

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Марина Милетић-Ковачевић

Улога галектина 3 у патогенези експерименталног аутоимунског миокардитиса

Ментор: Доц. др Биљана Љујић

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	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	5
1.1.3.3. Миокардитис циновских ћелија	6
1.1.3.4. Еозинофилни миокардитис	6
1.1.3.5. Дилатациона кардиомиопатија	6
1.1.3.6. Саркоидотични миокардитис	7
1.1.4. Клиничка презентација миокардитиса	7
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	12
1.1.8. Улога урођеног имунског одговора у аутоимунском миокардитису	13
1.1.9. Улога стеченог имунског одговора у имунопатогенези миокардитиса	17
1.1.9.1. Улога Th1 ћелија у аутоимунском миокардитису	17
1.1.9.2. Улога Th2 ћелија у аутоимунском миокардитису	19
1.1.9.3. Улога Th17 ћелија у аутоимунском миокардитису	20
1.1.9.4. Улога Т регулаторних ћелија у аутоимунском миокардитису	21
1.1.9.5. Улога Th9 ћелија у аутоимунском миокардитису	22
1.2. Улога хуморалног имунског одговора у аутоимунском миокардитису	22
1.3. Галектин 3	23
1.4. Класификација галектинских молекула	23

1.5. Структурне и биохемијске карактеристике галектин 3	25
1.5.1. ND терминални домен	26
1.5.2. CRD регион	27
1.6. Експресијастике галектина 3	28
1.7. Улога галектина 3	29
1.7.1. Улога екстрацелуларног галектина 3	29
1.7.2. Улога галектина 3 у ћелијској атхезији	30
1.7.3. Улога галектина 3 у ћелијској активацији и хемотакси	31
1.7.4. Улога интрацелуларног галектина 3	32
1.7.5. Улога и значај галектина 3 у регулацији имунског одговора	33
1.7.6. Улога галектина 3 у развоју миокардитиса и срчане фиброзе	35
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	37
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	39
3.1. Експерименталне животиње	39
3.1.1. Поступак добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3	39
3.2. Индукција експерименталног модела аутоимунског миокардитиса применом МуНС $\alpha_{334-352}$ пептида	41
3.3. Одређивање хипертрофије срца	43
3.4. Хистопатолошка процена тежине експерименталног аутоимунског миокардитиса	44
3.4.1. Фиксација ткива	44
3.4.2. Дехидратација	45
3.4.3. Просветљавање ткива у ксилолу	45
3.4.4. Импрегнација ткива парафином	45
3.4.5. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	46
3.4.6. Бојење колагена Sirius red методом	47
3.4.7. Трихромно бојење колагена по Masson-у	48
3.4.8. Процена хистолошког скорa	49
3.5. Имунофлуоресценција	49
3.6. Имунохистохемија	50

3.7. Анализа моноклеарних ћелија срца и слезине методом проточне цитометрије	52
3.7.1. Изолација моноклеарних ћелија из срца	52
3.7.2. Изолација моноклеарних ћелија из слезине	53
3.8. Фенотипса и функционална анализа популација изолованих моноклеарних ћелија	54
3.8.1. Бојење мембранских маркера	56
3.8.2. Бојење интрацелуларних маркера и цитокина	56
3.7. Одређивање концентрације цитокина у серуму	58
3.10. Статистичка обрада података	59
4. РЕЗУЛТАТИ	61
4.1. Делација гена за Gal-3 значајно повећава хипертрофију миокарда	61
4.2. Делација гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису	62
4.3. Делација гена за Gal-3 значајно мења заступљеност моноцитних и гранулоцитних популација/субпопулација у ткиву срца мишева имунизованих МуНС $\alpha_{334-352}$ пептидом	66
4.4. Серумске концентрације Th2 цитокина IL-4 И IL-33 су веће у оболелим Gal-3КО мишевима	69
4.5. Делација гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева	71
4.6. Делација гена за Gal-3 значајно повећава укупан број F4/80+ ћелија и олакшава алтернативну активацију макрофага у срцу	75
4.7. Делација гена за Gal-3 значајно повећава процентуалну заступљеност и укупан број мијелоидних CD11b+ Ly6C ^{hi} макрофага	78
4.8. У срцу оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+ ћелија које продукују IL-13	82
4.9. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца	85
4.10. Делација гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу	86

4.11. Делетија гена за Gal-3 повећава експресију IL-10 у срцу	89
4.12. Делетија гена за Gal-3 олакшава алтернативну активацију макрофага и мења процентуални однос F4/80+IL-12+/IL-10+, тако што повећава процентуалну заступљеност F4/80+IL-10+ макрофага у слезини	90
4.13. У слезини оболелих Gal-3КО мишева присутно је више регулаторних дендритских ћелија	93
5. ДИСКУСИЈА	96
5.1 Делетија гена за Gal-3 у C57BL/6 мишевима значајно повећава оштећење ткива срца у експерименталном аутоимунском миокардитису	97
5.2. Делетија гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева	98
5.3. Одсуство галектина 3 подстиче алтернативну активацију макрофага у срцу након имунизације пептидом миозина MuHC $\alpha_{334-352}$	101
5.4. Дефицијенција галектина 3 је удружена са повећаном инфилтрацијом дендритских ћелија у срцу и слезини	103
5.5. Делетија гена за Gal-3 смањује депоновање колагена у срцу	104
5.6. Оболели Gal-3КО мишеви имају већи број IgG позитивних ћелија и IgG депозита у ткиву срца	106
6. ЗАКЉУЧЦИ	107
СКРАЋЕНИЦЕ	108
7. РЕФЕРЕНЦЕ	110

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 ≥ 14 лимфоцита/ mm^2 , ≤ 4 моноцита/ mm^2 , ≥ 7 CD3+ Т лимфоцита/ mm^2 , поставља се дијагноза миокардитиса. Постављање дијагнозе на основу оваквих имунохистохемијских критеријумима 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, β тежак ланац срчаног миозина, узрок настанка ДЦМ [7, 8]. Такође, миокардитис може бити узрокован широким спектром инфективних агенаса, укључујући вирусе (коксаки вирус В3 и аденовируси), бактерије, рикеције, хламидију, гљивице и протозое као и неинфективним агенсима као што су физички агенси (зрачење), токсини, хиперсензитивне реакције, као и одређени медикаменти (трициклични антидепресиви, антрациклин) [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, тропонину и митохондријалним 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 диновских ћелија и неки случајеви еозинofilног миокардитиса који нису праћени периферном хиперееозинофилијом. 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 (*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, а, и f хаплотип: А/Ј Н-2^а, А.СА Н-2^f и А.СВ Н-2^s) развјају тежак облик миокардитиса, док су мишеви са В10 подлогом (Н-2 b, а, s, и хаплотип: С57BL/10Ј, В10.А, В10.С, и В10.PL 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 EAM [23]. Недавно су описана још три генска локуса лоцирана на хромозому 1 и 4, који утичу на развој миокардитиса индукованог коксаки В3 вирусом [24].

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 ≈ 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 трансплатације 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 моноклеарним ћелијама укључујући CD3+ Т лимфоците, CD68+ макрофаге, дендритичке 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. Миокардитс циновских ћелија

Миокардитс циновских ћелија настаје као резултат самосталног аутоимунског одговора и или у склопу других аутоимунских болести [40]. Најчешће се јавља код старијих жена. Миокардитс циновских ћелија карактерише јединствена хистолошка слика и прогресија ка субкутним 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, плазмаци, 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 мононуклеарног 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 Т 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 Т 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 аутоimunских 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. 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% животња 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/c, који развијају болест 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/c соја. На хистопатолошким препаратима ткива срца изолованог из мишева инффицираних *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/c, A/J и SJL/J мишеви развијају хронични миокардитис са генерализованим мононуклеарним 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- α [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 α -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 мононуклеарни 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^a, А.ВУ H2^b, А.СА H2^f и А.СВ H2^s), као и ВАLB/c мишеви са H2^d 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 МуНСα₆₁₄₋₆₂₉ пептидом, SWXJ мишеви МуНСα₄₀₆₋₄₂₅ и МуНСα₁₆₃₁₋₁₆₅₀ пептидом, док се код мишева соја А/Ј миокардитис индукује применом МуНСα₃₃₄₋₃₅₂ пептида као и сТnI₁₀₅₋₁₂₂. Мишеви соја А/Ј имунизовани тропонином I или миозином, развијају тежак миокардитис са кардиомегагијом, фиброзом, редукованом ејекционом фракцијом и повећаним морталитетом [70]. Много блажи облик миокардитиса и са мањом инциденцом болести развијају имунизовани мишеви соја C57BL/10 J (В10.А H2^a, В10.С H2^s и В10.РL H2^u) [71]. Резултати новијих истраживања описују и мишеве који спонтано развијају миокардитис, као што су HLA-DQ8 трансгени NOD мишеви (NOD.DQ8.Аβо) [72]. У овом експерименталном моделу детектован је већи степен систолне дисфункције, обимнији моноклеарни ћелијски инфилтрат и већа смртност код NOD.DQ8.Аβо 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+ Т лимфоцити главне ефекторске ћелије у аутоимунском миокардитису [73]. Иако су CD4+ Т лимфоцити главне ефекторске ћелије, за развој аутоимунског миокардитиса неопходна је и активација других ћелија урођеног и стеченог имунског одговора [74]. Показано је да C3 компонента комплемента има кључну улогу у развоју ЕАМ посебно у иницијалној фази болести. Деплеција C3 компоненте у време иницијације болести али не и у време прогресије, је од суштинске важности за превенцију ЕАМ [75]. Осим C3 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 урођених лимфоидних ћелија (енгл. *Innate lymphoid cells*) [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 НК ћелија резултира већом инфламацијом, фиброзом и губитком срчане функције [81]. НК ћелија 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 [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 НК 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 мононуклеарних 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^{high} популације моноцита чија је улога уклањање ткивног дебриса 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^{high} моноцити могу диференцирати у алтернативно активирание M2 макрофаге. Према томе Ly6C^{high} моноцити могу диференцирати и у M1 и M2 макрофаге [90, 91]. Међутим, Ly6C^{low} моноцити регрутовани у касној фази запаљења могу диференцирати само у M2 макрофаге [91]. Хумани CD14^{high} моноцити/макрофаги одговарају мишјм Ly6C^{high} ћелијама, док су CD14^{int} еквивалентни Ly6C^{low} макрофагама [92]. Ly6C^{high} моноцити се регрутују у оштећен миокард преко CCR2 и диференцирају у M1 макрофаге [93, 94]. M1 макрофаге секретују IL-1 β , IL-6 и TNF- α и исказују фагоцитне, протеолитичке и проинфламаторне функције [95]. M1 макрофаге фагоцитишу и уклањају ткивни дебрис у раној фази оштећења срца. У каснијим фазама, Ly6C^{low} моноцити се регрутују у миокард преко CX3CR1 и диференцирају у M2 макрофаге који секретују TGF- β 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⁺ 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- β 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⁺ CD204⁺ 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^{high} 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⁺ моноцити. CD11b⁺ моноцити

