M, Waehre A, Nygard S, Sjaastad I, Andersson KB, Husberg C, et al. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *Journal of Applied Physiology* 2010; 108:1357-1364.
149. Cappuzzello C, Di Vito L, Melchionna R, Melillo G, Silvestri L, Cesareo E, et al. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN-gamma in patients with chronic heart failure. *Journal of Translation Medicine* 2011; 9:28.
150. Moudgil KD, and Sercarz EE. Crypticity of self antigenic determinants is the cornerstone of a theory of autoimmunity. *Discovery Medicine* 2005; 5:378-82.

151. Cheng HM, and Chamley L. Cryptic natural autoantibodies and co-potentiators. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7:431-434.
152. Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, and McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *European Journal of Heart Failure* 2002; 4:411-417.
153. Drickamer K, and Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1993; 9:237-264.
154. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76:597-598.
155. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572:209-231.
156. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, and Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:20807-20810.
157. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, and Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* 2004; 19:433-440.
158. Loris L. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572:198-208.
159. Hirabayashi J, and Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 1993; 3:297-304.
160. Ho MK, and Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 1982; 128:1221-1228.
161. Roff CF, and John LW. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; 258:10657-10663.
162. Liu FT, and Norman O. Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1984; 259:10649-10652.
163. Cerra RF, Gitt MA, and Barondes SH. Three soluble rat beta-galactosidebinding lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260:10474-10477.

164. Sparrow CP, Leffler H, and Barondes SH. Multiple soluble b-galactosidebinding lectins from human lung. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262:7383-7390.
165. Raz A, Meromsky L, Zvibel I, and Lotan R. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *International Journal of Cancer* 1987; 39:353-360.
166. Woo HJ, Leslie MS, Messier JM, and Mercurio AM. The major nonintegrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:7097-7099.
167. Albrandt K, Norman K, and Liu FT. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1987; 84:6859-6863.
168. Jia S, Robert P, Morford G, Agrwal N, Voss PG, Moutsatsos IK, et al. Carbohydrate-binding protein 35: molecular cloning and expression of a recombinant polypeptide with lectin activity in *Escherichia coli*. *Gene* 1987; 60:197-204.
169. Cherayil BJ, Weiner SJ, and Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *The Journal of Experimental Medicine* 1989; 170:1959-1972.
170. Laing JG, Gritzmacher CA, Wang JL, and Liu FT. Biochemical and immunological comparisons of carbohydrate-binding protein 35 and an IgE-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264:1097-1100.
171. Leffler H, Frank RM, and Barondes SH. Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 1989; 28:9222-9229.
172. Raz A, Pnina C, Raz T, Hogan V, Mohamed A, and Wolman SR. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactosidebinding protein. *Cancer Research* 1991; 51:2173-2178.
173. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, 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. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:26704-26711.
174. Gaudin JC, Mehul B, and Hughes RC. Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. *Biology of the Cell* 2000; 92:49-58.



175. Houzelstein D, Isabelle RG, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Molecular Biology and Evolution* 2004; 21:1177–1187.
176. Liu FT, and Rabinovich G. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5:29-41.
177. Liu FT, and Rabinovich G. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5:29-41.
178. Ochieng J, Furtak V, and Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate Journal* 2004; 19:527-535.
179. Almkvist J, and Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate Journal* 2004; 19:575-581.
180. Wang JL, Laing JG, and Anderson RL. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* 1991; 1:243-252.
181. Raz A, Pazerini G, and Carmi P. Identification of the metastasis-associated galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Research* 1989; 49:3489-3493.
182. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, and Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate 30. recognition domain at 2.1-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:13047-13052.
183. Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, and Hughes RC. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology* 2000; 10:1201-1208.
184. Menon RP, and Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum–Golgi complex. *European Journal of Biochemistry* 1999; 264:569-576.
185. Yoshii T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, and Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:6852-6857.
186. Hsu DK, Zuberi RI, and Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:14167-14174.

187. Birdsall B, Feeney J, Burdett ID, Bawumia S, Barboni EA, and Hughes RC. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry* 2001; 40:4859-4866.
188. Yang RY, Hsu DK, and Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93:6737-6742.
189. Yang RY, Hill PN, Hsu DK, and Liu FT. Role of the carboxylterminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* 1998; 37:4086-4092.
190. Kuklinski S, and Probstmeier R. Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain. *Journal of Neurochemistry* 1998; 70:814-823.
191. Woo HJ, Jung JU, and Mercurio AM. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:18419-18422.
192. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, et al. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Molecular Medicine* 1995; 1:634-646.
193. Poirier F, and Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 1993; 119:1229-1236.
194. Fowles D, Colnot C, Ripoche MA, and Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Developmental Dynamics* 1995; 203:241-251.
195. Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, and Balmain N. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. *Molecular Biology and Evolution* 1999; 45:1191-1202.
196. van den Brule FA, Buicu C, Liu FT, Jackers P, Lambotte R, and Castronovo V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. *Developmental Dynamics* 1997; 209:399-405.
197. Nio J, Kon Y, and Iwanaga T. Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; 53:1323-1334.

198. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, and Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biology International* 2007; 31:655-662.
199. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, and Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *The Journal of Immunology* 2002; 168:1813-1822.
200. Nio J, Morimatsu M, Kon Y, and Iwanaga T. Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in the urinary system of adult mice. *Histochemistry and Cell Biology* 2006; 126:45-56.
201. Villa-Verde DM, Silva ME, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *European Journal of Immunology* 2002; 32:1434-1444.
202. Silva-Monteiro E, Lorenzato LR, Nihei OK, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, et al. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Pathology* 2007; 170:546-556.
203. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1473:172-185.
204. J Garin, Roberto D, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Rondeau C, et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *The Journal of Cell Biology* 2001; 152:165-180.
205. They C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology* 2001; 166:7309-7318.
206. van den Brule FA, Buicu C, Sobel ME, Liu FT, and Castronovo V. Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. *Neoplasma* 1995; 42:215-219.
207. Sato S, and Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *Biological Chemistry* 1992; 267:6983-6990.

208. Ochieng J, Leite-Browning ML, and Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 246:788-791.
209. Dong S, and Huges RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconjugate Journal* 1997; 14:267-274.
210. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
211. Kuwabara I, and Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *The Journal of Immunology* 1996; 156:3939-3944.
212. Ohannesian DW, Lotan D, Thomas P, Jessup JM, Fukuda M, Gabius HJ, et al. Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 1995; 55:2191-2199.
213. Swarte VV, Mebius RE, Joziassse DH, Van den Eijnden DH, and Kraal G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3- mediated binding to dendritic cells. *European Journal of Immunology* 1998; 28:2864-2871.
214. Dong S, and Haughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconjugate Journal* 1997; 14:267-274.
215. Paret C, Beer A, Miyazaki K, Schnolzer M, Fiedler S, and Zoller M. Ly6 family member C4.4A binds laminins 1 and 5, associates with galectin-3 and supports cell migration. *International Journal of Cancer* 2005; 115:724-733.
216. Inohara H, Akahani S, Kohts K, and Raz A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell–cell adhesion. *Cancer Research* 1996 56:4530-4534.
217. Jeng KC, Frigeri LG, and Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunology Letters* 1994; 42:113-116.
218. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, and Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *The Journal of Immunology* 1995; 154:3479-3487.
219. Almkvist J, Jenny F, Dahlgren C, Leffler H, and Karlsson A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infection and Immunity* 2001; 69:832-837.

220. Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, and Karlsson A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *The Journal of Immunology* 1999; 163:5592-5598.
221. Fernandez GC, Juan MI, Rubel CJ, Toscano MA, Gomez SA, Beigier Bompadre M, et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology* 2005; 15:519-527.
222. Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, et al. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *The Journal of Immunology* 1998; 161:385-389.
223. Nangia-Makker P, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, and Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 2000; 156:899-909.
224. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3121-3128.
225. Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jungel A, Michel BA, Gay RE, et al. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Annals of Rheumatic Diseases* 2005; 64:419-424.
226. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, et al. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:18938-18944.
227. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *The Journal of Immunology* 2000; 165:2156-2164.
228. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, and Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1673:75-93.
229. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, and Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Research* 2005; 65:7292-7300.

230. Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, et al. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Experimental Cell Research* 2003; 288:21-34.
231. Yu F, Finley RL, Raz A, and Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 2002 277; 15819-15827.
232. Park JW, Voss P, Grabski S, Wang JL, and Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Research* 2001; 29:3595-3602.
233. Laing JG, and Wang JL. Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry* 1988; 27:5329-5334.
234. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Research* 2005; 65:3535-3537.
235. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; 20:455-460.
236. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American Journal of Pathology* 2000; 156:1073-1083.
237. Colnot C, Ripoche MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, and Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 1998; 94:290-296.
238. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:389-397.
239. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, and Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *The Journal of Immunology* 1996; 156:1572-1577.
240. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *The Journal of Immunology* 2008 180:2650-2658.

241. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *The Journal of Immunology* 2008; 181:2781-2789.
242. Jeon SB, Yoon H, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, and Park EJ. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *The Journal of Immunology* 2010; 189:7037-7046.
243. Hsu DK, Chernyavski AI, Chen HY, Yu L, Grando SA and Liu FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129:573-583.
244. Mensah-Brown E, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clinical Immunology* 2009; 130:83-88.
245. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infection and Immunity* 2007; 75:5148-5157.
246. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W and Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69:555-564.
247. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA et al. Galectin-3 mediates IL-4- induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology* 2004; 172:493-502.
248. Oliveira FL, Brand C, Paula AA, Arcanjo KD, Hsu DK, Liu F-T, et al. Lack of galectin-3 disturbs mesenteric lymph node homeostasis and B cell niches in the course of *schistosoma mansoni* infection. *Plos One* 2011; 6:e19216.
249. Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, et al. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *The American Journal of Pathology* 2004; 164:893-902.
250. Clark AG, Weston ML, and Foster MH. Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. *Glycobiology* 2013; 23:893-903.

251. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Experimental Biology and Medicine* 2015; 240:1019-1028.
252. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infected and Immunity* 2007; 75:5148-5157.
253. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012; 55:1954-1964.
254. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1473:172-185.
255. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochemical Society Transactions* 1997; 25:1194-1198.
256. Henderson NC, Mackinnon A, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *The American Journal of Pathology* 2008; 172:288-298.
257. Henderson NC, Mackinnon A, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103:5060-5065.
258. Ahmad T, Fiuzat M, Felker GM, and O'Connor C. Novel biomarkers in chronic heart failure. *Nature Reviews Cardiology* 2012; 9:347-359.
259. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3121-3128.
260. Kasper M, and Hughes R. Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis. *The Journal of Pathology* 1996; 179:309-316.
261. Sasaki S, Bao Q, and Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *The Journal of Pathology* 1999; 187:481-489.



262. Liu YH, D Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, et al. N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2009; 296:404-412.
263. Kolatsi-Joannou M, Price K, Winyard PJ, and Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One* 2011; 6:e18683.
264. van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48:1217-1224.
265. Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clinical Research in Cardiology* 2010; 99:323-328.
266. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, et al. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circulation: Heart Failure* 2012; 5:72-78.
267. Heechul K, Lee J, HyunJW, Park JW, Hong-gu J, and Taekyun S. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biology International* 2007; 31:655-662.
268. Jaquenod De Giusti C, Ure AE, Rivadeneyra L, Schattner M, and Gomez RM. Macrophages and galectin 3 play critica roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* 2015; 85:58-70.
269. Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, et al. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60:1249-1256.
270. Yu L, Ruifrok W, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circulation: Heart Failure* 2013; 6:107-117.

271. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; 501-578.
272. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; 263-328.
273. Smit CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14:14-32.
274. A Rutheford. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420:510.
275. Smit CM. Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14:14-32.
276. A Rutheford. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420:510.
277. Gritzmacher CA, Mehl VS, and Liu FT. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 59 untranslated regions. *Biochemistry* 1992; 31:9533-9538.
278. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *The American Journal of Pathology* 2000; 156:1073-1083.
279. Pala P, Hussell T, and Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243:107-124.
280. Lv H, Evis H, Pinto S, Gottumukkala RV, Cornivelli L, Raddassi K, et al. Impaired thymic tolerance to  $\alpha$ -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* 2011; 121:1561-1573.
281. Okabe TA, Hattori M, Yuan Z, and Kishimoto C. L-arginine ameliorates experimental autoimmune myocarditis by maintaining extracellular matrix and reducing cytotoxic activity of lymphocytes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2008; 89:382-388.
282. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, and Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology* 2007; 239:1883-1891.
283. Abston ED, Barin JG, Cihakova D, Bucek A, Coronado MJ, Brandt JE, et al. IL-33 independently induces eosinophilic pericarditis and cardiac dilation: ST2 improves cardiac function. *Circulation- Heart Failure* 2012; 5:366-375.

284. Zimmermann O, Homann J, Bangert A, Muller A, Hristov G, Goeser S, et al. Successful Use of mRNA-Nucleofection for Overexpression of Interleukin-10 in Murine Monocytes/Macrophages for Anti-inflammatory Therapy in a Murine Model of Autoimmune Myocarditis. *Journal of the American Heart Association* 2012; 1:e003293.
285. Radosavljevic G, Pantic J, Jovanovic I, Lukic ML, and Arsenijevic N. The Two Faces Of Galectin 3: Roles In Various Pathological Conditions. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2016; 17:187-198.
286. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PSC, et al. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Scientific Reports* 2016; doi:10.1038/srep23348.
287. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 2009; 182:1167-1173.
288. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013; 69:1932-1944.
289. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, and Rose NR. Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3:476-486.
290. Daniels MD, Hyland KV, Wang K, and Engman DM. Recombinant cardiac myosin fragment induces experimental autoimmune myocarditis via activation of Th1 and Th17 immunity. *Autoimmunity* 2008; 41:490-499.
291. Wang Y, Afanasyeva M, Hill SL, and Rose NR. Characterization of murine autoimmune myocarditis induced by self and foreign cardiac myosin. *Autoimmunity* 1999; 31:151-162.
292. Smith SC, and Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *The Journal of Immunology* 1991; 147:2141-2147.
293. Rose NR. Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2011; 31:705-710.
294. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA* 2009; 106:14496-14501.

295. Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, and Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12:1092-1099.
296. Tzartos JS, Friese M, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American Journal of Pathology* 2008; 172:146-155.
297. Barret SP, Gleeson PA, de Silva H, Toh BH, and van Driel IR. Interferon-gamma is required during the initiation of an organ-specific autoimmune disease. *European Journal of Immunology* 1996; 26:1652-1655.
298. Boehm U, Klamp T, Groot M, and Howard JC. Cellular responses to interferon-g. *Annual Review of Immunology* 1999; 15:749-795.
299. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, and Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD41 T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1993; 177:573-576.
300. Gajewski TF, and Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *The Journal of Immunology* 1988; 140:4245-4252.
301. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: A major scavenging role for galectin-3 in liver. *Journal of Hepatology* 2011; 54:975-983.
302. Henderson NC, and Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews* 2009; 230:160-171.
303. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circulation Research* 2014; 115:284-295.
304. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Mukaida N, Kawano Y, et al. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 2013; 38:570-580.
305. Docan Dragomir AC, Sun R, Choi H, Laskin JD, and Laskin DL. Role of Galectin-3 in Classical and Alternative Macrophage Activation in the Liver following Acetaminophen Intoxication. *The Journal of Immunology* 2012; 189:5934-5941.

306. Fermin Lee A, Chen HY, Wan L, Wu SY, Yu JS, Huang AC, et al. Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines. *The American Journal of Pathology* 2013; 183:1209-1222.
307. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The American Journal of Pathology* 2004; 165:2045-2053.
308. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, et al. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *The American Journal of Pathology* 2006; 168:1910-1920.
309. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, et al. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *The American Journal of Pathology* 2009; 174:922-931.
310. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, et al. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *The Journal of Pathology* 2006; 210:469-477.
311. Bellinghausen I, Brand P, Böttcher I, Klostermann B, Knop J, and Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003; 108:167-176.
312. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 Modulates Immune and Inflammatory Responses during Helminthic Infection: Impact of Galectin-3 Deficiency on the Functions of Dendritic Cells. *Infection and Immunity* 2007; 75:5148-5157.
313. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *European Journal of Immunology* 2015; 45:531-543.
314. Li LC, Li J, and Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2014; 351:336-343.

315. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, and Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Molecular Medicine* 2015; 21:453-465.
316. de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, van der Meer P, Voors AA, Hillege HL, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Annals of Medicine* 2011; 43:60-68.
317. Frunza O, Russo I, Saxena A, Arti VS, Humeres C, Hanif W, et al. Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. *The American Journal of Pathology* 2016; 186:1114-1127.
318. Jaquenod De Giusti C, Ure AE, Rivadeneyra L, Schattner M, and Gomez RM. Macrophages and galectin 3 play critica roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015; 85:58-70.
319. González GE, Rhaleb NE, D'Ambrosio MA, Nakagawa P, Liao TD, Peterson EL, et al. Cardiac-deleterious role of galectin-3 in chronic angiotensin II-induced hypertension. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology* 2016; 311:1287-1296.
320. Louis H, Van Laethem J, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28:1607-1615.
321. Arai T, Abe K, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, et al. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000; 278:914-922.
322. Demols A, Van Laethem J, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, et al. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2002; 282:1105-1112.
323. Seki K, Sandra S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin- 33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circulation Heart Failure* 2009; 2:684691.

324. Oliveira FL, Roger C, Ricon L, Fermino ML, Bernarders ES, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates peritoneal B1-cell differentiation into plasma cells. *Glycobiology* 2009; 19:1248-1258.
325. Clark AG, Weston ML, and Foster MH. Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. *Glycobiology* 2013; 23:893-903.
326. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosomacruzi infection. *Journal of Immunology* 2004; 172:493-502.
327. Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, Hofhuis FM, Renardel de Lavalette CR, Schmidt RE, et al. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *Journal of Immunology* 1998; 161:3026-3032.
328. Weiler CR, Kita H, Hukee M, and Gleich GJ. Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 60:493-501.

## БИОГРАФИЈА

Др Марина Милетић-Ковачевић је рођена 09.11.1984. године у Краљеву. Основну и средњу школу је завршила у Краљеву. Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу је уписала школске 2003/2004 године (основне студије медицине, доктор медицине), а на истом је дипломирала у новембру 2009. године са просечном оценом 9,71. Након дипломирања обавила је приправнички лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине.

Током основних студија више пута је била награђивана као један од најбољих студената на години студија и као један од најбољих апсолвената генерације. Као студент демонстратор помагала је у извођењу наставе на предмету Хистологија и ембриологија током школске 2005/2006 године. Учествовала је на више конгреса са националним и међународним значајем.

Школске 2009/2010 године је уписала Докторске академске студије на Медицинском факултету, Универзитета у Крагујевцу, а усмени докторски испит је положила у фебруару 2012. године. У новембру 2016. године пријавила је докторску дисертацију под називом: „Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса“.

Од школске 2010/2011 је ангажована у извођењу наставе на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу на предмету Хистологија и ембриологија као сарадник у настави, а од маја 2013. године је у звању асистента.

Кандидат је аутор више оригиналних научних радова и први аутор у једном раду објављеном у часопису индексираном на *SCI* листи.



## БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Miletic-Kovacevic M**, Pejnovic N, Mitrovic S, Jovicic N, Petrovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, Lujic B. Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice. *Immunol Res.* 2018; 66(4):491-502.
2. Tanaskovic-Stankovic S, Tanaskovic I, Jovicic N, **Miletic-Kovacevic M**, Kanjevac T, Milosavljevic Z. The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2018; 162(2):149-153.
3. Kovacevic V, Jovanovic N, **Miletic-Kovacevic M**, Nikolic R, Peulic M, Rotim K, Sajko T, Rasulic L. Standard discectomy versus microdiscectomy, differences in clinical outcome and disc reherniation rate. *Acta clinica Croatica* 2017; 56(3):391-398.
4. Peulic M, Kovacevic V, **Miletic-Kovacevic M**, Grujicic D. To wait for a spontaneous recovery of the third cranial nerve palsy occurring after the coiling of a PComA aneurysm or to implement surgical treatment? A case report. *Vojnosanitetski preglad* 2016. doi: 10.2298/VSP160317235P
5. Jeftic I\*, **Miletic-Kovacevic M\***, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 deletion enhances visceral adipose tissue inflammation and dysregulates glucose metabolism in mice on a high-fat diet. *Serb J Exp Clin Res.* 2016; 17(3):231-239.
6. Jovicic N, Jeftic I, **Miletic-Kovacevic M**, Tanaskovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c mice. *Serb J Exp Clin Res.* 2015; 16:9-20.
7. Petrovic M, **Miletic-Kovacevic M**, Jovanovic N, Nikolic R, Raicevic S, Kovacevic V. Tanycytic ependymoma of the filum terminale region; a case report. *Serb J Exp Clin Res.* 2017; 19:277-280.

# ПРИЛОГ

## 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:**

**ТД**

Монографска публикација

**Тип записа:**

**ТЗ**

Текстуални штампани материјал

**Врста рада:**

**ВР**

Докторска дисертација

**Аутор:**

**АУ**

Марина Милетић-Ковачевић

**Ментор/коментор:**

**МН**

Проф. др Биљана Љујић

<b>Наслов рада:</b> <b>НР</b>	Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса
<b>Језик публикације:</b> <b>ЈП</b>	Српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> <b>ЈИ</b>	Српски/Енглески
<b>Земља публикавања:</b> <b>ЗП</b>	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> <b>УГП</b>	Србија
<b>Година:</b> <b>ГО</b>	2019.
<b>Издавач:</b> <b>ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> <b>МС</b>	34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
<b>Физичи опис рада:</b> <b>ФО</b>	Дисертација има 142 страна, садржи 7 поглавља, 2 графикона, 3 табеле, 8 фигура, 10 слика и 328 референци

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина:** Медицина

**ДИ**

**Предметна одредница/ кључне речи**

**ПО** експериментални аутоимунски миокардитис, галектин 3, тип 2 инфламација

**УДК**

**Чува се:** У Библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

**ЧУ**

**Важна напомена:** Нема

**МН**

**Извод:**

**ИД**

Миокардитис је инфламаторно обољење срчаног мишића, које се карактерише дегенерацијом и/или некрозом кардиомиоцита и присуством ћелијског инфилтрата у интерстицијуму миокарда. Миокардитис се може манифестовати као акутно, субакутно или хронично запаљење миокарда, са фокалним или дифузним ћелијским инфилтратом и може прогредирати до фиброзе, ремоделовања ткива и губитка контрактилне функције. Најчешћи узрочници миокардитиса су вируси, бактерије и паразити, међутим бројни докази указују да ово обољење може бити и аутоимунске природе. Експериментални аутоимунски миокардитис (ЕАМ) представља анимални модел постинфективног миокардитиса и дилатационе кардиомиопатије. Галектин 3 (Gal-3) припада фамилији  $\beta$ -галактозид-везујућих лектина и експримиран је на многим ћелијама имунског система и има важну улогу у регулацији инфламације. Улога Gal-3 је

испитивана у различитим аутоимунским и инфламаторним болестима и показано је да Gal-3 може двојако регулисати имунски одговор, што зависи од више фактора, као што су специфични услови инфламације, врста ткива и ниво експресије овог молекула како у физиолошким тако и у патолошким стањима. Нема података о улози и значају Gal-3 у патогенези ЕАМ код C57BL/6 мишева, који су релативно резистентни на пептидом индуковани ЕАМ.

Да би се утврдило да ли и на који начин делеција гена за Gal-3 утиче на патогенезу ЕАМ коришћени су мишеви чистог соја WT- C57BL/6 и Gal-3КО мишеви. Сви WT и Gal-3КО мишеви имунизовани су МуНС $\alpha_{334-352}$  пептидом 0. и 7. дана. Тежина ЕАМ одређивана је 21-ог дана експеримента, односно приликом жртвовања животиња.

Gal-3КО мишеви су имали значајно већу хипертрофију срца и већи патохистолошки скор у поређењу са WT мишевима 21. дана након имунизације. Gal-3КО мишеви имали су значајно већу инфилтрацију срчаног мишића CD45+ мононуклеарним ћелијама посебно F4/80+ макрофагама и CD3+ Т лимфоцитима, као и већу заступљеност еозинофила у поређењу са WT мишевима. Серумске концентрације Th2 цитокина (IL-4 и IL-33) су биле више у серумима Gal-3КО у поређењу са контролним оболелим WT мишевима. Делеција гена за Gal-3 је индуковала значајно већи инфлукс Th1 и Th2 ћелија у срцу имунизованих Gal-3КО у односу на WT мишеве. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно повећава укупан број F4/80+ ћелија и олакшава алтернативну активацију макрофага у срцу. У оболелом миокарду Gal-3КО мишева регистрована је значајно већа процентуална заступљеност и укупан број: мијелоидних CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> макрофага; и CD11c+ ћелија које продукују IL-13. У миокарду Gal-3КО мишева детектован је већи број IgG позитивних ћелија и већа количина IgG депозита у поређењу са WT мишевима. Делеција гена за Gal-3 повећава број антифибротских ћелија које продукују IL-10 што се манифестује значајно слабијим депоновањем колагена у срцу оболелих мишева.

Делеција гена за Gal-3 повећава оштећење ткива у анималном моделу аутоимунског миокардитиса индукованог апликацијом МуНС $\alpha_{334-352}$  пептида и укида резистенцију C57BL/6 мишева на индукцију болести.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:**

**28.03.2017. г.**

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

1. **Проф. др Миодраг Лукић**, редовни професор - емеритус Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, **председник**;
2. **Доц. др Немања Јовичић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, **члан**;
3. **Проф. др Владимир Трајковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија и имунологија, **члан**.

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

**DT**

Monographic publication

**Type of record:**

**TR**

Textual printed material

**Contents code:**

**CC**

Ph.D. Thesis

**Author:**

**AU**

Marina Miletic-Kovacevic, MD

**Menthor/co-mentor**

**MN**

Prof. Biljana Ljujic, MD, PhD

**Title:**

**TI**

Role of Galectin 3 in the pathogenesis of experimental  
autoimmune myocarditis



**Language of text:** Serbian (Cyrillic)  
**LT**

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication:** Serbia  
**CP**

**Locality of publication:** Serbia  
**LP**

**Publication year:** 2019  
**PY**

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69

**Physical description**  
**PD** Thesis contains 142 pages, 7 chapters, 2 graphs, 3 tables, 8 figures, 10 pictures, and 328 citations

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Medicine  
**SD**

**Subject/key words:** experimental autoimmune myocarditis, galectin 3, type 2  
immune  
response

**SKW**

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, 34000  
Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69

**Note:**

N

**Abstract:**

**AB**

Myocarditis is an inflammatory heart muscle disease characterized by degeneration and necrosis of cardiomyocytes with presence of cellular infiltrates in the interstitium. Myocarditis can be manifested as acute, subacute or chronic myocardial inflammation with focal or diffuse cell infiltrates, it can progress to fibrosis, tissue remodeling and loss of contractile function. The most common causes of myocarditis are viruses, bacteria and parasites, however numerous evidence suggests that this disease can also be autoimmune. Experimental autoimmune myocarditis (EAM) is an animal model of postinfective myocarditis and dilated cardiomyopathy. Galectin 3 (Gal-3), which belongs to the family of  $\beta$ -galactoside-binding lectins is expressed on many cells of the immune system and plays an important role in regulation of inflammation. The role of Gal-3 was studied in various autoimmune and inflammatory diseases and it has been shown that Gal-3 can have a different effect on the immune response. Its role depends on several factors, such as the specific conditions of inflammation, the type of tissue, and the expression level of this molecule in pathological as well as in physiological conditions. There are no precise data on the role and significance of Gal-3 in the pathogenesis of EAM in C57BL/6 mice, which are relatively resistant to EAM-induced by peptide.

Mice of the pure strain WT-C57BL/6 and Gal-3KO mice were used in order to determine whether and how the deletion of the Gal-3 gene affects the EAM pathogenesis. WT and Gal-3KO mice were immunized with the MyHC $\alpha_{334-352}$  peptide on day zero and day seven. Severity of EAM was determined on the 21st day of the experiment, during the sacrifice of animals.

Gal-3KO mice had significantly higher cardiac hypertrophy and higher histopathological score compared to WT mice on the 21st day after immunization. Gal-3KO mice also had a significantly higher infiltration of heart muscle by CD45<sup>+</sup> mononuclear cells, particularly with F4/80<sup>+</sup> macrophages and CD3<sup>+</sup>T lymphocytes, and higher number of eosinophils compared to WT mice.

Serum concentrations of Th2 cytokine (IL-4 and IL-33) were higher in Gal-3KO mice than in control diseased WT mice. The deletion of the Gal-3 gene also induced significantly higher influx Th1 and Th2 cells at the heart of the immunized Gal-3KO compared to WT mice. The absence of gene expression for Gal-3 significantly increases the total number of F4/80+ cells and facilitates alternative macrophage activation in the heart. In myocardium of Gal-3KO mice were significantly higher percentage of distribution and total number of: myeloid CD11b+Ly6C<sup>hi</sup> macrophages and CD11c+ cells producing IL-13. In the myocardium of Gal-3KO mice were detected a higher number of IgG positive cells and a larger amount of IgG deposits compared to WT mice. The deletion of Gal-3 gene increases the number of antifibrotic cells that produce IL-10, which is manifested by significantly less collagen storage in the heart of diseased mice.

Gal-3 gene deletion increases tissue damage in animal model of autoimmune myocarditis induced by application of the MyHC $\alpha_{334-352}$  peptide and eliminates the resistance of C57BL/6 mice to induction of the disease.

**Accepted by the Scientific Board on:**

**ASB**

**Defended on: 28.03.2017.g.**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

1. **Full Professor, Miodrag L. Lukic**, MD, PhD, Professor Emeritus of Kragujevac, University of Kragujevac, **chairman**;
2. **Assistant professor, Nemanja Jovicic**, MD, PhD, Assistant Professor of Histology and Embriology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, **member**;
3. **Associate Professor, Vladimir Trajkovic**, MD, PhD, Associate Professor of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, University of Belgrade, **member**.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Марина Милетић-Ковачевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 27.03.2019. године,

  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Марина Милетић-Ковачевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

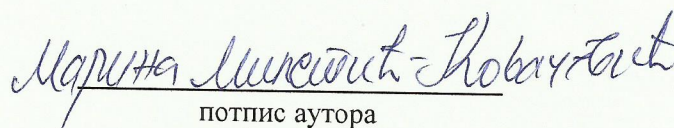
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 27.03.2019. године,

  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

РАДОВИ КОЈИ СУ БИЛИ УСЛОВ ЗА ПРИЈАВУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. **Kovacevic MM**, Pejnovic N, Mitrovic S, Jovicic N, Petrovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, Ljubic B. Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice. *Immunol Res.* 2018; 66(4):491-502. doi: 10.1007/s12026-018-9013-8.
2. M. Peulic, V. Kovacevic, **Marina Miletic Kovacevic**, D. Grujicic. To wait for a spontaneous recovery of the third cranial nerve palsy occurring after the coiling of a PComA aneurysm or to implement surgical treatment? A case report. *Vojnosanitetski preglod*, 2016. doi: 10.2298/VSP160317235P
3. Kovacevic V, Jovanovic N, **Miletic-Kovacevic M**, Nikolic R, Peulic M, Rotim K, Sajko T, Rasulic L. Standard discectomy versus microdiscectomy, differences in clinical outcome and disc reherniation rate. *Acta clinica Croatica* 2017; 56(3):391-398. doi: 10.20471/acc.2017.56.03.05.
4. Tanaskovic-Stankovic S, Tanaskovic I, Jovicic N, **Miletic-Kovacevic M**, Kanjevac T, Milosavljevic Z. The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2018; 162(2):149-153. doi: 10.5507/bp.2018.017.
5. Ilija Jeftic\*, **Marina Miletic Kovacevic\***, Nemanja Jovicic, Jelena Pantic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag M. Lukic, Nada Pejnovic; Galectin-3 deletion enhances visceral adipose tissue inflammation and dysregulates glucose metabolism in mice on a high-fat diet; *Serb J Exp Clin Res* 2016; 17 (3):231-239 (\* први аутори – contributed equally)
6. Nemanja Jovicic, Ilija Jeftic, **Marina Miletic Kovacevic**, Irena Tanaskovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag M. Lukic, Nada Pejnovic; ST2 Deficiency Ameliorates High Fat Diet-Induced Liver Steatosis in BALB/c mice; *Serb J Exp Clin Res* 2015; 16:9-20.

7. Marko Petrovic, **Marina Miletic Kovacevic**, Nemanja Jovanovic, Radivoje Nikolic, Savo Raicevic, Vojin Kovacevic; TANYCYTIC EPENDYMOMA OF THE FILUM TERMINALE REGION; A CASE REPORT; Serb J Exp Clin Res 2017; 19:277-280.



*Galectin-3 deficiency enhances type 2  
immune cell-mediated myocarditis in mice*

**Marina Miletic Kovacevic, Nada  
Pejnovic, Slobodanka Mitrovic,  
Nemanja Jovicic, Ivica Petrovic, Nebojsa  
Arsenijevic, et al.**

**Immunologic Research**

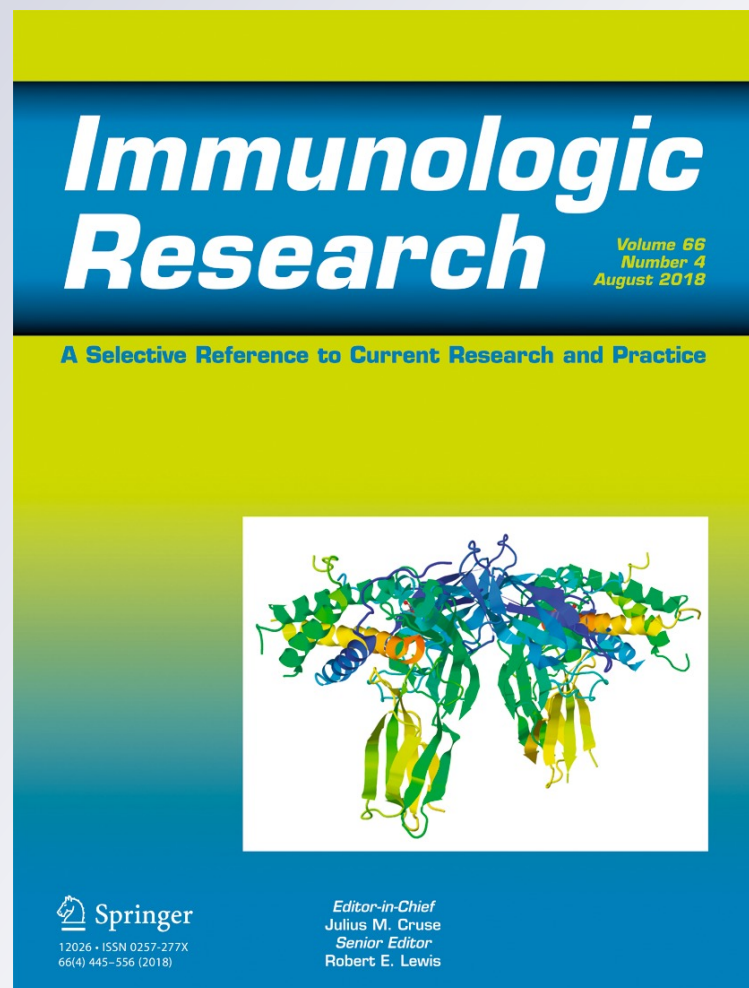
ISSN 0257-277X

Volume 66

Number 4

Immunol Res (2018) 66:491-502


DOI 10.1007/s12026-018-9013-8



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice

Marina Miletic Kovacevic<sup>1</sup> · Nada Pejnovic<sup>2,3</sup> · Slobodanka Mitrovic<sup>4</sup> · Nemanja Jovicic<sup>1,2</sup> · Ivica Petrovic<sup>3</sup> · Nebojsa Arsenijevic<sup>2</sup> · Miodrag L. Lukic<sup>2</sup>  · Biljana Ljubic<sup>2,5</sup>

Published online: 11 August 2018

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Experimental autoimmune myocarditis (EAM) is a mouse model of immune-mediated myocarditis and cardiomyopathy. The role of Galectin-3 (Gal-3), a  $\beta$ -galactoside-binding lectin, in autoimmune myocarditis has not been studied. Therefore, the aim of this study was to delineate the role of Gal-3 in myosin peptide-induced autoimmune myocarditis in mice. EAM was induced in relatively resistant C57BL/6J mice (wild type, WT) and in mice with a targeted deletion of Gal-3 gene (Gal-3KO) by immunization with myosin peptide MyHC $\alpha_{334-352}$ . Gal-3KO mice developed more severe myocarditis and more pronounced heart hypertrophy than WT mice. Increased infiltration of CD45<sup>+</sup> leucocytes, CD3<sup>+</sup> T cells, F4/80<sup>+</sup> macrophages, and eosinophils was observed in hearts of Gal-3KO mice compared to WT mice on day 21 after EAM induction. Moreover, hearts of Gal-3KO mice had more T helper type 2 (Th2) cells, alternatively activated M2 macrophages, higher amounts of IgG deposits, and higher serum levels of IL-4 and IL-33 than WT mice. Ablation of Gal-3 in Th1-dominant C57BL/6J mice that are relatively resistant to EAM resulted in more severe disease characterized by type 2 cardiac inflammation. The complex effects of Gal-3 on EAM progression might be important in the consideration of therapeutic options for the treatment of EAM.

**Keywords** Experimental autoimmune myocarditis · Galectin-3 · Type 2 immune response

## Introduction

Myocarditis represents progressive organ-specific autoimmune disease of the myocardium with clinical presentations ranging from asymptomatic disease to a fatal outcome [1, 2].

Marina Miletic Kovacevic and Nada Pejnovic contributed equally to this work.

✉ Miodrag L. Lukic  
miodrag.lukic@medf.kg.ac.rs

<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Department of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup> Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Myocarditis is characterized by a cellular infiltrate in the myocardium, and degeneration and necrosis of myocytes. Although infectious pathogens including viruses and bacterial infections are important etiological agents of myocarditis, genetic predisposition and autoimmune mechanisms cause pathogenic heart injury [3]. In viral myocarditis, disease develops through an early phase of cardiac inflammation, the second phase of autoimmune inflammation, and the third, chronic phase which is characterized by dilated cardiomyopathy [4]. The dominant autoantigen most often associated with autoimmune myocarditis is cardiac myosin [5] and the disease is mediated by autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells and anti-cardiac autoantibodies [6, 7]. The relative contribution of Th1, Th2, and Th17 cells in the pathogenesis of this disease is still unclear [8–10]. Immunosuppressive therapy was not effective in patients with myocarditis, the findings that point to a complex nature of the disease [11].

Experimental autoimmune myocarditis (EAM) is a mouse model of immune-mediated myocarditis and cardiomyopathy [10]. Immunization with cardiac myosin (CM) and cardiac myosin peptides has been utilized to induce EAM in animals. The susceptibility to EAM is genetically determined and

differs among rodent strains. A/J and BALB/c mice are susceptible to EAM [9], whereas C57BL/6 mice are relatively resistant [11]. In A/J mice, EAM can be induced by immunization with CM peptide 334–352, CM peptide 1074–1646, and whole CM [9, 12], in BALB/c mice with CM peptide 614 to 629 or with whole myosin [13, 14], whereas in C57BL/6 mice with whole CM or myosin peptide 334–352 [2, 15]. The development of EAM in particular mouse strain or individual may be related to Th1 or a Th2 cytokine profile [11]. C57BL/6 mice preferentially develop Th1 immune response and BALB/c mice Th2-type response, and they represent prototypic Th1- and Th2-type mouse strains [16, 17]. In A/J and BALB/c mice, EAM exhibits Th2 phenotype, as demonstrated by the presence of eosinophils in the heart lesions and by the humoral response with upregulation of IgG1 and total IgE with the critical role of IL-4 in disease progression [9, 18]. Among mouse strains, C57BL/6 mice showed the lowest susceptibility to Coxsackievirus B3-induced autoimmune myocarditis [19]. It has been also reported that this strain is resistant to myosin-induced myocarditis [11]. However, Okabe et al. reported induction of EAM in C57BL/6 mice immunized with porcine CM [15] and Lv et al. [2] evoked EAM in C57BL/6 mice by using mouse CM or cardiac troponine I. Also, Gangaplara et al. [20] reported that C57BL/6 male mice immunized with myosin peptide 334–352 developed myocarditis accompanied with higher frequencies of IL-17A and IL-22 producing Th17 cells.

Gal-3 is a galactosidase-binding lectin and has multiple functions depending on its location. Extracellular Gal-3 can trigger mediator release of apoptosis, while intracellular Gal-3 inhibits apoptosis and regulates the cell cycle. Gal-3 is widely distributed in a number of cell types including cells of innate and adaptive immune responses, constitutively, or induced by various inflammatory stimuli [21, 22]. This multifunctional lectin promotes or suppresses inflammation depending on the nature of the pathophysiological process and tissues/organs involved. Numerous studies suggest the pro-inflammatory role of Gal-3 through its effects on cell activation, cell migration, or inhibition of apoptosis [23]. Recent report demonstrated that Gal-3 released by microglia acts as an endogenous ligand and induces TLR4-mediated cell activation and that depletion of Gal-3 exerted neuroprotective and anti-inflammatory effects in LPS-induced inflammation [24]. However, reported data also show exacerbation of inflammation and microglial activation in the absence of Gal-3 in the model of amyotrophic lateral sclerosis [25]. Thus, Gal-3 may attenuate or enhance the development of inflammation, depending on which immune mechanisms predominate in each disease [26].

Gal-3 has an important role in cardiovascular diseases [27]. Elevated serum levels of Gal-3 in patients with acute and chronic heart failure have been reported to be predictive of

disease outcome [28]. In experimental model of viral myocarditis, it has been shown that Gal-3 produced by macrophages in heart lesions promoted cardiac inflammation [29]. Thus, Gal-3 could be a potential therapeutic target for the treatment of various cardiovascular diseases.

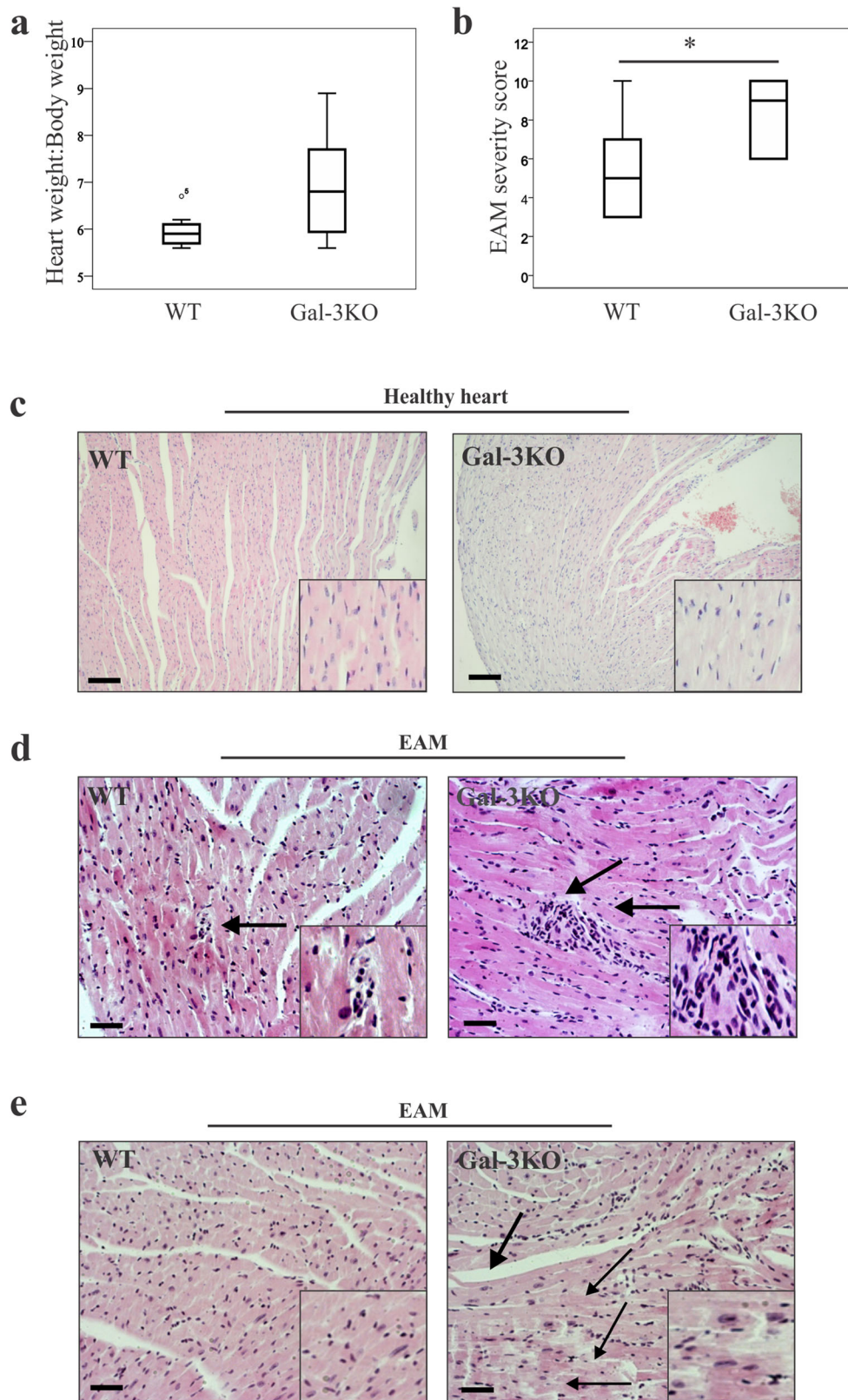
The role of Gal-3 in EAM has not been studied. It is a given fact that C57BL/6 mice are relatively resistant to cardiac peptide-induced EAM which it was of interest to explore their susceptibility to EAM in the absence of Gal-3. In this study, we investigated whether the disruption of the Gal-3 gene in C57BL/6J mice would affect the development of MyHC- $\alpha_{334-352}$  peptide-induced EAM. Our results demonstrate that depletion of Gal-3 enhanced the severity of EAM by facilitating type 2 myocardial inflammation.

## Materials and methods

### Experimental animals

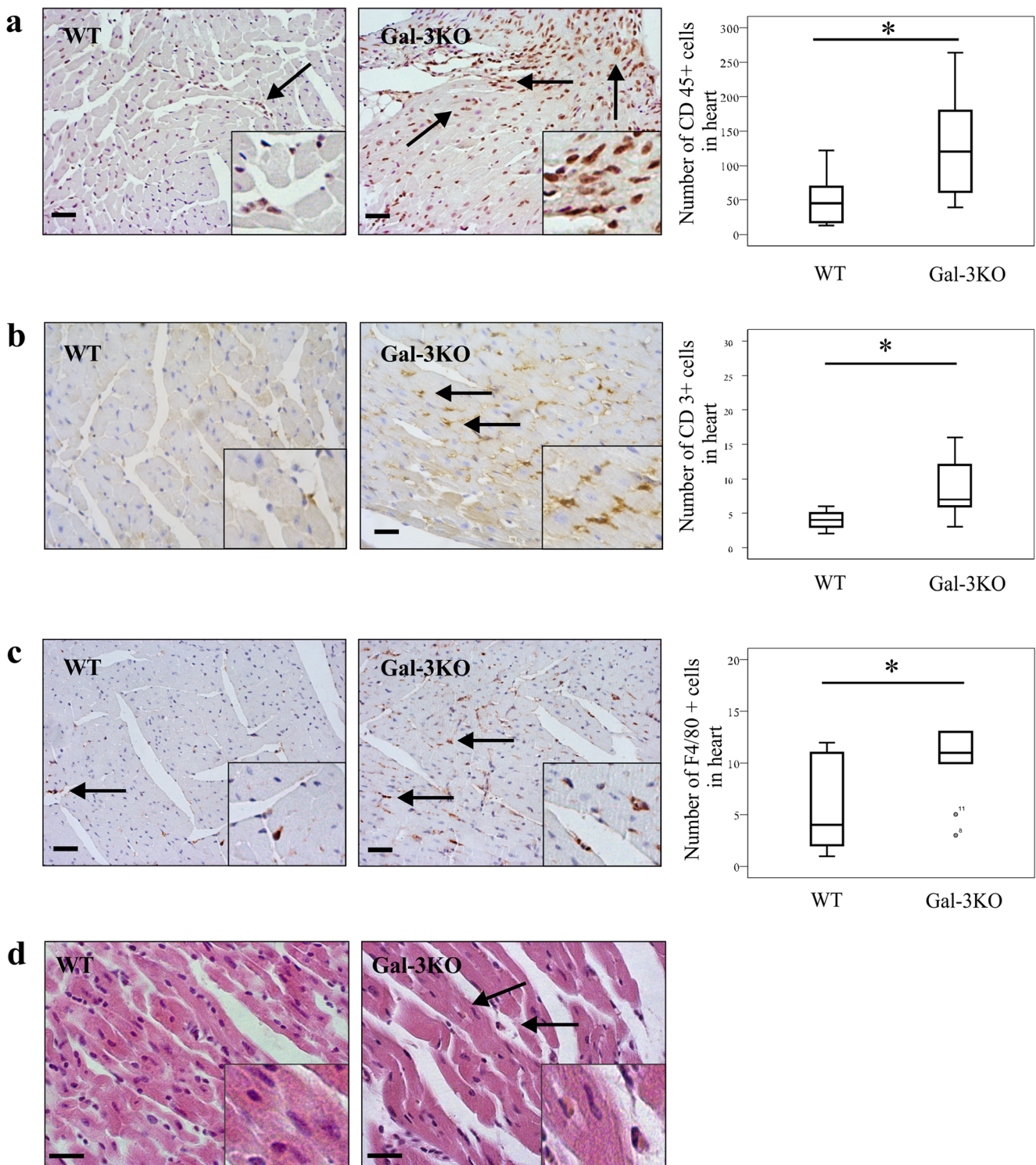
Eight-week-old male Gal-3-deficient mice on the C57BL/6J background (Gal-3KO) and their littermate controls, wild-type (WT) C57BL/6J mice, were obtained from the University of California Davis (Davis, CA; by courtesy of D.K.Hsu and F.T.Liu). Targeted disruption of mouse Gal-3 gene was performed in C57BL/6J embryonic stem cells, and mice homozygous for disrupted gene were obtained [30]. Breeding pairs of Gal-3KO and WT C57BL/6 mice were maintained in animal facilities of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. The genotypes of WT and Gal-3KO mice were confirmed by PCR. Mice were housed under standard laboratory conditions. All animal experiments were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,

**Fig. 1** Gal-3 deletion enhances myocardial hypertrophy and inflammation as evaluated by increased number of inflammatory cells, and level of degeneration and necrosis in EAM. **a.** Gal-3KO mice have significantly higher heart vs. body weight ratios compared to WT mice on day 21 after EAM induction. **b.** Gal-3KO mice have a significantly higher EAM severity score which included the degree of heart infiltration, degeneration, and necrosis compared to WT mice. **c.** Images of H&E staining of paraffin-embedded normal heart tissue sections (original magnification  $\times 200$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). **d.** Images of H&E staining of paraffin-embedded heart tissue sections (original magnification  $\times 200$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). Increased infiltration of mononuclear cells in hearts of Gal-3KO mice than in WT mice (arrows). **e.** Images of H&E staining of paraffin-embedded heart tissue sections (original magnification  $\times 200$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). The interstitial space was enlarged (thick arrows). Gal-3KO mice exhibited signs of increased degeneration and necrosis with cardiac muscle fibers without nuclei and with the loss of transverse stratification (thin arrows). Combined results of three experiments ( $n = 9$  mice/group). Data are shown as a median (middle line of the box) and percentiles 25 and 75 (inferior and superior borders of the box), 5 and 95 (vertical lines outside the box),  $*P < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$  test



Serbia (01-2630). The animal experiments were performed conform the guidelines from Directive 2010/63/EU of the

European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.



**Fig. 2** Gal-3 deletion enhances infiltration of T cells and eosinophils in the hearts of cardiac peptide-immunized mice. **a.** More numerous CD45<sup>+</sup> leukocytes in hearts of Gal-3KO mice compared to WT mice (right panel); images of CD45<sup>+</sup> cells (arrows) in hearts of WT and Gal-3KO mice (left panel). **b.** Gal-3KO mice have significantly higher number of heart-infiltrating CD3<sup>+</sup> T cells than WT mice (right panel); images of CD3<sup>+</sup> cells (arrows) in hearts of WT and Gal-3KO mice (left panel). **c.** Increased number of heart-infiltrating F4/80<sup>+</sup> macrophages in Gal-3KO mice compared to WT mice (right panel); images of F4/80<sup>+</sup> macrophages (arrows) in hearts of WT and Gal-3KO mice (left panel). **d.** Immunostaining of

CD45, CD3, and F4/80 on paraffin-embedded heart sections from WT and Gal-3KO mice (original magnification  $\times 200$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). **e.** Increased influx of eosinophils (arrows) in the hearts of Gal-3KO mice during EAM; images of H&E staining of paraffin-embedded heart tissue sections (original magnification  $\times 400$ , scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ). The results of three experiments ( $n = 9$  mice/group). Data are shown as a median (middle line of the box) and percentiles 25 and 75 (inferior and superior borders of the box), 5 and 95 (vertical lines outside the box),  $*P < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$  test

## Induction of EAM

EAM was induced by subcutaneous administration of 200  $\mu$ L suspension at two sites over the hind flanks. The suspension consisted of 100  $\mu$ g myocarditogenic peptide (MyHC $\alpha_{334-352}$ , Shanghai ShineGene Molecular Biotech) in 100  $\mu$ L of PBS, emulsified with 100  $\mu$ L complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich, Germany) with 0.5 mg heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37 RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). Each mouse was immediately, thereafter, injected intraperitoneally and 48 h later with 200 ng pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, USA) in 100  $\mu$ L 0.9% NaCl. Mice were sacrificed on day 21 following immunization and hearts and blood were collected for further analyses [8].

## Histological assessment of EAM

Mouse hearts were removed and fixed in 10% buffered formalin fixative overnight. Paraffin wax-embedded hearts (5  $\mu$ m), from nine mice per group, were cut from base to apex and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For evaluating the severity of EAM, histology scoring system was used [31] and microscopy was performed in blinded fashion by two investigators (S.M. and M.M.K.). Localization of the inflammatory infiltration was quantified as described: 0-disease free; 1-apex; 2-lateral wall; 3-septum. To assess the intensity of inflammatory infiltration, the following score was used: 0-no infiltrates in the visual field; 1-less than 5 individual mononuclear cells in contact with the sarcolemma in the visual field; 2–5–20 single mononuclear cells in contact with the sarcolemma in the visual field; 3-more than 20 individual mononuclear cells in contact with the sarcolemma in the visual field. Evaluation of the degree of degeneration and necrosis of cardiomyocytes was quantified using the following score: grade 0-no disease; grade 1-< 10% of the observed field; grade 2–11–30% of the observed field; grade 3–31–50% of the observed field; grade 4–51–90% of the observed field; grade 5-> 91% of the observed field. The images were captured with a light microscope (Olympus) equipped with a digital camera. Score is calculated for each of the tissue clip and compared with a control.

## Detection of IgG deposits by confocal fluorescence immunocytochemistry

The detection of IgG deposits and IgG-positive cells in the hearts was performed by immunofluorescence. Hearts were isolated from Gal-3KO mice and WT mice and immediately frozen. Sections (5  $\mu$ m) were cut on a cryostat, fixed in acetone, and washed in PBS (phosphate buffered saline) two times and blocked with 1% BSA in PBS for 15 min. Diluted goat anti-mouse IgG (FITC)-labeled antibodies (ab7064,

Abcam, Cambridge, UK) were incubated 1 h at room temperature in a humid chamber. The presence of IgG deposits and IgG-positive cells was determined by observation on a confocal laser microscope (Axiovert 200M, LSM 510 Laser Module, Zeiss, magnification  $\times$  630). The fluorescence intensity of stained heart tissue sections from each animal (five mice per group) was calculated using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD), and expressed as mean value of the fluorescence intensity.

## Immunohistochemical analysis of heart-infiltrated mononuclear cells

For the immunohistochemical staining, we used paraffin-embedded heart sections (5  $\mu$ m). Deparaffinized tissue sections were incubated with primary rabbit anti-CD45 (ab10558, Abcam, Cambridge, UK), primary rat anti-F4/80 (ab15694, Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal CD3 (PC3/188A: sc-20047, Santa Cruz Biotechnology), and rabbit anti-rat IgG (ab6703, Abcam, Cambridge, UK) followed by visualization using HRP/DAB detection IHC Kit (ab64259, Abcam) and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Sections were photomicrographed with a digital camera mounted on a light microscope (Olympus BX51, Japan), digitized, and analyzed. Analysis was performed on 10 fields/section (magnification  $\times$  200). Results are presented as mean number of positive cells per field.

## Flow cytometric analysis of heart-infiltrated mononuclear cells

Cells were labeled with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: CD45, CD3, CD4, CD8, CD11c, F4/80, CD206, or isotype-matched controls (BD; eBioscience; BioLegend, San Diego, CA, USA). For flow cytometric analysis of intracellular cytokines, cells were activated with PMA (50 ng/ml)/ionomycin (500 ng/ml) (Sigma-Aldrich) with Golgi Stop (BD Bioscience) for 4 h and stained with fluorochrome-labeled anti-mouse mAb specific for IL-4, IL-13, IL-33, and IFN- $\gamma$ . Cells were acquired using FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyses performed using FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## Serum cytokine levels

Serum levels of IL-4, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

## Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using SPSS version 22.0. Statistical significance was determined by *t* test and, where appropriate, by Mann-Whitney *U* test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM or as median (25th, 75th percentiles) and  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Gal-3 deletion enhances the severity of Myhca<sub>334–352</sub>-induced myocarditis in C57BL/6J mice

WT and Gal-3KO mice were immunized with Myhca<sub>334–352</sub>, sacrificed on day 21 and hearts removed for the evaluation of EAM severity. Cardiac hypertrophy, as assessed by the ratio of heart weight to body weight, was significantly higher in Gal-3KO mice compared to WT mice (Fig. 1a,  $P < 0.05$ ). EAM histology score, which included the degree of inflammatory infiltration, and the degree of cardiac muscle degeneration and necrosis, was markedly higher in Gal-3KO compared to WT mice (Fig. 1b,  $P < 0.05$ ). Figure 1c shows that deletion of Gal-3 did not affect the structure of the heart muscle tissue.

The hearts of Gal-3KO mice after immunization showed more pronounced inflammatory foci, cardiac muscle degeneration, and necrosis (Fig. 1d, right vs left panel). WT mice exhibited very mild cardiac muscle degeneration (Fig. 1e, left panel). Heart muscle fibers of Gal-3KO mice exhibited clear signs of hypertrophy with partial irregular distribution. Muscle cell nuclei were hypertrophic or vesicular, an indication of muscle cell necrosis. The interstitial space was enlarged and hypercellular, mainly due to the increased infiltration of mononuclear cells. Cardiac muscle fibers of Gal-3KO mice exhibited signs of degeneration and necrosis, as shown by muscular fibers that were without nuclei and interrupted with the loss of transverse stratification (Fig. 1e, right panel). These pathological changes were minimal in the hearts of WT mice.

### Increased infiltration of CD45<sup>+</sup> leucocytes, CD3<sup>+</sup> T cells, F4/80<sup>+</sup> macrophages, and eosinophils in hearts of Gal-3-deficient mice with EAM

We next investigated the composition of the mononuclear cell infiltrate on the longitudinal cross sections of the heart tissue using immunohistochemistry. In comparison to WT mice, Gal-3KO mice had significantly higher numbers of CD45<sup>+</sup> leucocytes in their hearts after EAM induction (Fig. 2a,  $P < 0.05$ ). Similarly, CD3<sup>+</sup> T cells were

significantly more numerous in the heart tissue of Gal-3KO mice during EAM (Fig. 2b,  $P < 0.05$ ). Figure 2c shows the increased presence of F4/80<sup>+</sup> macrophages in the hearts of Gal-3KO mice than in WT ( $P < 0.05$ ).

Furthermore, hearts of Gal-3KO mice contained scattered eosinophils which could not be detected in the hearts of WT mice. Heart-infiltrated eosinophils in Gal-3KO mice had red stained granules and a donut-shaped nucleus, typical characteristics of mouse eosinophils as shown in Fig. 2d.

### Gal-3 deficiency enhances the number of heart-infiltrating Th2 cells in EAM

We next analyzed the phenotype of heart-infiltrating T cells by flow cytometry in Gal-3KO and WT mice. We found higher total number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the hearts of Gal-3KO mice compared to WT mice (Fig. 3a, right graph,  $P < 0.05$ ), whereas the frequencies of CD4<sup>+</sup> lymphocytes did not differ between two genotypes of mice (Fig. 3a, left graph). There was no difference in the percentage and number of CD8<sup>+</sup> cells between groups of mice as shown in Fig. 3b.

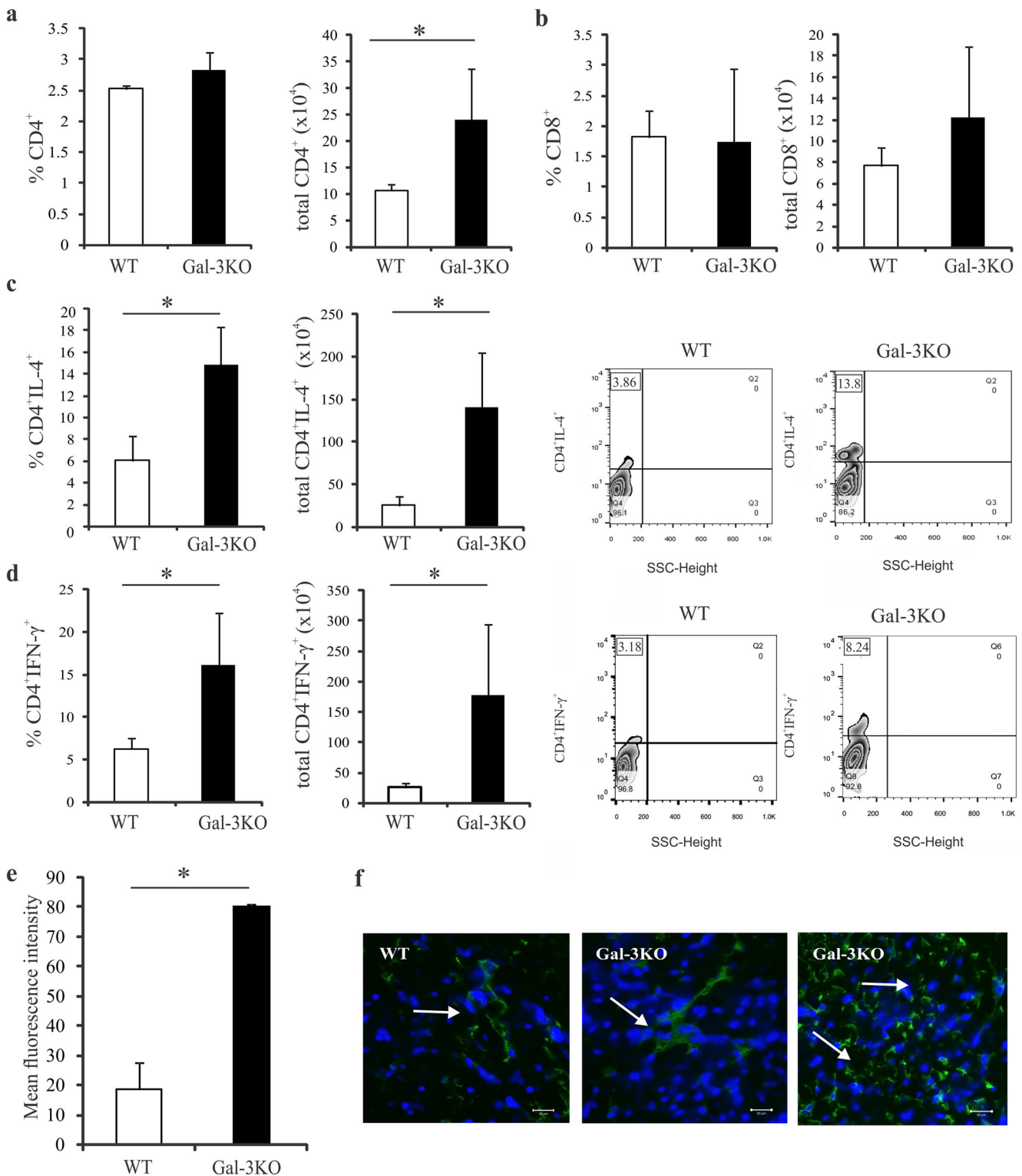
We next determined intracellular cytokine profiles of heart-infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells. The percentage and total number of IL-4-expressing CD4<sup>+</sup> cells (Th2 cells) were significantly higher in Gal-3KO mice than in WT mice (Fig. 3c, both  $P < 0.05$ ). Similarly, hearts of Gal-3KO mice contained significantly higher percentage and total number of IFN- $\gamma$ -expressing CD4<sup>+</sup> cells (Th1 cells) (Fig. 3d, both  $P < 0.05$ ). Based on the obtained results of increased number of IL-4-producing Th2 cells and IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells in Gal-3KO mice during EAM, which are involved in strong antibody production, we next looked for the IgG deposits in the hearts.

We showed that Gal-3 deficiency resulted in increased amount of IgG deposits and more numerous IgG-positive cells in the hearts during EAM as shown in Fig. 3e ( $P < 0.05$ ). Figure 3f shows images of scarce IgG deposits in WT mice (left panel), large amount of IgG deposits along the Gal-3KO cardiomyocytes (middle panel), and IgG-positive cells (right panel) in the hearts of Gal-3KO mice.

### Gal-3 deletion favors polarization of alternative activated macrophages and increased influx of IL-13<sup>+</sup> dendritic cells in hearts of Myhca<sub>334–352</sub>-immunized C57BL/6J mice

Based on the obtained results of increased presence of Th2 and Th1 cells in the hearts of Gal-3KO mice, we sought to determine the percentage and absolute number of M1 and M2 macrophages in their hearts during EAM.





**Fig. 3** Gal-3 deletion increased the influx of CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> cells and amount of IgG deposits in the hearts following immunization with Myhα<sub>334–352</sub>. **a**. Percentage and total number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in WT and Gal-3KO mice during EAM. **b**. Percentage and total number of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in WT and Gal-3KO mice during EAM. **c**. Percentage and total number of IL-4-expressing CD4<sup>+</sup> lymphocytes in WT and Gal-3KO mice during EAM representative dotplots of heart-infiltrating CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> cells in WT and Gal-3KO mice (right panel). **d**. Percentage and total number of CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> Th1 cells in WT and Gal-3KO mice. Representative dotplots of heart-infiltrating

CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> cells in WT and Gal-3KO mice (right panel). **e**. Quantification of amount of IgG deposits and IgG-positive cells by mean fluorescence intensity in hearts of WT and Gal-3KO mice. **f**. Immunofluorescence images of IgG deposits and IgG-positive cells (arrows) in the hearts of WT and Gal-3KO mice. IgG deposits and IgG-positive cells is seen along the cardiomyocytes in the hearts of Gal-3KO mice. There was less IgG deposits and IgG-positive cells in the heart of WT mice (magnification × 630 scale bar = 20 μm). Combined results of three experiments (n = 9 mice/group), presented as mean ± s.e.m., \*P < 0.05, Student's *t* test

The percentage of F4/80<sup>+</sup> macrophages did not differ between two groups of mice, whereas total number of F4/80<sup>+</sup> macrophages in the hearts was significantly higher in Gal-3KO mice than in WT mice (Fig. 4a,  $P < 0.05$ ). Percentage and the total number of M1 macrophages did not differ between Gal-3KO and WT mice during EAM (data not shown). Total number of M2 macrophages (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) was significantly higher in Gal-3KO compared to WT mice (Fig. 4b,  $P < 0.05$ ). In addition, total number of heart-infiltrating IL-13-expressing F4/80<sup>+</sup> M2 macrophages was significantly higher in Gal-3KO compared to WT mice (Fig. 4c,  $P < 0.05$ ). Similarly, in comparison to WT mice, total number of IL-33-expressing F4/80<sup>+</sup> macrophages (Fig. 4d,  $P < 0.05$ ) was significantly higher in the hearts of Gal-3KO mice.

The frequency and total number of dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) were significantly higher in the hearts of Gal-3KO mice than in WT mice during EAM (Fig. 4e, both  $P < 0.05$ ). Furthermore, we show significantly higher percentage and total number IL-13-expressing CD11c<sup>+</sup> cells in Gal-3KO hearts (Fig. 4f, both  $P < 0.05$ ).

### Gal-3 deletion increases serum levels of IL-4 and IL-33 in Myhca<sub>334–352</sub>-immunized C57BL/6J mice

We next examined the levels of IL-4, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 in the sera of WT and Gal-3KO mice on day 21 after EAM induction. Immunization with Myhca<sub>334–352</sub> induced significant increase of serum levels of IL-4 in Gal-3KO mice compared to WT mice (Fig. 5a,  $P < 0.05$ ). Gal-3KO mice had significantly higher levels of IL-33 in their sera in comparison to WT mice (Fig. 5b,  $P < 0.05$ ). Serum levels of IFN- $\gamma$  (Fig. 5c) and IL-10 (Fig. 5d) and TNF- $\alpha$  (data not shown) did not differ between Gal-3KO and WT mice.