представљају главну ћелијску популацију у миокарду током акутне фазе инфламације, међутим током хроничне фазе инфламације имају протективну улогу. Заправо, CD11b+ моноцити представљају највећи део инфилтришућих мононуклеара у срцу током пика болести. Међутим, CD11b+ моноцити су главни негативни регулатори секреције IFN- γ чији недостатак супримира аутореактивне CD4+ 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+ 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+ популација Т лимфоцита у зависности од цитокинског миљеа и антигенпредентујућих ћелија, може да диференцира у субсетове са терминалним фенотипом. До сад је идентификовано неколико субпопулација CD4+ 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+ ћелије које првенствено продукују IFN- γ [111]. Високи нивои IFN- γ забележени су у мишевима оболелим од тешког облика вирусног миокардитиса, такође и у серуму пацијената са идиопатском дилатираном кардиомиопатијом [112, 113]. Повећана продукција IFN- γ 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- γ [114, 115]. Трансгени мишеви који прекомерно експримују ген за IFN- γ развијају хронични миокардитис и кардиомиопатију тако што делују као потентни индуктори системских инфламаторних цитокина и то првенствено IL-12 и TNF- α [116, 117]. IL-12 на сличан начин делује као и IFN- γ . Мишеви третирани егзогеним IL-12 развијају тежи облик миокардитиса [118, 119]. Међутим, сасвим супротни резултати се добијају применом блокирајућих IFN- γ моноклонских антитела или делецијом гена за IFN- γ . IFN- γ *knock-out* (IFN- $\gamma^{-/-}$) 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 *IFNg^{-/-}*, *IFNgr^{-/-}*, *Tbx21^{-/-}* и животињама које су третиране анти-IFN- γ моноклонским антителима [118, 119, 121, 122]. Интересантно је да када се *IFNg^{-/-}* 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 *IFNg^{-/-}* мишевима прогредирао је до обимног фиброзног ремоделирања срца, констриктивне и ДЦМ које су се често завршавале смрћу [123, 124]. Могуће објашњење протективне улоге IFN- γ може се наћи у резултатима студија које показују да овај цитокин индукује апоптозу аутореактивних Т ћелија [125], односно поседује антипролиферативне и имunosупресивне ефекте на лимфоидне и мијелоидне ћелије [123, 126]. Али највероватније је да IFN- γ поседује и патогене и протективне ефекторске функције које зависе од многобројних сигнала из микроокружења.

Осим IFN- γ као главног цитокина у Th1 имунском одговору, значајну улогу има и IL-12 као примарни медијатор ових ћелија. Показано је да су IL12R β 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 $^{-/-}$) развијају аутоимунски миокардитис, док су IL12p40 $^{-/-}$ 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^{-/-} који због делеције гена за IL-4 развијају болест која је по тежини врло слична ЕАМ у WT BALB/с 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^{-/-} животиње развијају тежи облик миокардитиса у поређењу са контролном групом [133]. Слични резултати добијени су када су IL-4^{-/-} 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 ЕАМ

индукују у IL-13^{-/-} 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 IL-13^{-/-}IL-4^{-/-} мишевима који су имали значајно блажи ток болести и инфламацију срца у поређењу са IL-13^{+/+}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- γ . Потенцијално решење овог проблема видело се након откривања новог субсета ефекторских CD4⁺ ћелија које продукују IL-17A и назване су Th17 лимфоцити [135]. Диференцијација и пролиферација наивних лимфоцита у Th17 ћелије је усмерена цитокинима TGF- β , 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-17A^{-/-} мишеви имају врло сличну инфламацију срца до 21. дана од индукције болести. Тек након 21. дана IL-17A^{-/-} 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 В10.S мишеви су резистентни на индукцију ЕАМ услед слабе поларизације у правцу Th17 имунског одговора [142].

1.1.9.4. Улога Т регулаторних ћелија у аутоимунском миокардитису

Регулаторни Т лимфоцити (T_{reg}) представљају јединствену субпопулацију Т лимфоцита која супримира функцију ефекторских Т ћелија и одржава периферну толеранцију [143]. Познато је да је недостатак T_{reg} 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 Н2^s соја осетљивији су на индукцију ЕАМ у поређењу са В10.С Н2^s мишевима упркос њиховом идентичном Н2^s хаплотипу. Једно од могућих објашњења је да А.СВ мишеви након индукције ЕАМ, у срцу имају значајно мањи T_{reg} дефинисаних као CD4+CD25+Foxp3+Т лимфоцити у односу на В10.С Н2^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- β . Запажена је значајно већа експресија TGF- β 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- β 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 Ca²⁺ 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].

1.2. Улога хуморалног имунског одговора у аутоимунском миокардитису

У патогенези аутоимунског миокардитиса осим главних ефекторских ћелија а то су аутореактивни CD4⁺ 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 α тешком ланцу срчаног миозина. Показано је да високи нивои анти- $\text{MyHC}\alpha$ антитела корелирају са тежином и прогресијом срчане болести док је смањење титра анти- $\text{MyHC}\alpha$ антитела у позитивној корелацији са добрим клиничким одговором [152].

1.3. 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 $\text{MyHC}\alpha_{334-352}$. Зато, у уводном делу детаљно објашњавамо структуру, експресију, биолошке ефекте галектина 3 и описујемо његов значај у регулацији имунског одговора.

1.4. 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 β -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 β -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 процесма [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 β -сандвич кога формирају две благо савијене β -плоче које се састоје из 6 β -ланаца који формирају конкавну страну, и 5 β -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 1993. године, на основу броја и организације CRD региона, галектине класификовали у три групе:

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 полипептидног ланца који формира два различита али хомолога CRD региона повезана кратким пептидом ланцом дужине од 70 аминокиселина. 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.

1.5. 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 перитеоналних макрофага 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 остеле 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) NH₂ терминалног домена (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 металопротеиназама (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 антиапоптотичку 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 [177-179].

1.5.1. 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 Tyr¹⁰² 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 металопроотеиназа (MMP-2 и MMP-9) [184]. Расцеп на позицији Ala⁶²–Tyr⁶³ 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 Ser⁶ утиче на антиапоптотску активност Gal-3 [185].

1.5.2. 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 анти-апоптотску активност како Vcl-2 молекула, као 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 интеракцију 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 монемричну 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].

1.6. 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 четвог 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].

1.7. 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.

1.7.1. 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 адхезији, активацији и хемотакси за различите типове ћелија. На тај начин Gal-3 утиче на различите биолошке процесе које су одржаваће ћелијске хомеостазе, имунолошке реакције, органогенеза и ангиогенеза, инвазија тумора и метастазе.

1.7.2. 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 везе за ламинин, фибронектин, као и за колаген тип 4 и тенасцин-С i –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 $\alpha 1\beta 1$ интегрини и α 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].

1.7.3. 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 анјона 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 Ц и протеин киназе А [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.

1.7.4. 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 D₁ [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].

1.7.5. 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, дендритичним 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^{-/-} макрофаги имају смањену фагоцитну активност апоптотичних тимоцита или овчијих еритроцита у односу на макрофаге контролних мишева који експримирају овај лектин (Gal-3^{+/+}) [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-5 и IL-13 је редукована у односу на контролну групу животиња, док је класични пут активације под утицајем LPS и IFN- γ не измењена [240]. Под утицајем LPS, макрофаги Gal-3^{-/-} мишева продукују већу

концентрацију проинфламаторних цитокина IL-6, IL-12 и TNF- α него макрофаги Gal-3^{+/+} 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- α , IL-6, IL-1 β и IFN- γ) [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].

Т и Б лимфоцити експримирају Gal-3 искључиво након активације. Т 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 В лимфоцита са IL-4 праћена је појачаном експресијом Gal-3, што промовише диференцијацију В лимфоцитау меморијске ћелије [247]. Галектин 3 у лимфном ткиву регулише организацију ниша B220⁺ и CD138⁺ 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 антиапоптоску улогу у неоплазмама В лимфоцита [249] и одржавању анергије В 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.

1.7.6. 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 да је Gal-3 потенцијална нова терапеутска мета у лечењу хроничне срчане инсуфицијенције. Такође, *Henderson* и сарадници [256] показали су 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 претходо 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 мозина $\text{MuHC}\alpha_{334-352}$.

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

1. Испитати утицај галектина 3 на развој хипертрофије миокарда 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 развој фиброзе срца хистолошким бојењима код WT C57BL/6 и Gal-3 дефицијентних C57BL/6 мишева
6. Испитати фенотипске и функционалне карактеристике ћелија које посредују у инфламацији и фибрози 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* или *Gal3^{-/-}*). Gal-3KO животиње су добијене из виваријума Универзитета Калифорније (*Proffesor 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 добијања *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. *Polimerase 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. Добијени 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 МуНС α ₃₃₄₋₃₅₂ пептида

Као антиген за индукцију ЕАМ коришћен је МуНС α ₃₃₄₋₃₅₂ пептид (*Shanghai ShineGene Molecular Biotech*). Сви мишеви (WT и Gal-3КО) имунизовани су раствором који је садржао исту количину МуНС α ₃₃₄₋₃₅₂ пептида и CFA (eng. *Freunds adjuvant complete, Sigma-Aldrich St.Louis, USA*). Сваком мишу је субкутано у пределу бокова, на два места, апликовано 100 μ g МуНС α ₃₃₄₋₃₅₂ пептида у 100 μ l PBS-а (енг. *Phosphate-buffered saline, Gibcotm, USA*) и 100 μ l CFA (*Sigma-Aldrich St.Louis, USA*) са 500 μ 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 μ l дестиловане воде). *Pertusis toxin* је купљен од *List Biological Laboratories, USA, Campbell*. Растворени *Pertusis toxin* у концентрацији 50 μ 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 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 1).