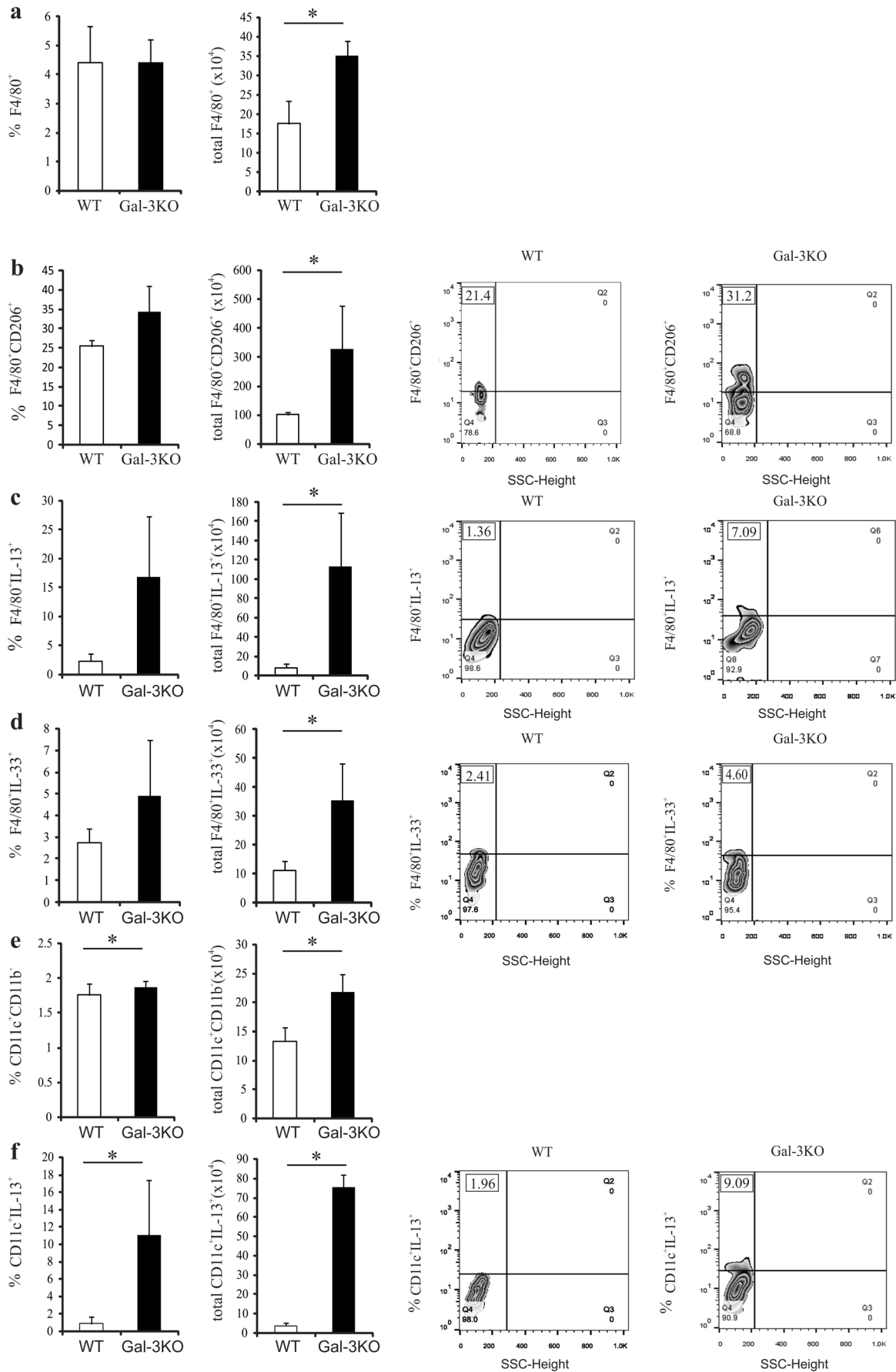
## Discussion

The hallmarks of EAM are the presence of inflammatory infiltrates consisting of T cells and macrophages, autoantibodies to cardiac antigens, degeneration and necrosis of cardiomyocytes, and dilated cardiomyopathy [32]. C57BL/6J mice develop only very mild disease after challenge with CM or peptide with immunodominant epitopes. In this study, we demonstrated that deletion of Gal-3 in C57BL/6J mice enhances Th2-type inflammation and also the presence of Th1 cells in their hearts during EAM compared to WT mice. These results clearly demonstrate that ablation of Gal-3 resulted in increased severity of Myhca<sub>334–352</sub>-induced autoimmune myocarditis in C57BL/6J mice.

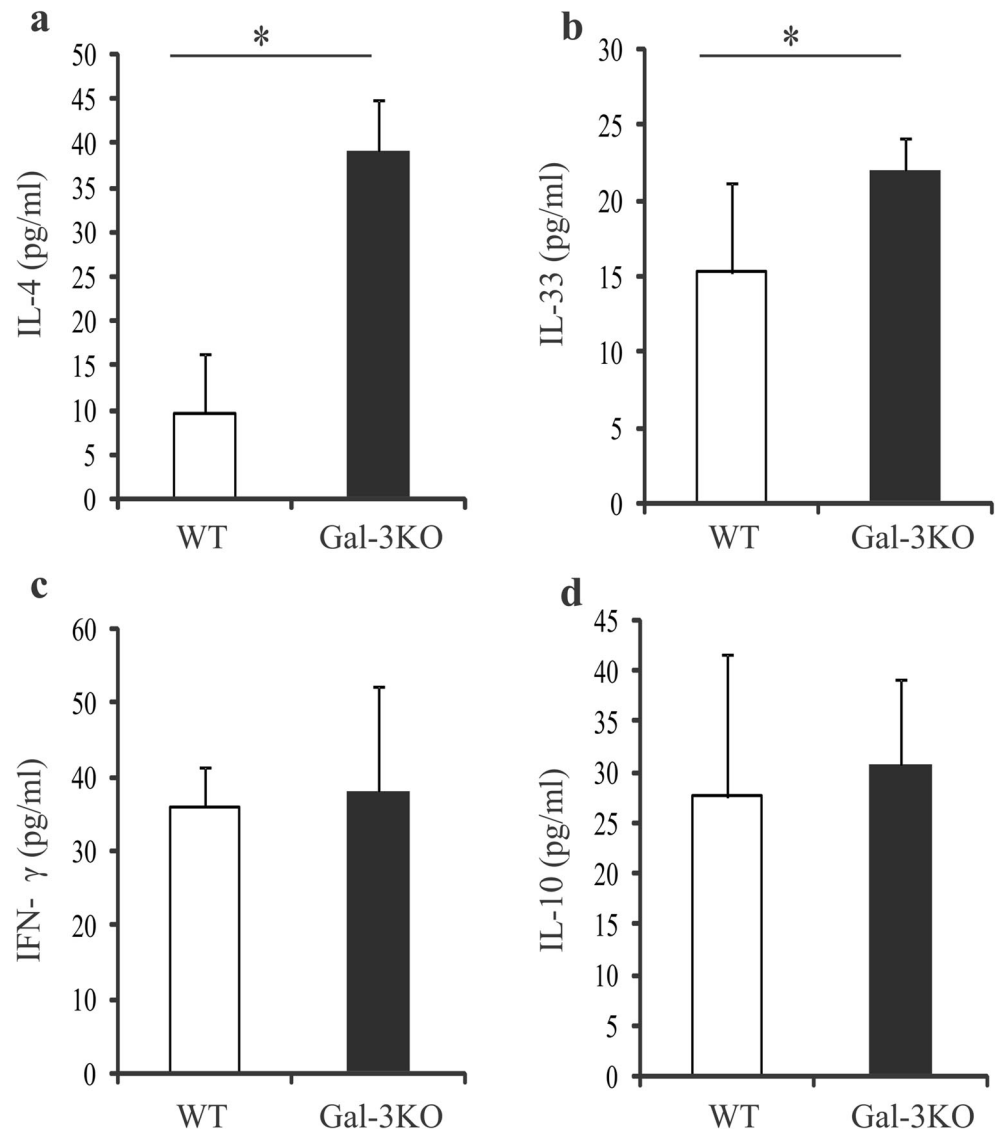
We show that Gal-3KO mice had more numerous T cells, macrophages (Fig. 2a–c), and eosinophils (Fig. 2d) in their hearts on day 21 of EAM. Moreover, hearts of Gal-3KO mice had increased number of both IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 3c, d). Here, elevated IL-4 and IL-33 serum levels were found in Gal-3KO mice (Fig. 5a, b), the findings that indicate the association of Th2 phenotype with more severe inflammation in the absence of Gal-3. In addition, we found increased IgG deposits and IgG-positive cells in the hearts of Gal-3KO mice (Fig. 3e–f), which may cause damage of cardiomyocytes by triggering antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity [33]. Th1, Th2, or Th17 cells have important roles in the pathogenesis of EAM which predominance is dependent on mouse strain [34]. Th2 cytokine IL-4 was shown to be a critical mediator of severe EAM in A/J mice [9] and the absence of IFN- $\gamma$  aggravated the severity of the Th2-mediated autoimmune myocarditis in BALB/c mice [35]. Recent study showed that eosinophils were the major IL-4-expressing cell type in the heart during EAM that cause severe EAM and drove progression to dilated cardiomyopathy in BALB/c mice [18]. IL-4 may also enhance the severity of EAM through activation of B cells and increased production of IgG antibodies [36]. Th17 cells and IL-17A have been shown to have crucial roles in postmyocarditis cardiac remodeling and dilated cardiomyopathy [37].

In mice, Gal-3 is being upregulated after activation of T and B cells [22, 38]. Our findings of increased presence of Th2 and Th1 cells in the hearts and increased IgG deposits in hearts of Gal-3-deficient mice are in line with the evidence that intracellular Gal-3 negatively regulates TCR-mediated CD4 T cell activation at immunological synapses resulting in enhanced production of IFN- $\gamma$  and IL-4 after T cell receptor engagement [39]. Intracellular Gal-3 inhibits plasma cell differentiation [40, 41] and lack of Gal-3 favors antigen-specific

**Fig. 4** Gal-3 deletion favors alternative activation of macrophages in the hearts of Myhca<sub>334–352</sub>-immunized C57BL/6J mice. **a.** Percentage and total number of F4/80<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice during EAM. **b.** Percentage and total number of F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice during EAM representative dotplots of heart-infiltrating F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice (right panel). **c.** Percentage and total number of F4/80<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice during EAM representative dotplots of heart-infiltrating F4/80<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice (right panel). **d.** Percentage and total number of F4/80<sup>+</sup>IL-33<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice during EAM representative dotplots of heart-infiltrating F4/80<sup>+</sup>IL-33<sup>+</sup> macrophages in WT and Gal-3KO mice (right panel). **e.** Percentage and total number of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> dendritic cells in WT and Gal-3KO mice during EAM. **f.** Percentage and total number of CD11c<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> dendritic cells in WT and Gal-3KO mice during EAM representative dotplots of heart-infiltrating CD11c<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> dendritic cells in WT and Gal-3KO mice (right panel). Combined results of three experiments ( $n = 9$  mice/group), presented as mean  $\pm$  s.e.m., \* $P < 0.05$ , Student's  $t$  test



**Fig. 5** Gal-3 deletion increases serum levels of IL-4 and IL-33 in Myhc $\alpha_{334-352}$ -immunized C57BL/6J mice. **a.** Serum levels of IL-4 were significantly higher in Gal-3KO mice compared to WT mice. **b.** Serum levels of IL-33 were significantly higher in Gal-3KO mice compared to WT mice. **c.** Serum levels of IFN- $\gamma$  did not differ between WT and Gal-3KO mice. **d.** Serum level of IL-10 did not differ between WT and Gal-3KO mice. Combined results of three experiments ( $n = 9$  mice/group), presented as mean  $\pm$  s.e.m., \* $P < 0.05$ , Student's  $t$  test



antibody production [42]. More pronounced myocardial damage in Gal-3KO mice was accompanied with more numerous alternatively activated M2 macrophages in the hearts than WT animals (Fig. 4b, c). Similarly, reported data show the link between predominance of alternatively activated M2 macrophages in the hearts and the severity of EAM [13, 43]. Gal-3KO mice had also higher percentage and number of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells (Fig. 4e) and type 2 dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup>) in their hearts (Fig. 4f). Ericsson et al. demonstrated the key role for dendritic cells in the EAM induction, as cardiac dendritic cells loaded with cardiac antigens induced autoimmune myocarditis and infiltration of CD4<sup>+</sup> T cells in myocardium [7]. Further, Bellinghausen et al. reported the key role of IL-13 produced by human dendritic cells in the production of Th2 cytokines [44].

## Conclusion

Our study indicates that deletion of Gal-3 enhanced severity of myosin peptide MyHC $\alpha_{334-352}$ -induced EAM in C57BL/6J mice enhancing pathogenic Th2-type inflammation in their hearts.

**Acknowledgements** We thank our colleagues Prof. Marija Milovanovic (University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research), Prof. Zoran Milosavljevic (University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Histology and embryology), Ilija Jeftic (University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathophysiology), Petar Milosavljevic (Institute for medical research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia), and Vesna Matovic for collegial help. We also thank Miljan Nedeljkovic for excellent technical assistance.

**Sources of funding** This work was financially supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (ON175103 and ON17506), Serbia and Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia (Grant No. MP 01/14), and Swiss Science Foundation, No. SCOPES, IZ73ZO\_152407/1.

The research was performed at Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All animal experiments were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia (01-2630). The animal experiments were performed conform the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

## References

- Brown CA, O'Connell JB. Myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med.* 1995;99(3):309–14.
- Lv H, Havari E, Pinto S, Gottumukkala RVSrk, Cornivelli L, Raddassi K, et al. Impaired thymic tolerance to  $\alpha$ -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1561–73.
- Cihakova D, Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol.* 2008;99:95–114.
- Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun.* 2001;16(3):175–86.
- Caforio AL, Goldman JH, Haven AJ, Baig KM, McKenna WJ. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Int J Cardiol.* 1996;54(2):157–63.
- Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, Strauer BE, Schultheiss HP. Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(1):11–8.
- Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires co-operation between adaptive and innate immunity. *Nat Med.* 2003;9(12):1484–90.
- Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Stafford EA, Dohmen KM, Sadighi Akha AA, et al. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway. *Circulation.* 2001;104(25):3145–51.
- Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, et al. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *Am J Pathol.* 2001;159(1):193–203.
- Cihakova D, Sharma RB, Fairweather D, Afanasyeva M, Rose NR. Animal models for autoimmune myocarditis and autoimmune thyroiditis. *Methods Mol Med.* 2004;102:175–93.
- Cunningham MW. Cardiac myosin and the TH1/TH2 paradigm in autoimmune myocarditis. *Am J Pathol.* 2001;159(1):5–12.
- Daniels MD, Hyland KV, Wang K, Engman DM. Recombinant cardiac myosin fragment induces experimental autoimmune myocarditis via activation of Th1 and Th17 immunity. *Autoimmunity.* 2008;41(6):490–9.
- Cihakova D, Barin JG, Afanasyeva M, Kimura M, Fairweather DL, Berg M, et al. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *Am J Pathol.* 2008;172(5):1195–208.
- Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, Ramsundar AC, Barin JG, Kass DA, et al. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *Am J Pathol.* 2004;164(3):807–15.
- Okabe TA, Hattori M, Yuan Z, Kishimoto C. L-arginine ameliorates experimental autoimmune myocarditis by maintaining extracellular matrix and reducing cytotoxic activity of lymphocytes. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(5):382–8.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166–73.
- Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, et al. Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding. *PLoS One.* 10(7):e0134089.
- Diny NL, Baldeviano GC, Talor MV, Barin JG, Ong SF, Bedja D, et al. Eosinophil-derived IL-4 drives progression of myocarditis to inflammatory dilated cardiomyopathy. *J Exp Med.* 2017;214(4):943–57.
- Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest.* 1991;64(1):55–64.
- Gangaplara A, Massilamany C, Steffen D, Reddy J. Gender differences in the development of autoimmune myocarditis induced with cardiac myosin heavy chain-alpha, 334-352 in C57Bl/6 mice. *J Immunol.* 2014;192(1 Supplement):179.6.
- Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol.* 2007;66(2–3):143–58.
- Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev.* 2009;230(1):114–27.
- Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res.* 2012;52(1–2):100–10.
- Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, et al. Microglia-secreted Galectin-3 acts as a toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell Rep.* 2015;10(9):1626–38.
- Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu FT, et al. Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav.* 2012;2(5):563–75.
- de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, et al. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med.* 2015;240(8):1019–28.
- Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, et al. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(14):1249–56.
- Lok DJ, Lok SI, Bruggink-Andre de la Porte PW, et al. Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2013;102(2):103–10.
- Jaquenod De Giusti C, Ure AE, Rivadeneyra L, Schattner M, Gomez RM. Macrophages and galectin 3 play critical roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;85:58–70.

30. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2000;156(3):1073–83.
31. Valaperti A, Marty R, Kania G, et al. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 2008;180(4):2686–95.
32. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Rose NR. Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmun Rev.* 2004;3(7–8):476–86.
33. Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, et al. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol.* 1998;161(6):3026–32.
34. Noel R, Rose. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation. *J Interf Cytokine Res.* 2011;31(10):705–10.
35. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Fairweather D, et al. Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN- $\gamma$  and IL-17A. *J Immunol.* 2013;191(8):4038–47.
36. Vitetta ES, Ohara J, Myers CD, Layton JE, Krammer PH, Paul WE. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med.* 1985;162(5):1726–31.
37. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, Srinivasan S, Bedja D, Zheng D, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;106(10):1646–55.
38. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001;69(4):555–64.
39. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KFR, Chang EY, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14496–501.
40. Oliveira FL, Chammas R, Ricon L, Fermino ML, Bernardes ES, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates peritoneal B1-cell differentiation into plasma cells. *Glycobiology.* 2009;19(11):1248–58.
41. Clark AG, Weston ML, Foster MH. Lack of galectin-1 or galectin-3 alters B cell deletion and anergy in an autoantibody transgene model. *Glycobiology.* 2013;23(7):893–903.
42. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosomacruzi infection. *J Immunol.* 2004;172(1):493–502.
43. Frisancho-Kiss S, Coronado MJ, Frisancho JA, Lau VM, Rose NR, Klein SL, et al. Gonadectomy of male BALB/c mice increases Tim-3+ alternatively activated M2 macrophages, Tim-3+ T cells, Th2 cells and Treg in the heart during acute coxsackievirus-induced myocarditis. *Brain Behav Immun.* 2009;23(5):649–57.
44. Bellinghausen I, Brand P, Böttcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology.* 2003;108(2):167–76.



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

**VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA**

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

**ACCEPTED MANUSCRIPT**

This is the early electronic version of the as-received manuscript accepted for publication in the *Vojnosanitetski pregled* (Military Medical Journal) before editing and publishing procedure applied by the Editorial Office of the Journal.

Please cite this article: **TO WAIT FOR A SPONTANEOUS RECOVERY OF THE THIRD CRANIAL NERVE PALSY OCCURRING AFTER THE COILING OF A PCOMA ANEURYSM OR TO IMPLEMENT SURGICAL TREATMENT? A CASE REPORT.**

**DA LI ČEKATI SPONTANI OPORAVAK SLABOSTI TREĆEG KRANIJALNOG NERVA NASTALE NAKON KOILINGA PCOMA ANEURIZME ILI SPROVESTI OPERATIVNO LEČENJE? PRIKAZ SLUČAJA**

**Authors:** <sup>1</sup>Miodrag Peulić\*, <sup>1</sup>Vojin Kovačević\*, Marina Miletić Kovačević†, Danica Grujičić‡ ; *Vojnosanitetski pregled* (2016); Online First September, 2016.

UDC:

DOI: 10.2298/VSP160317235P

This “raw” version of the manuscript is being provided to the authors and readers for their technical service. Pay attention that the manuscript still has to be subjected to copyediting, typesetting, language editing professional editing and authors’ review of the galley proof before publishing in its final form. Yet, in preparation for publishing, some errors are possible that could affect the final version of the manuscript and all legal disclaimers applied according to the policies of the Journal.

<sup>1</sup> Equally contributed first author

\*Clinical Center Kragujevac, Center for neurosurgery, Faculty of Medical Sciences,  
University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

† Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of  
Kragujevac, Kragujevac, Serbia

‡Clinical Center of Serbia, Clinic for neurosurgery, School of Medicine, Belgrade  
University, Belgrade, Serbia

Corresponding author:

Vojin Kovačević, ul. Sušička 1, 34000 Kragujevac, Serbia  
vojinkg@gmail.com

Third cranial nerve palsy after coiling

PAPER ACCEPTED



## Sažetak

Uvod: U poslednje dve decenije metoda endovaskularne embolizacije se nametnula kao metoda izbora u lečenju nerupturiranih intrakranijalnih aneurizmi. Stoga je problem lečenja aneurizmi u regiji PComA, udružene sa slabošću trećeg kranijalnog nerva (TKN), postao još kompleksniji. Slučaj pacijenta prikazanog u ovom radu je stvorio dilemu da li treba čekati spontani oporavak oftalmoplegije koja je nastala nakon embolizacije aneurizme na PComA ili je potrebno sprovesti rano operativno lečenje?

Prikaz bolesnika: U pacijenta muškog pola 58 godina starosti je dijagnostikovana nerupturirana inferolateralno orjentisana bilobarna aneurizma na desnoj ACI u regiji ishodišta PComA, dijametra 9mm i širine vrata 6mm. Dan pre planirane embolizacije u pacijenta se javila ipsilateralna oftalmopareza, a prvog dana nakon endovaskularne procedure došlo je do razvoja kompletne desnostrane oftalmoplegije. Nakon 10 nedelja perzistentne oftalmoplegije doneli smo odluku da se sprovede operativno lečenje u vidu klipsovanja aneurizme i ekstrakcije koilova. Nakon 18 meseci od operacije došlo je do potpunog oporavka funkcije m. levator palpebrae, m. rectus medialis i pupilarne funkcije, sa parcijalnim oporavkom funkcije m.obliquus inferior, m. rectus inferior i m.rectus superior.

Zaključak: prema literaturi očekivano vreme barem parcijalnog oporavka TKN nakon embolizacije je tokom prvih nekoliko nedelja. Progresija oftalmopareze u oftalmoplegiju uprkos sprovedenom endovaskularnom lečenju, a bez kliničkog poboljšanja nakon 10 nedelja od sprovođenja istog, je shvaćena kao indikator izražene kompresije TKN, koja bi dovela do ireverzibilnog oštećenja nerva. Uprkos sve većoj učestalosti metode endovaskularne embolizacije u lečenju aneurizmi u regiji PComA koje su praćene preoperativnom slabošću TKN, smatramo da je operativno lečenje bilo neophodno. Ostaje pitanje da li je naša reakcija u ovom slučaju zakasnila?

Ključne reči: unutrašnja karotidna arterija, oftalmoplegija, aneurizma

## Summary

**Introduction:** In the last two decades a method of endovascular embolization has been imposed as a method of choice in the treatment of unruptured intracranial aneurysms. Therefore, the problem of treating posterior communicating artery (PcomA) aneurysms presenting with the third cranial nerve (TCN) palsy has become even more complex. The case of a patient reported in the paper itself has presented a dilemma of whether to wait for spontaneous resolution of ophthalmoplegia developed after the coiling of a PcomA aneurysm or whether to implement an early surgical treatment?

**A case report:** An unruptured saccular aneurysm, directed inferolaterally in the right ICA segment in the position of the PcomA origin, was diagnosed in a 58-year-old male patient. The aneurysm was measuring 9 mm in diameter while the neck was measuring 5 mm. The day before the planned embolization, the patient developed ipsilateral ophthalmoparesis, whereas the first day after the endovascular procedure was completed, the patient developed right-sided complete ophthalmoplegia. Ten weeks after the endovascular embolization our team decided to perform a microsurgical treatment including aneurysm clipping and coil extraction. Eighteen months after the surgery, the patient made a full recovery of the functions of m. levator palabrae, m. rectus medialis and pupillary function, with a partial recovery of the functions of m. obliquus inferior, m. rectus inferior and m. rectus superior.

**Conclusion:** according to medical research and literature, the partial recovery of TCN palsy is expected to happen in the first few weeks after embolization. Despite the completion of endovascular treatment progression of ophthalmoparesis to ophthalmoplegia without any symptoms of clinical improvement after 10 weeks is considered to be an indicator of long-standing TCN compression, which can lead to irreversible nerve damage. Despite the increase in the use of an endovascular embolization method in the treatment of PComA aneurysms preceded by the TCN palsy, neurosurgical treatment is believed to have been necessary. One question is yet to be answered: did we react too late in this particular case?

**Key words:** Carotid Artery, Internal; Ophthalmoplegia; Aneurysm.

## INTRODUCTION

The question of an effective treatment alternative of unruptured intracranial aneurysms poses a particular problem encountered by neurosurgeons, especially nowadays when the detection rate of aneurysms during routine neurodiagnostic examinations has been increased (1). Particular neurosurgical approaches have always been required for the treatment of posterior communicating artery (PCoA) aneurysms. These aneurysms reported to occur in 13-30% of all cases cause the third cranial nerve (TCN) palsy (2). Therefore, even before the era of 'high definition' neuroimaging, aneurysms have been detected prior to the occurrence of spontaneous subarachnoid hemorrhage due to aneurysmal rupture. The clinical presentation of unruptured PCoA aneurysms includes symptoms associated not only with the TCN palsy, but with retrobulbar pain as well (3). Considering the wide use of endovascular coil embolization to treat unruptured intracranial aneurysms (4), particularly in the last decade, the problem regarding optimum management of unruptured PCoA aneurysm has become even more complex.

Possible mechanisms for the occurrence of the TCN palsy caused by a PCoA aneurysm are the following: aneurysm induced mass effect and consequent compression of neighboring nerve, pulsatile effects of aneurysm and the combination of the latter two mechanisms. Coiling of PCoA aneurysms was considered to affect the compression effect on the TCN, and aneurysms in this region were believed to require surgical treatment. However, in the past few years there has been an increasing number of reports speaking in favour of complete symptomatic recovery or partial relief from the TCN after coil embolization (5-7). Also, they refer to the fact that no significant differences were recognized in the clinical outcome observed while following treatment compared with surgical clipping aneurysms (8-10).

The patient's case presented in our paper has initiated a dilemma related to until which moment or whether to wait for a spontaneous recovery of the TCN palsy which

progression is observed immediately after endovascular coiling of an unruptured PComA aneurysm. Once more, the reported case put an emphasis upon the complexity of pathology manifested within the case itself along with the emergence of taking a patient-centred approach which should be tailored to each individual. Other possible complications relating to the management of a PComA aneurysm have also been discussed within the paper itself.

## CLINICAL PRESENTATION

A 58-year-old male patient was admitted to the outpatient clinic of the Department of Neurology because of repeated episodes of right-sided headaches followed by ipsilateral retrobulbar pain. The computed tomography (CT) scan of endocranium revealed no evidence of intracranial hemorrhage or any other pathological lesions. During the further course of examination, magnetic resonance (MR) angiography was performed, complete with the digital subtraction angiography (DSA) study. With 3D DSA of the cerebral vessels, an unruptured aneurysm was recognized (Fig.1A). It revealed a bilobed saccular aneurysm of the right internal carotid artery (ICA) proximal to the PComA origin, directed inferolaterally. A diameter of the aneurysm sac was 9 mm, with a proximal neck diameter of 6 mm and a dome-to-neck ratio of 1.5. Endovascular coil embolization was recommended as an initial treatment. It was also planned along additional placement of a stent for the finally recovery of aneurysm.

The day before the scheduled endovascular embolization the patient developed a TCN palsy causing ptosis which was accompanied by lateral deviation in the right eyeball. Although it was followed by ophthalmoparesis, the procedure of endovascular embolization (EE) was administered in order to relieve compression of TCN by relieving pulsating effect of the aneurysm.

The EE was performed and after treating the intracranial wide-necked aneurysm, approximately 75% of the total aneurysm sac volume was filled, which was revealed by the immediate postprocedural DSA images (Fig. 1B). However, in the immediate postprocedural course the patient developed right-sided ophthalmoplegia,

including drooping of the upper eyelid (ptosis), pupillary dilation (mydriasis) and paralysis of the bulbomotor muscles innervated by TCN.

Eight weeks after procedure there was no regression of neurological deficit. Taking into consideration that it was not possible to completely fill the aneurysm and that in the postprocedural course the patient exhibited the progression to complete ophthalmoplegia, our clinical team decided to perform neurosurgical operative treatment 10 weeks after the endovascular embolization.

After the right-sided pterional craniotomy, due to the level of magnification increased by an operating microscope it was enabled to present the right n. opticus and right ICA in the first place. In a microdissection procedure a wide-necked aneurysm was first identified on the posterolateral wall of the ICA proximal to the PComA origin, with a fundus which was directed inferolaterally, causing compression of the TCN (Fig. 2A). N. oculomotorius presented a flatter surface, while the fundus caused its slightly elevated prominence and convex outer surface. The two clips were placed across the neck of the aneurysm – a slightly curved clip, measuring 9 mm and the straight one, measuring 8,3 mm (Fig. 2B). Then, microdissection of the aneurysm fundus was carried out. Using the microscissors, the fundus was cut sharply and the placed coils were gradually removed (Fig. 2C, 2D). The TCN compression was relieved completely, but nerve was bent and arch-shaped and it was made thinner.

In the early postoperative period after surgery the patient awoke with right ophthalmoplegia. Immediate postoperative angiography showed the absence of aneurysm rest (Fig. 3). The postoperative course was uneventful. Examination performed two months after surgery revealed regression rate of neurological deficit. The patient was found to have made a full recovery, with resolution of the eyelid ptosis first, which was followed by the recovery of external ocular movement and then improvement in pupillary function. Follow up data concerning the patient's neurological state were collected during a 6-month period. Eighteen months after the surgery the patient had made a full recovery of the functions of m. levator palpebrae, m. rectus medialis and pupil function. It also demonstrated that the patient had made a partial recovery of the functions of m. obliquus inferior, m. rectus inferior and m. rectus superior.

## DISCUSSION

Although it can be stated that the adequate management of unruptured intracranial aneurysms is still one of the most controversial topics (11), unruptured PComA aneurysms, presenting with TCN palsy, require urgent treatment to maximize the potential of functional recovery and prevent subarachnoid hemorrhage (12). A surgical procedure of aneurysm clipping used to be a method applied in a standard treatment of TCN palsy caused by an expanding PComA aneurysm (13). Also, the mechanism of recovery by surgical clipping was known to be effective by relieving the mass effect. As the method of endovascular embolization has been more widely used over time, more cases have been reported along with a minor case series of patients who have made a functional recovery of TCN after coiling of an PComA aneurysm (5-7). Recovery mechanism of TCN following coil embolization is related to loss or decrease of aneurysmal pulsation, despite the fact that the mass effect was not completely relieved. There is also evidence indicating that after embolization the aneurysm volume decreases by 30% within the period lasting from 2 to 12 months (14).

Although some studies suggested that surgical clipping was associated with a higher incidence of recovery of the TCN and higher recovery level in comparison with endovascular treatment (15), meta-analysis of all similar available studies showed that there were no statistically significant differences in clinical outcome and rate of complete recovery between the two groups of patients following coil embolization and surgical clipping (9, 10). The findings suggested that oculomotor nerve palsy may result not only from mechanical compression by coils but also from inflammation induced by perpendicular thrombosis occurring immediately after endosaccular embolization (11).

The prognosis of TCN palsy mainly depends on the degree of preoperative deficit. Gender, age and size of the aneurysm had no influence on the functional recovery of the nerve (6, 7, 10, 17). The importance of interval between the onset of palsy and the time of operation/embolisation seems to be contradictory when compared to the recovery of the nerve according to the results obtained by various authors (7, 12). Patients usually experienced complete functional recovery of TCN within 3 months of surgery/embolization. However, full recovery may also take two years. (6, 7, 17).

Ptosis is generally the first symptom, and it frequently shows the earliest recovery of all other disturbed oculomotor functions after surgery. The restitution of the single ocular muscle functions shows a fairly constant course: the levator palpebrae muscle and the m. rectus medialis show rapid recovery. The parasympathetic fibres follow next, but normal function of elevation and depression of the ocular bulb (m. rectus sup., m. obliquus inf. and m. rectus inf.) is often delayed. The above mentioned clinical course of TCN recovery in patients after clipping completely correlates with the clinical data of the patient reported here, regarding his/her functional recovery (13).

Endovascular embolization of PComA aneurysms imposes a problem of anatomical specificity of the location of an aneurysm, based on which the following types of aneurysms can be identified: „true PComA aneurysms”, aneurysms which arise on the posterolateral wall of the ICA located proximal to the origin of the PComA and ICA communicating segment aneurysms distal to the origin of the PComA (18). In the first aneurysmal type neck of the aneurysm originate of the PCom artery itself and is often associated with large or fetal PComA arteries. In the most common second type the neck of the aneurysm can partially incorporate the PComA artery (9), which was not present in our reported patient, although the aneurysm neck was closely related to the PComA origin. Although it is a seemingly irrelevant classification of a small segment of blood vessels at the base of the brain, its significance is highlighted in the era of endovascular embolization. As for recommendations given for the first two aforementioned subgroups of aneurysms, microsurgical treatment performed by placing adequately modified clips is being recommended. Endovascular embolization of the mentioned aneurysms is often incomplete due to the efforts invested in order to save the PComA origin. This is followed by aneurysm recurrence, while stent placement may compromise perforant branches. The location of the branches cannot be determined without performing neurosurgical microdissection. ICA communicating segment aneurysms distal to the origin of the PComA can be adequately treated by microsurgical treatment and endovascular embolization (18).

In the past few years, it has been reported an increasing number of aneurysms demanding operative treatment immediately after the performed procedure of endovascular embolization. In our viewpoint, it is a result of inadequate diagnostic indications for aneurysm coiling procedures. Based on the literature, the most

common indications for operative treatment of previously coiled aneurysms were the following: incomplete aneurysm occlusion, aneurysmal regrowth and coil herniation (19). A few case series of patients demonstrated that microsurgical treatment of the given aneurysms was associated with a low incidence of serious complications and favourable clinical outcome in most cases. When reviewing the mass effect of an aneurysm, numerous authors consider utilizing a aneurismal sac evacuation technique to be their first choice regardless of aneurysm location and nerve deficits it causes (20). Taking into consideration all the available literature, we have not been able to identify a case of microsurgical treatment of a PComA aneurysm where ophthalmoparesis progressed to acute TCN palsy immediately following the coiling procedure.

Due to all mentioned above, we are facing the following clinical dilemma: to wait for a spontaneous recovery of developed ophtalmoplegia after the coiling of a PcomA aneurysm or not and how long we should wait. In addition, is it necessary for patients to undergo operative treatment as soon as possible? Or, to rephrase our question: can our patient's state be led to the point of irreversible TCN damage by taking an expectation approach? The literature published so far does not give clear guidelines related to a reasonable time frame to expect the recovery of the nerve after endovascular embolization. Although it has been noticed that the recovery of TCN palsy can take even a whole year after the embolization have been performed, it is all about cases where initial regression of weakness symptoms has appeared in the first few weeks after the intervention (6, 7). Taking into consideration all the findings revealed up to this point, we believed that concerning our patient's case we had run out of time and that microsurgical intervention was necessary. The progression of ophthalmoparesis to ophthalmoplegia that did not improve within ten weeks, was considered in our opinion to be an indicator of long-standing compression of the TCN. In the following postembolization course, it could lead to irreversible TCN damage. Having completed further analyses of the clinical course and intraoperative findings, we concluded that the right decision was made at the given moment, the one related to the further patient's treatment. The decision was made for the purpose of prevention of permanent nerve deficit. Still, one question remains to be answered: did we react in a timely manner? Additionally, is the progression of ophthalmoparesis to ophthalmoplegia after coiling considered to be a early predictor of unfavourable outcome of the recovery of TCN which demands operative treatment in the first few days? All the additional questions that may arise concerning the given topic



remain unanswered for the state being due to the lack of reported cases of patients with the clinical course similar to the one presented within our case report.

## CONCLUSION

Despite the increasing frequency of use of endovascular embolization in the treatment of unruptured PComA aneurysms presenting with the TCN palsy, it is our viewpoint that concerning the cases with weakness showing markedly progression towards complete opthalmoplegia after EE is performed – the patients are required to undergo surgery. The surgery is to be performed by placing a clip over the neck of an aneurysm and by the use of the technique of coil extraction in order to decompress the oculomotor nerve. Simultaneously, it is necessary to take into account the time factor, because the acute complete opthalmoplegia occurring after the coiling of a PcomA aneurysm should be taken as an indicator of a predominantly expressed compression of the TCN. The compression may lead to irreversible nerve damage, resulting in permanent nerve deficit. In the case of the aforementioned clinical course microsurgical procedure is advised, by which the aneurysm mass effect could be relieved. Unfortunately, based on our own experience and the given literature, we have to state that nothing can be said about the period of time recommended for the patient to undergo surgery which is considered to be more invasive treatment modality. However, in this case, according to the authors of the paper itself – the utilized modus of treatment was highly necessary.