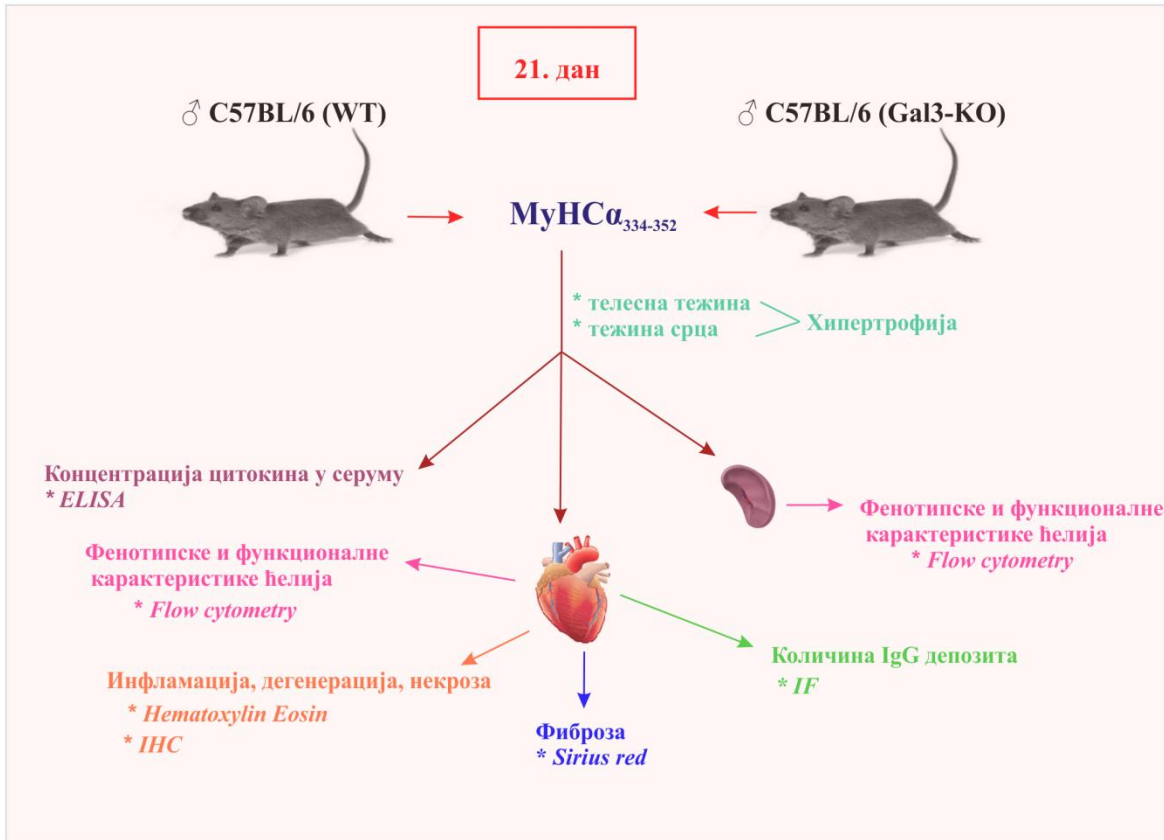


Схема 1. Евалуација ЕАМ у WT и Gal3-KO мишева. Индукција ЕАМ применом МуНСα₃₃₄₋₃₅₂ пептида код C57BL/6 WT мишева и C57BL/6 Gal3-KO мишева.

3.3. Одређивање хипертрофије срца

Степен хипертрофије срца одређиван је 21. дана након индукције болести одређивањем односа између укупне телесне тежине миша и тежине претходно перфундованог срца раствором за перфузију. Раствор за перфузију је припремљен

мешањем 400 μ 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 μ m који су бојени хематоксилином и еозином са циљем да се утврди локализација запаљенског инфилтрата, интезитет 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 микроорганизмима.

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 уроњена 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 једењења (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 ксилола 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 5 μ m резањем калупа на микротому. Микротом је апарат који служи са сечење екстремно малих пресека ткива ($\geq 5 \text{ mm}$). 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 урађани 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 мишића 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 исечка петнаестоминутним потапањем у *Буеново* раствор који је претходно био загрејан на 56°C (енг. *Bouins solution, Sigma Aldrich*). Испирање ткивних исечка 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 исечка у раствор који је садржао исте количине фосфо-

тунгстичне 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 (NIH, 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 израчунат 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 $5\mu\text{m}$ до $8\mu\text{m}$. 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 $500\mu\text{l}$ до $1000\mu\text{l}$ 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 $100\mu\text{l}$ 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 $150\mu\text{l}$ флуорохромом коњугованог и раствореног секундарног антитета: козјег анти-мишјег IgG (*Abcam, Cambridge, UK*) у разблажењу 1:200. Радни раствор секундарног антитета направљен је додавањем $1\mu\text{l}$ 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 $1000\mu\text{l}$ воденог медијума (*Fluorescent Mounting Medium with DAPI*), за очување флуоресценције ткива, и покровном лъуспицом.

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 интензитета флуоресценције је урађена анализом фотомикрографија помоћу рачунарског програма *ImageJ* (NIHh, 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 антимишћјих антитела (*Abcam, Cambridge, UK*).

Пре имунохистохемијског бојења парафински калупи ткива срца су на микротому исечени на серијске пресеке дебљине 5µм. 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 ендogene пероксидазе ткивни исечци су инкубирани у трајању од десет минута којима је претходно додато 100µl *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 третирано 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 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.

Испрани 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, увеличање x200.

3.7. Анализа мононуклеарних ћелија срца и слезине методом проточне цитометрије

Сви мишеви (*wild type* (WT) и *knock-out* (Gal-3KO)) након три недеље од субкутаног убризгавања МуНС $\alpha_{334-352}$ 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 μ l DNA-зе (*Sigma*) растворених у 2,5ml HBSS-a (*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 μ 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 порема од 40 μ 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% NaN₃ 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 порема величине 40 μ 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 dH₂O сипано је 200mg NaHCO₃, 8mg EDTA и 1652mg NH₄Cl. 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 спленocyта од хистиocyта. Суспензија спленocyта добијена овим начином користила се за анализу фенотипа ћелија проточном цитометријом. Вијабилност изолованих спленocyта 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 5×10^5 ресуспендованих ћелија у пуферу за бојење (*BD Biosciences*) волумена 50 μ 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

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
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- γ	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

НАЗИВ	КЛОН	ПРОИЗВОЂАЧ
Pe Rat anti mouse IgG _{2a} Isotype control	eBR2a	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Per CP Rat anti mouse IgG _{2ak} Isotype control	R35-95	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC Rat anti mouse IgG _{2b} Isotype control	A95-1	eBiosciences, San Diego, CA, USA
FITC Rat anti mouse IgG _{2a} 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 3×10^5 вијабилних ћелија ресуспендованих у укупном волумену од 50 μ l. У сваку епрувету која је садржала 50 μ 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 μ l узорка. Потом је у сваки узорак сипано по 50 μ 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 μ l антитела сипано је у 500 μ l раствора за бојење и из такве суспензије је узимано по 50 μ l радног раствора антитела и сипано у узорак волумена од 50 μ 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 узорка 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 μ 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 1×10^6 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 их 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 двадесетминутну 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 је 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 HEM, 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- γ , 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 μ 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 μ 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- γ . У све остале бунарчиће микротитар плоче сипано је по 150 μ 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 μ l одговарајућег стандарда а у остале бунарчиће прве колоне по 100 μ l *Reagent Diluent*-а (концентрације стандарда у првом бунарчету: IL-4 и IL-33 конц. 1000 pg/ml; IL-10 и IFN- γ конц. 2000 pg/ml; IL-13 4000 pg/ml). Добијања опадајућих концентрација стандарда изведено је на следећи начин: из првог бунарчета прве колоне у које је сипано 200 μ l стандарда одговарајуће концентрације узето је 100 μ l и сипано у друго бунарче исте колоне. Након мешања садржаја другог бунарчета из њега је извађено 100 μ l у треће бунарче и по истом принципу урађено до седмог бунарчета прве колоне, тако да је осмо бунарче прве колоне сдржало само 100 μ 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 μ l који је садржао 20 μ l серума и 80 μ 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 μ l *Wash Buffer*-а за свако бунарче три пута. Након испирања у свако бунарче је сипано по

100µl *Detection* антитела, плоче су прекривене фолијом и инкубиране два сата на собној температури. Након двочасовне инкубације просут 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 просут 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 интензитет 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 анализирани су на апарату *Microplate reader* у програму *Zenith, 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 група је одређена на $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

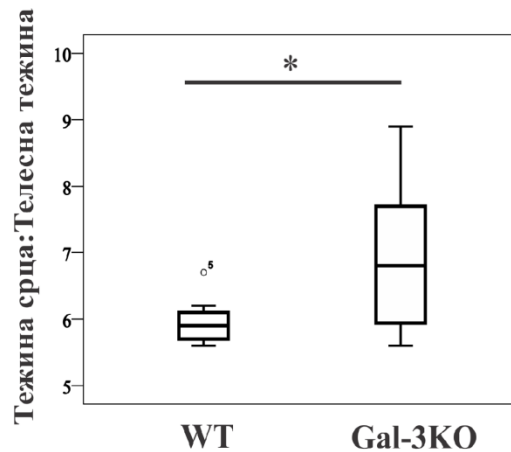
4.1. Одсуство гена за Gal-3 значајно повећава хипертрофију миокарда

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 МуНС $\alpha_{334-352}$ 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 миокарда 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 $\text{MyHC}\alpha_{334-35}$ пептида. Оболели Gal-3KO мишеви имају значајно већу хипертрофију миокарда у односу на WT мишеве (5.9889 ± 0.11235 vs 7.0558 ± 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. Делација 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 миокарда (**Графикон 1**) испитано је да ли одсуство овог молекула утиче на остале показатеље тежине аутоимунског миокардитиса.

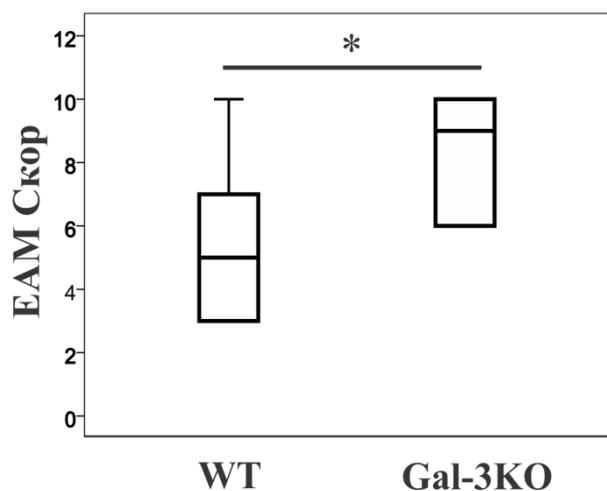
На тежину ЕАМ осим хипертрофије утичу и број, величина и локализација инфилтрата у срцу, као и степен дегенерације и некрозе кардиомиоцита. У том циљу одређиван је хистолошки скор и на основу њега вршена процена тежине ЕАМ. За дефинисање и квантификовање тежине ЕАМ, коришћен је скоринг систем по *Valaperti 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.)

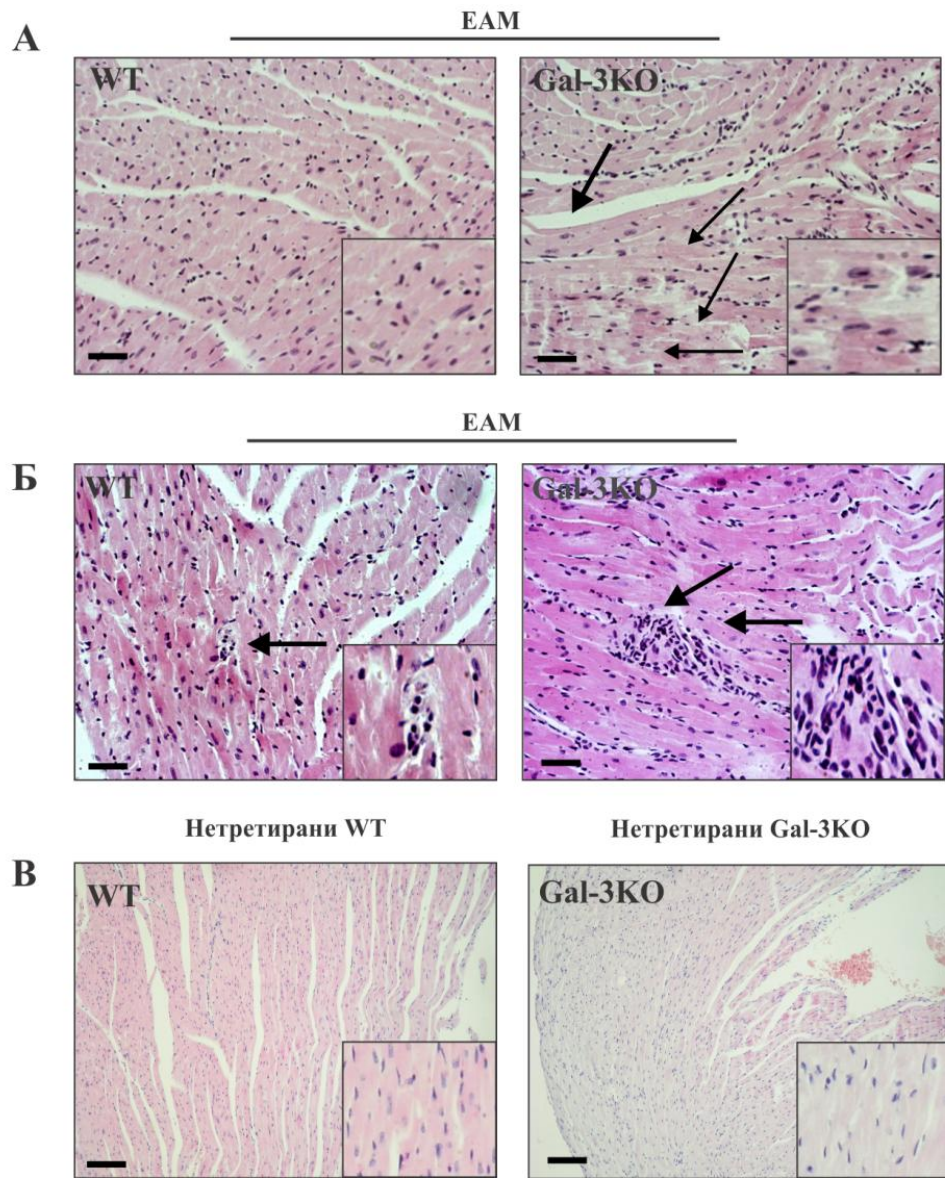
	ЛОКАЛИЗАЦИЈА	ИНТЕЗИТЕТ ЗАПАЉЕНСКЕ ИНФИЛТРАЦИЈЕ	ДЕГЕНЕРАЦИЈА	НЕКРОЗА	
0	Без знакова болести	Без знакова болести	Без знакова болести	Без знакова болести	
1	Апекс	<5 мононуклеара у видном пољу	<10% пп*	<10% пп*	
2	Латерални зид	5-20 мононуклеара у видном пољу	11-30% пп*	11-30% пп*	
3	Септум	>20 мононуклеара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

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 $MuHSc_{334-352}$ пептида. Репрезентативни исечци ткива срца обојени стандардним патохистолошким бојењем (увеличање 200х, размера=50 μ 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 $\text{MuNS}\alpha_{334-352}$ пептидом

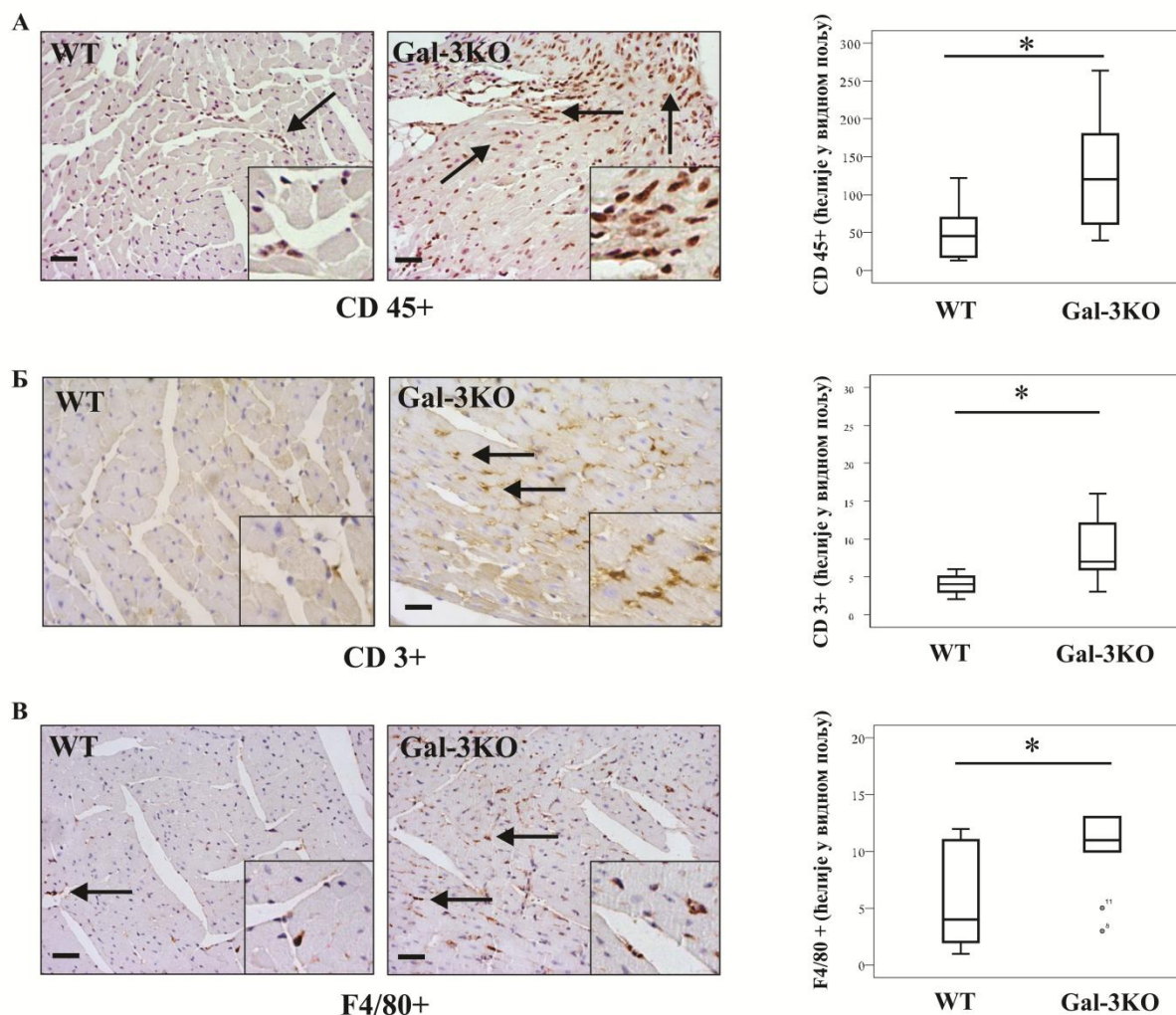
Како је код Gal-3KO мишева уочен већи хистолошки скор (**Графикон 2**), значајно јаче оштећење миокарда са бројнијим инфламацијским ћелијама (**Слика 1**), анализирано је да ли су уочене разлике последица различите заступљености појединих субпопулација моноцита. Познато је да се инфламацијски инфилтрати у ткиву оболелог миокарда углавном састоји 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-3KO мишева у поређењу са бројем истих ћелија у ткиву срца WT контролних мишева (**Слика 2А**).