## REFERENCES 10526

1. *Morris Z, Whiteley WN, Longstreth WT Jr, Weber F, Lee YC, Tsushima Y, et al.* Incidental findings on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009; 339: b3016.
2. *Good EF.* Ptosis as the sole manifestation of compression of the oculomotor nerve by an aneurysm of the posterior communicating artery. *J Clin Neuroophthalmol* 1990; 10(1): 59–61.
3. *Lanzino G, Andreoli A, Tognetti F, Limoni P, Calbucci F, Bortolami R, et al.* Orbital pain and unruptured carotid-posterior communicating artery aneurysms: the role of sensory fibers of the third cranial nerve. *Acta Neurochir (Wien)* 1993; 120(1–2): 7–11.
4. *Im SH, Han MH, Kwon OK, Kwon BJ, Kim SH, Kim JE, et al.* Endovascular coil embolization of 435 small asymptomatic unruptured intracranial aneurysms: procedural morbidity and patient outcome. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30(1): 79–84.
5. *Gu DQ, Luo B, Zhang X, Long XA, Duan CZ.* Recovery of posterior communicating artery aneurysm-induced oculomotor nerve paresis after endovascular treatment. *Clin Neurol Neurosurg* 2012; 114(9): 1238–42.
6. *Chalouhi N, Theofanis T, Jabbour P, Dumont AS, Gonzalez LF, Starke RM, et al.* Endovascular treatment of posterior communicating artery aneurysms with oculomotor nerve palsy: clinical outcomes and predictors of nerve recovery. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34(4): 828–32.
7. *Hanse MC, Gerrits MC, van Rooij WJ, Houben MP, Nijssen PC, Sluzewski M.* Recovery of posterior communicating artery aneurysm-induced oculomotor palsy after coiling. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29(5): 988–90.
8. *Nam KH, Choi CH, Lee JI, Ko JG, Lee TH, Lee SW.* Unruptured Intracranial Aneurysms with Oculomotor Nerve Palsy : Clinical Outcome between Surgical Clipping and Coil Embolization. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 48(2): 109–14.

9. *Golshani K, Ferrell A, Zomorodi A, Smith TP, Britz GW.* A review of the management of posterior communicating artery aneurysms in the modern era. *Surg Neurol Int* 2010; 1: 88.
10. *Khan SA, Agrawal A, Hailey CE, Smith TP, Gokhale S, Alexander MJ, et al.* Effect of surgical clipping versus endovascular coiling on recovery from oculomotor nerve palsy in patients with posterior communicating artery aneurysms: A retrospective comparative study and meta-analysis. *Asian J Neurosurg* 2013; 8(3): 117–24.
11. *van Rooij WJ, Sluzewski M.* Procedural morbidity and mortality of elective coil treatment of unruptured intracranial aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27(8): 1678–80.
12. *Okawara SH.* Warning signs prior to rupture of an intracranial aneurysm. *J Neurosurg.* 1973; 38(5): 575–80.
13. *Leivo S, Hernesniemi J, Luukkonen M, Vapalahti M.* Early surgery improves the cure of aneurysm-induced oculomotor palsy. *Surg Neurol* 1996; 45(5): 430–4.
14. *de Oliveira JG, Borba LA, Rassi-Neto A, de Moura SM, Sanchez-Júnior SL, Rassi MS, et al.* Intracranial aneurysms presenting with mass effect over the anterior optic pathways: neurosurgical management and outcomes. *Neurosurg Focus* 2009; 26(5): E3.
15. *Chen PR, Amin-Hanjani S, Albuquerque FC, McDougall C, Zabramski JM, Spetzler RF.* Outcome of oculomotor nerve palsy from posterior communicating artery aneurysms: comparison of clipping and coiling. *Neurosurgery* 2006; 58(6): 1040–6; discussion 1040–6.
16. *Nishino K, Ito Y, Hasegawa H, Shimbo J, Kikuchi B, Fujii Y.* Development of cranial nerve palsy shortly after endosaccular embolization for asymptomatic cerebral aneurysm: report of two cases and literature review. *Acta Neurochir (Wien)* 2009; 151(4): 379–83.
17. *Hamer J.* Prognosis of oculomotor palsy in patients with aneurysms of the posterior communicating artery. *Acta Neurochir (Wien)* 1982; 66(3–4): 173–85.
18. *He W, Gandhi CD, Quinn J, Karimi R, Prestigiacomo CJ.* True aneurysms of the posterior communicating artery: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *World Neurosurg* 2011; 75(1): 64–72; discussion 49.
19. *Romani R, Lehto H, Laakso A, Horcajadas A, Kivisaari R, von und zu Fraunberg M, et al.* Microsurgery for previously coiled aneurysms: experience with 81 patients. *Neurosurgery* 2011; 68(1): 140–53; discussion 153–4.
20. *Waldron JS, Halbach VV, Lawton MT.* Microsurgical management of incompletely coiled and recurrent aneurysms: trends, techniques, and observations on coil extrusion. *Neurosurgery* 2009; 64(5 Suppl 2): 301–15; discussion 315–7.

Fig. 1: Preoperative cerebral digital subtraction angiography (DSA) shows (A) bilobed saccular aneurysm of posterolateral wall of the internal carotid artery (ICA), communicating segment, aneurysmal sac was measuring 9 mm in diameter while the neck was measuring 6 mm in diameter, with a fundus which was directed inferolaterally. (B) DSA immediately after coil endovascular embolization shows that approximately 75% of the total aneurysm sac volume was filled (arrow), with a neck residue (asterisk).

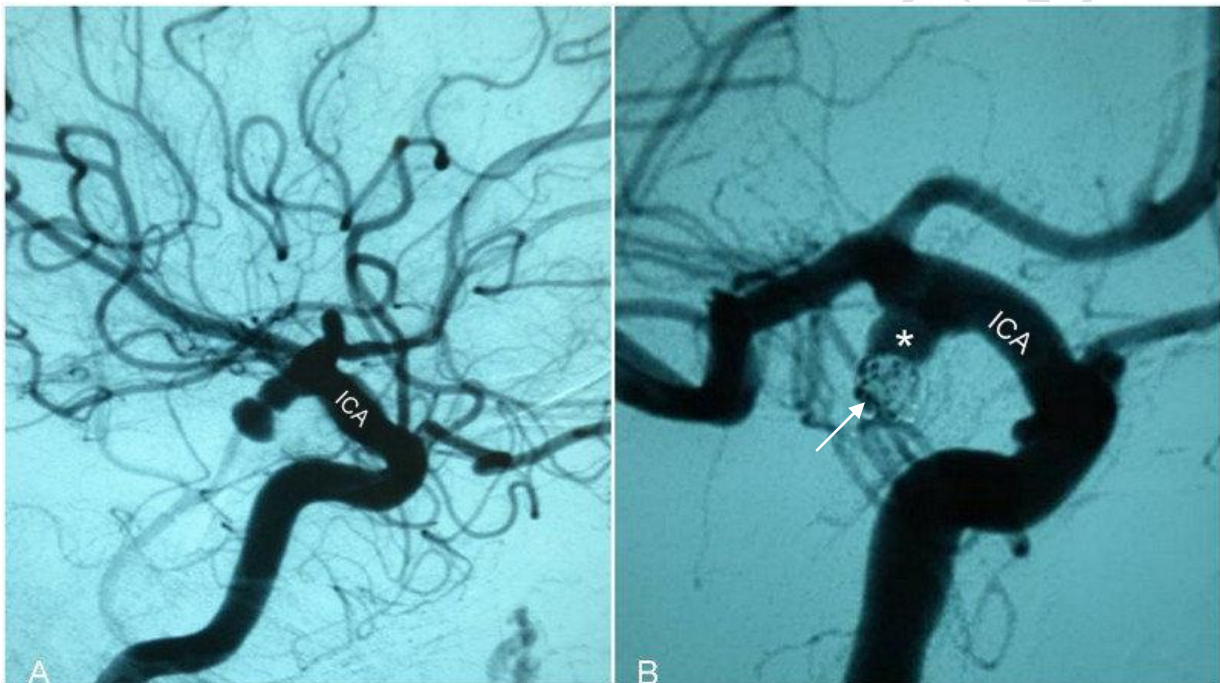
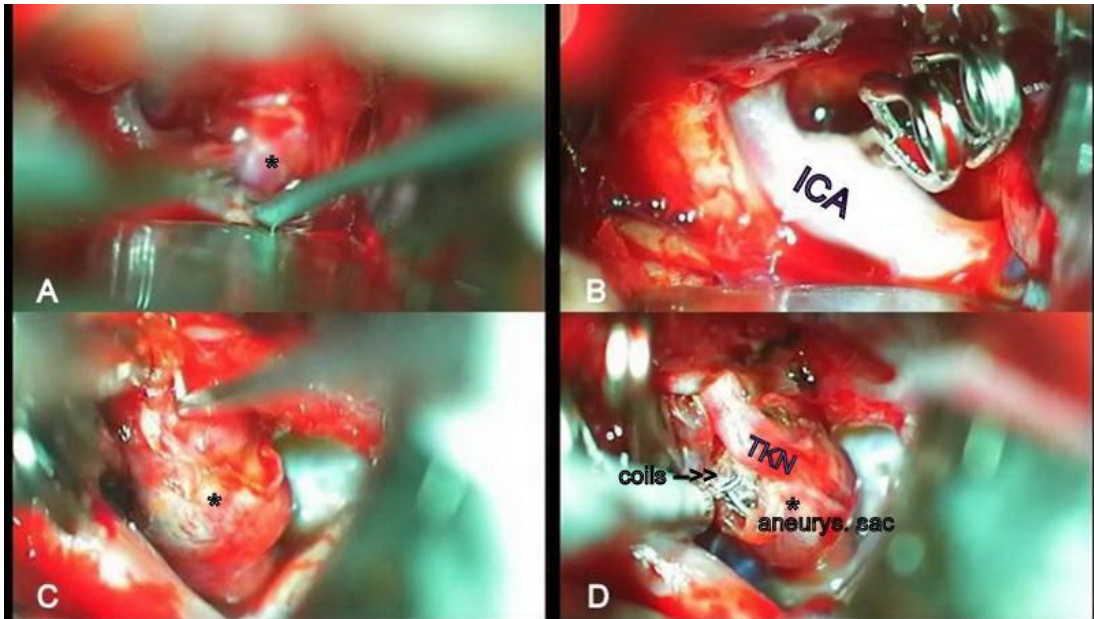
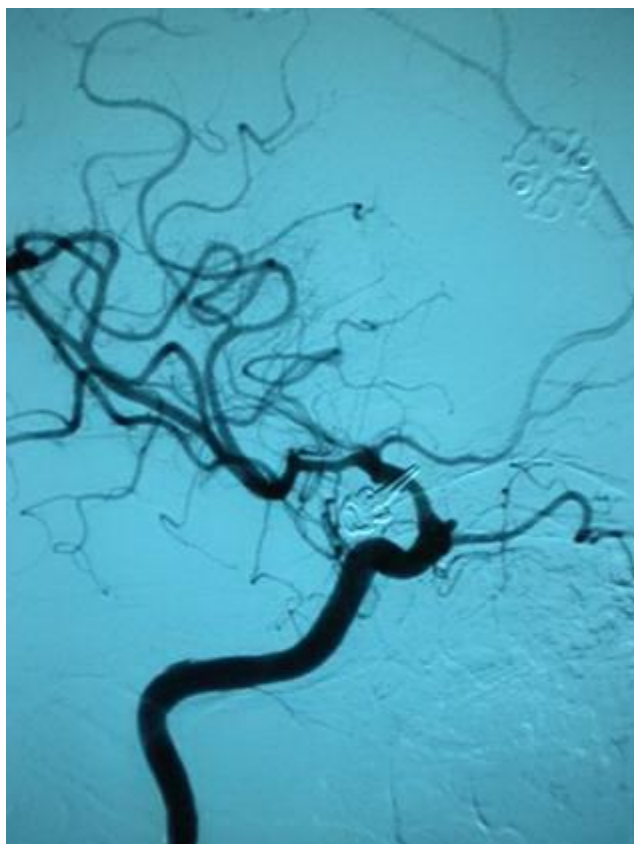


Fig. 2. Intraoperative images under magnification (8x) of an operating microscope shows (A) microdissection of an aneurysmal sac (asterisk) (B) by placing two clips at aneurysmal neck which is at posterolateral wall of internal carotid artery (ICA) followed by the (C) aneurysmal sac opening and (D) removing of coils from aneurysmal sac with third cranial nerve (TKN) decompression.



PAPER

Fig. 3. Immediate postoperative cerebral digital subtraction angiography shows complete obliteration of the aneurysm



Received on March 17, 2016.

Revised on June 03, 2016.

Accepted on June 03, 2016.

Online First September, 2016.

# STANDARD LUMBAR DISCECTOMY *VERSUS* MICRODISCECTOMY – DIFFERENCES IN CLINICAL OUTCOME AND REOPERATION RATE

Vojin Kovačević<sup>1,2</sup>, Nemanja Jovanović<sup>1,2</sup>, Marina Miletić-Kovačević<sup>1</sup>, Radivoje Nikolić<sup>1,2</sup>,  
Miodrag Peulić<sup>1,2</sup>, Křešimir Rotim<sup>3,4</sup>, Tomislav Sajko<sup>3,4</sup> and Lukas Rasulić<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; <sup>2</sup>Center for Neurosurgery, Kragujevac Clinical Center, Kragujevac, Serbia; <sup>3</sup>University of Applied Health Sciences, Zagreb, Croatia; <sup>4</sup>Clinical Department of Neurosurgery, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia; <sup>5</sup>School of Medicine, University of Belgrade; <sup>6</sup>Clinical Department of Neurosurgery, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

**SUMMARY** – Microdiscectomy (MD) is accepted nowadays as the operative method of choice for lumbar disc herniation, but it is not rare for neurosurgeons to opt for standard discectomy (SD), which does not entail the use of operating microscope. In our study, differences in disc herniation recurrence and clinical outcome of surgical treatment of lumbar disc herniation with and without the use of operating microscope were assessed. Our study included 167 patients undergoing lumbar disc surgery during a three-year period (SD, n=111 and MD, n=56). Clinical outcome assessments were recorded by patients *via* questionnaire forms filled out by patients at three time points. Operation duration, length of hospital stay and revision surgeries were also recorded. According to study results, after one-year follow up there was no statistically significant difference between the SD and MD groups in functional outcome. However, we recorded a statistically significant difference in leg pain reduction in favor of the MD group. According to the frequency of reoperations with the mean follow up period of 33.4 months, there was a statistically significant difference in favor of the MD group (SD 6.3% *vs.* MD 3.2%). There appears to be no particular advantage of either technique in terms of functional outcome since both result in good overall outcome. However, we choose MD over SD because it includes significantly lower recurrent disc herniation rate and higher reduction of leg pain.

**Key words:** *Microdiscectomy; Standard discectomy; Clinical outcome; Reoperation*

## Introduction

Elective lumbar discectomy is regarded a good treatment option for lumbar disc herniation and one of the most common neurosurgical procedures. Discectomy is considered the gold standard in the treatment of lumbar disc herniation patients if sciatica or neurological deficits occur and still persist after a course of conservative therapy<sup>1,2</sup>. In 1934, Mixter and Barr were

the first to recognize herniated disc as a common cause of neural compression in the lumbar spinal canal and advocated surgical approach to the problem<sup>3</sup>. Surgical approach, commonly known as standard discectomy, is still employed today, accompanied by a number of technical modifications implemented over years, and includes partial hemilaminectomy and partial discectomy for herniated disc removal. A new era in the operative management of lumbar disc herniation began in the year 1977 with the use of operating microscope for surgical removal of herniated disc material<sup>4,5</sup>. Soon after the introduction of the above mentioned innovation, according to the first results, it was pointed out that microdiscectomy was just as efficient as standard

Correspondence to: Prof. Lukas Rasulić, MD, PhD, Clinical Department of Neurosurgery, Clinical Center of Serbia, Dr Koste Todorovića 4, 11000 Belgrade, Serbia  
E-mail: lukas.rasulic@gmail.com

Received September 1, 2016, accepted June 30, 2017

discectomy, having certain advantages over the latter<sup>6</sup>. Compared with the standard open discectomy, microdiscectomy enabled the use of smaller incisions of the skin and fascia and facilitated a less traumatic surgical procedure, thereby reducing postoperative pain and hospital stay.

Although microdiscectomy is accepted nowadays as the method of choice for the presenting pathology, it is not rare for neurosurgeons to opt for standard discectomy, which does not entail the use of operating microscope. Over the last two decades, several kinds of operative techniques have been generated in the treatment of lumbar disc herniation patients (chemonucleolysis, laser discectomy and endoscopic-assisted techniques), but they have not become widely accepted into clinical practice due to having a limited range of indications and often unsatisfactory clinical results<sup>7-9</sup>. The newer minimally invasive methods (microendoscopic or tubular discectomy), which appear to be generally accepted nowadays, have been proven to be a satisfactory alternative to microdiscectomy. The major advantages of endoscopic discectomy are reported to include significantly less muscle damage<sup>10</sup> and less peridural scar tissue formation<sup>11</sup>. However, there were no statistically significant differences in the final clinical treatment outcome<sup>12</sup>.

Several retrospective<sup>13-15</sup> and prospective<sup>16,17</sup> randomized studies have been published so far, comparing the relative merits of microdiscectomy and standard discectomy, which imposes a general conclusion that there is no clinically relevant difference in the clinical treatment outcome even after continuous long-term monitoring of patients.

It is our belief that a drawback of prospective randomized studies is the fact that they are highly influencing the choice of surgical procedure performed by the individual surgeon because if the surgeon is not familiar with his/her own chosen method, its application can affect the final clinical treatment outcome. In addition, most of the studies are dedicated to the surgical aspects in the treatment of patients, including possible complications, surgery duration and hospital stay. Although pain assessment method is covered in numerous studies, there are quite a few studies that include patient self-rated outcome scale, which turns out to be essential in the clinical outcome assessment. Unlike most other studies, we included the problem of recurrent disc herniation that required reoperation.

Our study presents an attempt to make a multidimensional comparison between the course and outcome of surgical treatment of lumbar disc herniation with and without the use of operating microscope.

## Patients and Methods

Our study was designed as a prospective non-randomized study and it included patients undergoing lumbar disc surgery during the three-year period at the Center for Neurosurgery, Kragujevac Clinical Center in Kragujevac, Republic of Serbia. Clinical outcome assessments were recorded by the patients *via* questionnaire forms filled out by the patients preoperatively, three months after surgery and properly conducted physical therapy program, and also one year after surgery. The questionnaires contained the following parameters: Visual Analog Scale (VAS, 0-10) used as a tool in quantifying patient experience of back and leg pain intensity and Oswestry Disability Index (ODI, 0-100% disability) used for assessment of disability and functional recovery in patient daily activities. The ODI is considered the 'gold standard' of low back functional outcome tools<sup>18</sup>. Operation duration, length of hospital stay and revision surgeries were also recorded.

The mean follow-up in terms of potential reoperation and other surgical complications in the postoperative period was 33.4 months.

The criteria for inclusion into the study were defined as: single level lumbar disc herniation; monoradicular symptoms with predominant sciatica compared to less severe lower back pain; conservative treatment failure or intolerable sciatica, or rapidly progressive neurological deficits (including motor deficits, bladder dysfunction, partial and complete cauda equina syndrome).

Exclusion criteria were defined as a history of previous lumbar back surgery; signs of spinal instability or other spinal abnormalities; excessive obesity; body mass index above 35<sup>19</sup>; and history of psychiatric or addiction and mental disorders.

Procedures were performed under general anesthesia and patients were placed in the genupectoral position. The affected interlaminar space was localized by lateral x-ray fluoroscopy just before and with confirmation during surgery. Microdiscectomy was performed after a horizontal skin incision of approximately 4-5 cm in length above the lumbar spinal seg-



ments and incision of lumbodorsal fascia and subperiosteal preparation to the interlaminar space. Using the operating microscope (Carl Zeiss Co., OPMI Vario/NC33, Oberkochen, Germany), the following aspects of the surgery were performed: partial hemilaminectomy of the superior and inferior lamina and partial flavectomy. After these aspects had been performed, the herniated disc was removed. In addition, all patients were mobilized during the first 24 hours after surgery.

The protocol of the present study was approved by the institutional ethics committee.

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median (range). For comparison of the two treatment modalities, the independent samples t-test was used for normally distributed data and the Mann-Whitney test for skewed data. The paired samples *t* test was used to test statistical difference between two time points within each procedure. The  $\chi^2$ -test was used to analyze the association between surgical group and reoperation rate. Statistical significance was accepted at the  $p \leq 0.05$  level. Statistical data analyses were done using SPSS Statistics 22.

## Results

During the study period, 223 patients diagnosed with lumbar disc herniation underwent surgery by

four experienced neurosurgeons. The study admission criteria were satisfied by 167 patients and at the same time they were available when requested to complete the questionnaires. Depending on the surgeon's preference, 111 patients underwent surgery by using the method of standard discectomy, that is, without using operative microscope, whereas 56 patients underwent surgery by the method of microdiscectomy. The standard discectomy group had 57 men and 54 women undergoing surgery, whereas the microdiscectomy group included 34 men and 22 women. The mean age of patients in the standard discectomy group (SD) and microdiscectomy group (MD) was 44.9 (range: 17-75) years and 44.8 (range: 19-67) years, respectively. The most common level of disc herniation was at the level of L5/S1 lumbar vertebrae in both groups (SD,  $n=61$  and MD,  $n=28$ ), and then at the level of L4/L5 (SD,  $n=33$  and MD,  $n=17$ ).

There were no statistically significant group differences in the operation duration or the length of hospital stay. In both groups, surgery was usually completed during the first hour from the beginning of operation, which was observed in 74.3% of SD cases and 68.7% of MD cases. The mean duration of hospital stay was  $5.6 \pm 2.8$  (range: 3-9) days in the SD group and  $6.7 \pm 3.1$  (range: 4-11) days in the MD group.

The mean preoperative ODI score in the SD group was  $58.34 \pm 21.32$  (range: 23-94) and mean VAS leg

Table 1. Initial parameters and operation details

Variable	Standard discectomy group	Microdiscectomy group	p value
Number of patients	111	56	
Gender			
- male	57	34	
- female	54	22	
Patient age (years)	44.9 (17-75)	44.8 (19-67)	$p=0.95$
Operation duration (h)			
<1 h	74.3%	68.7%	$p=0.43$
>1 h	25.7%	31.3%	
Hospital stay (days)	$5.6 \pm 2.8$	$6.7 \pm 3.1$	$p=0.87$
Preoperative VAS leg pain	$7.7 \pm 1.9$ (range: 2.5-9.2)	$8.2 \pm 2.1$ (range: 2.3-9.6)	$p=0.26$
Preoperative VAS back pain	$4.7 \pm 2.2$ (range: 1.8-6.5)	$4.2 \pm 1.9$ (range: 1.5-6.2)	$p=0.33$
Preoperative ODI (%)	$58.34 \pm 21.32$	$55.1 \pm 19.13$	$p=0.7$

VAS = Visual Analog Scale; ODI = Oswestry Disability Index

Table 2. Clinical outcome 3 months after surgery

Variable	Standard discectomy group	Microdiscectomy group	p value
3-month postoperative VAS leg pain	3.0±2.5 (range: 0.5-7.5 )	2.8±2.3 (range: 0-7)	p=0.69
3-month postoperative VAS back pain	2.1±2.2 (range: 1-5.2)	1.9±2.0 (range: 0-6.1)	p=0.89
3-month postoperative ODI (%)	25.67±18.43 (range: 4-63)	22.4±16.14 (range: 0-43)	p=0.7
VAS leg pain reduction after 3 months	4.7	5.4	p=0.08
VAS back pain reduction after 3 months	2.6	2.3	p=0.67
Reduction in ODI after 3 months	32.67	32.7	p=0.93

VAS = Visual Analog Scale; ODI = Oswestry Disability Index

pain level was 7.7±1.9 (range: 2.5-9.2). The mean preoperative ODI score in the MD group was 55.1±19.13 (range: 26-87) and mean VAS leg pain level was 8.2±2.1 (range: 2.3-9.6). Patients in the SD group had a baseline mean low back pain (LBP) score of 4.7±2.2 (range: 1.8-6.5), whereas patients in the MD group had a mean LBP score of 4.2±1.9 (range: 1.5-6.2). There was no statistically significant difference between the two groups according to these initial parameters (Table 1).

While completing the questionnaires for the second time at 3 months postoperatively, significant reduction was noted in the perceived pain score for leg pain and for LBP in both study groups. The mean VAS for leg pain in the SD group was 3.0±2.5 (range: 0.5-7.5), compared to 2.8±2.3 (range: 0-7) in the MD group. The mean VAS for LBP in the SD group was 2.1±2.2 (range: 1-5.2), compared to 1.9±2.0 (0-6.1) in the MD group. Also, a significant decrease in ODI values was observed: 25.67±18.43 (range: 4-63) in the SD group and 22.4±16.14 (range: 0-43) in the MD group. There was no statistically significant difference between the two groups in the monitored parameters after three months of surgery. There was no statistically significant difference in the reduction of ODI and VAS values for leg and back pain at three months either (Table 2).

At 12-month follow-up after operative treatment, the patients were requested to complete the questionnaires once again. Both groups showed a clinically im-

portant trend towards a decrease in the VAS of leg pain and ODI scores, whereas LBP values determined using the VAS scale demonstrated a minimum decrease compared to the previous examination. The SD patients displayed the mean leg pain level of 2.3±2.5 (range: 0-7.5), median back pain of 2±1.9 (range: 0-5.5) and ODI of 19.13±15.69 (range: 0-60). The MD patients had the mean leg pain of 1.9±2.5 (range: 0-7), median back pain of 1.60±2.0 (range: 0-6), and ODI of 14.65±13.2 (range: 0-32). At one-year follow-up, improvement of preoperative leg pain according to VAS was 5.4 ( $p<0.001$ ) in SD patients and 6.3 ( $p<0.001$ ) in MD patients.

Significant reduction in LBP intensity was noted as well. The corresponding values for LBP reduction were 2.7 in the SD group and 2.6 in the MD group. The preoperative mean ODI values after one year decreased by 39.21 in the SD group and by 40.45 in the MD group ( $p<0.001$  both), yielding a statistically significant improvement in both groups. At one-year follow-up, there was no statistically significant difference between the SD and MD groups according to the reduction in VAS score for back pain or reduction in ODI values. However, we recorded significant difference in the leg pain reduction by VAS ( $p=0.038$ ) in favor of the MD group (Table 3).

Of the 167 patients in the database with the mean follow-up of 33.4 months, nine (5.4%) patients underwent reoperation. In the SD group, seven (6.3%) patients underwent reoperation, whereas five (4.5%) pa-

Table 3. Clinical outcome 12 months after surgery and reoperation rate

Variable	Standard discectomy group	Microdiscectomy group	p value
12-month postoperative VAS leg pain	2.3±2.5 (range: 0-7.5)	1.9±2.5 (range: 0-7)	p=0.37
12-month postoperative VAS back pain (median)	2±1.9 (range: 0-5.5)	1.60±2 (range: 0-6)	p=0.23
12-month postoperative ODI (%)	19.13±15.69 (range: 0-60)	14.65±13.2 (range: 0-32)	p=0.19
VAS leg pain reduction after 12 months	5.4	6.3	<b>p=0.038</b>
VAS back pain reduction after 12 months	2.7	2.6	p=0.75
Reduction in ODI after 12 months	39.21 (p<0.001)	40.45 (p<0.001)	p=0.86
Reoperation rate (%)	5.4	3.2	<b>p=0.0001</b>

VAS = Visual Analog Scale; ODI = Oswestry Disability Index

tients underwent reoperation because of recurrent disc herniation. Due to postoperative recurrent radicular pain, two patients received the treatment of fibrous adhesions of spinal nerve roots caused by scar tissue formation. Of the 56 patients in the MD group, two (3.2%) patients underwent reoperation and one (1.78%) patient underwent reoperation because of recurrent disc herniation. According to the frequency of reoperations, there was a statistically significant difference in favor of the MD group ( $p=0.0001$ ). The SD patients underwent reoperation at 6-28 (mean, 16.5) months after their first surgery.

## Discussion

The present study sought to investigate differences in the functional outcome after lumbar disc excision with and without the use of microscope, and also to detect whether there were significant differences in terms of the pain syndrome reduction. If each group is assessed separately, both groups displayed significant improvement in terms of leg and low back pain intensity scores, showing good recovery according to the ODI. The only statistically significant difference noted between the two groups was reduction in the leg pain intensity score. Although no significant difference was noted at 3 months post-surgery, there was a statistically significant reduction in leg pain intensity at 12

months in the MD group (pain reduced by 6.3 points) compared to the SD group (pain reduced by 5.4 points). The verified difference could be attributed to the lower preoperative leg pain score in the SD group, which could be caused by better patient selection for operative treatment in the MD group.

Although we had expected better functional outcomes after surgical treatment in the MD group because they had the advantage of less tissue trauma and better visualization, no statistically significant differences were detected between the two groups in outcomes based on the results obtained by the ODI and VAS. Our starting hypothesis was not verified in the works of other authors either, who used various questionnaires for treatment outcome assessment<sup>14,16,24,25</sup>. Most of the above mentioned studies share the same view related to the significant reduction in leg and low back pain intensity in both groups, completed with excellent functional recovery, but the overall results are not statistically and clinically significant. In addition, some segments of the studies show the authors' preference for one of the treatment modalities. However, their overall results are generally heterogeneous.

The main reason why our study differs from the majority of other studies is the follow-up of lumbar disc reherniation rate and the need for reoperation. The abovementioned studies do not give their views on recurrent lumbar disc herniation. Our study showed

that after microdiscectomy, there was a statistically less chance of reoperative treatment because of recurrent lumbar disc herniation or excessive fibrous traction of the dural sac and spinal roots. We attribute this result to better visualization of the neural structure and pathologic substrate, and their mutual relations. According to a few available studies on recurrent lumbar disc herniation, the reoperation rate is 6%-24% depending on the length of follow-up<sup>20-22</sup>. Studies having similar length of follow-up just like ours are reported to have the reoperation rate of approximately 10%<sup>23</sup>, which is a considerably higher rate compared to our study. However, it is not the difference related to the reoperation rate that proves the higher level of efficiency in lumbar disc herniation treatment (demonstrated by our own results), but the reasons for claiming this should be found in setting different indications for reoperation.

In the present study, the use of microscope did not lengthen the duration of the operation, although a higher percentage of the operation cases in the SD group lasted for less than one hour. The operating time varies in other studies depending on the use of microscope. Our results are in agreement with the findings of some earlier studies<sup>26</sup>, some of which even report a shorter operation time when using the standard discectomy technique<sup>16,17,24</sup>. However, there are only a few authors who came to the following conclusion and report a shorter operation time when using the microscope<sup>14</sup>. The operating time is an important factor to consider, especially the aspect of blood loss and intraoperative risk factors for surgical site infections. According to the findings of some studies, one of the benefits of microdiscectomy is a significantly decreased perioperative blood loss<sup>26-28</sup>. In terms of surgical data, considering the fact that the increased visualization allowed for smaller incisions of the skin and fascia, less tissue trauma and more efficient hemostasis are expected. However, bearing in mind that blood loss reported for standard discectomy does not affect the hemodynamic stability of the patient, the aforementioned surgical data cannot be taken as an essential factor for the choice of one of the surgical methods given. In addition, blood loss is directly proportionate to the length of operation duration, which is frequently dependent on the individual surgeon's skills *per se*, and not so much on the operating method preferred.

Our study concurs with the recently published results<sup>16,25,26</sup>, which demonstrated that both standard

discectomy and microdiscectomy were appropriate techniques with no difference in outcomes. However, studies concerned with patient earlier return to work/normal activities are reported to choose microdiscectomy over standard discectomy<sup>24,28</sup>. These results were explained by the correspondingly reduced tissue trauma during microsurgery. However, the results given should not be fully taken into consideration because they are strongly influenced by differences in the worker compensation policies in different countries worldwide.

As regards the length of hospital stay, there was no clinically relevant difference between the two groups in our study. There are some studies favoring microdiscectomy<sup>16,27,28</sup>, but also there are other studies supporting the results obtained in our study<sup>26</sup>. However, this variable, too, is often dependent on the factors other than the medical ones, such as healthcare policies and insurance systems in a particular country.

When making comparison between our study and a number of similar studies in this respect, some studies are reported to have the following drawbacks: retrospective character<sup>28</sup>, and the fact that there is only one surgeon and patients randomized to treatment by using one of the aforementioned methods<sup>13,16</sup>. If the validity of our study is subject to discussion, it is our belief that its main advantages were related to the fact that the surgeon was enabled to implement a familiar technique and relatively uniform indications for surgery. In addition, in our study, patients were not randomized to treatment by the use of specific modality, but it was the surgeon who made final choice in the way that best served the patients' interests, and the choice itself was related to the adequate treatment modality, depending on the pathology-based substrate. Apart from the patient inclusion criteria for the study, the approximate mean initial VAS and ODI values provide similar indications for surgery. The similarity of frequency of disc herniation level, gender distribution and mean age in both groups additionally demonstrate the level of compatibility between the two patient groups. Finally, although the two group sizes were different, the MD group size (56 patients) was still large enough to give the study sufficient power to reach appropriate conclusions.

We have come to a conclusion that in terms of patient-rated outcomes, there appears to be no particular advantage of either technique for the operative treat-

ment since they both result in good overall outcome. In addition, there was no significant difference in the overall functional outcome after standard discectomy and microdiscectomy procedures. Bearing in mind the results obtained, along with a constant tendency in spine surgery towards developing minimally invasive techniques, an important concern has been raised regarding the justification of financing a plethora of the above mentioned tools for minimally invasive spinal surgery. Good overall long-term functional outcome in both groups imposes a conclusion that the surgeon should make decision to use a specific operative technique relating to whether he/she is adept in his/her own chosen method. However, we choose microdiscectomy over standard discectomy because it includes a significantly lower recurrent disc herniation rate and higher reduction of leg pain, as observed in the present study. In addition, one of the most obvious advantages of microdiscectomy is its superiority in teaching younger colleagues, for it provides a brief overview of insights into the neuroanatomy and pathologic substrate, which is not always possible to achieve when it comes to standard discectomy.