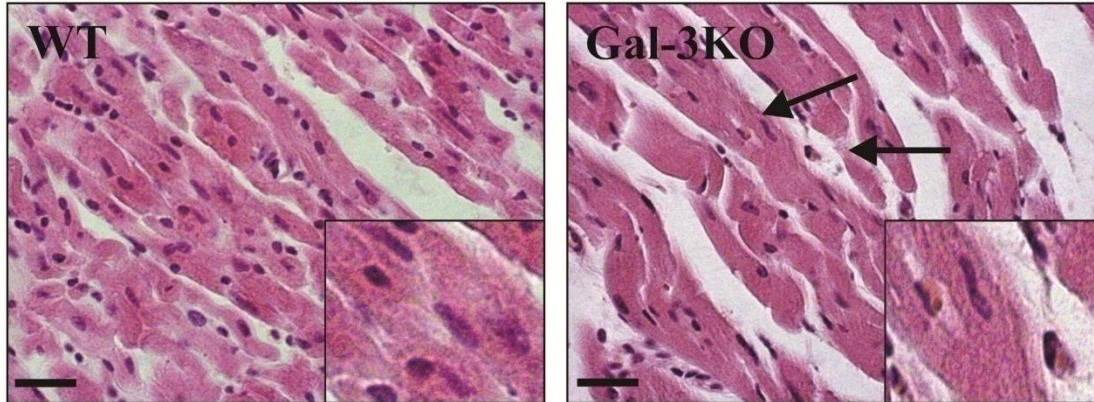
CD3+ лимфоцити: Даљом анализом ткивних исечака срца имунизованих мишева детектована је значајна разлика у броју CD3+ ћелија. Резултати анализе показали су да се у миокарду Gal-3KO мишева детектује значајно већа заступљеност CD3+ лимфоцита када се пореди са бројем ових ћелија у ткиву миокарда WT контролних 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-3KO 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±19,8 vs 135±2,1), F4/80+ (5,66±1,9 vs 11,11±1,8) и CD3+ (4±0,5 vs 13,77±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 ± медијана ± 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^b. Патохистолошком анализом ткива срца обојених хематоксилин-еозином (H&E), детектовани су еозинофили само у ткиву срца имунизованих Gal-3KO животиња (Слика 3). Еозинофили са тамно црвено пребојеном цитоплазмом уочени су само у ткиву Gal-3KO мишева.



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

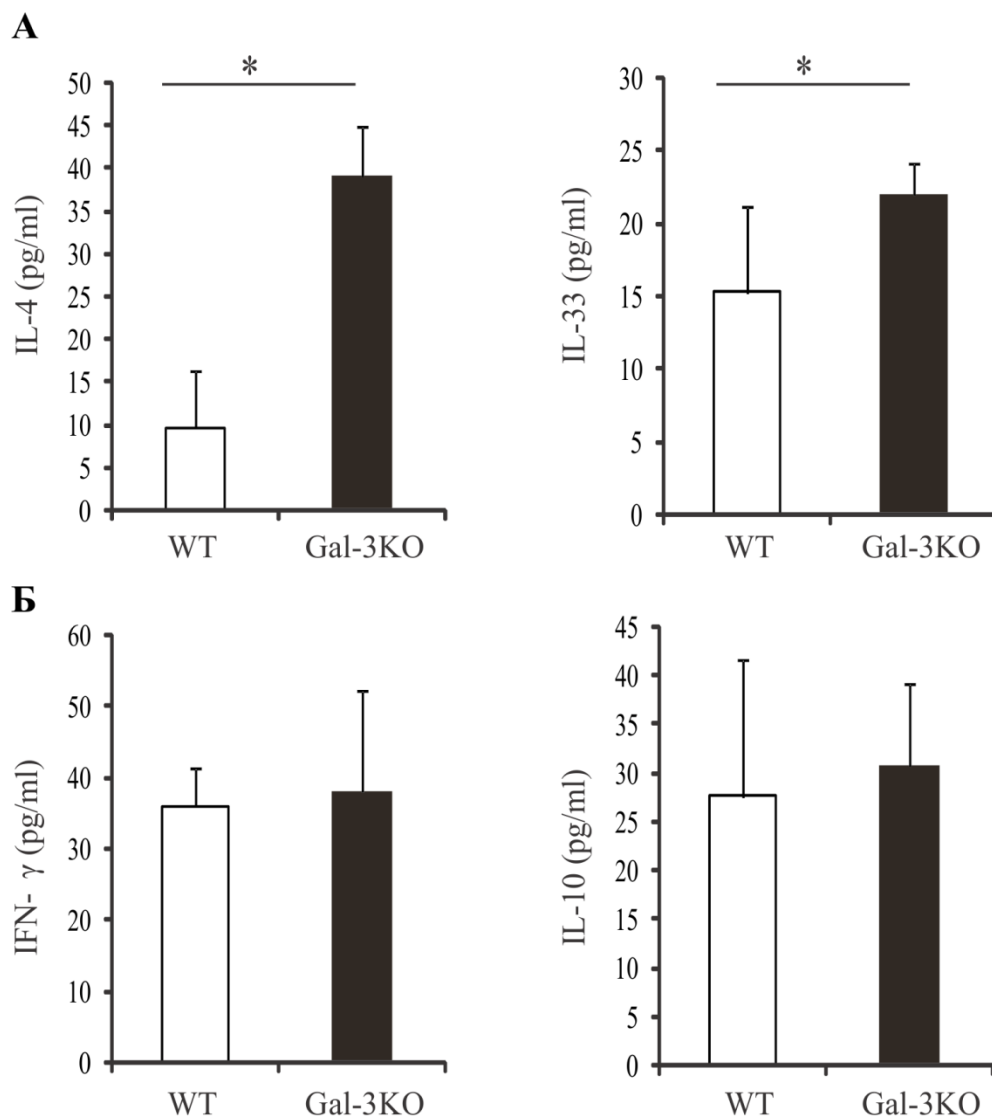
Добијени подаци указују да недостатак експресије гена за Gal-3 утиче на састав инфламцијских инфилтрата у ткиву миокарда тако што мења заступљеност појединих моноцитних и гранулоцитних субпопулација.

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- γ више у мишевима који имају тежи облик ЕАМ, супротно од ових резултата показано је да је делеција гена за IFN- γ 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- γ) као ни имуносупресивног 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- γ ($36,02 \pm 5,4$ 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).

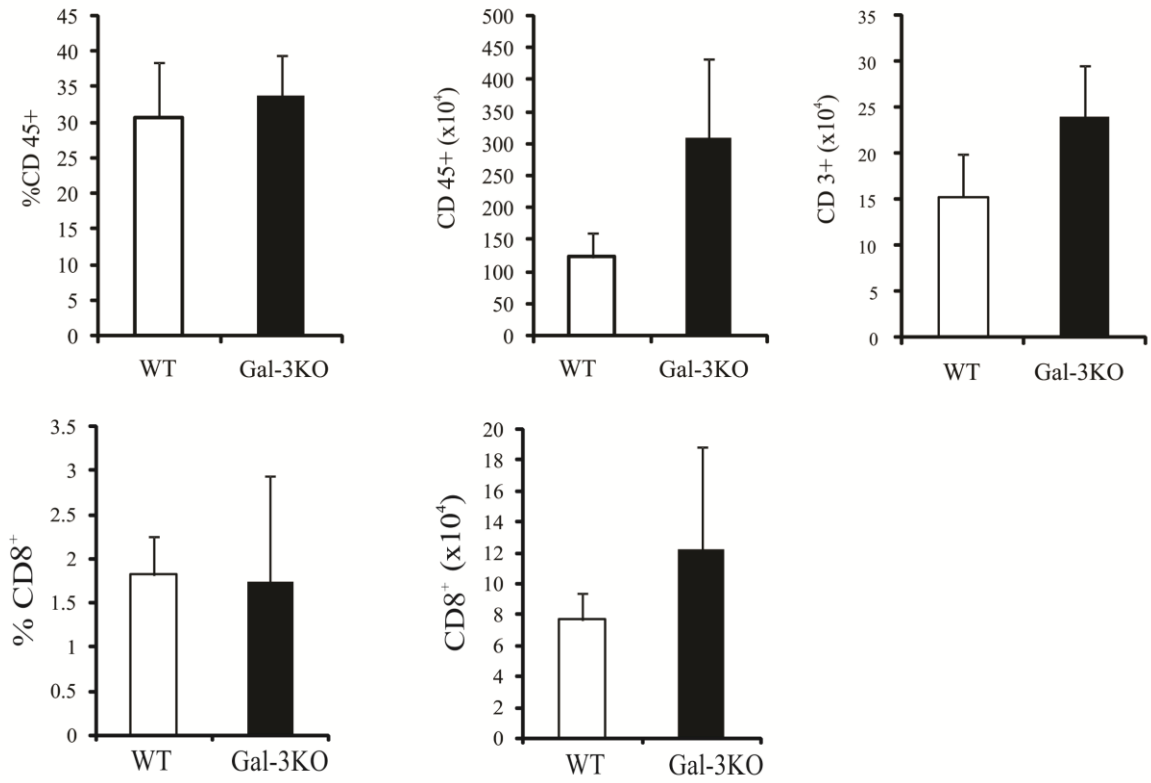
4.5. Одсуство експресије гена за Gal-3 повећава број инфилтришућих Th2 и Th1 ћелија у срцу оболелих мишева

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 мононуклеара у срцу имунизованих мишева.

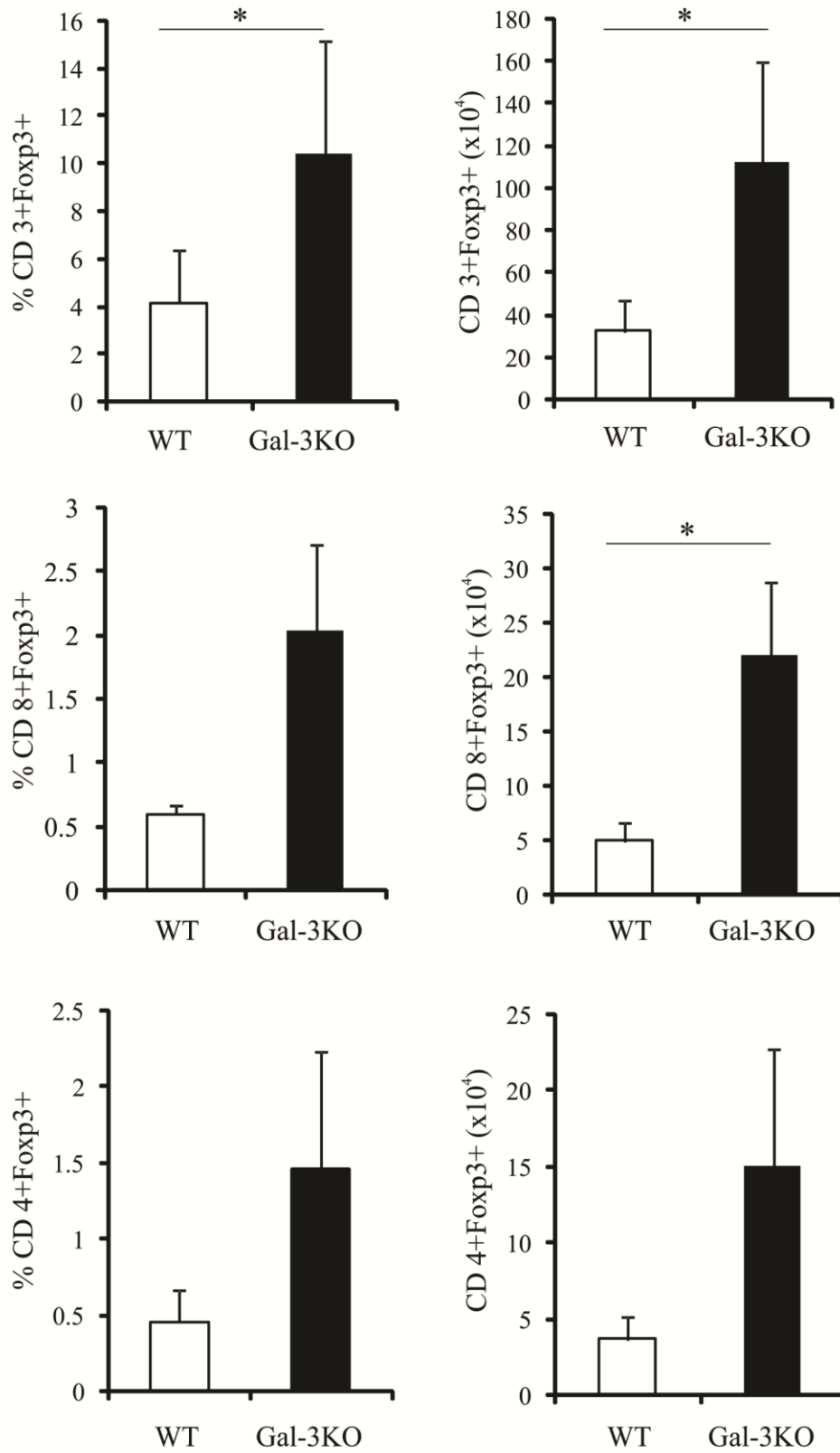
Проточно цитометријском анализом одређивани су и процентуални и нумерички односи моноцитних CD45+, CD3+, CD4+ и CD8+ субпопулација. Детектоване разлике у процентуалној заступљености и апсолутном броју CD45+, CD3+ и CD8+ субпопулација нису досегле статистичку значајност ($p>0.05$) између оболелих WT и 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**, $p>0.05$).

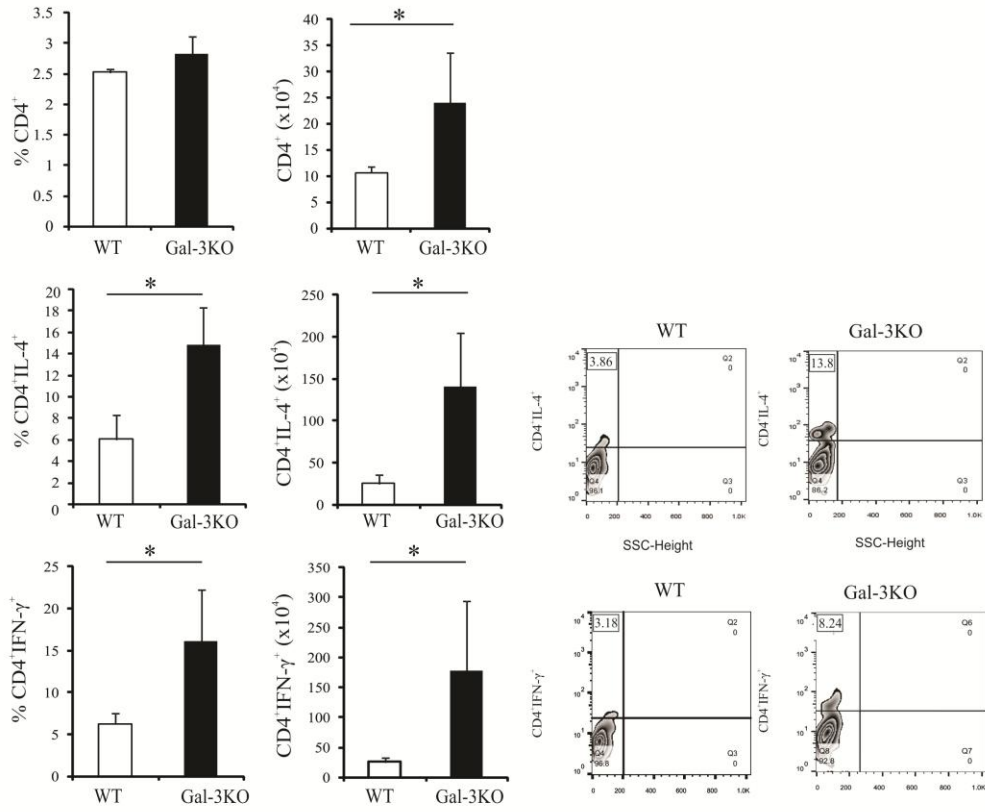
Иако разлика у процентуалној заступљености CD4+ лимфоцита између изолата добијених из испитиваних група није досегла статистичку значајност (**Фигура 2В**, $p>0.05$) анализом апсолутног броја ових ћелија детектован је статистички значајно већи број CD4+ ћелија у миокарду Gal-3КО мишева него у WT мишевима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

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

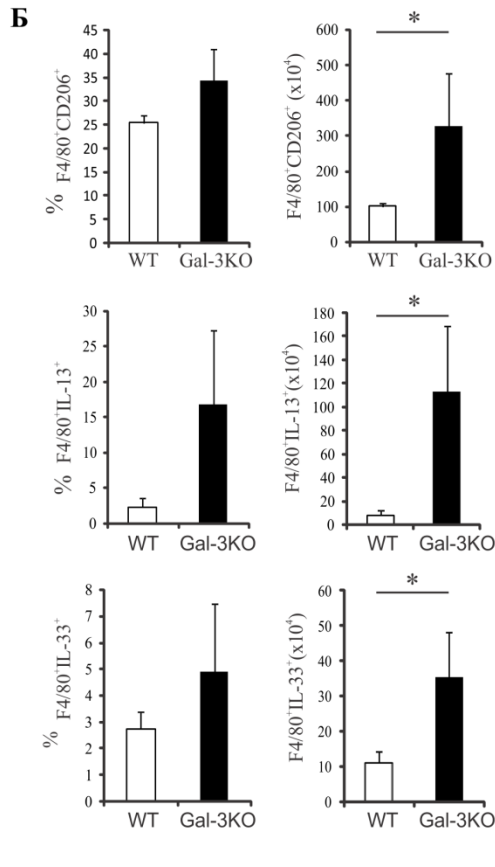
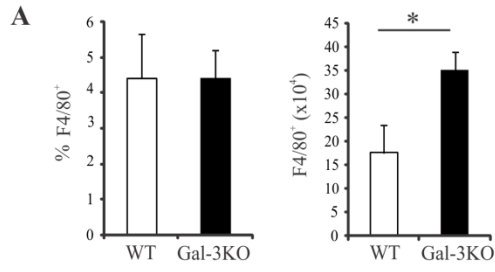
Резултати претходних студија су показали да Gal-3 може да подстиче или супримира алтернативну активацију макрофага што најчешће зависи од микросредине, природе патофизиолошког процеса и врсте ткива/органа као и од ћелија на којима је Gal-3 експримиран [240].

Налаз значајно израженијих дегенеративних промена у срцу праћених обимним, дифузним инфламацијским инфилтратима (Слика 1) код Gal-3КО посредно су навели на закључак да заступљеност макрофага и њихова поларизација у M1 или M2 правцу могу бити узрок уоченим разликама. Из тог разлога је проточном цитометријом одређивана заступљеност и фенотип инфилтрирујућих макрофага у срцу имунизованих мишева.

У оболелом миокарду Gal-3КО 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. Делација гена за Gal-3 значајно повећава процентуалну заступљеност и укупан број мијелоидних CD11b+Ly6C^{hi} макрофага