## References

- Gibson JN, Waddell AG. Surgical interventions for lumbar disc prolapse: updated Cochrane Review. *Spine*. 2007;32-16:1735-47. <http://dx.doi.org/10.1097/BRS.0b013e3180bc2431>
- Peul WC, van Houwelingen HC, van den Hout WB, Brand R, Eekhof JA, Tans JT, Thomeer RT, Koes BW. Surgery *versus* prolonged conservative treatment for sciatica. *N Engl J Med*. 2007;356:2245-56. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa064039>
- Mixter WJ, Barr JS. Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *N Engl J Med*. 1934;211:210-25. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM193408022110506>
- Caspar W. A new surgical procedure for lumbar disc herniation causing less tissue damage through a microsurgical approach. *Adv Neurosurg*. 1977;4:74-80. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-66578-3\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-66578-3_15)
- Yasargil MG. Microsurgical operation for herniated disc. *Adv Neurosurg*. 1977;4:81. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-66578-3\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-66578-3_16)
- Williams RW. Microlumbar discectomy: a conservative surgical approach to the virgin herniated lumbar disc. *Spine*. 1978;3-2:175-82.
- Day AL, Savage DF, Friedman WA, Sybert GW. Chemonucleolysis *versus* open discectomy: the case against chymopapain. *Clin Neurosurg*. 1986;33:385-96.
- Schenk B, Brouwer PA, Peul WC, van Buchem MA. Percutaneous laser disk decompression: a review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27:232-5.
- Schreiber A, Suezawa Y. Transdiscoscopic percutaneous nucleotomy in disk herniation. *Orthop Rev*. 1986;15:35-8.
- Shin DA, Kim KN, Shin HC, Yoon DH. The efficacy of microendoscopic discectomy in reducing iatrogenic muscle injury. *J Neurosurg Spine*. 2008;8-1:39-43. <http://dx.doi.org/10.3171/SPI-08/01/039>
- Gempt J, Jonek M, Ringel F, Preuß A, Wolf P, Ryang Y. Long-term follow-up of standard microdiscectomy *versus* minimal access surgery for lumbar disc herniations. *Acta Neurochir*. 2013;155:2333-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-013-1901-z>
- Arts MP, Brand R, van den Akker ME, Koes BW, Bartels RH, Tan WF, Peul WC. Tubular discectomy *versus* conventional microdiscectomy for the treatment of lumbar disc herniation: two-year results of a double-blind randomised controlled trial. *Neurosurgery*. 2011;69:135-44. <http://dx.doi.org/10.1227/NEU.0b013e318214a98c>
- Andrew DW, Lavyne MH. Retrospective analysis of microsurgical and standard lumbar discectomy. *Spine*. 1990;15:329-35.
- Barrios C, Ahmed M, Arroategui J, Bjornsson A, Gillstrom P. Microsurgery *versus* standard removal of the herniated lumbar disc. A3-year comparison in 150 cases. *Acta Orthop Scand*. 1990;61:399-403.
- Sachdev VP. Lumbar discectomy under the operating microscope. *Mt Sinai J Med*. 1991;58:147-9.
- Katayama Y, Matsuyama Y, Yoshihara H, Sakai Y, Nakamura H, Nakashima S, Ito Z, Ishiguro N. Comparison of surgical outcomes between macrodiscectomy and microdiscectomy for lumbar disc herniation: a prospective randomized study with surgery performed by the same spine surgeon. *J Spinal Disord Tech*. 2006;19:344-7. <http://dx.doi.org/10.1097/01.bsd.0000211201.93125.1c>
- Henriksen L, Schmidt K, Eskesen V, Jantzen E. A controlled study of microsurgical *versus* standard lumbar discectomy. *Br J Neurosurg*. 1996;10:289-93.
- Fairbank JC, Pynsent PB. The Oswestry Disability Index. *Spine*. 2000;25-22:2940-52.
- Meredith DS, Huang RC, Nguyen J, Lyman S. Obesity increases the risk of recurrent herniated nucleus pulposus after lumbar microdiscectomy. *Spine J*. 2010;10-7:575-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2010.02.021>
- Kim Min Seok, Park Kun-Woo, Hwang Changju, Lee Young-Kyun, Koo Ki Hyoung, Chang Bong-Soon, Lee Choon-Ki, Lee Dong-Ho. Recurrence rate of lumbar disc herniation after open discectomy in active young men. *Spine*. 2009;34-1:24-9. <http://dx.doi.org/10.1097/BRS.0b013e31818f9116>
- Thomé C, Barth M, Scharf J, Schmiedek P. Outcome after lumbar sequestrectomy compared with microdiscectomy: a prospective randomized study. *J Neurosurg Spine*. 2005;2-3:271-8. <http://dx.doi.org/10.3171/spi.2005.2.3.0271>

22. Vukas D, Ledić D, Grahovac G, Kolić Z, Rotim K, Vilendečić M. Clinical outcomes in patients after lumbar disk surgery with annular reinforcement device: two-year follow up. *Acta Clin Croat.* 2013;52-1:87-91.
23. Kim, Chi Heon; Chung, Chun Kee; Park, ChoonSeon; Choi, Boram; Kim, Min Jung; Park, ByungJoo. Reoperation rate after surgery for lumbar herniated intervertebral disc disease: Nationwide Cohort Study. *Spine.* 2013;38-7:581-90. <http://dx.doi.org/10.1097/BRS.0b013e318274f9a7>
24. Tureyen K. One-level one-sided lumbar disc surgery with and without microscopic assistance: 1-year outcome in 114 consecutive patients. *J Neurosurg.* 2003;99:247-50.
25. Veresciagina K, Spakauskas B, Vytautas Ambrozaitis K. Clinical outcomes of patients with lumbar disc herniation, selected for one-level open-discectomy and microdiscectomy. *Eur Spine J.* 2010;19-9:1450-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-010-1431-9>
26. Porchet F, Bartanusz V, Kleinstueck FS, Lattig F, Jeszenszky D, Grob D, Mannion AF. Microdiscectomy compared with standard discectomy: an old problem revisited with new outcome measures within the framework of a spine surgical registry. *Eur Spine J.* 2009;18(Suppl3):S360-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-009-0917-9>
27. Kahanovitz N, Viola K, Muculloch J. Limited surgical discectomy and microdiscectomy: a clinical comparison. *Spine.* 1989;14-1:79-81.
28. Wolfhard C, Campbell B, Barbier D, Kretschmmer R, Yechiel G. The Caspar microsurgical discectomy and comparison with a conventional standard lumbar disc procedure. *Neurosurgery.* 1991;28-1:78-86.

## Sažetak

STANDARDNA LUMBALNA DISKEKTOMIJA NASUPROT MIKRODISKEKTOMIJI  
– RAZLIKE U ISHODU LIJEČENJA I STOPI REOPERACIJE

V. Kovačević, N. Jovanović, M. Miletić-Kovačević, R. Nikolić, M. Peulić, K. Rotim, T. Sajko i L. Rasulić

Mikrodiskektomija (MD) je danas prihvaćena kao operativna metoda izbora u liječenju lumbalne diskus hernije, ali se neurokirurzi nerijetko odlučuju za standardnu diskektomiju (SD) koja ne podrazumijeva upotrebu operativnog mikroskopa. U našoj studiji smo nastojali uočiti razlike vezano za rekurentnu diskus herniju i funkcionalni ishod kirurškog liječenja lumbalne diskus hernije uz uporabu operativnog mikroskopa i bez nje. Naša studija je uključila 167 bolesnika koji su podvrgnuti operaciji lumbalne diskus hernije tijekom trogodišnjeg razdoblja (SD, n=111 i MD, n=56). Ishod liječenja procjenjivao se pomoću upitnika koji su bolesnici ispunjavali u tri vremenske točke. Vrijeme trajanja operacije, dužina hospitalizacije i reoperacije su također bilježeni. Nakon godinu dana praćenja prema našim rezultatima nije bilo statistički značajne razlike između skupina SD i MD u funkcionalnom ishodu liječenja, ali je zabilježena statistički značajna razlika u smanjenju boli u nozi u korist skupine MD. Prema učestalosti reoperacija s prosječnim razdobljem praćenja od 33,4 mjeseca, utvrđena je statistički značajna razlika u korist skupine MD (SD, 6,3% i MD, 3,2%). Nijednoj operativnoj tehnici ne može se dati prednost u smislu funkcionalnog ishoda liječenja, jer obje daju odlične rezultate. Ipak, naš izbor je mikrodiskektomija zbog niže stope rekurentne diskus hernije i višeg stupnja smanjenja boli u nozi.

Ključne riječi: *Mikrodiskektomija; Standardna diskektomija; Ishod liječenja; Reoperacija*

## The mineral content of the hard dental tissue of mesiodens

Sanja Tanaskovic-Stankovic<sup>a</sup>, Irena Tanaskovic<sup>a</sup>, Nemanja Jovicic<sup>a</sup>, Marina Miletic-Kovacevic<sup>a</sup>, Tatjana Kanjevac<sup>b</sup>,  
Zoran Milosavljevic<sup>a</sup>

**Objective.** Mesiodens is the most common form of supernumerary tooth mainly located between the maxillary central incisors. Its etiology is not completely understood but both genetic and environmental factors are assumed. The degree of mineralization and inorganic element content in hard tooth tissues is poorly understood as well as is the durability and suitability for allo- and auto-transplantation. Therefore aim of this study was to examine the content of inorganic elements.

**Materials and Methods.** This study included 26 mesiodens teeth and 26 normal central incisor teeth as controls. All specimens were prepared for SEM/EDS analysis which was aimed at specific sites on the enamel, dentine and cementum in order to evaluate the weight percentage and ratio of important inorganic elements.

**Results and Conclusion.** The results showed that there was a difference in the weight percentage of selected inorganic elements (calcium, phosphorus, oxygen, carbon, magnesium and sodium) in all three types of dental hard tissues but the differences were mostly expressed in the cementum tissue. The statistical analysis showed that the differences were marginally significant especially for calcium and phosphorus values and ratio in the enamel and dentine. The carbon and magnesium content in all three hard tissues showed the most differences, but overall, the hard tissues mineral content of the mesiodens did not differ significantly from healthy teeth.

**Key words:** mesiodens, elemental composition, dentin, enamel, cementum

Received: March 16, 2018; Accepted: April 4, 2018; Available online: May 15, 2018  
<https://doi.org/10.5507/bp.2018.017>

<sup>a</sup>Institute for Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup>Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia  
Corresponding author: Zoran Milosavljevic, e-mail: zormil67@medf.kg.ac.rs

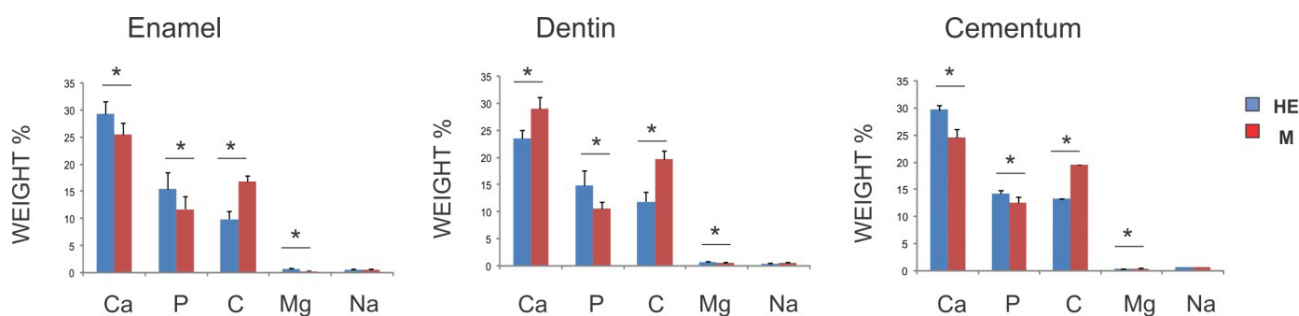
### INTRODUCTION

Tooth development is a complex process of mineralization of connective tissues that depends on various genetic control mechanisms and biochemical cellular reactions. Supernumerary teeth have become interesting to clinicians and researchers in last decade due to their auto- and allo-transplantation potential as well as a good source of stem cells<sup>1-3</sup>. The overall prevalence of the supernumerary tooth in permanent dentition is from 1.5–3.5% and mesiodens contribute around 80% of cases (ref.<sup>4</sup>). Mesiodens is the most common form of the supernumerary tooth mainly located just between the maxillary central incisors<sup>5</sup>. Often the mesiodens has a typical appearance (conical shape) and with all morphological characteristics of the normal tooth, but it sometimes is atypical with altered form as a result of defective development from the remnants of the tooth bud<sup>6,7</sup>. Both, genetic and environmental, factors have been considered and several different theories such as the atavism, dichotomy theory and genetic syndromes have been suggested to explain the occurrence of the mesiodens<sup>8-10</sup>. Regardless of the reason, its development follows that of other normal permanent teeth, while its mineralization frequently occurs later than homologous teeth which means that inductive factors (stimuli) for mesiodens teeth are weaker and somewhat impaired<sup>11,12</sup>. A number of studies have shown that the normal tooth possess calcium (Ca), phosphorus (P), and

oxygen (O), as indicated by the formula for hydroxyapatite (HAP), also carbon (C), magnesium (Mg), sodium (Na), as well as several trace elements<sup>13-15</sup>. On the other hand, a survey of the literature related to the mineral content of the supernumerary teeth as well as mesiodens provided no results. Given that, the degree of mineralization, ratio of inorganic elements as well as the presence of trace elements in hard dental tissues of the mesiodens are important facts when susceptibility to tooth decay and erosion are evaluated, the aim of our study was to examine the mineral content of the enamel, dentin and cementum of the mesiodens.

### MATERIAL AND METHODS

All procedures in the study were approved by the Ethics Committee. The study included 26 mesiodens teeth and 26 central incisor teeth. All specimens were obtained from different patients. Clinical diagnosis of the mesiodens was confirmed with X-ray imaging and these teeth, extracted for esthetic or orthodontic reasons, were used as the experimental group, while the control group consisted of central incisor teeth extracted for orthodontic reasons. Teeth from both groups were from the permanent dentition, from healthy patients of both sexes without caries, periapical granulomas and orthodontic treatment. Patients were 25–50 years of age from whom we received



**Fig. 1.** Distribution of basic chemical elements in healthy and mesiodens enamel, dentine and cementum in weight percentage. HE- healthy teeth; M-mesiodens; (\*)-significantly

written consent to participate in the study and who had previously been fully informed, orally and in writing, about the aims of the study. During the initial preparation of samples, the teeth were cut into a lingual and labial part and separated using a diamond disc with constant cooling at the speed of 6000 rev/min. The surface of the obtained parts was first polished with fine silicon carbide paper and then with diamond paste. Diamond polishing was essential to remove the debris and to obtain glossy surfaces needed for a quantitative chemical analysis. The enamel surface of each tooth was polished for 5 min with a rubber cup mounted at a low-speed hand piece (KaVo, Biberach, Germany) and under constant deionized water irrigation in order to remove the remnants of the carbide paper. Abrasive substances were not used. Finally, the teeth were rinsed again in an ultrasonic bath before storing them in labeled plastic tubes with 10% formalin solution for 3 days for further analysis. Although fixing solution for a prolonged period could affect the mineral composition of the teeth, in our experiment the fixation period was too short to manifest that effect.

#### Energy dispersive spectrometry (EDS) analysis

Energy dispersive spectrometry is a specific method for determining the concentration of chemical elements in the substratum. Samples for the EDS analysis were previously cleaned by ethanol and kept in an ultrasonic bath for a several minutes and then air dried. The samples were then fixed on a holder with carbon paste (to the bottom of the specimens) and gold vapor was applied, so that the surface would be electron transparent for the penetrating electron beam. Such samples were then analyzed with scanning electron microscope equipped with energy-dispersive system for EDS analyses. The analysis of the chemical elements of the enamel, dentin and cementum was performed in the Laboratory for Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive Spectrometry (SEM-EDS) Surface of the specimens was examined by means of a scanning electron microscope (SEM) type JEOL JSM-6610LV at 20 kV. Relative amounts of the measured chemical elements were calculated using Energy-Dispersive System-EDS, model XMax Large Area Analytical Silicon Drift connected with INCA Energy 350 Microanalysis System, with the detection limit of 0.1 mass percentages and resolution of 126 eV. Optimal magnification was set on 500. The SEM/EDS analysis was directed to specific regions of the teeth: for the enamel the three sites selected

were (the surface, 0,5mm below the surface and 0.5 mm distal from the dentin-enamel junction). For dentin crown and root parts were selected and for cementum 0,1mm from the root apex. In order to assure the same location of analysis for all the specimens, selection of every line of interest was performed by aiming the EDS X-ray at the exact same distance from the marker point (e.g. tooth surface, enamel-dentin junction and root apex) on the low-power microscopic image of the examined tooth.

#### Statistics

Quantitative analysis of the distribution of chemical elements in enamel, dentin and cementum were done by applying "dotted" analysis at a previously determined line of analysis. The chemical and elemental composition of each tooth samples were tested for normal distribution (Gaussian distribution) using the Shapiro-Wilk test. The following were used to process the: Mann-Whitney U-test, Student t-test and  $\chi^2$  test. The level of significance was set as ( $P < 0.05$ ). The results are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). For statistical analysis SPSS, IBM Analytics, USA software, version 22.0 was used.

## RESULTS

Results of the comparative quantitative analysis of the basic chemical elements (plus oxygen whose content had been calculated by stoichiometric calculations) in hard tissues of the healthy teeth and mesiodens are displayed in Table 1.

#### Enamel analysis

Analysis of healthy enamel showed that the mean value of Ca concentration was 29.33 wt% whereas the mean value of calcium concentration in mesiodens enamel was 25.59 wt%. It was observed that the concentration of calcium was significantly higher in healthy enamel compared to mesiodens enamel ( $P < 0.05$ ). The mean value of phosphorus concentration in the enamel of the teeth from the control group was 15.46 wt% and in mesiodens enamel 11.78 wt%. Carbon concentration was statistically significantly higher in mesiodens enamel compared to healthy enamel ( $P < 0.05$ ). Regional distribution of the carbon showed that the concentration of this element sharply decreased from the dentin-enamel border towards the surface (Table 2). The mean value of magnesium



**Table 1.** EDS results from enamel, dentine and cementum.

ELEMENT	ENAMEL		DENTIN		CEMENTUM	
	HE	M	HE	M	HE	M
Calcium (%)	29.33 ± 2.33	25.59 ± 2.01	23.55 ± 1.55	29.10 ± 2.03	29.62 ± 1.44	24.54 ± 1.51
Phosphorus (%)	15.46 ± 3.04	11.78 ± 2.26	14.94 ± 2.62	10.59 ± 1.26	14.17 ± 0.87	12.47 ± 1.60
Carbon (%)	9.95 ± 1.40	20.64 ± 2.18	11.93 ± 1.76	19.78 ± 1.52	13.21 ± 0.71	19.50 ± 1.10
Oxygen (%)	44.48 ± 1.95	44.15 ± 2.10	48.15 ± 2.59	39.33 ± 2.64	41.96 ± 1.02	42.28 ± 1.89
Magnesium (%)	0.72 ± 0.16	0.35 ± 0.12	0.76 ± 0.14	0.60 ± 0.11	0.28 ± 0.06	0.34 ± 0.12
Sodium (%)	0.58 ± 0.10	0.61 ± 0.11	0.48 ± 0.07	0.59 ± 0.10	0.68 ± 0.12	0.62 ± 0.21
Ca/P ratio	1.97 ± 0.55	2.26 ± 0.50	1.63 ± 0.35	2.78 ± 0.38	2.10 ± 0.19	2.00 ± 0.30
Ca/C ratio	3.02 ± 0.49	1.53 ± 0.15	2.23 ± 0.37	1.48 ± 0.17	2.25 ± 0.21	1.26 ± 0.12

Data in weight %. HE - healthy teeth group; M - mesiodens teeth group

concentration in enamel of the teeth from the control group was 0.72 wt% and in mesiodens enamel 0.35 wt%. Magnesium concentration was statistically significantly higher in healthy enamel compared to mesiodens enamel ( $P < 0.05$ ). The mean value of sodium concentration in healthy enamel was 0.58 wt% and in mesiodens enamel 0.61 wt%. There was no statistically significant difference between the concentration of sodium in healthy enamel compared to mesiodens enamel ( $P > 0.05$ ). When the concentration of calcium and phosphorus was considered, the experimental and control group of were significantly different, as well as carbon in enamel ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1).

The ratio of calcium and phosphorus concentration in healthy enamel was 1.97:1, whereas this ratio in mesiodens enamel was 2.26:1. Analysis of the ratio of calcium and carbon concentration in healthy enamel was 3.02:1 and the ratio of calcium and carbon concentration in mesiodens enamel was 1.53:1. Healthy and mesiodens enamel did not differ significantly in terms of statistics considering the ratio of calcium and phosphorus concentration ( $P = 0.083$ ), whereas the ratio of calcium and carbon concentration was statistically significantly higher in healthy enamel compared to mesiodens enamel ( $P = 0.000$ ) (Table 1).

### Dentine analysis

Analysis of healthy dentine showed that the mean value of Ca concentration was 23.55 wt% whereas the mean value of calcium concentration in mesiodens dentine was 29.10 wt%. It is shown that the concentration of calcium was significantly higher in mesiodens dentine compared to healthy dentin ( $P < 0.05$ ). The mean value of phosphorus concentration in healthy dentine was 14.94 wt% and in mesiodens dentine 10.59 wt%. Phosphorus concentration was statistically significantly higher in healthy dentin compared to mesiodens dentine ( $P < 0.05$ ). The mean value of carbon concentration in healthy dentine was 11.93 wt% and in mesiodens dentine 19.78 wt%. Carbon concentration was statistically significantly higher in mesiodens dentine compared to healthy dentine ( $P < 0.05$ ). The mean value of magnesium concentration in healthy dentine was 0.76 wt% and in mesiodens dentine 0.60 wt%. Magnesium concentration was statistically significantly higher in healthy dentine compared to mesiodens dentine ( $P < 0.05$ ). The mean value of sodium

**Table 2.** Carbon content in wt% in different zone of enamel of healthy and mesiodens teeth.

Zone of enamel	Carbon (weight %)	
	Healthy teeth	Mesiodens teeth
Close to DEJ	14.10 ± 1.83	39.20 ± 3.64
Middle zone	9.12 ± 1.36	15.58 ± 1.94
Surface zone	6.63 ± 1.01	7.14 ± 1.14
Mean±SD	9.95 ± 1.40	20.64 ± 2.18

concentration in healthy dentine was 0.48 wt% and in mesiodens dentine 0.59 wt%. Sodium concentration was not significantly higher in mesiodens dentine compared to healthy dentin ( $P > 0.05$ ). The concentration of dentine calcium, phosphorus and carbon was significantly different between groups ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1).

The ratio of calcium and phosphorus concentration in the dentine of the teeth from the control group was 1.63:1, whereas the ratio of calcium and phosphorus concentration in mesiodens dentine was 2.78:1. Analysis of the ratio of calcium and carbon concentration in healthy dentine was 2.23:1, and the ratio of calcium and carbon concentration in mesiodens dentine was 1.48:1. Healthy and mesiodens dentine were statistically significantly different for ratio of calcium and phosphorus concentration ( $P < 0.05$ ). The ratio of calcium and phosphorus concentration was statistically significantly higher in mesiodens dentine compared to healthy dentine. The ratio of calcium and carbon concentration was statistically significantly higher in healthy dentine ( $P < 0.05$ ) (Table 1).

### Cementum analysis

Chemical elements analysis of healthy cementum showed that the mean value of Ca concentration was 29.62 wt% whereas the mean value of calcium concentration in mesiodens cementum was 24.54 wt%. We observed that the concentration of calcium was significantly higher in healthy cementum compared to mesiodens cementum ( $P < 0.05$ ). The mean value of phosphorus concentration in healthy cementum was 14.17 wt% while in mesiodens cementum was 12.47 wt%. Phosphorus concentration was statistically significantly higher in healthy cementum compared to mesiodens cementum ( $P < 0.05$ ). The mean value of carbon concentration in healthy cementum was 13.21 wt% and in mesiodens cementum 19.50 wt%.

Carbon concentration was statistically significantly higher in mesiodens cementum compared to healthy cementum ( $P < 0.05$ ). The mean value of magnesium concentration in healthy cementum was 0.28 wt% while in mesiodens cementum was 0.34 wt%. Magnesium concentration was statistically significantly higher in mesiodens cementum compared to healthy cementum ( $P < 0.05$ ). The mean value of sodium concentration in healthy cementum was 0.68 wt% and in mesiodens cementum 0.62 wt%. There was no statistically significant difference between the concentration of sodium in healthy cementum compared to mesiodens cementum ( $P > 0.05$ ). The cementum levels of Ca, P and C were statistically significant between groups ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1).

Ratio of calcium and phosphorus concentration in healthy cementum was 2.10:1, whereas the ratio of calcium and phosphorus concentration in mesiodens cementum was 1.96:1. Analysis of the ratio of calcium and carbon concentration in healthy cementum was 2.25:1, and the ratio of calcium and carbon concentration in mesiodens cementum was 1.26:1. Healthy and mesiodens cementum did not differ significantly for calcium and phosphorus concentration ( $P > 0.05$ ), whereas the ratio of calcium and carbon concentration was statistically significantly higher in healthy cementum compared to mesiodens cementum ( $P < 0.05$ ) (Table 1).

## DISCUSSION

Scientific and clinical interest in supernumerary teeth and mesiodens has risen sharply in the last decade mostly due to reports in which researchers showed their successful clinical use in auto- and allo-transplantation procedures and identified these teeth as a good source of stem cells<sup>1-3</sup>. Previously, supernumerary teeth were considered mostly as an orthodontic and esthetic problem. Clinical utilization of these teeth in transplantation procedures potentiates the importance of the quality and durability of the hard dental tissues, especially in terms of their mineral content. In the available literature a number of the studies have been published on epidemiology, etiology and clinical manifestations associated with supernumerary teeth and mesiodens, but not on inorganic content<sup>5,8</sup>. In our study, the results showed that the concentration of calcium and phosphorus is higher in healthy enamel and cementum compared to mesiodens while in the dentine the calcium is higher, but phosphorus is lower. Nevertheless, overall the in incisors are very similar which is in correlation with the previous findings<sup>16,17</sup>. It is well known that when enamel ratio of Ca/P is under 1,33 the tooth is more susceptible to decay, but in our investigation neither normal incisors, nor the mesiodens belong to that category<sup>18,19</sup>. Our results showed a significant different in carbon content between groups. Analysis of the carbon concentration shows that the values are significantly higher in mesiodens enamel compared to healthy teeth, but regional distribution shows that concentration of mesiodens carbon abruptly decreases from the DEJ to the surface (with end-value very near to the normal teeth) which is

in correlation to the previous findings<sup>7,20</sup>. This increased carbon presence in mesiodens is the result of persistence of remains of organic matter, probably due to alteration in maturation during which proteins are reabsorbed<sup>21</sup>. Bozal et al.<sup>21</sup> and Jalevik et al.<sup>22</sup> reported that decreased carbonate content strengthens the enamel. Crombie et al.<sup>23</sup> claim that carbonate is a substitute for the phosphate group in the HAP. Normal or lower carbon concentration contributes to enamel hardness. One more conclusion is that mesiodens is not susceptible to accelerated decay although there are no comprehensive data on the incidence of the mesiodens caries<sup>24-26</sup>. In relation to the Mg differences found, magnesium is "trace" element that is absorbed, but not incorporated into the hydroxyapatite structure. Our results showed significantly (twice) lower amounts of magnesium in mesiodens enamel compared to normal teeth. Wychowański et al.<sup>27</sup>, suggest that magnesium is detrimental to enamel due to increased susceptibility to acid influence. We conclude that lower mesiodens enamel magnesium content in fact contributes to its resistance. This study showed increased calcium and decreased phosphorus content so the ratio of these elements is markedly in favor of calcium (up to 2.78:1). Our findings are in correlation with the report of Akgun et al.<sup>17</sup> who found that mesiodens dentine is more calcified than normal dentine although exact values are at variance. On this matter we managed to find one very short report of Caihong et al.<sup>28</sup> who stated the opposite, but our sample was larger. The dentinal Ca/C ratio examination in our study showed that this ratio is lower in mesiodens than in healthy teeth, but the total amount of these elements was in fact increased. This is important because some authors claim that the very low carbon content in dentine may reduce its ability to withstand the mechanical pressure from the enamel, to become brittle and develop micro-cracks<sup>29,30</sup>. In a conclusion we can state that our study showed that, although there are some differences in overall mineral content and the ratio of the important inorganic elements of the hard tissues of the mesiodens and normal incisors, these differences are not highly significant. Therefore, auto- and allo-transplantation of mesiodens is valid given that durability is similar to normal teeth.

**Acknowledgement:** This research was supported by JP 02/17 of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

**Author contributions:** All authors participated in gathering information and samples for the work, design of experiment, review of the literature, writing, statistical analysis and manuscript revision.

**Conflict of interest statement:** The authors declare there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## REFERENCES

1. Tirali R, Sar C, Ates U, Kizilkaya M, Cehreli B. Autotransplantation of a supernumerary tooth to replace a misaligned incisor with abnormal dimensions and morphology: 2-year follow-up. Case Rep Dent 2013;2013:1-5. doi: 10.1155/2013/146343

2. Pai SM, Patil PS, Poornima P, Subbareddy VV. Mesiodens used for alio-transplantation. *Eur J Gen Dent* 2013;2:178-81. doi: 10.4103/2278-9626.112324
3. Lee S, An S, Kang TH, Kim KH, Chang NH, Kang S, Kwak CK, Park HS. Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med* 2011;6(6):689-99. doi: 10.2217/rme.11.95
4. Marinelli A, Giuntini V, Franchi L, Tollaro I, Baccetti T, Defraia E. Dental anomalies in the primary dentition and their repetition in the permanent dentition: a diagnostic performance study. *Odontology* 2012;100:22-7. doi: 10.1007/s10266-011-0021-6
5. Minguez-Martinez I, Ata-Ali J, Bonet-Coloma C, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago MA, Minguez-Sanz JM. Management and outcome following extraction of 303 supernumerary teeth in pediatric patients. *Pediatr Dent* 2012;34:136-9.
6. Subasioglu A, Savas S, Kucukyilmaz E, Kesim S, Yagci A, Dundar M. Genetic background of supernumerary teeth. *Eur J Dent* 2015;9(1):153-8. doi: 10.4103/1305-7456.149670
7. Torabinejad M, Walton RE. *Endodontics: Principles and Practice* 5th St. Louis, Missouri: Elsevier 2015.
8. Ata-Ali F, Ata-Ali J, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Prevalence, etiology, diagnosis, treatment and complications of supernumerary teeth. *J ClinExp Dent* 2014;6(4):e414-8. doi: 10.4317/jced.51499
9. Wang XP, Fan J. Molecular genetics of supernumerary tooth formation. *Genesis* 2011;49(4):261-77. doi: 10.1002/dvg.20715
10. Subasioglu A, Savas S, Kucukyilmaz E, Kesim S, Yagci A, Dundar M. Genetic background of supernumerary teeth. *Eur J Dent* 2015;9(1):153-8. doi: 10.4103/1305-7456.149670
11. Roberto Pippi. Odontomas and Supernumerary Teeth: Is There a Common Origin? *Int J Med Sci* 2014;11(12):1282-97. doi: 10.7150/ijms.10501
12. MonishaPKhatri, Samuel V. Overview of mesiodens – A review. *Int J Pharm Bio Sci* 2014; 5(2):526-39.
13. Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Toledo SD, Junior FH. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci* 2005;4(12):651-8. doi: 10.20396/bjos.v4i12.8641790
14. Fagrell TG, Dietz W, Jälevik B, Norén JG. Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta Odontol Scand* 2010;68(4):215-22. doi: 10.3109/00016351003752395
15. Cakir FY, Korkmaz Y, Firat E, Oztas SS, Gurgan S. Chemical Analysis of Enamel and Dentin Following the Application of Three Different At-home Bleaching Systems. *Operative Dentistry* 2011;36(5):529-36. doi: 10.2341/11-050-L
16. Arnold WH, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Ann Anat* 2007;189(2):183-90. doi: 10.1016/j.aanat.2006.09.008
17. Akgun OM, Bayari SH, Ide S, Polat GG, Kalkhoran IO. Micro- and Nanoscale Structures of Mesiodens Dentin: Combined Study of FTIR and SAXS/WAXS Techniques. *Microsc Res Tech* 2015;78(1):52-8. doi: 10.1002/jemt.22444
18. Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Ortiz-López J, Arzate H. X-Ray Microanalysis of Human Cementum. *Microsc. Microanal* 2005;11:313-8. doi: 10.1017/S1431927605050221
19. Gutiérrez-Salazar MP, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research* 2003;6(3):367-73. doi: 10.1590/S1516-14392003000300011
20. Spizzirri PG, Cochrane NJ, Praver S, Reynolds EC. A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy. *Caries Res* 2012;46(4):353-60. doi: 10.1159/000337398
21. Bozal CB, Kaplan A, Ortolani A, Cortese GS, Biondi MA. Ultrastructure of the surface of dental enamel with molar incisor hypomineralization with and without acid etching. *Acta Odontol Latinoam* 2015;28(2):192-8. doi: 10.1590/S1852-48342015000200016
22. Jalevik B, Noren JG. Enamel hypomineralization of permanent first molars: A morphological study and survey of possible aetiological factors. *Int J Paediatr Dent* 2000;10(4):278-89. doi: 10.1046/j.1365-263x.2000.00210
23. Crombie FA, Manton DJ, Palamara JE, Zaluzniak I, Cochrane NJ, Reynolds EC. Characterisation of developmentally hypomineralised human enamel. *J Dent* 2013;41(7):611-8. doi: 10.1016/j.jdent.2013.05.002
24. Xu C, Reed R, Gorski PJ, Wang Y, Walker PM. The Distribution of Carbonate in Enamel and its Correlation with Structure and Mechanical Properties. *J Mater Sci* 2012;47(23):8035-43. doi: 10.1007/s10853-012-6693-7
25. Ippolitov AY, Ippolitov IY, Seredin P.V. Morphology of the human dental enamel. *Indian journal of dentistry* 2014;5(suppl):135-9. doi: 10.1016/j.ijid.2014.03.004
26. Amr AM, Fattah A, Helal I. Analysis of Trace Elements in Teeth by ICP-MS: Implications for Caries. *Journal of Physical Science* 2010;21(2):1-12.
27. Wychowański P, Wojtowicz A, Stawicka-Wychowańska R, Roszkowski W, Kalinowski E. Morphological Analysis of Dentin of the supernumerary and additional teeth. *Nowa Stomatologia* 2004;1:3-6.
28. Caihong Y, Lihong G, Yan G, Shuzhen P, Dengcheng W. Histology and morphology between supernumerary tooth and normal tooth. *Journal of Modern Stomatology* 2002;3:270-1.
29. Pavlova VT, Nesterov VA, Lubov A, Pavlova LA, Peshkova KE. Study of Mineral Composition and Morphology of Hard Tissue of Teeth in Patients with Thyroid Gland Pathology in Russia, Belgorod Region. *Research Journal of Medical Sciences* 2015;9(4):256-62. doi: 10.3923/rjmsci.2015.256.262
30. Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 2005;38:107-14. doi: 10.1016/j.vibspec.2005.02.015

# GALECTIN-3 DELETION ENHANCES VISCERAL ADIPOSE TISSUE INFLAMMATION AND DYSREGULATES GLUCOSE METABOLISM IN MICE ON A HIGH-FAT DIET

Ilija Jeftić<sup>1,2\*</sup>, Marina Miletic-Kovacevic<sup>1,3\*</sup>, Nemanja Jovicic<sup>1,3</sup>, Jelena Pantić<sup>1</sup>, Nebojsa Arsenijević<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukic<sup>1</sup>, Nada Pejnovic<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Institut za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

<sup>3</sup>Institut za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

\*Authors Ilija Jeftić and Marina Miletic-Kovacevic contributed equally to this study.

## DELECIJA GALEKTINA-3 POSPEŠUJE INFLAMACIJU U VISCERALNOM MASNOM TKIVU I NARUŠAVA HOMEOSTAZU GLUKOZE U MIŠEVA NA ISHRANI BOGATOJ MASTIMA

Ilija Jeftić<sup>1,2\*</sup>, Marina Miletić-Kovačević<sup>1,3\*</sup>, Nemanja Jovičić<sup>1,3</sup>, Jelena Pantić<sup>1</sup>, Nebojša Arsenijević<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukić<sup>1</sup>, Nada Pejnović<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centar za molekulske medicine i ispitivanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

<sup>2</sup>Institut za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

<sup>3</sup>Institut za histologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

\*Autori Ilija Jeftić i Marina Miletić-Kovačević su podjednako učestvovali u istraživanju.

Received / Prilmljen: 16. 02. 2016.

Accepted / Prihvaćen: 15. 03. 2016.

### ABSTRACT

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) constitute major health problems worldwide. Increased visceral adiposity enhances the risk of insulin resistance and type 2 diabetes. The mechanisms involved in obesity-associated chronic inflammation in metabolic tissues (metaflammation) that lead to insulin resistance and dysregulated glucose metabolism are incompletely defined. Galectin-3 (Gal-3), a  $\beta$ -galactoside-binding lectin, modulates immune/inflammatory responses and specifically binds to metabolic danger molecules. To dissect the role of Gal-3 in obesity and diabetes, Gal-3-deficient (LGALS3<sup>-/-</sup>) and wild-type (WT) C57Bl/6 male mice were placed on a high-fat diet (HFD, 60% kcal fat) or a standard chow diet (10% kcal fat) for 6 months and metabolic, histological and immunophenotypical analyses of the visceral adipose tissue were performed. HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice had higher body weights and more body weight gain, visceral adipose tissue (VAT), hyperglycaemia, hyperinsulinemia, insulin resistance and hyperlipidemia than diet-matched WT mice. Compared to WT mice, the enlarged VAT in obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice contained larger adipocytes. Additionally, we demonstrate enhanced inflammation in the VAT of LGALS3<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice. The VAT of LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD contained more numerous dendritic cells and proinflammatory F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and F4/80<sup>high</sup> macrophages. In contrast to WT mice, the numbers of CXCR3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were increased in the VAT of Gal-3-deficient mice after 6 months of high-fat feeding. We provide evidence that Gal-3 ablation results in enhanced HFD-induced adiposity, inflammation in the adipose tissue, insulin resistance and hyperglycaemia. Thus, Gal-3 represents an important regulator of obesity-associated immunometabolic alterations.

**Keywords:** Galectin-3, obesity, hyperglycaemia, insulin resistance, metaflammation

### SAŽETAK

Gojaznost i tip 2 diabetes mellitus (T2DM) predstavljaju veliki svetski zdravstveni problem. Uvećanje visceralnog masnog tkiva u gojaznosti je povezano sa većim rizikom za nastanak insulinske rezistencije i T2DM. Molekularni mehanizmi povezani sa hroničnom inflamacijom u metabolički aktivnim tkivima (metaflamacijom) u gojaznosti koji leže u osnovi insulinske rezistencije i narušene homeostaze glukoze nisu do kraja razjašnjeni. Galektin-3 je multifunkcionalni lektin sa značajnom ulogom u imunoregulaciji i metaflamaciji. Sa ciljem da se ispita uloga galektina-3 u nastanku gojaznosti i T2DM, galektin-3 deficijentni miševi (LGALS3<sup>-/-</sup>) i miševi divljeg soja (WT) stavljeni su na ishranu sa visokim sadržajem masti (60% kcal od masti) ili standardnu ishranu (10% kcal od masti) u trajanju od 6 meseci nakon čega su ispitivani metabolički parametri, morfologija visceralnog masnog tkiva i fenotipske karakteristike infiltrirajućih ćelija. LGALS3<sup>-/-</sup> miševi na ishrani sa visokim sadržajem masti imali su veću telesnu težinu, veću količinu visceralnog masnog tkiva, hiperglikemiju, hiperinsulinemiju, izraženiju insulinsku rezistenciju i hiperlipidemiju u poređenju sa WT miševima na istom režimu ishrane. Adipociti iz uvećanog visceralnog masnog tkiva LGALS3<sup>-/-</sup> miševa imali su veći dijametar u poređenju sa adipocitima u WT miševa. Izražena je veća zastupljenost dendritičnih ćelija, proinflammatory F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> i F4/80<sup>high</sup> makrofaga, CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocita u poređenju sa WT miševima na istom režimu ishrane. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu protektivnu ulogu galektina-3 u nastanku gojaznosti, insulinske rezistencije i T2DM.

**Cljučne reči:** Galektin-3, gojaznost, hiperglikemija, insulinska rezistencija, metaflamacija





## INTRODUCTION

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) constitute a major public health problem worldwide, particularly in developing countries (1). Obesity, mainly abdominal adiposity, is linked to various metabolic alterations that increase the risk for T2DM (2). T2DM is a metabolic disorder characterized by insulin resistance (IR) followed by pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction (3). Pancreatic  $\beta$ -cells normally compensate for obesity-associated reduced insulin sensitivity by secreting more insulin to maintain glucose homeostasis. Hyperinsulinemia occurs early in the disease progression and before the  $\beta$ -cell function becomes impaired, leading to late-stage (insulin-dependent) T2DM (4).

Obesity-induced diabetes is associated with low-grade inflammation in the visceral adipose tissue (VAT). Inflammation in the VAT plays an important role in metabolic abnormalities such as IR (5). Antigen-presenting cells, including dendritic cells (DCs) and macrophages, are increased in the VAT in obesity, where they potentiate both innate and adaptive immune/inflammatory responses. Numerous studies have shown the increased infiltration of the visceral adipose tissue by macrophages during obesity (6,7). Macrophages may be derived from blood monocytes and are classified as classically (M1) and alternatively (M2) activated macrophages (8). Recent studies have shown that macrophages are key cells that mediate obesity-induced metabolic abnormalities. In obesity, a shift from alternatively activated M2 to classically activated M1 macrophages, characterized by elevated F4/80, CD11b and CD11c expression, has been demonstrated (9,10). Moreover, the ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin-resistant animals (11). Adipocytes damaged by high lipid intake produce signals that promote a proinflammatory Type 1 immune response. The number of T cells is increased in the enlarged VAT during obesity in response to adipose tissue-specific factors (12). Adipose tissue-associated regulatory T cells (Tregs) protect against (13), while the recruitment of Type 1 CD4 and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes precedes, metabolic alterations in obesity (14,15). The chemokine receptor CXCR3 is highly expressed in activated T cells and is involved in the regulation of T cell trafficking and maturation. Additionally, it has been shown that CXCR3-positive cells play an important role in the modulation of obesity-induced visceral adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance (16).

Galectin-3 (Gal-3) is a  $\beta$ -galactoside-binding lectin that is expressed in different tissues and cells and plays an important role in obesity, T2DM and inflammation (17,18,19). Gal-3 regulates inflammation and adipogenesis, and this lectin is expressed in adipocytes and infiltrating immune cells in the adipose tissue (20). Additionally, Gal-3 regulates adipocyte cell proliferation and differentiation (21) and has a variety of regulatory roles in the innate and adaptive immune response, depending on the disease con-

ditions (18,22,23). However, the role of Gal-3 in type 2 diabetes remains incompletely understood. The Gal-3 levels are increased in the sera of obese subjects and negatively correlate with the levels of glycosylated haemoglobin (24). In contrast with these data, Okhura et al. reported that low serum Gal-3 levels are associated with insulin resistance and T2DM (25). However, controversial results have been reported regarding the effects of Gal-3 ablation in experimental models of diabetes. It has been shown that Gal-3-deficient mice were relatively resistant to diabetogenesis in streptozotocin-induced diabetes (26). On the other hand, Pejnovic et al. reported that obese Gal-3-deficient mice had enhanced adiposity, hyperglycaemia, hyperinsulinemia, IR and systemic inflammation in comparison with their diet-matched wild-type controls (18). Moreover, in a study by Peng et al. (27), Gal-3-null mice fed a HFD had increased adiposity and dysregulated glucose metabolism. In addition, the same authors found that young Gal-3-deficient mice fed a standard diet exhibit altered glucose homeostasis, thus suggesting the modulation of glucose metabolism and possibly  $\beta$ -cell function by Galectin-3 (Gal-3) independently of obesity and inflammation.

To investigate the role of Gal-3 in high-fat diet-induced obesity, we used Gal-3-deficient mice on a C57Bl/6 background. We examined inflammation in the visceral adipose tissue and metabolic abnormalities following long-term HFD exposure in Gal-3-deficient and wild type (WT) mice. We report here that Gal-3 deletion enhanced high-fat diet (HFD)-induced obesity and visceral adiposity, amplified inflammation in the visceral adipose tissue and led to dysregulated glucose metabolism characterized by hyperglycaemia and insulin resistance.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental mice and study design

Gal-3-deficient mice on a C57BL/6 background and their littermate controls were obtained from the University of California Davis (Davis, CA; by courtesy of D.K. Hsu and F.T. Liu) and accommodated in our animal facilities under standard laboratory conditions in a temperature-controlled environment with a 12 h light/darkness cycle. Male 2-month-old wild type (WT) and Gal-3-deficient (LGALS3<sup>-/-</sup>) mice were fed either normal chow or a 60% fat/kcal diet (Mucedola, Italy) *ad libitum*. After 6 months, the mice were sacrificed and blood samples and visceral adipose tissue were collected for analyses. All animal procedures were approved by the ethical committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Permit Number 01-2759/2).

### Body weight and glucose metabolism analyses

Body weights and fasting blood glucose levels were measured once per month and after 6 months on a standard or



HFD. The mice were fasted for 4 h, and their glucose levels (mmol/L) were determined using the Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The serum concentrations of total cholesterol and triacylglycerol were measured using the Olympus AU600 Chemistry Immuno Analyzer (Olympus, Tokyo, Japan) and the fasting insulin was measured using an Insulin ELISA kit (Alpco, Salem, NH, USA). The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula:  $HOMA-IR = [(Glucose\text{ mmol/L} \times Insulin\text{ mU/L})] / 22.5$ .

### Histological analysis of visceral adipose tissue

Visceral adipose tissue (VAT), including the epididymal, mesenteric and renal fat pads, was dissected and weighed as visceral fat content. After weighing, part of the epididymal fat was fixed in 10% buffered formalin. The mean adipocyte size of the visceral fat pad was determined by computer-assisted image analysis of paraffin-embedded adipose tissue sections (5  $\mu\text{m}$ ) stained with haematoxylin and eosin (H&E). The adipocyte size was measured from a total of 50 cells per mouse in three separate fields using a light microscope (BX51; Olympus) equipped with a digital camera and *ImageJ* software. Analyses were performed in a blinded fashion by two independent observers. The data are expressed as the mean adipocyte diameter ( $\mu\text{m}$ ) for each tissue in each animal.

### Isolation of visceral adipose tissue stromal vascular fraction cells

Total visceral adipose tissue (VAT) was subjected to the isolation of stromal vascular fraction (SVF) cells. Collagenase digestion (1 mg/ml collagenase type II and 2% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) was used to separate the SVF from the adipocytes of the VAT, as previously described (18). SVF was used for flow cytometric analysis, as described below.

### Flow cytometric analyses

Adipose tissue SVF cells were stained with the following fluorescence-tagged monoclonal antibodies: anti-mouse CD45, CD3, CD4, CXCR3, CD8, CD11b, Lineage cocktail (BD Biosciences, San Jose, CA), Sca-1, NK 1.1, F4/80 and CD11c (BioLegend, San Diego, CA) or isotype-matched controls (BD Biosciences). The cells were analysed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star).

### Statistical analyses

Statistical analysis was performed using SPSS 13.0. The data are presented as the means  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by an independent-sample Stu-

dent's t test and, where appropriate, a Mann-Whitney U test. Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Galectin-3 ablation accelerated HFD-induced obesity and obesity-related metabolic alterations

After 6 months, HFD increased the body weight and weight gain in both genotypes of mice, and these parameters were higher in HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in diet-matched WT mice (Fig. 1A). HFD feeding increased the visceral fat mass in both genotypes of mice, which was more pronounced in HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in diet-matched WT mice (Fig. 1B). The serum total cholesterol and triglyceride levels were significantly higher in obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 1C).

### Galectin-3 deletion modulates HFD-induced adipocyte morphology

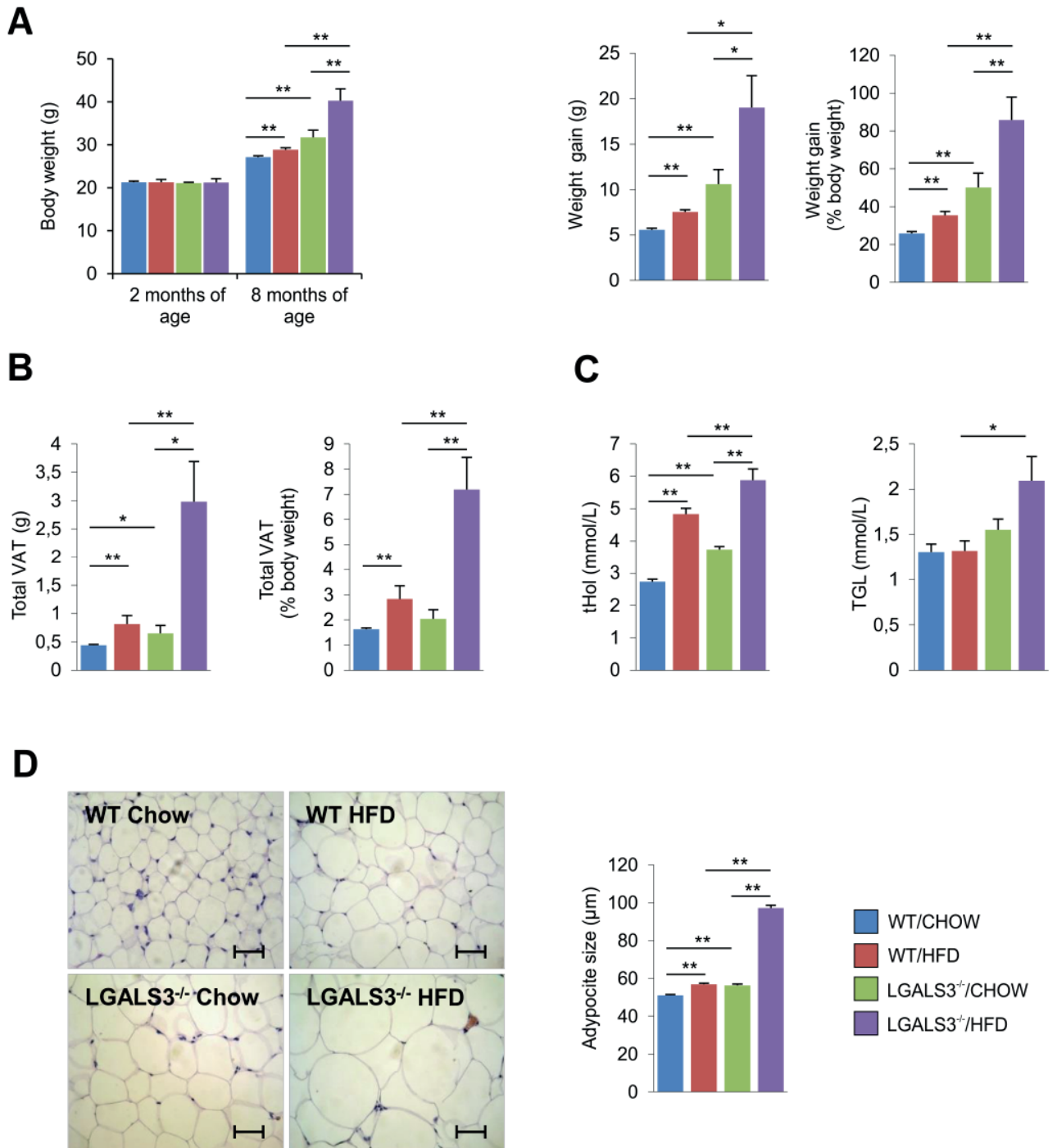
In view of the fact that Gal-3 is expressed in the adipose tissue and regulates adipocyte cell proliferation and differentiation, we analysed adipose tissue morphology and adipocyte size. The HFD significantly increased the adipocyte size in both genotypes of mice compared with mice on a standard diet. A significantly higher amount of total visceral adipose tissue was accompanied by larger adipocytes in LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a HFD than in diet-matched WT animals (Fig. 1D).

### Gal-3 ablation accelerated HFD-induced hyperglycaemia, hyperinsulinemia and obesity-associated insulin resistance

In addition to accelerated HFD-induced obesity, the fasting blood glucose, insulin and HOMA-IR were significantly higher in obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 2). Additionally, the fasting blood glucose levels, insulin and insulin resistance were significantly higher in LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice on a standard diet (Fig. 2).

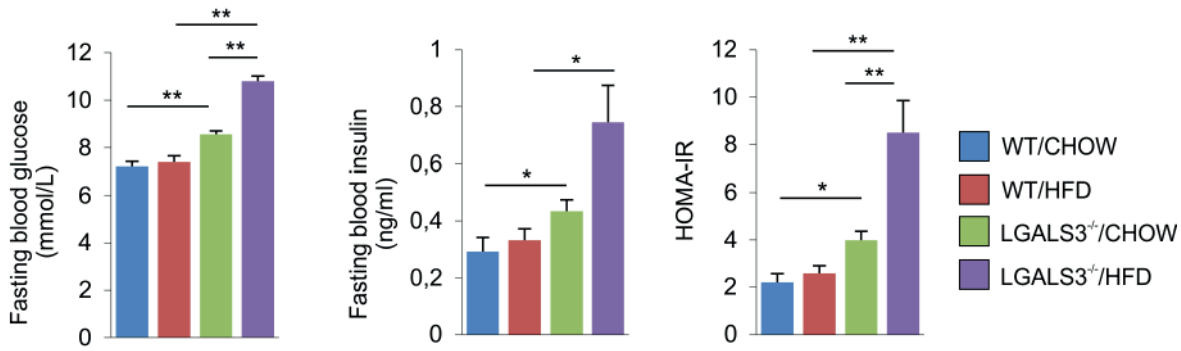
### Increased dendritic cells and proinflammatory macrophages in the VAT in LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a HFD

Because obesity-induced diabetes is strongly associated with adipose tissue inflammation, we first analysed the innate immune cells in the visceral adipose tissue in both genotypes of mice after 6 months on a HFD. DCs and macrophages are known to be increased in the visceral adipose tissue during obesity. The VAT from HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice contained higher numbers of total CD11c<sup>+</sup> ( $p = 0.034$ ) and CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> ( $p = 0.043$ ) DCs than the VAT from HFD-fed WT mice (Fig. 3A). In addition, the subsets of mature proinflammatory F4/80<sup>hi</sup> ( $p = 0.034$ ) and triple-pos-



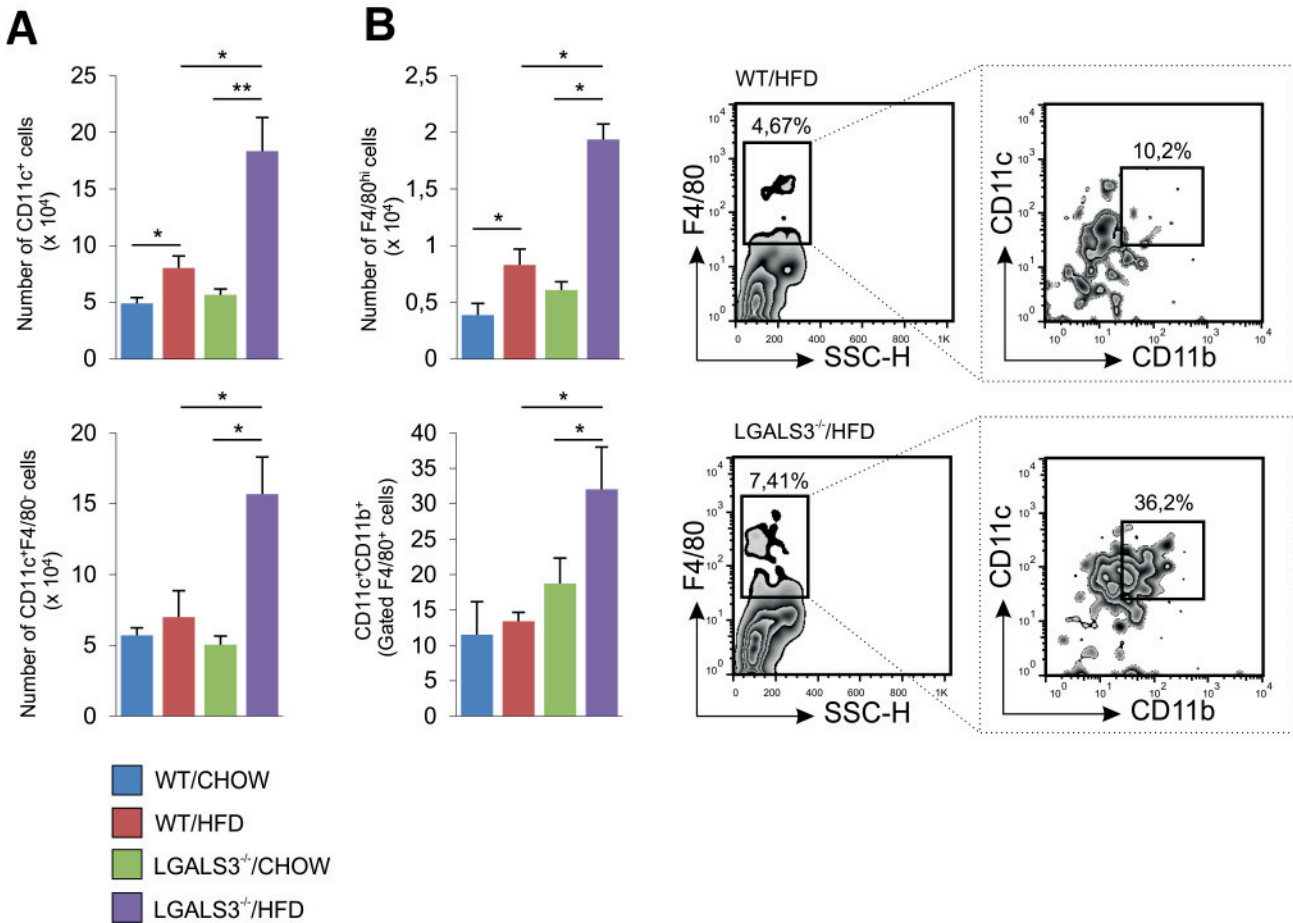
**Figure 1. Galectin-3 ablation accelerated HFD-induced obesity and adipocyte hypertrophy**

Male 2-month-old wild type (WT) and Gal-3-deficient (LGALS3<sup>-/-</sup>) mice were fed either standard chow or a HFD *ad libitum* for 6 months. Metabolic parameters after 6 months on the HFD or standard diet are shown. (A) Body weight and weight gain were higher in HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in diet-matched WT mice. (B) Total VAT and visceral fat mass (% body weight) were significantly higher in LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD than in diet-matched WT animals. (C) Serum lipid levels were significantly higher in obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice. (D) Representative images depicting the larger adipocyte size in LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a HFD than in diet-matched WT animals (original magnification 40x, scale bar = 50 μm). The results are shown as the means ± SEM (n=5-6 mice/group), \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Figure 2. Galectin-3 ablation accelerated HFD-induced hyperglycaemia, insulinemia and insulin resistance**

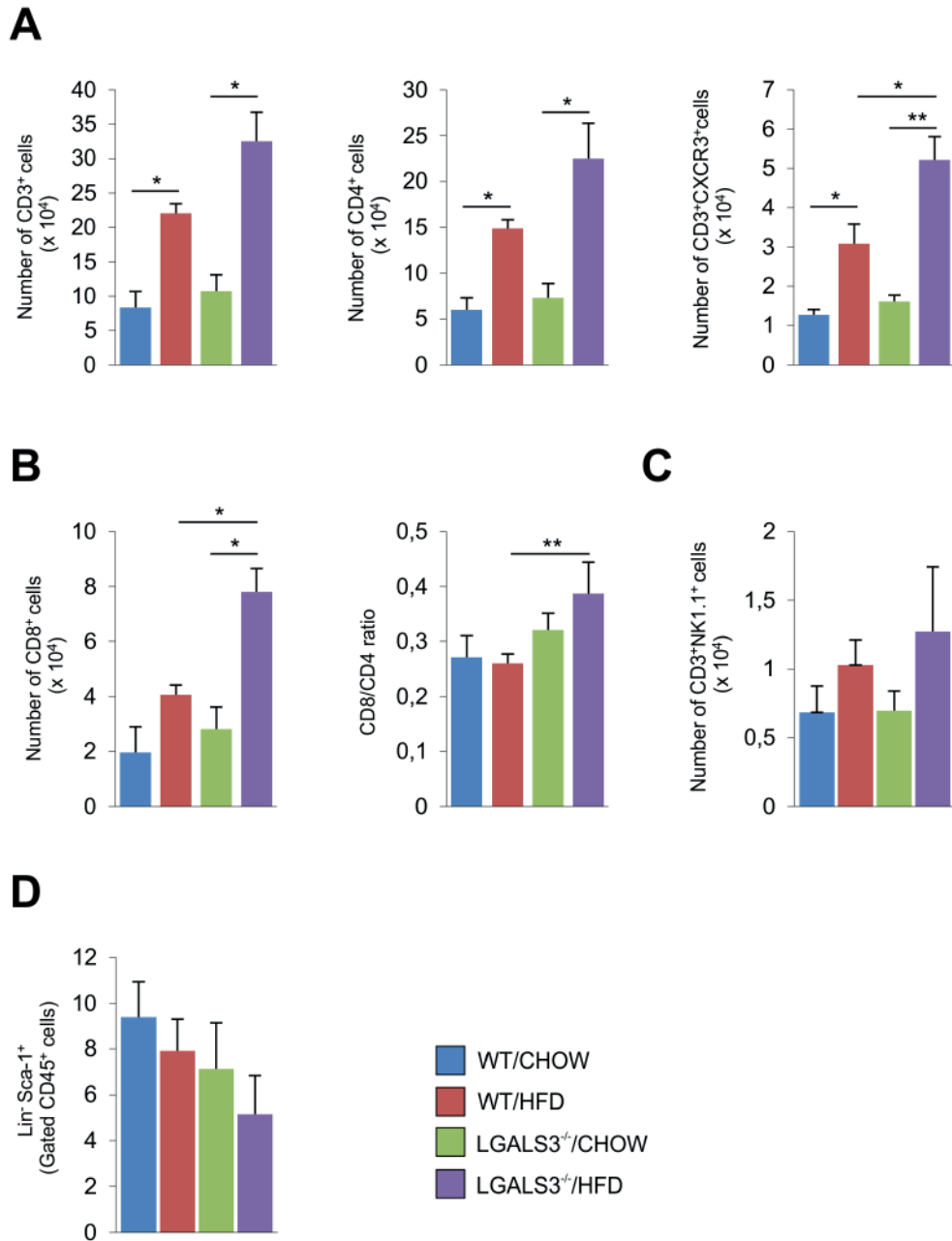
The fasting blood glucose, insulin and HOMA-IR were significantly higher in LGALS3<sup>-/+</sup> mice than in WT mice after 6 months on a HFD. The results are shown as the means ± SEM (n=5-6 mice/group), \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Figure 3. Increased dendritic cells and proinflammatory macrophages in the visceral adipose tissue of LGALS3<sup>-/+</sup> mice on a HFD**

Representative images and flow cytometric analysis of VAT stromal vascular fraction cells from WT and LGALS3<sup>-/+</sup> mice after 6 months on a HFD or standard diet. (A) Dendritic cell numbers were increased significantly in the VAT in obese LGALS3<sup>-/+</sup> mice. (B) Proinflammatory macrophages were significantly increased in LGALS3<sup>-/+</sup> mice fed a HFD compared with diet-matched WT mice. Representative FACS plots are shown. The results are shown as the means ± SEM (n=5-6 mice/group), \*P<0.05, \*\*P<0.01.





**Figure 4. Increased CXCR3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the visceral adipose tissue of LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a HFD**

Flow cytometric analysis of VAT stromal vascular fraction cells from WT and LGALS3<sup>-/-</sup> mice after 6 months on a HFD or standard diet. (A) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T lymphocytes in the VAT. (B) The number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the CD8/CD4 ratio were higher in Gal-3-deficient mice on a HFD than in diet-matched WT mice. (C) NKT lymphocytes in the VAT (D) Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> innate lymphoid cells in the VAT. The results are shown as the means ± SEM (n=5-6 mice/group), \*P<0.05, \*\*P<0.01.

itive F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> macrophages (p=0.034) were significantly higher in the VAT of obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 3B).

#### Increased CXCR3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the VAT in LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a HFD.

Increased Type 1 T cells and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in the VAT are hallmarks of obesity-induced diabetes and

are strongly associated with adipose tissue inflammation. Therefore, we performed phenotypic analyses of T lymphocytes in the visceral adipose tissue in both genotypes of mice after 6 months on a HFD.

The HFD significantly increased the number of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in both genotypes of mice compared with mice on a standard diet. There was no significant difference in the number of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells between the genotypes on a HFD (Fig. 4A). The HFD sig-



nificantly increased the number of CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T cells in both genotypes of mice compared with mice fed a standard diet. However, the number of CD3<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> cells ( $p=0.031$ ) was higher in the VAT from LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in the VAT from WT mice, both on a HFD (Fig. 4A). Moreover, the number of CD8<sup>+</sup> ( $p=0.034$ ) T lymphocytes and the CD8-to-CD4 ratio (Fig. 4B) were higher in LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD than in diet-matched WT mice ( $p=0.014$ ). There was no difference in the number of NKT cells (Fig. 4C) or the percentage of CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> innate lymphoid cells between the two genotypes of mice on both diets (Fig. 4D).

## DISCUSSION

In this report, we demonstrate increased obesity, visceral adipose tissue inflammation and dysregulated glucose metabolism in LGALS3<sup>-/-</sup> mice on a long-term high-fat diet. These effects appear to be mediated by both the metabolic and the immunoregulatory effects of Gal-3. After 6 months on a HFD, the body weight, weight gain and amount of total visceral tissue were significantly higher in LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in diet-matched WT mice (Fig. 1A and 1B). HFD feeding in Gal-3-deficient mice resulted in increased weight and visceral fat mass followed by significantly higher serum total cholesterol and triglyceride levels (Fig. 1C). Additionally, the fasting blood glucose and insulin levels, as well as the HOMA-IR, were significantly higher in obese and lean LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 2).

There is increasing evidence that Gal-3 plays an important role in obesity and T2DM (18). However, controversial results have been reported regarding the effects of Gal-3 in obese patients and experimental models. Our results are in agreement with the study reported by Okhura et al., which demonstrated that low serum Gal-3 levels are associated with insulin resistance in T2DM patients (25). It has been recently demonstrated that obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice have increased fasting blood glucose and insulin levels compared with diet-matched WT animals (18). Additionally, Pejnovic et al. (18) reported significantly increased IFN- $\gamma$ -producing Type 1 T/NKT cells and proinflammatory M1 macrophages and reduced T regulatory cells and alternatively activated M2 macrophages in the VAT of LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD compared with diet-matched WT animals. Pang et al. (27) reported that Gal-3-deficient mice fed a HFD for 12 weeks develop increased adiposity and systemic inflammation. In addition, the same authors showed that despite the increased adiposity in Gal-3-deficient mice, there was no significant difference in the size of the adipocytes (27). In this study, we demonstrated that LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD for 6 months developed visceral adiposity, hyperglycaemia and IR. Increased adiposity in Gal-3-deficient mice on a HFD was associated with adipocyte hypertrophy (Fig. 1D).

Inflammation in the VAT during obesity plays a central role in metabolic abnormalities such as IR. We demon-

strate that a long-term HFD induced innate and adaptive immune cell infiltration in the VAT (Fig. 3 and 4). It has been reported that DCs, as professional antigen-presenting cells, have an important role in obesity-induced VAT inflammation (28). The obesity-associated increase of CD11c<sup>+</sup> cells in the adipose tissue suggests that DCs play a role in macrophage recruitment and activation (29). The VAT from HFD-fed LGALS3<sup>-/-</sup> mice contained higher numbers of total CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> DCs than HFD-fed WT animals (Fig. 3A). Additionally, the expression of CD11c is one of the key characteristics of proinflammatory (M1) macrophages in addition to specific markers such as F4/80 and CD11b. Triple-positive F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> macrophages (30) were more numerous in the VAT of LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD (Fig. 3B) and were recently described as a proinflammatory macrophage subset (10). This macrophage population is increased in the adipose tissue in obese vs. lean mice (10). In addition, the subset of proinflammatory F4/80<sup>hi</sup> macrophages (30) was significantly higher in obese LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Fig. 3B). This result is in agreement with the reported data of increased proinflammatory F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> macrophage numbers in the VAT of LGALS3<sup>-/-</sup> after 11 weeks on a HFD (18). Type 1 T cells have a major role in obesity-associated chronic inflammation (31). The HFD increased the number of CD3<sup>+</sup> lymphocytes in the VAT of both genotypes of mice compared with chow-fed mice (Fig. 4A). CXCR3, a chemokine receptor that is highly expressed on activated T cells, is involved in T cell trafficking and activation (32). CD3<sup>+</sup> cells expressing CXCR3 were higher in the VAT from LGALS3<sup>-/-</sup> mice than in WT mice, both on a HFD (Fig. 4A). Despite the overlapping expression of chemokine receptors, CXCR3-positive cells represent Th1 lymphocytes. Th1 lymphocytes expressing CXCR3 produce more Th1-type cytokines such as IFN- $\gamma$  and enhance the activity of CD8<sup>+</sup> T cell effectors *in vitro* (33). Obesity is associated with increased CD8<sup>+</sup> cells in the VAT (33). In our study, the number of CD8<sup>+</sup> cells and the CD8/CD4 ratio (Fig. 4B) in the VAT was increased in LGALS3<sup>-/-</sup> mice fed a HFD compared with diet-matched WT mice, suggesting the role of cytotoxic CD8<sup>+</sup> cells in VAT inflammation and related metabolic abnormalities.

In summary, we provide evidence that Gal-3 deletion enhanced long-term HFD-induced adiposity, visceral adipose tissue inflammation, insulin resistance and hyperglycaemia. These data contribute to better understanding of the role Gal-3 in obesity, metabolic inflammation and T2DM.

## Acknowledgments

We thank Ivan Jovanovic and Gordana Radosavljevic for collegial help and Aleksandar Ilic, Katerina Martinova, Sandra Nikolic (Center for Molecular Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac) and Zoran Mitrovic (Institute of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac) for technical assistance.



## Financial support

This study was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071 and 175069) (Belgrade, Serbia), the Swiss Science Foundation (SCOPES, IZ73Z0\_152407) and Faculty of Medical Sciences grants (JP 02-14, JP 03-14, JP 07-12 and MP 01-12), Kragujevac, Serbia.

## REFERENCES

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14
- Guilherme A, Virbasius J, Vishwajeet P and Czech MP. Adipocyte dysfunction linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:367-77
- Masato K. Insulin resistance and pancreatic  $\beta$  cell failure. *J Clin Invest* 2006;116:1756-60
- Ferannini E and Mari A.  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes. *Metabolism* 2014;63:1217-27
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821-30
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest*. 2003;112:1796-1808
- Neels JG and Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 2006;116:33-35
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci*. 2008;13:453-61
- Zeyda M and Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007;112:61-67
- Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR. Obesity induce a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175-184
- Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 2008;8:301-309
- Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC and Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2011;70:408-17
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009;15:930-39
- Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15:921-29.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsuqi M et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009;15:914-20
- Deuliis JA, Oghumu S, Duggineni D, Zhong J, Rutsky J, Banerjee A et al. CXCR3 modulates obesity-induced visceral adipose inflammation and systemic insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 2014;22:1264-74
- Dumic J, Dabelic S and Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:616-35
- Pejnovic N, Pantic J, Jovanovic I, Radosavljevic G, Milovanovic M, Nikolic I, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML: Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013;62:1932-44.
- Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN et al. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1404-11
- Rhodes DH, Pini M, Castellanos KJ, Montero-Melendez T, Cooper D, Perretti M et al. Adipose tissue-specific modulation of galectin expression in lean and obese mice: evidence for regulatory function. 2013;21:310-19
- Kiwak K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT and Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity* 2007; 15:32-39
- Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:385-400
- Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, arsenijevic N et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res*. 2010;52:100-10
- Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, et al. (2010) Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1404-11
- Okhura T, Fujioka Y, Nakanishi R, Shiochi H, Sumi K, Yamamoto N, et al. Low serum galectin-3 concentrations are associated with insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:106
- 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;130:83-88
- Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, Cooper D, Perretti M, Fantuzzi G: Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One* 2013;8:e57915
- Huh JJ, Park YJ, Ham M and Kim JB. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue Inflammation



- mation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* 2014;37:265-71
29. Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, et al. Dendritic Cells Promote Macrophage Infiltration and Comprise a Substantial Proportion of Obesity-Associated Increases in CD11c+ Cells in Adipose Tissue and Liver. *Diabetes* 2012;61:2330-9
30. Nguyen MT, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryen R et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007;282:35279-92
31. Strissel KJ, DeFuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1918-25
32. Yoon SH, Yun SO, Park JY, Won HY, Kim EK, Sohn HJ, et al. Selective addition of CXCR3 (+)CCR4(-)CD4(+) Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro. *Exp Mol Med* 2009;41:161-70
33. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes* 2008 32:451-63



# ST2 DEFICIENCY AMELIORATES HIGH FAT DIET-INDUCED LIVER STEATOSIS IN BALB/C MICE

Nemanja Jovicic<sup>1,2\*</sup>, Ilija Jeftic<sup>1,3\*</sup>, Marina Miletic Kovacevic<sup>2</sup>, Irena Tanaskovic<sup>2</sup>, Nebojsa Arsenijevic<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukic<sup>1</sup>, Nada Pejnovic<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Molecular Medicine;

<sup>2</sup> Institute of Histology;

<sup>3</sup> Institute of Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

## DELECIJA GENA ZA ST2 U BALB/C MIŠEVA UBLAŽAVA STEATOZU JETRE INDUKOVANU DIJETOM SA VISOKIM SADRŽAJEM MASTI

Nemanja Jovičić<sup>1,2\*</sup>, Ilija Jeftić<sup>1,3\*</sup>, Marina Milić Kovačević<sup>2</sup>, Irena Tanasković<sup>2</sup>, Nebojša Arsenijević<sup>1</sup>, Miodrag L. Lukić<sup>1</sup>, Nada Pejnović<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Centar za molekulska medicinu;

<sup>2</sup> Institut za histologiju;

<sup>3</sup> Institut za patofiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Prilmljen: 12. 02. 2015.