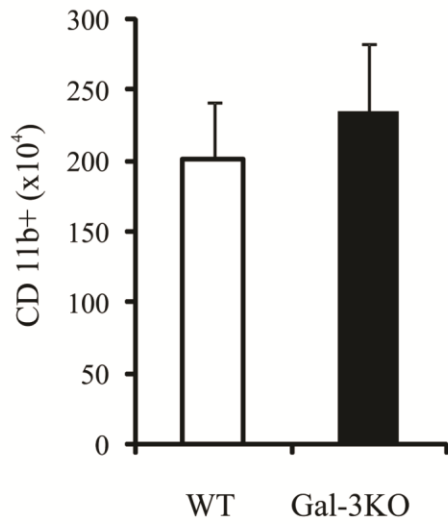
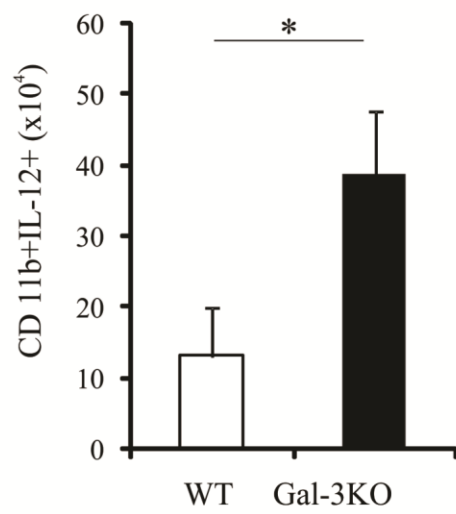
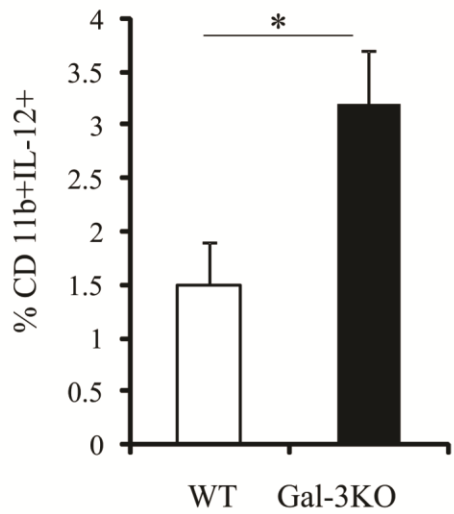
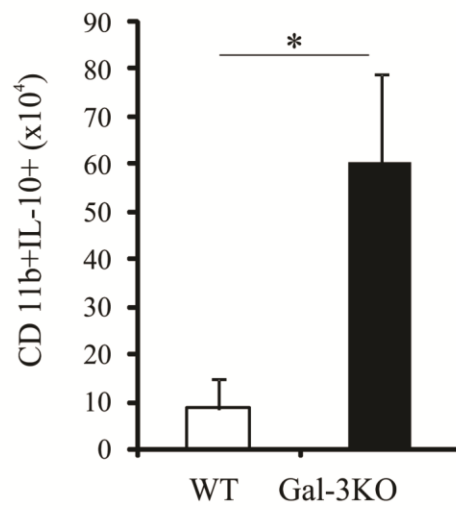
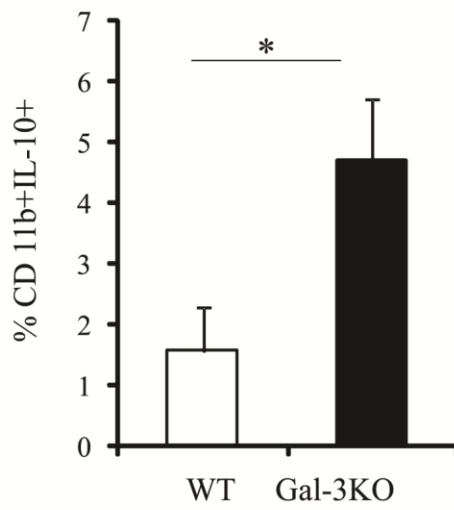
Мијелоидне CD11b+ макрофаге представљају главне ефекторске ћелије у миокарду током акутне фазе инфламације, међутим током хроничне фазе инфламације имају протективну улогу. У акутној фази инфламације Ly6C^{high} ћелије могу диференцирати и у M1 и M2 макрофаге, док у хроничној фази инфламације регрутовани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

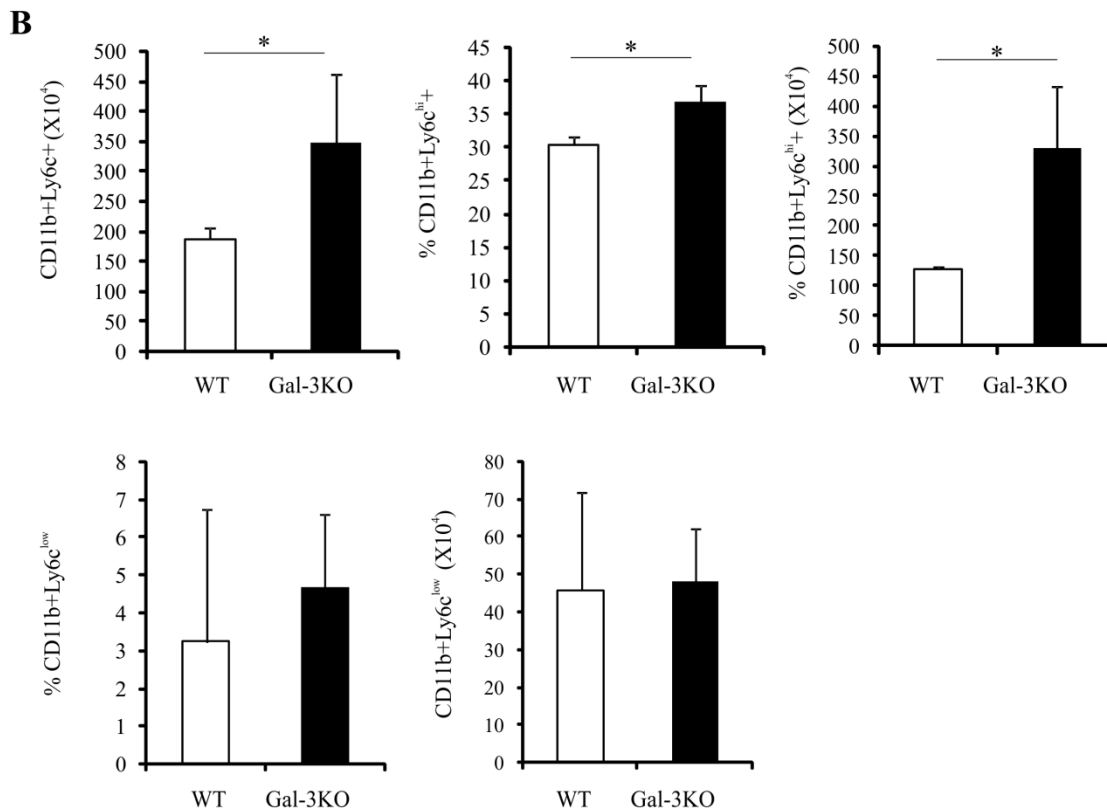
Обзиром да су досадашњи резултати показали да оболели Gal-3КО мишеви имају већи број F4/80+ макрофага (**Фигура 3А**) као и алтернативно активираних F4/80+CD206+ макрофага (**Фигура 3Б**), у наставку истраживања испитивали смо заступљеност мијелоидних CD11b+ и CD11b+Ly6C+ ћелија.

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^{hi} ћелија у Gal-3КО

мишева док разлика у заступљености и броју CD11b+Ly6C^{low} 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^{hi} ($128,97 \pm 3 \times 10^4$ 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^{low} 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).

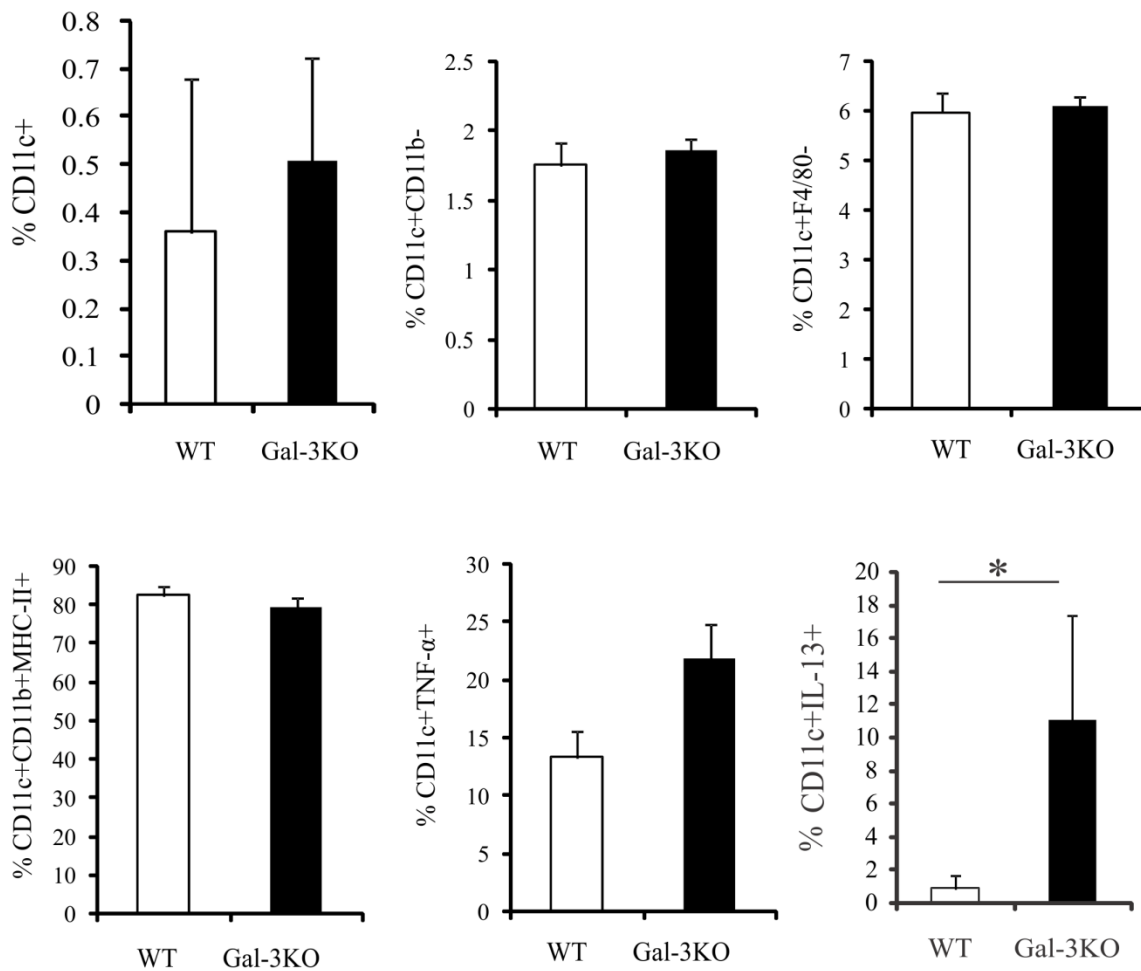
4.8. У срцу оболелих Gal-3КО мишева присутно је више CD11c+ ћелија које продукују IL-13

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 α + и CD11c+ IL-13+.