\*The authors NJ and IJ contributed equally to this study.

Accepted / Prihvaćen: 24. 02. 2015.

### ABSTRACT

*Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is strongly associated with obesity, but the molecular mechanisms of liver steatosis and its progression to non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis are incompletely understood. Immune reactivity plays an important role in the pathogenesis of NAFLD. The IL-33/ST2 axis has a protective role in adiposity and atherosclerosis, but its role in obesity-associated metabolic disorders requires further clarification. To investigate the unresolved role of IL-33/ST2 signalling in NAFLD, we used ST2-deficient (ST2<sup>-/-</sup>) and wild type (WT) BALB/c mice maintained on a high-fat diet (HFD) for 24 weeks. HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice exhibited increased weight gain, visceral adipose tissue weight and triglyceridaemia and decreased liver weight compared with diet-matched WT mice. Compared with WT mice on an HFD, ST2 deletion significantly reduced hepatic steatosis, liver inflammation and fibrosis and downregulated the expression of genes related to lipid metabolism in the liver. The frequency of innate immune cells in the liver, including CD68<sup>+</sup> macrophages and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells, was lower in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice, accompanied by lower TNF $\alpha$  serum levels compared with diet-matched WT mice. Less collagen deposition in the livers of ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD was associated with lower numbers of profibrotic CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup> monocytes and CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells in the liver, lower hepatic gene expression of procollagen, IL-33 and IL-13, and lower serum levels of IL-33 and IL-13 compared with diet-matched WT mice.*

*Our findings suggest that the IL-33/ST2 axis may have a complex role in obesity-associated metabolic disorders. Although it is protective in HFD-induced adiposity, the IL-33/ST2 pathway promotes hepatic steatosis, inflammation and fibrosis.*

**Key words:** Obesity, steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, liver fibrosis, immune cells

### SAŽETAK

*Nealkoholna masna bolest jetre je najčešće udružena sa gojaznošću, ali su molekularni mehanizmi razvoja steatoze i progresije u stetaohepatitis i fibrozu jetre nedovoljno razjašnjeni. Imunski mehanizmi imaju važnu ulogu u razvoju nealkoholne masne bolesti jetre. IL-33/ST2 signalni put ima zaštitnu ulogu u gojaznosti i aterosklerozi, ali je njegova uloga u razvoju metaboličkih poremećaja udruženih sa gojaznošću nedovoljno ispitana.*

*U ovom istraživanju ispitivali smo ulogu IL-33/ST2 signalnog puta u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre na mišjem modelu gojaznosti indukovane primenom dijetete sa visokim sadržajem masti u trajanju od 24 nedelje na ST2 deficijentnim (ST2<sup>-/-</sup>) i miševima divljeg soja BALB/c.*

*ST2<sup>-/-</sup> miševi na dijeti sa visokim sadržajem masti su imali veći prirast telesne težine, veću težinu visceralnog masnog tkiva i više serumske nivoe triglicerida, dok je težina jetre bila manja u poredjenju sa miševima divljeg soja na istoj dijeti. Nadalje, delecija ST2<sup>-/-</sup> gena je značajno smanjila steatozu jetre, inflamaciju i fibrozu jetre što je bilo praćeno sniženom ekspresijom gena uključenih u metabolizam lipida u jetri. Zastupljenost ćelija prirodne imunosti u jetri, CD68<sup>+</sup> makrofaga i CD11c<sup>+</sup> dendritskih ćelija i serumski nivo TNF $\alpha$  su bili niži kod ST2<sup>-/-</sup> miševa. Manje izražena fibroza jetre u ST2<sup>-/-</sup> miševa je bila povezana sa sniženom zastupljenošću profibrotskih CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>low</sup> monocita i CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T limfocita u jetri, sniženom ekspresijom gena za prokolagen, IL-33 i IL-13 i sniženim serumskim nivoima IL-33 i IL-13 u poredjenju sa miševima divljeg soja.*

*Dobijeni rezultati ukazuju na kompleksnu ulogu IL-33/ST2 signalnog puta u metaboličkim poremećajima udruženim sa gojaznošću. Iako protektivan za razvoj gojaznosti, IL-33/ST2 signalni put pospešuje steatozu, inflamaciju i fibrozu jetre.*

**Ključne reči:** gojaznost, steatoza, nealkoholni steatohepatitis, fibroza jetre, imunske ćelije



## ABBREVIATIONS

<b>ABCA</b> - ATP-binding cassette transporter	<b>NAFLD</b> - non-alcoholic fatty liver disease
<b>BSA</b> - bovine serum albumin	<b>NASH</b> - non-alcoholic steatohepatitis
<b>CD</b> - cluster of differentiation	<b>PBS</b> - phosphate-buffered saline
<b>CDNA</b> - complementary DNA	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> - peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<b>FCS</b> - foetal calf serum	<b>qRT-PCR</b> - quantitative real-time polymerase chain reaction
<b>FFAs</b> - free fatty acids	<b>RNA</b> - Ribonucleic acid
<b>Gal-3</b> - galectin 3	<b>TNF<math>\alpha</math></b> - tumour necrosis factor alpha
<b>HFD</b> - high fat diet	<b>VAT</b> - visceral adipose tissue
<b>IFN<math>\gamma</math></b> - interferon- $\gamma$	<b>VLDL</b> - very low density lipoprotein
<b>IL</b> - Interleukin	<b>WT</b> - wild type
<b>LXR<math>\alpha</math></b> - Liver X receptor alpha	<b><math>\alpha</math>-SMA</b> - alpha smooth muscle actin

## INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease in developed countries and comprises a wide spectrum of liver pathologies, from benign liver steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), eventually causing liver cirrhosis that may lead to hepatocellular carcinoma (1). Approximately one third of the individuals with simple steatosis develop NASH, and among them, up to 20% will progress to liver cirrhosis over the period of years (2).

NAFLD is considered as a hepatic manifestation of metabolic syndrome, which is a cluster of interrelated metabolic disorders, including obesity, hypertension and atherosclerosis, insulin resistance and diabetes, and dyslipidemia and fatty liver. The central features of metabolic syndrome are related to lipotoxicity, glucotoxicity and chronic low-grade inflammation leading to insulin resistance (3,4), for which immune mechanisms and complex cytokine network coordinate the inflammatory responses and metabolic disturbances (3,5). Genetic and environmental factors play a role in the development of obesity (6,7), but the cellular and molecular mechanisms involved in obesity-associated metabolic disorders are incompletely understood.

The hallmark of NAFLD is hepatocyte triglyceride accumulation. Hepatic steatosis represents excessive fat accumulation in hepatocytes and occurs as a result of multiple metabolic pathways, including increased fat delivery, increased fat synthesis, reduced fat oxidation, and/or reduced fat export in the form of VLDL (8). Increased circulating fatty acids (FFAs) and de novo lipogenesis from glucose are important determinants of hepatic steatosis. Adipose tissue dysfunction in obesity is thought to increase plasma FFAs, which are the major lipid providers in hepatic steatosis, and ectopic lipid accumulation in liver and muscle tissues, leading to insulin resistance. The mechanisms that lead to excessive plasma FFAs include increased lipolysis in adipose tissue, increased dietary fatty acids and newly synthesized fatty acids in the liver that are esterified into triglycerides and either stored in hepatocyte lipid droplets or secreted as plasma VLDLs (9).

The molecular mechanisms involved in the progression of benign liver steatosis to liver inflammation and fibrosis in NA-

FLD are incompletely understood. Hepatic lipid accumulation may promote the inflammatory response characterized by activated resident tissue macrophages (Kupffer cells), the increased infiltration of myeloid and lymphoid cells within the liver and the subsequent release of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , all of which enhance the progression of NASH to fibrosis. Moreover, the most recent study demonstrated that development of hepatic steatosis requires IL-1 signalling, which promotes hepatic lipogenesis (10). Other members of the IL-1 superfamily, including the IL-1 receptor antagonist, IL-18 and IL-33, together with IL-1 have been implicated in various pathological conditions, but their roles in obesity-associated metabolic disorders are unclear.

IL-33 is a member of the IL-1 cytokine family, a multi-functional cytokine involved in the pathogenesis of various inflammatory and autoimmune diseases (11). IL-33 is a pleiotropic cytokine that binds to its plasma membrane receptor complex comprising ST2 and the IL-1R accessory protein (11) and generally promotes Th2-type immune responses. IL-33 appears to exert protective metabolic effects in obesity and atherosclerosis (12). IL-33 promotes liver fibrosis through the activation and expansion of liver-resident innate lymphoid cells, which produce profibrotic IL-13 (13). In the fibrotic liver, IL-33 is present in activated hepatic stellate cells, which are key cellular mediators of liver fibrosis (14).

The role of the IL-33/ST2 axis in obesity-associated metabolic disorders requires further clarification. We aimed to investigate the role of IL-33/ST2 signalling in the development of hepatic steatosis, inflammation and fibrosis in a model of high fat diet (HFD)-induced obesity using ST2-deficient (ST2<sup>-/-</sup>) mice on the BALB/c background.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental mice and study design

Eight-week-old, male mice were used in the experiments. ST2-deficient mice (ST2<sup>-/-</sup> mice) on the BALB/c background were generated by targeted disruption of the



mouse ST2 gene (15). ST2<sup>-/-</sup> mice were kindly provided by Dr McKenzie (University of Cambridge, UK). ST2-deficient (ST2<sup>-/-</sup>) and wild-type (WT) BALB/c mice were accommodated in our animal facilities under standard laboratory conditions in a temperature-controlled environment with a 12-h light/dark cycle. Mice received water and standard chow (10% calories from fat, Mucedola, Milano, Italy) or a high fat diet (60% calories from fat, Mucedola, Italy) *ad libitum*. Animals were sacrificed after 24 weeks of feeding, and blood samples and liver and visceral adipose tissues were collected for further analyses. All animal procedures were approved by the Ethical committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

### Metabolic parameters

Body weights and fasting blood glucose levels were measured periodically, every 4 weeks. Before the measurements, mice were fasted for 4 h, and glucose levels (mmol/L) were determined using the Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Serum concentrations of total cholesterol, triglycerides, AST and ALT were measured using the Olympus AU600 Chemistry Immuno Analyzer (Olympus, Tokyo, Japan). Fasting insulin levels in sera were measured using the Mouse Insulin ELISA Kit (Alpco, Salem, NH, USA).

### Liver histological analysis

Livers were excised, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Tissue sections, 5- $\mu$ m-thick, were stained with haematoxylin and eosin and picosirius red as previously described (16). The quantification of red-stained collagen in liver sections stained with picosirius red was performed on 10 fields of a section at 10X magnification, as previously described (17).

We performed Oil Red O staining on 5- $\mu$ m-thick liver tissue cryosections. Tissue sections were fixed in paraformaldehyde (10%), rinsed with 60% isopropanol and stained with freshly prepared a working solution of Oil Red O for 10 minutes. After rinsing with 60% isopropanol, sections were counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted using water-based mounting medium. The quantification of red-stained lipids in mouse liver sections stained with Oil Red O was performed on 10 fields of a section at 100X magnification by digital image analyses, as previously described (18).

The quantification of liver tissue inflammatory cell infiltration was performed in blinded fashion by two independent observers. Analysis was performed on 10 fields of a section at 10X magnification. Inflammatory cell infiltration was graded as follows: 0=no foci; 1=<2 foci/field; 2=2-4 foci per field; and 3=>4 foci per field. Then, a mean score was calculated (19). Histological analysis was performed on tissue sections using light microscope (BX51; Olympus) equipped with a digital camera.

### Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining, we used paraffin-embedded liver tissue sections (5- $\mu$ m-thick). After performing heat-mediated antigen retrieval in citrate buffer (pH=6.0), deparaffinized tissue sections were incubated with primary mouse anti- $\alpha$ -SMA antibody (ab7817, Abcam, Cambridge, UK) or mouse anti-CD68 antibody (ab49777, Abcam). Staining was visualized using the Mouse-specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab64259, Abcam), and sections were counterstained with Mayer's haematoxylin. Sections were photomicrographed with a digital camera mounted on a light microscope (Olympus BX51, Japan), digitized and analysed. Analysis was performed on 10 fields of a section at 40X magnification. The results are presented as the mean count of positively stained cells per field.

### Isolation of liver mononuclear cells

The mice were euthanized, and their livers were removed, thoroughly dissected and passed through a 100- $\mu$ m nylon cell strainer (BD Biosciences); isolated cells were then suspended in complete RPMI-1640 medium containing 10% foetal calf serum (FCS). Cell suspensions were centrifuged at 507 rpm for 1 minute, and the supernatants enriched for mononuclear cells were collected and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes, as previously described (20). Cell pellets were then resuspended in complete RPMI-1640 medium.

### Flow cytometry

Liver mononuclear cells were stained with combinations of either fluorochrome-labelled primary Abs or isotype controls for 30 min at 4°C. For intracellular staining, cells were activated with PMA/ionomycin and processed as previously described (21). Cells were labelled with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-mouse CD3, CD11b, CD45, CD4, (BD Biosciences), F4/80, CD11c (BioLegend, San Diego, CA), and Ly-6C (Life Technologies, Carlsbad, CA). The cells were analysed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star).

### Expression of genes related to lipid metabolism and fibrosis in the liver

RNA was extracted from frozen mouse liver tissue using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (2  $\mu$ g) was reverse-transcribed to cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). qRT-PCR was performed using Power SYBR MasterMix (Applied Biosystems) and miRNA-specific primers for procollagen,  $\alpha$ SMA, IL-33, CD36, IL-13, TGF- $\beta$ , Abca-1, LXR $\alpha$ , and PPAR $\gamma$  as well as for  $\beta$ -actin, as





**Table 1:** Primers used for qRT-PCR analysis

	Sense (5' to 3')	Antisense (5' to 3')
<b>Procollagen</b>	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGCTCACCATTGGGG
<b>α-SMA</b>	ACTGGGACGACATGGAAAAG	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
<b>IL-33</b>	TCCTTGCTTGGCAGTATCCA	TGCTCAATGTGTCAACAGACG
<b>IL-13</b>	CCTGGCTCTTGCTTGCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
<b>TGF-β</b>	ATACAGGGCTTTCGATTTCAGC	GTCCAGGCTCCAAATATAGG
<b>mLXR-α</b>	ATCGCCTTGCTGAAGACCTCTG	GATGGGGTTGATGAACTCCACC
<b>PPAR-γ</b>	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA	GAGGGTGTAGAAGGTTCTTCATGA
<b>Abca-1</b>	CGCAGTGACCAGAAAACAATGTG	TATCAATGAGGCAAGGGTGTGG
<b>CD36</b>	TCCAGCCAATGCCTTTGC	TGGAGATTACTTTTTCAGTGCAGAA

a housekeeping gene (Table 1). qPCR reactions were initiated with a 10-minute incubation time at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds in a Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). The fold change of miRNA gene expression was calculated by the equation  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , described by Livak and Schmittgen (22), where Ct is the cycle threshold.  $\Delta Ct$  was calculated by subtracting the Ct values of the endogenous control from the Ct values of the miRNA of interest.  $\Delta\Delta Ct$  was then calculated by subtracting  $\Delta Ct$  of the control from  $\Delta Ct$  of the calibrator.

### Cytokine measurements

Cytokine levels in sera were measured using mouse DuoSet ELISA kits for IL-6, IL-10, IL-13, IL-33, TGF-β, IFN-γ and TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 22.0. Data are presented as the means ± SEM. Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney U test, and, if appropriate, independent sample Student's t test. Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Metabolic analysis in WT and ST2<sup>-/-</sup> BALB/c mice exposed to an HFD

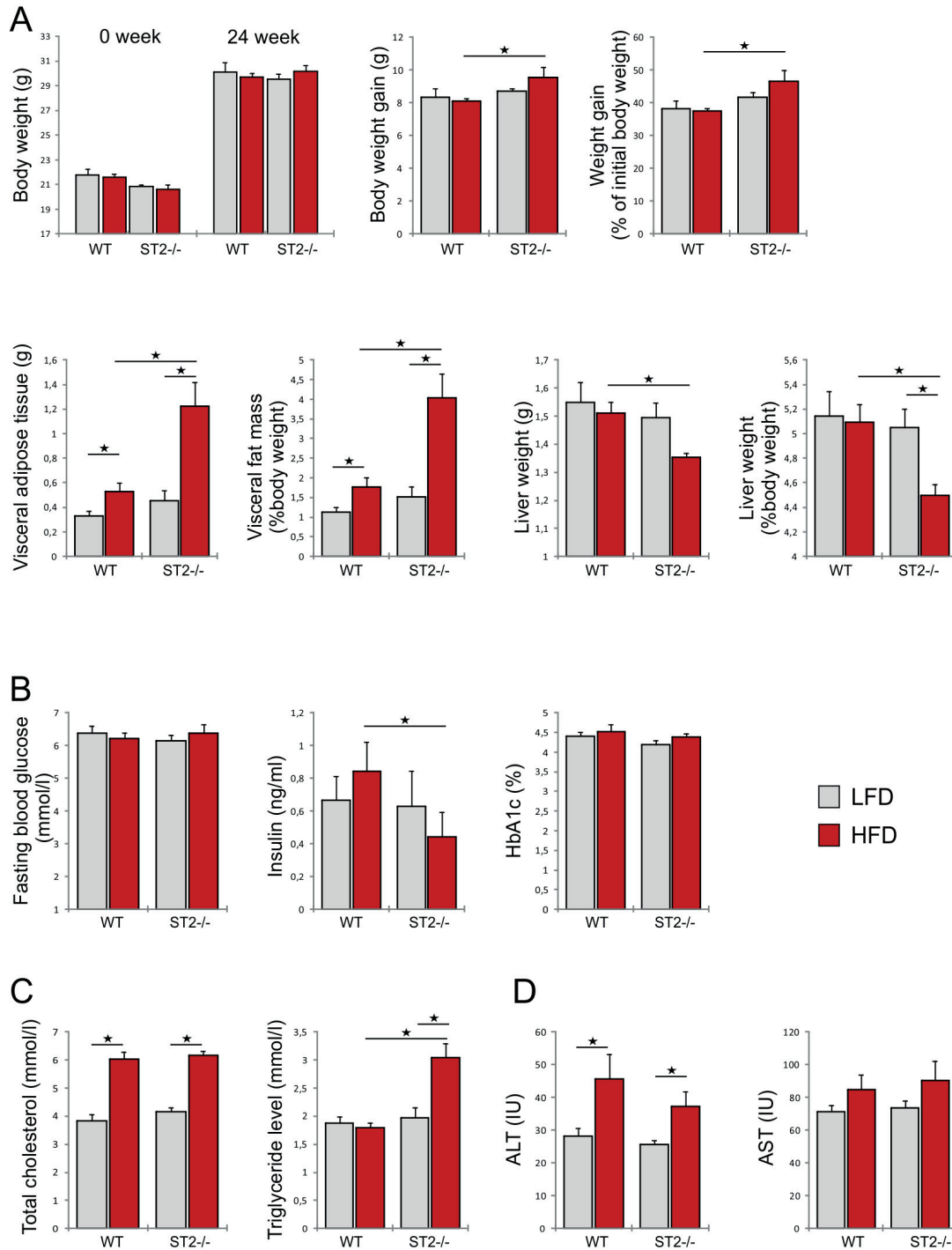
At the beginning of the experiment, WT and ST2<sup>-/-</sup> BALB/c mice had similar body weights. After 24 weeks of feeding with either chow or an HFD, no differences in body weights were observed between WT and ST2<sup>-/-</sup> mice. However, the weight gain and the weight gain expressed as a percentage of the initial body weight were significantly higher in ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD compared with diet-matched WT mice (Fig. 1A).

The visceral adipose tissue (VAT) weight and the VAT weight expressed as a percentage of total body weight were significantly higher in HFD-fed mice of both genotypes compared with chow-fed mice. The visceral adipose tissue weight was significantly higher in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with HFD-fed WT mice (Fig. 1A). The liver weight and the liver weight expressed as a percentage of the total body weight were significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD compared with HFD-fed WT mice (Fig. 1A). Fasting blood glucose levels and the HbA1c percentage did not differ in HFD-fed mice of both genotypes, whereas fasting serum insulin levels were significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice (Fig. 1B).

Serum triglycerides were significantly higher in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> vs. WT mice as well as compared with chow-fed ST2<sup>-/-</sup> mice. An HFD significantly increased total cholesterol serum levels in both genotypes, with no significant differences observed between ST2<sup>-/-</sup> and WT mice (Fig. 1C). ALT activity was significantly increased in HFD-fed WT and ST2<sup>-/-</sup> mice compared with chow fed mice, with no differences found between the genotypes (Fig. 1D). AST levels did not differ between chow- or HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> and WT mice.

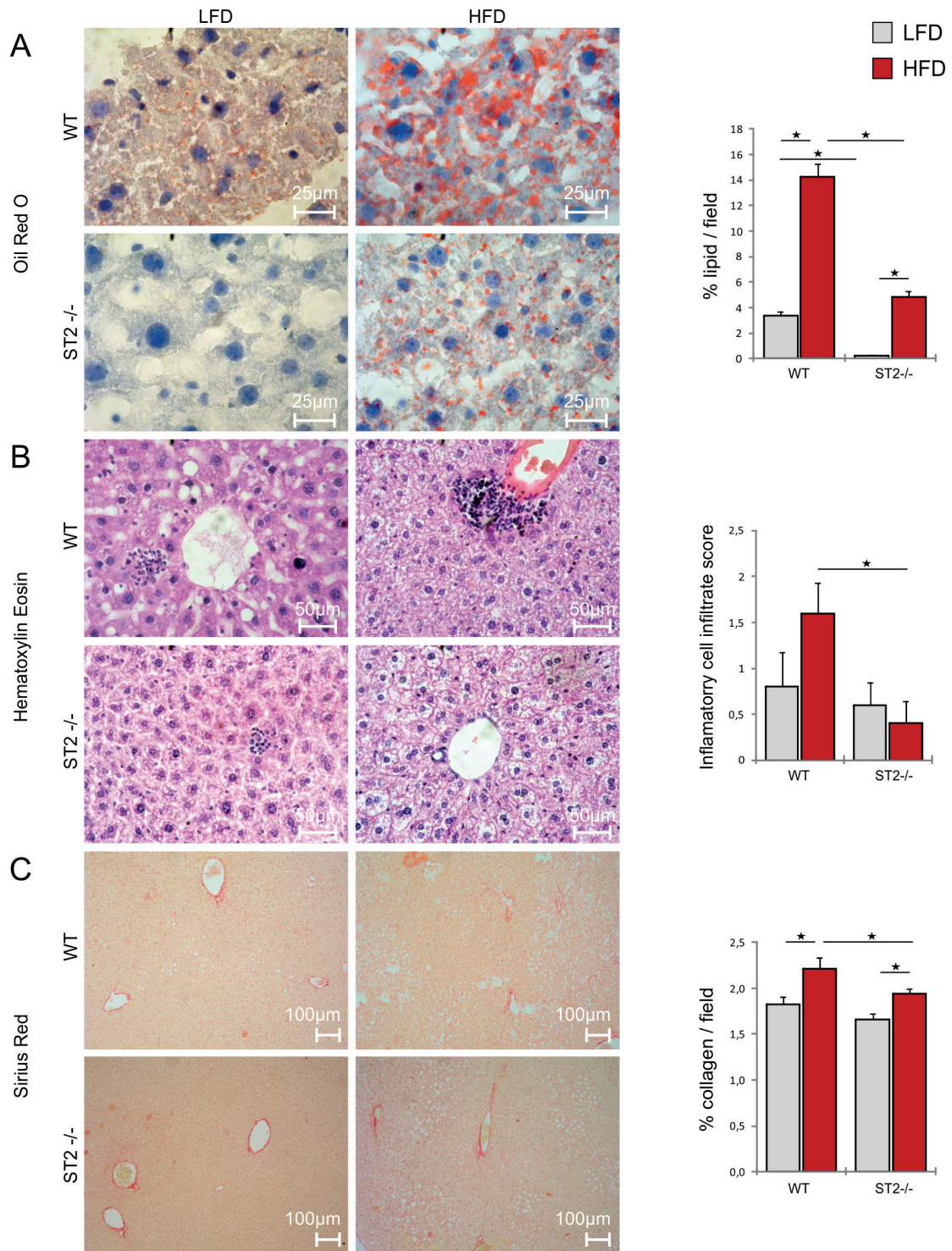
### Liver steatosis, inflammation and fibrosis in WT and ST2<sup>-/-</sup> BALB/c mice

Semiquantitative analysis of lipid deposition in liver tissue sections stained with Oil Red O demonstrated that HFD increased liver steatosis in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice compared with chow-fed animals. However, liver steatosis was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD compared with diet-matched WT mice (Fig. 2A). Liver inflammation, as evaluated by the inflammatory cell infiltrate score, was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD compared with diet-matched WT mice (Fig. 2B). The degree of liver fibrosis, quantified by staining collagen with picrosirius red, was significantly higher in both genotypes of mice fed an HFD compared with chow-fed mice. Notably, the degree of collagen deposition was significantly lower in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with HFD-fed WT mice (Fig. 2C).



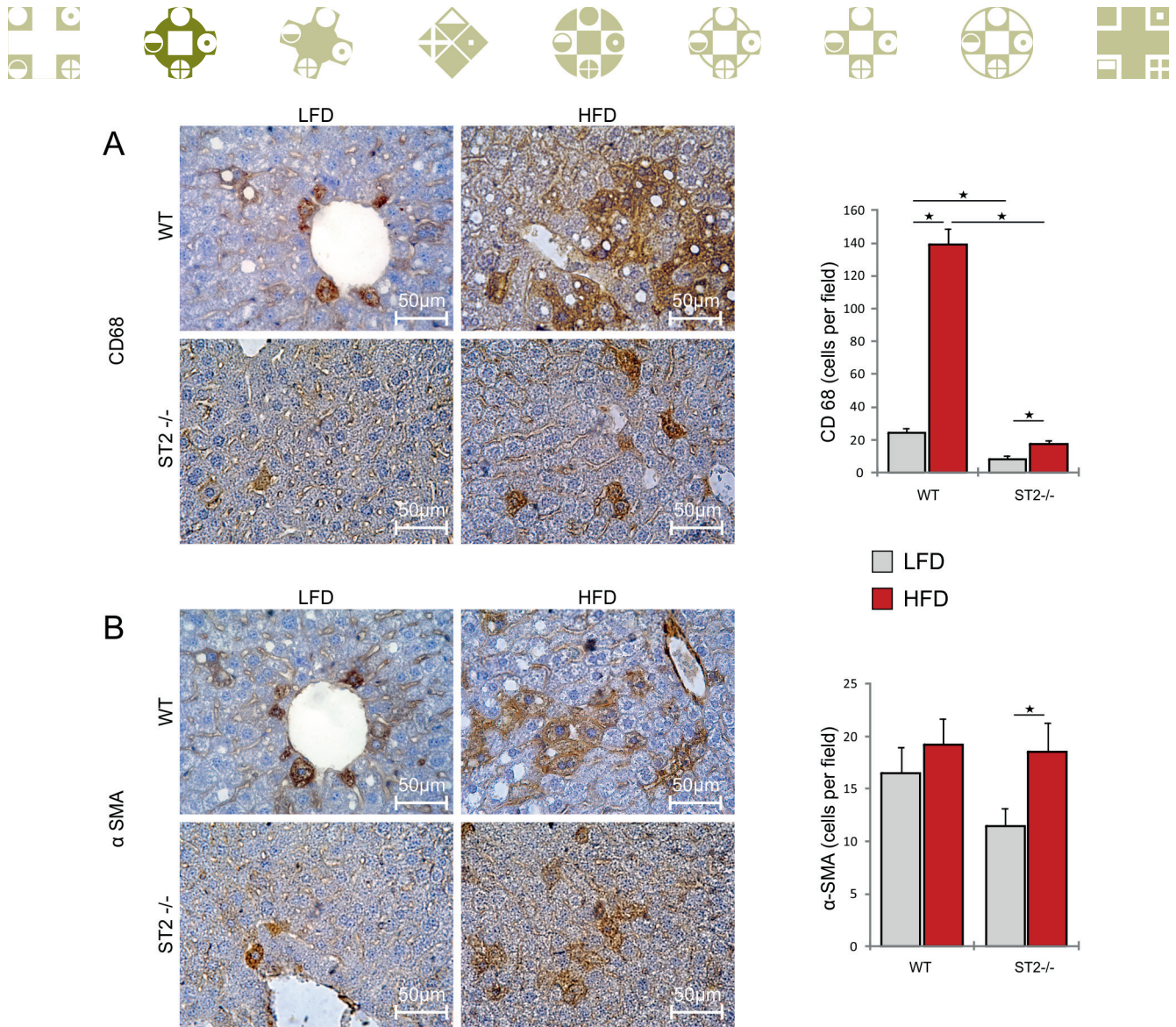
**Figure 1. Metabolic parameters**

- A. Body weight at the beginning of the experiment and after 24 weeks. Body weight gain as well as weight gain expressed as a percentage of the initial body weight were significantly higher in  $ST2^{-/-}$  mice on a high-fat diet compared with diet-matched WT mice. The visceral adipose tissue weight and its weight expressed as a percentage of the total body weight were significantly higher in high-fat diet-fed vs. chow-fed groups of mice of both genotypes. The visceral adipose tissue weight was significantly higher in HFD-fed  $ST2^{-/-}$  mice compared with HFD-fed WT mice. The liver weight and the liver weight expressed as a percentage of the total body weight were significantly lower in  $ST2^{-/-}$  mice fed an HFD compared with diet-matched WT mice.
- B. There was no difference in fasting blood glucose levels between groups. Fasting serum insulin levels was significantly lower in  $ST2^{-/-}$  mice compared with WT mice, both fed an HFD.
- C. Total cholesterol levels in the sera were significantly higher in the HFD-fed groups compared with the respective chow diet-fed groups.  $ST2^{-/-}$  mice fed an HFD had significantly higher levels of serum triglycerides compared with  $ST2^{-/-}$  as well as WT mice fed a chow diet.
- D. ALT activity was significantly increased in WT and  $ST2^{-/-}$  mice fed an HFD compared with the respective chow-fed groups. There were no differences in AST activity between groups.



**Figure 2. Liver steatosis, inflammation and fibrosis**

- A. Significantly higher liver steatosis was observed in WT mice fed an HFD compared with WT mice fed chow. Significantly higher liver steatosis was observed in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with ST2<sup>-/-</sup> mice fed chow. Liver steatosis was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice than in WT mice, both fed an HFD.
- B. Liver inflammation, as evaluated by the inflammatory cell infiltrate score, was significantly lower in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with HFD-fed WT mice.
- C. The degree of liver fibrosis was significantly higher in mice fed an HFD compared with mice fed a chow diet in both genotypes. The extent of liver fibrosis was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with diet-matched WT mice.



**Figure 3. Immunohistochemical staining in liver**

- A. Number of  $\alpha$ SMA positive cells was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on chow diet compared to ST2<sup>-/-</sup> mice on HFD, with no differences between the genotypes of mice
- B. The number of CD68<sup>+</sup> macrophages was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on chow diet compared to ST2<sup>-/-</sup> mice on HFD as well as WT mice on chow. ST2<sup>-/-</sup> mice on HFD had significantly lower number of CD68<sup>+</sup> macrophages compared to WT mice on HFD. Wild type mice on chow had significantly lower number of CD68<sup>+</sup> macrophages compared to WT mice on HFD.

HFD significantly increased the number of CD68<sup>+</sup> macrophages in livers in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice. However, the number of CD68<sup>+</sup> macrophages was significantly lower in chow- or HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice (Fig 3A). HFD feeding significantly increased the number of  $\alpha$ SMA-positive myofibroblasts in the livers of ST2<sup>-/-</sup> mice only; there was no difference in the number of  $\alpha$ SMA-positive cells between the two genotypes of mice fed chow or an HFD (Fig. 3B).

#### Immune cell composition in the livers of WT and ST2<sup>-/-</sup> BALB/c mice

We analysed several populations of innate immune cell and lymphocyte subpopulations. HFD feeding increased the

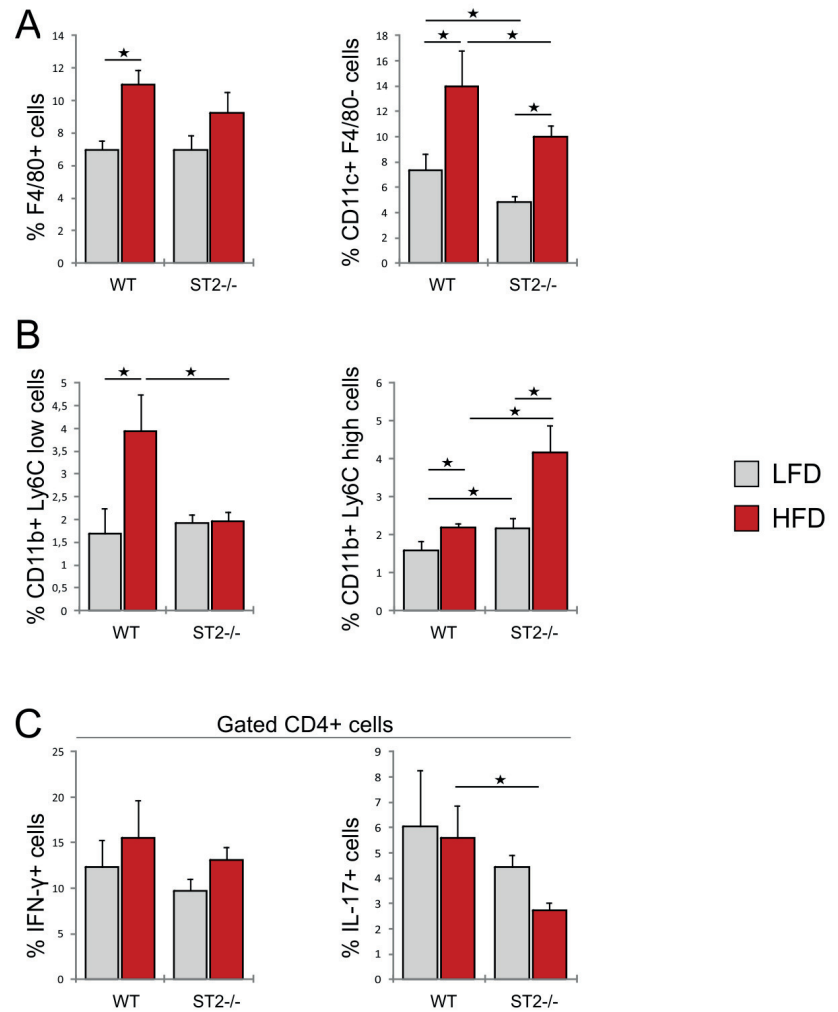
percentage of F4/80<sup>+</sup> macrophages in the livers of WT mice; in contrast, no significant differences in the proportion of these cells were found between WT and ST2<sup>-/-</sup> mice on an HFD. The percentage of CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> dendritic cells (DCs) was significantly higher in both genotypes fed an HFD compared with chow-fed mice. CD11c<sup>+</sup> DCs were significantly lower in the livers of ST2<sup>-/-</sup> mice fed either chow or an HFD compared with diet-matched WT mice (Fig. 4A).

HFD feeding significantly increased the percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> cells in WT mice compared with HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice. In contrast, HFD increased the percentages of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> cells in both genotypes, and the proportion of these cells was significantly higher in both chow- and HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice (Fig. 4B).



**Figure 4. Phenotypic analysis of immune cells in the liver**

- A. The percentage of F4/80<sup>+</sup> macrophages was significantly higher in WT mice fed an HFD compared with WT mice fed a chow diet. The percentage of CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells was significantly higher in groups fed an HFD compared with the chow-fed groups. The percentage of CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> cells was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed a chow diet compared with WT mice fed chow and was also significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with WT mice fed an HFD.
- B. The percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> cells was significantly higher in WT mice fed an HFD compared with WT mice fed chow as well as with ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD. The percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> cells was significantly higher in both the chow- and HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice.
- C. Among the gated CD4<sup>+</sup> cells, no difference in the percentages of IFN- $\gamma$  producing cells was found. The percentage of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> cells was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with WT mice fed an HFD.



Among gated CD4<sup>+</sup> T cells, no difference in the percentage of IFN- $\gamma$  producing cells was observed among the genotypes of mice fed either chow or an HFD. However, the percentage of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells was significantly lower in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with HFD-fed WT mice (Fig. 4C).

**The expression of genes related to liver lipid metabolism and fibrosis and cytokine profiles in the sera of WT and ST2<sup>-/-</sup> BALB/c mice**

HFD significantly increased the expression of ATP binding cassette sub-family A member 1 (Abca-1), CD36 and oxysterol receptor LXR-alpha (LXR- $\alpha$ ) genes in the livers of WT mice compared with chow-fed animals; no differences were observed in the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) (Fig. 5A). LXR $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  expression was significantly lower in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice.

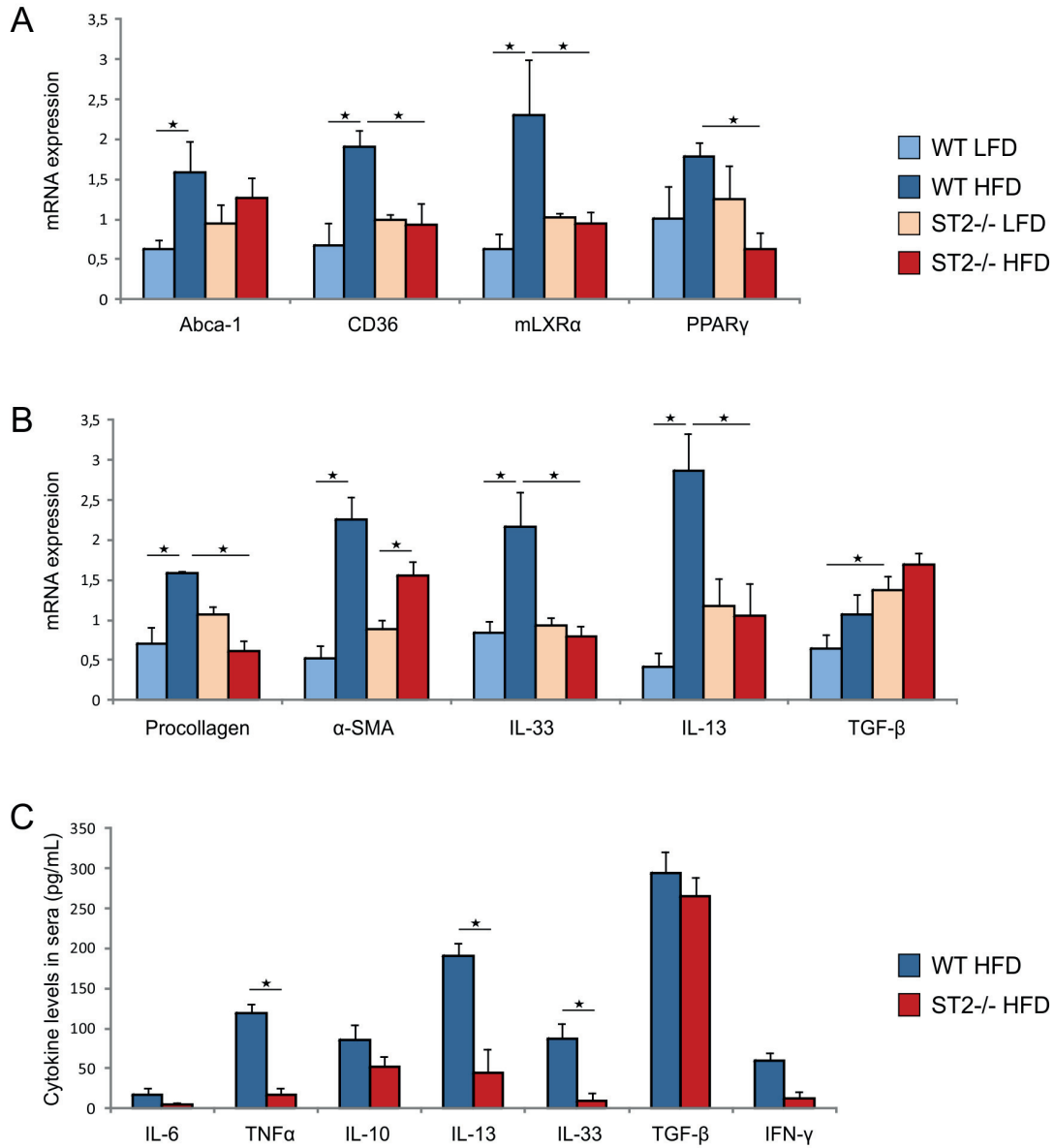
HFD significantly increased expression of the liver fibrosis-related genes collagen alpha 1 chain precursor (pro-collagen), and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) and the profibrotic genes IL-33 and IL-13 in the livers of WT mice

compared with chow-fed animals (Fig 5B). In ST2<sup>-/-</sup> mice, HFD feeding led to significantly increased  $\alpha$ SMA expression. The expression of procollagen, IL-33 and IL-13 was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> vs. WT mice, both fed an HFD. TGF- $\beta$  precursor expression was not influenced by HFD feeding in both genotypes, although its expression was significantly higher in chow-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice (Fig. 5B).

We also analysed serum proinflammatory and profibrotic cytokine levels in WT and ST2<sup>-/-</sup> mice fed to an HFD for 24 weeks, as indicated in Figure 5. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-13 and IL-33 were significantly lower in the sera of ST2<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice (Fig. 5C).

**DISCUSSION**

Mice on a BALB/c background are relatively resistant to HFD-induced obesity (23). However, we demonstrate that HFD-fed ST2-deficient mice had significantly higher body weight gain compared with wild type mice. It appears that ST2 deletion may partially attenuate the resistance to diet-induced obesity. This result is in accordance with previous studies, which suggested that



**Figure 5. Liver gene expression and cytokine profiles in sera**

- A. There were no significant differences in the expression of genes related to lipid metabolism in the livers of ST2<sup>-/-</sup> mice fed chow and an HFD. Significantly increased expression of the Abca-1, CD36 and LXR-α genes was observed in WT mice fed an HFD compared with WT mice fed a chow diet. The expression of CD36, LXRα and PPAR-γ was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with diet-matched WT mice.
- B. Expression of the procollagen, alpha smooth muscle actin, IL-33 and IL-13 genes was significantly increased in the livers of WT mice fed an HFD compared with WT mice fed chow. The expression of αSMA was significantly higher in the livers of ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with ST2<sup>-/-</sup> mice fed chow. The expression of IL-33 and IL-13 was significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with WT mice fed an HFD. Expression of the TGF-β precursor was significantly higher in ST2<sup>-/-</sup> mice fed chow compared with diet-matched WT mice.
- C. The levels of TNF-α, IL-13 and IL-33 were significantly lower in the sera of ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD compared with diet-matched WT mice.

IL-33 plays a protective role in obesity (12). Miller et al. have previously demonstrated that exogenous IL-33 exerted protective effects on adiposity and inflammation, and Pantic et al. showed that ST2 deletion enhanced visceral adiposity and inflammation in BALB/c mice. In line with these studies (12,24) we also demonstrate the higher amount of visceral adipose tissue in ST2<sup>-/-</sup> mice maintained on an HFD. Our main objective in this study was to investigate the unresolved role of the IL-33/ST2

axis in the development of hepatic steatosis. We demonstrate here that HFD-induced steatosis was ameliorated in ST2<sup>-/-</sup> mice compared with wild-type mice. Furthermore, the extent of liver steatosis was also significantly lower in ST2<sup>-/-</sup> mice on a standard diet compared with diet-matched WT mice. The lack of IL-33/ST2 signalling resulted in increased visceral fat weight and hypertriglyceridemia and attenuated liver steatosis in mice fed an HFD. This finding was somewhat unexpected consider-



ing that enhanced lipolysis in enlarged adipose tissues in obesity was shown to be the main contributing factor in the development of liver steatosis (9, 25). Adipose tissue lipolysis is the catabolic process leading to the breakdown of triglycerides stored in fat cells and the release of fatty acids and glycerol (26). Our findings imply that the protective effect of IL-33 in the obesity-associated enlargement of visceral adipose tissue is not exerted on hepatic steatosis. The role of IL-33/ST2 signalling in hepatic steatosis has not been investigated. Recent report suggests that IL-33/ST2 expression may promote maternal lipolysis during pregnancy (27). It could be speculated that the discrepancy between the protective effects on HFD-induced adiposity and enhanced liver steatosis may be related to the presumption that IL-33 promotes lipolysis and the “relocation” of fatty acids in the liver. Furthermore, we demonstrated that WT mice fed an HFD have increased expression of genes associated with lipid metabolism in the liver. The expression of fatty acid translocase (CD36/FAT) was significantly higher in WT mice than in ST2<sup>-/-</sup> mice, both fed an HFD. When fatty acids are released from adipose tissue stores, they enter the circulation as FFAs. CD36 is a molecule involved in the uptake of fatty acids by cells (28). We show markedly lower LXR $\alpha$  expression in HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with HFD-fed WT mice. Liver X receptor alpha (LXR $\alpha$ ) is oxysterol-activated nuclear receptor that is expressed in the liver and in other tissues and that regulates inflammation and lipogenesis. It has been demonstrated that LXR $\alpha$  activation has potentially deleterious effects by promoting hepatic steatosis and insulin resistance (29,30). As opposed to ST2<sup>-/-</sup> mice, WT mice fed an HFD had increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ), which has been associated with exacerbated steatosis when overexpressed in hepatocytes (31).

Our findings point to an important role for IL-33/ST2 signalling in obesity-associated changes in lipid metabolism in the liver. A recent study showed that the development of hepatic steatosis requires IL-1 signalling (10), and considering that the IL-33/ST2 axis shares similar downstream molecules with the IL-1 pathway, IL-33/ST2 signalling should be further explored in hepatic lipogenesis. Recently, the direct role of IL-17 in liver steatosis and fibrosis has been demonstrated (32,33). In accordance with this finding, we showed that IL-17-producing CD4<sup>+</sup> cells were less numerous in the livers of HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice compared with diet-matched WT mice. Liver inflammation was attenuated in ST2<sup>-/-</sup> mice fed an HFD, as evaluated by lower inflammatory scores and lower numbers of CD68<sup>+</sup> macrophages and percentages of CD11c<sup>+</sup> DCs in the livers of these mice compared with diet-matched WT mice. Liver damage due to pronounced steatosis in WT mice has been coupled with on-going fibrosis. In contrast to HFD-fed ST2<sup>-/-</sup> mice, higher gene expression of procollagen, IL-33 and profibrotic IL-13 observed in the livers of HFD-fed WT mice

supports the notion of the profibrotic role of IL-33/ST2 signalling in the liver. This was accompanied by increased collagen deposition in steatotic livers of HFD-fed WT mice and increased sera levels of IL-33 and IL-13. In addition, we also demonstrated that CD11b+Ly6c<sup>low</sup> monocytes, which are cells with profibrotic or M2-type functions in the liver (34,35,36), were more numerous in the livers of HFD-fed WT mice compared with diet-matched ST2<sup>-/-</sup> mice.

## Conclusion

In summary, our findings are compatible with the notion that the IL-33/ST2 (IL-33R) axis may play multiple roles in obesity-associated metabolic disorders and NAFLD. IL-33/ST2 signalling attenuates adiposity and inflammation in visceral adipose tissue but promotes liver steatosis, inflammation and fibrosis, most likely by modulating cell trafficking and the metabolic pathways that link adipose and liver tissues in obesity.

## Acknowledgments

We would like to thank Ivan Jovanovic, Gordana Radosavljevic, Jelena Pantic, Aleksandar Ilic, Katerina Martinsonova, Sandra Nikolic (Center for Molecular Medicine) and Zoran Mitrovic (Institute of Pathology) for their technical assistance.

## Grants

This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071 and 175069) (Belgrade, Serbia), a joint research project (SCOPEs, IZ73ZO\_152407) and the Internal Projects of Faculty of Medical Sciences (JP 02-14, JP 03-14) (Kragujevac, Serbia).

## Disclosure

The authors declare that they have no competing interests or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

## REFERENCES

1. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-23.
2. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.



3. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Current opinion in gastroenterology*. 2005;21(6):702-7.
4. Muralidarane A, Soeda J, Visconti-Pugmire C, Samuelsson AM, Pombo J, Maragkoudaki X, et al. Maternal obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune dysfunction in mice. *Hepatology*. 2013;58(1):128-38.
5. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. [Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease](#). *Hepatology*. 2005;42(4):880-5.
6. Grarup N, Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia*. 2014;57(8):1528-41.
7. Lin YC, Chang PF, Chang MH, Ni YH. Genetic variants in GCKR and PNPLA3 confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(4):869-74.
8. Postic C, Girard J. [Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice](#). *J Clin Invest*. 2008;118(3):829-38.
9. Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12 Suppl 2:83-92.
10. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevosian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107265.
11. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):89-99.
12. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res*. 2010;107(5):650-8.
13. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6b):1726-39.
14. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013;39(2):357-71.
15. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med*. 2000;191(6):1069-76.
16. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.
17. Hadi AM, Mouchaers KT, Schaliq I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: A new macro-based automated analysis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2010;33(5):257-69.
18. Deutsch MJ, Schriever SC, Roscher AA, Ensenaer R. Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells. *Anal Biochem*. 2014;445:87-9.
19. Juluri R, Vuppalanchi R, Olson J, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, et al. [Generalizability of the non-alcoholic steatohepatitis Clinical Research Network histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease](#). *J Clin Gastroenterol*. 2011;45(1):55-8.
20. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol*. 2012;56(1):26-33.
21. Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2007;Chapter 6:Unit 6.24.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
23. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013;56(5):1129-39.
24. Pantic JM, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Jovanovic I, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Lack of ST2 enhances high - fat diet -induced visceral adiposity and inflammation in BALB/c mice [Delecija gena za ST2 promoviše gojaznost i inflamaciju u visceralnom adipoznom tkivu BALB/c miševa na dijeti sa visokim sadržajem masti]. *Serb J Exp Clin Res* 2013; 14(4): 155 -160.
25. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
26. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*. 2006;53(6):482-91.
27. McKenna LA, Jordan F, Brown EA, Huda SS, Mackay VA, Miller AM, et al. The role of interleukin-33 and its receptor ST2 in human pregnancy. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2011;96(Suppl 1):Fa98.
28. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(2):72-7.
29. Greffhorst A, Parks EJ. [Reduced insulin-mediated inhibition of VLDL secretion upon pharmacological activation of the liver X receptor in mice](#). *J Lipid Res*. 2009;50(7):1374-83.
30. Beaven SW, Matveyenko A, Wroblewski K, Chao L, Wilpitz D, Hsu TW, et al. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors





- in obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*. 2013;18(1):106-17.
31. Moran-Salvador E, Lopez-Parra M, Garcia-Alonso V, Titos E, Martinez-Clemente M, Gonzalez-Periz A, et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J*. 2011;25(8):2538-50.
  32. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(2):281-90.
  33. Tan Z, Qian X, Jiang R, Liu Q, Wang Y, Chen C, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol*. 2013;191(4):1835-44.
  34. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupper ML, Jr., Duffield JS. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol*. 2009;183(10):6733-43.
  35. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2009;50(1):261-74.
  36. Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2012;5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies-Petro E Petrides and David Brenner):S27.

## TANycytic EPENDYMOma OF THE FILUM TERMINALE REGION; A CASE REPORT

Marko Petrović<sup>1,2</sup>, Marina Miletić-Kovacević<sup>2</sup>, Nemanja Jovanović<sup>1,2</sup>, Radivoje Nikolić<sup>1,2</sup>, Savo Raičević<sup>3</sup>, Vojin Kovacević<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Center for neurosurgery, Clinical Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Department of pathology, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

## TANICITIČNI EPENDIMOM FILUM TERMINALE REGIONA; PRIKAZ SLUČAJA

Marko Petrović<sup>1,2</sup>, Marina Miletić-Kovačević<sup>2</sup>, Nemanja Jovanović<sup>1,2</sup>, Radivoje Nikolić<sup>1,2</sup>, Savo Raičević<sup>3</sup>, Vojin Kovačević<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centar za neurohirurgiju, Klinički Centar Kragujevac, Kragujevac, Srbija

<sup>2</sup> Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

<sup>3</sup> Služba za patologiju, Klinički Centar Srbije, Beograd, Srbija

Received / Priljen: 30. 01. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 06. 03. 2017.

### ABSTRACT

*Tanycytic ependymoma is a very rare spindle-cell variant of ependymoma derived from tanocytes, which are part of the primitive nervous system. This paper is presenting 48-year old woman who presented with low back and right-sided leg pain of moderate intensity. MRI showed spinal intradural tumor at the level of the L1 vertebral body. Right-sided L1 hemilaminectomy and en bloc tumor resection were performed. Neuroradiological and intraoperative diagnosis of schwannoma was revised to tanycytic ependymoma after careful immunohistochemical analysis. Six months postoperatively, MRI did not show tumor recurrence. Tanycytic ependymoma at the region of filum terminale is extremely uncommon and only three cases have been described in the literature. The low incidence of this tumor and atypical histological image, which is distinct from the typical features of commonly encountered ependymomas, can present a challenge in terms of making an accurate diagnosis. Awareness of this transitional form of ependymoma among neurosurgeons and pathologists may avoid incorrect surgical approaches and postoperative treatment course.*

**Key words:** tanocytes, ependymoma, filum terminale

### SAŽETAK

*Tanicitični ependimom je vrlo retka forma ependimoma koja vodi poreklo od tanicita, ćelija koje su deo primitivnog nervnog sistema. Ovde je prikazan klinički slučaj pacijentkinje stare 48 godina, kod koje je bolest počela umerenim bolovima u donjem delu leđa i desnoj nozi. MR pregled je ukazao na spinalni intraduralni tumor u nivou L1 pršljenškog tela. Nakon hemilaminektomije na L1 nivou sa desne strane, tumor je uklonjen u celosti. Nakon pažljive analize imunohistohemijskih preparata, neuroradiološka i intraoperativna dijagnoza švanoma je revidirana u tanicitični ependimom. MR pregled nakon 6 meseci od operacije nije ukazao na sigurne znake recidiva tumora. Tanicitični ependimom u filum terminale regionu je izuzetno redak i do sada je u literaturi opisano 3 slučaja. Niska inidencija ovog tumora i atipična histološka slika, koja se razlikuje od drugih čestih ependimoma u ovoj regiji, može biti veliki izazov pri pokušaju donošenja precizne dijagnoze. Podizanjem svesti o postojanju ove forme ependimoma među neurohirurzima i patolozima mogu se izbeći pogrešni hirurški pristupi, kao postoperativna evaluacija i tok lečenja.*

**Ključne reči:** taniciti, ependimom, terminalni filum

### ABBREVIATIONS

MRI - magnetic resonance imaging

L - lumbar

HE - hematoxylin-eosin



## INTRODUCTION

Ependymomas are tumors of neuroectodermal origin which usually arise from the ependymal cells in the central canal of the spinal cord, the filum terminale region, choroid plexus or white matter adjacent to the ventricular surface of the brain (1). The annual incidence rate of all ependymomas in Europe is around 2 cases per million, occurring more often in men than women (2), and approximately 15% of all patients are children younger than 5 years (3). Spinal cord and filum terminale lesions are typically associated with back pain of long duration, and motor or sensory deficits of lower and upper extremities. Tanycytic ependymoma is an even more rare spindle-cell variant of ependymoma derived from tanycytes, which are part of the primitive nervous system. By reviewing the scientific papers that have been published so far, it is possible to find three similarly described cases of tanycytic ependymoma occurring at the region of filum terminale (4-6).

In the present paper we report a rare case of a tumor of the cauda equina region in a 48-year-old woman in whom the intraoperative diagnosis of schwannoma was revised to tanycytic ependymoma after the application of immunohistochemical stains and careful interpretation. The identification of ependymoma is of a particular significance not only in this case but in the similar cases as well because of the postoperative treatment course of patients and further evaluation.

## CASE REPORT

In this paper, we present the case of a 48-year-old female patient, who was admitted to the Centre for Neurosurgery, Clinical Centre "Kragujevac", Kragujevac, because of the spinal intradural tumor at the level of the L1 vertebral body, that is the region of filum terminale, diagnosed by means of a lumbosacral spine MRI. The lesion showed isointensity on the T1-weighted image and slightly higher signal intensity than the spinal cord on the T2-weighted image with minimal enhancement after gadolinium administration.

The patient's discomfort in terms of low back pain of moderate intensity had lasted for a couple of years before she felt the pain in her right leg five months prior to the hospitalization. There was no presence of a neurological deficit in the patient verified on hospital admission and there was no bowel or bladder dysfunction either.

After preoperative preparation the patient underwent surgery on the sixth day of hospitalization. We performed L1 right-sided hemilaminectomy, after which the strictly restricted intradural tumor was removed. The tumor was friable, its colour was gray-white and it was adherent to the filum terminale and spinal nerve. The entire tumor was removed under operative magnification with surgical microscope, the spinal nerves remained undamaged and the resection of the filum terminale was not performed.

The early postoperative course was uneventful. The patient had neither motor nor sensory deficits nor sphincter disturbances. Sutures were removed on the eighth postoperative day, after which liquorrhea occurred in the cranial part of the postoperative wound. The liquorrhea was managed by means of one secondary suture and the restriction of fluid intake.

Pathohistological analysis (HE staining and immunohistochemistry) indicated the presence of the moderate cellular tumor tissue of glial origin and solid and fascicular structure. Spindle-shaped cells formed perivascular rosettes and they were characterized by round to oval, moderately pleomorphic nuclei and grainy chromatin. In the pathohistological sample the cells showed diffuse immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and individual expression of S100 protein. The lesion was characterized by the pathologists as a grade II tanycytic ependymoma according to the classification of World Health Organization (WHO) (7).

In the further course of treatment the patient was referred to physical therapy. No adjuvant radiotherapy was offered to the patient. In order to exclude the possibility that the removed ependymoma had occurred due to the liquor dissemination – MRI of the endocranium was performed during a postoperative period, showing no sure signs of expansive lesions.

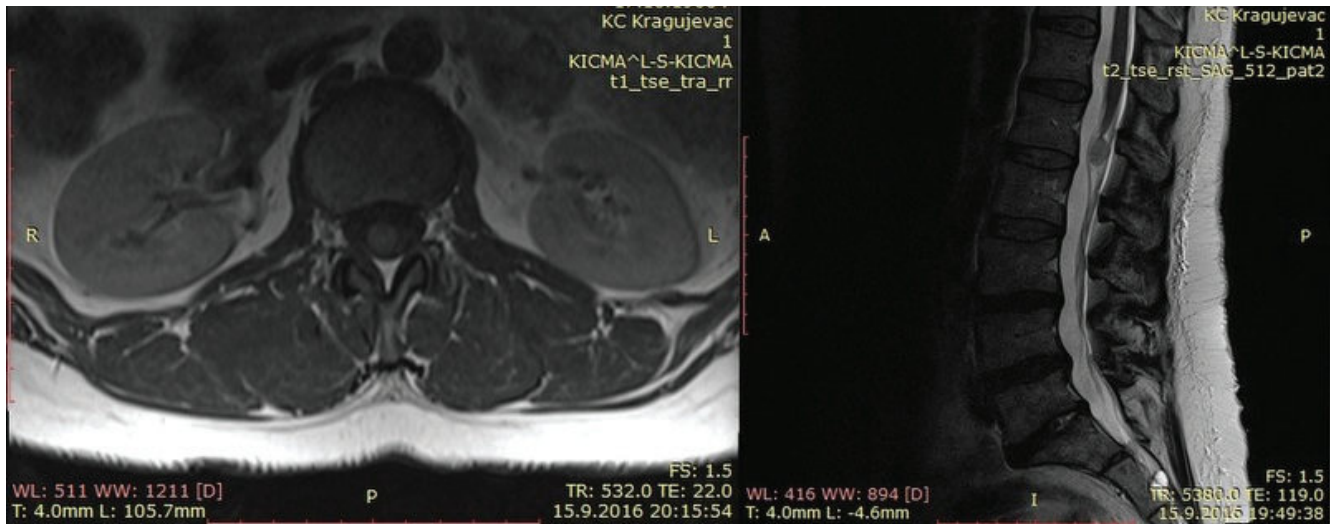
Three months after the surgery, at the first control examination the patient did not claim to feel any level of pain and discomfort. Six months after the surgery a control MRI of the lumbosacral spine was performed, showing no signs of the recurrence of tumor which had previously been operated on. A control MRI is planned to be performed again in a one-year period.

## DISCUSSION

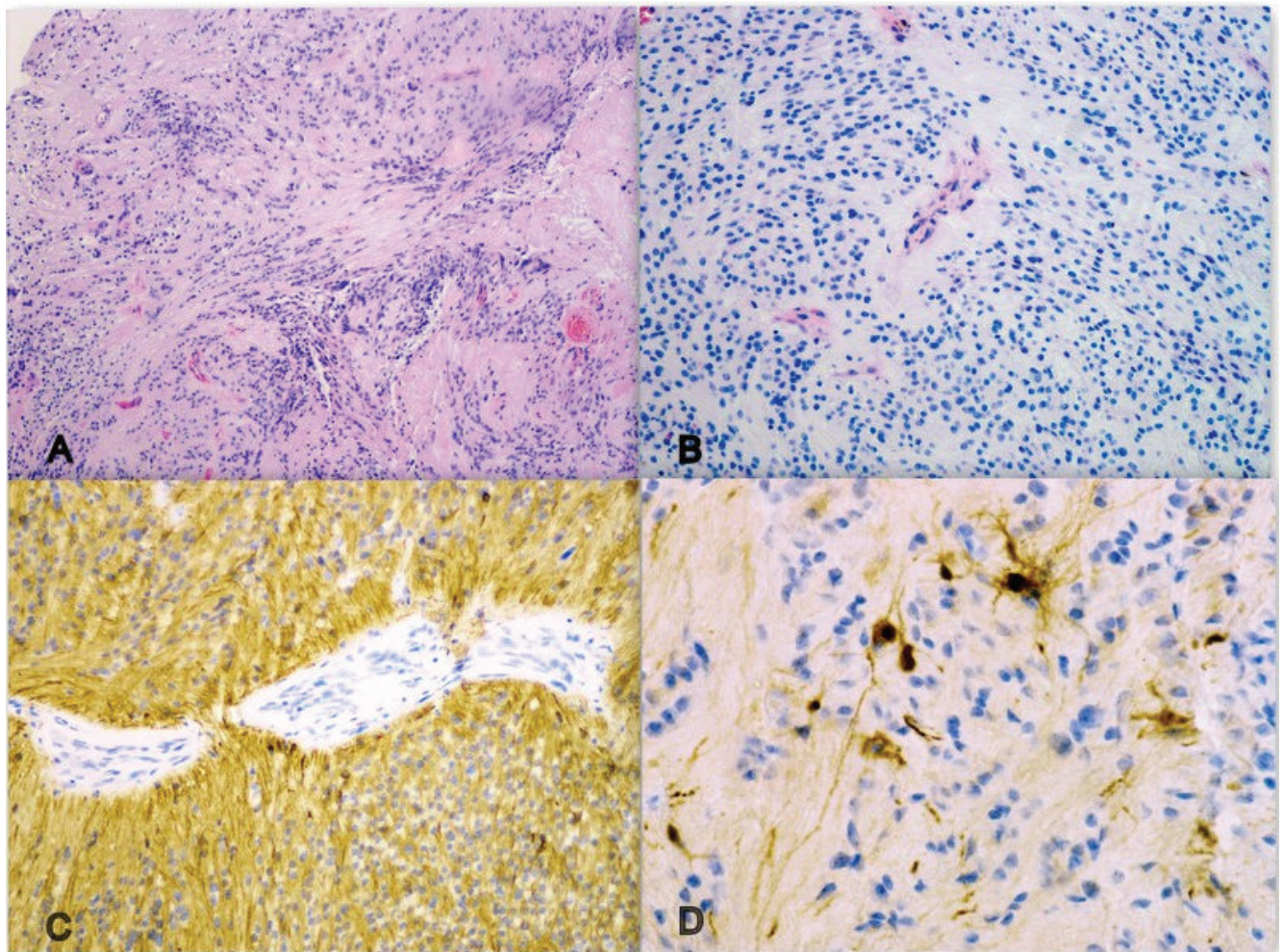
Tanycytes are specialized ependymal cells which line the floor of the third ventricle and provide structural and functional links between cerebrospinal fluid and the perivascular and neural space. They can also be found in the spinal cord and represent the common progenitor cells of both ependymal cells and astrocytes (8).

Tanycytic ependymoma is a form of ependymoma that was initially described by Friede and Pollak in 1978, who represented it as neoplasm of low-to-moderate cellularity characterized by a flow of elongated cells with moderate nuclear pleomorphism and usually absent mitotic figures (9). In these lesions, the classic ependymal rosettes and perivascular pseudorosettes are replaced by more fibrillar cells (10). Neoplastic cells usually do not exhibit anaplastic cytological features, and although it has been assigned for grade II lesions in the current WHO classification (7), it is generally a slow-growing and noninvasive tumor (11).

Just like in the case presented here, the clinical presentation correlates with the anatomic location of the neoplasm. Contrast-enhanced MR imaging remains the



**Figure 1.** Lesion showed isointensity on the MRI T1-weighted image (1a, transversal plane) and slightly higher signal intensity than the spinal cord on the T2-weighted image (1b, sagittal plane) with minimal enhancement after gadolinium administration.



**Figure 2.**

- A. HE x100 1 - The moderate cellular tumor tissue of glial origin and solid and fascicular structure.
- B. HE x200 1 - The tumor cells contain round to oval nuclei with the grainy chromatin and form rare structures such as perivascular pseudorosettes.
- C. GFAP x200 3 -The tumor cells show diffuse immunoeexpression of glial fibrillary acidic protein (GFAP).
- D. S100 x400 3 - The tumor cells show individual expression of S100 protein.



radiological investigation of choice. Due to the similar radiological picture as in myxopapillary ependymomas and cystic schwannomas, the final decision in resolving the diagnostic suspense rests with the pathologist.

Intraoperatively, the tumors have a clear cleavage in regard to neural structures but require a microneurosurgical technique for their removal. Tumors usually have minimal vascularity with cystic component, which contain dark-colored fluid. Among cases reported so far (4, 5), no increase in neurological deficits has been noted. Additionally, no tumor recurrence has been detected in the patients, which indicate favorable outcomes, without adjuvant therapy.

The low incidence of these tumors and atypical histological image, which is distinct from the typical features of commonly encountered ependymomas, can present a challenge in terms of making an accurate diagnosis. However, the presence of spindle cells, eosinophil cytoplasm, oval isomorphic nuclei and the absence of Rosenthal fibers indicate the ependymoma rather than other similar tumors (pilocytic astrocytoma, schwannoma, fibroblastic meningioma) (11). Careful immunohistochemical and ultrastructural analyses are necessary to establish the diagnosis of tanyctic ependymoma. Considering the fact that among other ependymomas in the cauda equine region the most frequent type is myxopapillary ependymoma, the diagnosis of the afore mentioned ependymoma can be excluded in this particular case due to the absence of papillary architecture and myxoid degeneration.

## CONCLUSION

Tanyctic ependymoma at the region of filum terminale is extremely uncommon and only three cases have been described in the literature. The treatment of tanyctic ependymomas should be conducted in the same way as ordinary ependymomas, since there is no current evidence suggesting that these morphologically distinct tumors differ in terms of biological behavior. A careful histological inspection with utilization of immunohistochemical stains and ultrastructural microscopy may be necessary to distinguish tanyctic ependymoma from other neoplasms such as schwannoma and pilocytic ependymoma. Awareness of

this transitional form of ependymoma among neurosurgeons and pathologists may avoid incorrect surgical approaches and postoperative course.

## REFERENCES

1. Oppenheim JS et al. Ependymomas of the third ventricle. *Neurosurgery*. 1994; 34:350–2.
2. ENCR. European Network of Cancer Registries. Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon; 2001.
3. Parkin DM, Kramarova E, Draper JG, et al. International incidence of childhood cancer, vol. II. Lyon: IARC Scientific Pub. No. 144; 1998.
4. Mohindra S, Bal A, Singla N. Pediatric tanyctic ependymoma of the cauda equina. Case report and review of the literature. *J Child Neurol*. 2008; 23:451–454.
5. M. Shintaku, T. Sakamoto. Tanyctic ependymoma of the filum terminale with pleomorphic giant cells. *Brain Tumor Pathol*. 2009; 26:79–82.
6. Neelima Radhakrishnana, N. Suresh Nair b, Divyata Rajendra Hingwalac, T.R. Kapilamoorthyc, V.V. Radhakrishnana, Tanyctic ependymoma of filum terminale: A case report. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2012; 114:169–171.
7. McLendon RE, Wiestler OD, Kros JM, Korshunov A, Ng HK. Ependymoma and anaplastic ependymoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) WHO classification of tumors of the central nervous system, 4th edn. IARC Press, Lyon, 2007. pp 74–80
8. Boccardo M, Telera S, Vitali A. Tanyctic ependymoma of the spinal cord: case report and review of the literature. *Neurochirurgie*. 2003; 49:605–10.
9. Kobata H et al. Tanyctic ependymoma in association with neurofibromatosis type 2. *Clin Neuropathol*. 2001; 20:93–100.
10. Khaled M. Krisht and Meic H. Schmidt, Tanyctic Ependymoma: A Challenging Histological Diagnosis. *Case Reports in Neurological Medicine*. 2013, Article ID 170791, 5 pages. doi.org/10.1155/2013/170791
11. Kawano N et al. Spinal tanyctic ependymomas. *Acta Neuropathol*. 2001; 101:43–48.