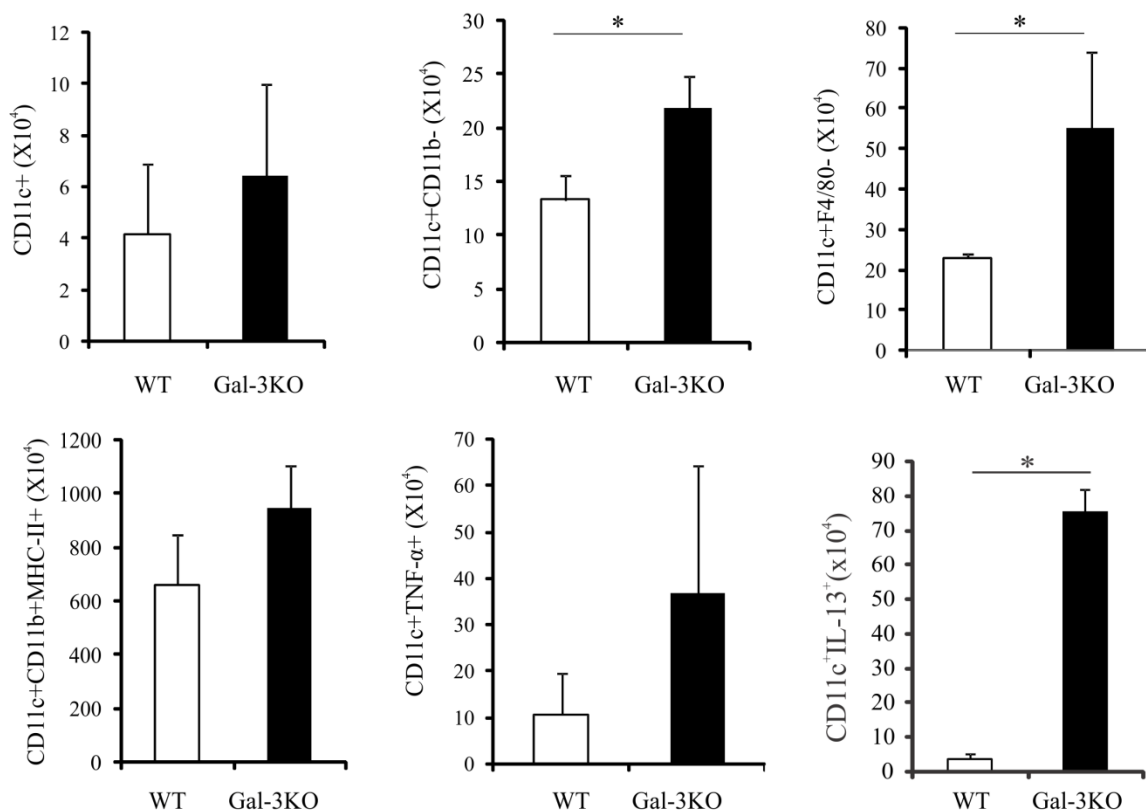
Није детектована значајна разлика у заступљености како укупних CD11c+ ћелија тако и њихових субпопулација које експримирају CD11c+CD11b-, CD11c+F4/80-, CD11c+CD11b+МНС II+ и CD11c+TNF α + између оболелих WT и Gal-3КО (Фигура 5, $p>0.05$).

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 α + 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).



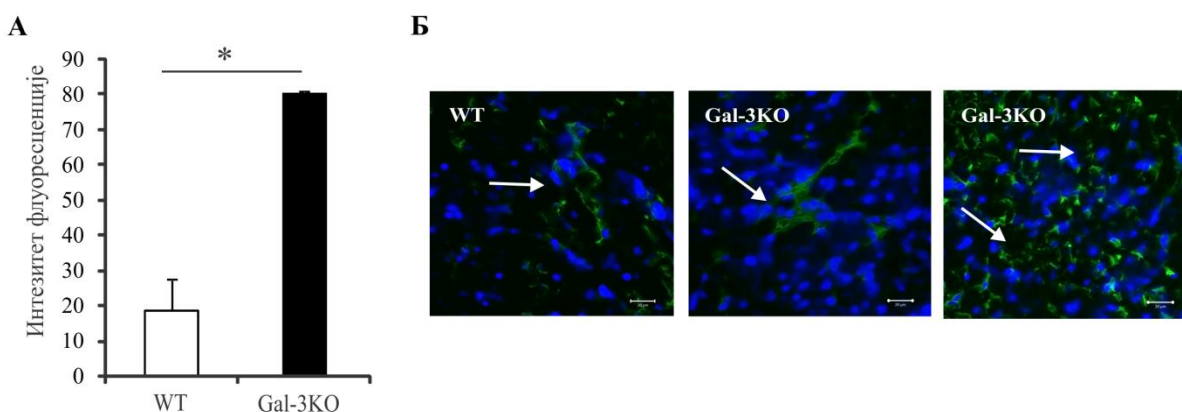
Фигура 6. Нумеричка заступљеност CD11c+ дендритских ћелија и субпопулација у оквиру CD11c+ популације у миокарду WT и Gal-3KO мишева. Нумеричка заступљеност CD11c+ дендритских ћелија које експримирају IL-13 ($3,67 \pm 3,6 \times 10^4$ vs $75,25 \pm 32,7 \times 10^4$) као и CD11c+CD11b- ($13,35 \pm 2,3 \times 10^4$ vs $21,80 \pm 3 \times 10^4$) и CD11c+F4/80- 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+CD11b+MHCII+ и CD11c+TNFα+ 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).

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).



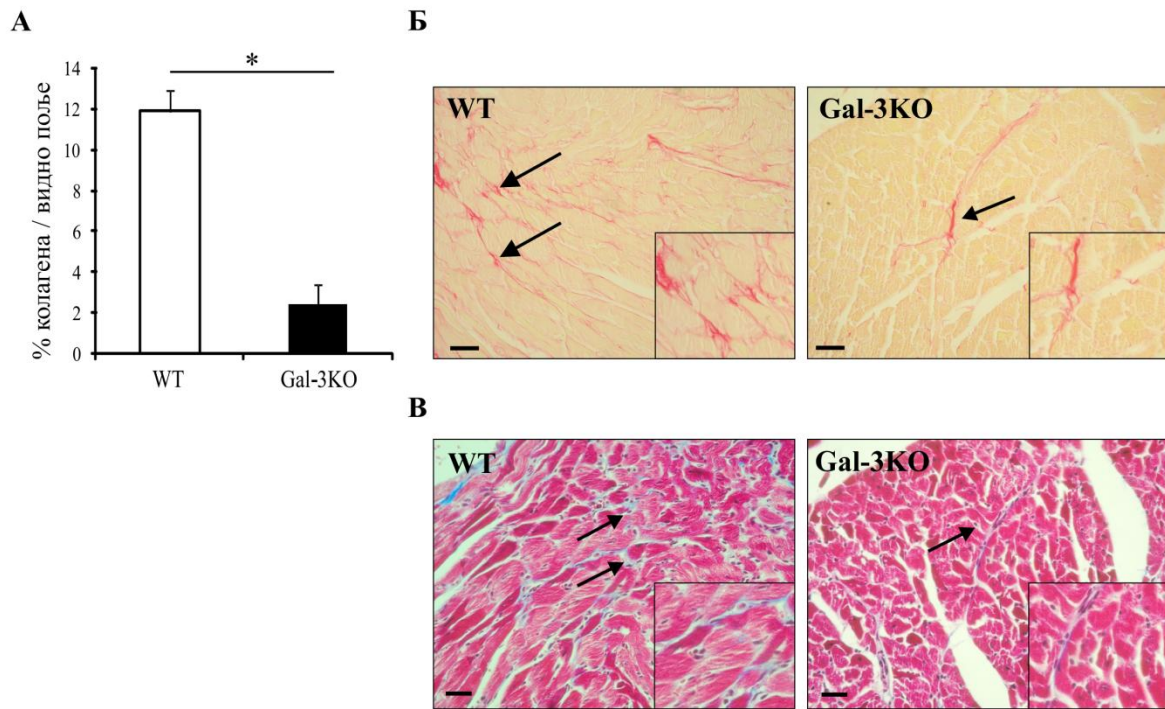
Слика 4. Оболели Gal-3KO мишеви имају већу количину IgG депозита и већи број IgG позитивних ћелија у односу на WT мишеве. А. На графикону је приказана SE±SEM интезитета флуоресценције из анализираних видних поља ($18,52 \pm 8.7$ vs $80,25 \pm 0.5$). **Б.** Репрезентативне фотографије смрзнутих резова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

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

Како би испитали да ли делација 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 интезитета 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-3КО 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.

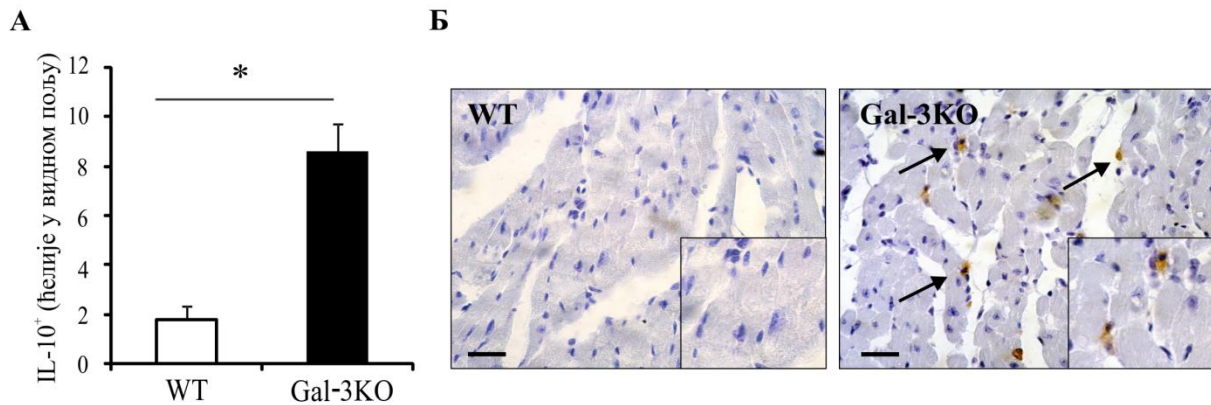


Слика 5. Одсуство експресије гена за Gal-3 значајно смањује депоновање колагена у срцу. **А.** На графикону су приказане $SE \pm SEM$ добијене из односа укупна површина видног поља/црвено пребојена површина ($11,91 \pm 0,6$ vs $2,43 \pm 0,4$). **Б.** Репрезентативне фотографије парафинских исечака ткива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

4.11. Оболели Gal-3KO 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-3KO 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-3KO мишевима детектована је већа заступљеност IL-10+ ћелија у миокарду (Слика 6А). У миокарду Gal-3KO 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-3KO 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-3KO 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-3KO мишева (увеличање 400x, размера=50 μ 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.

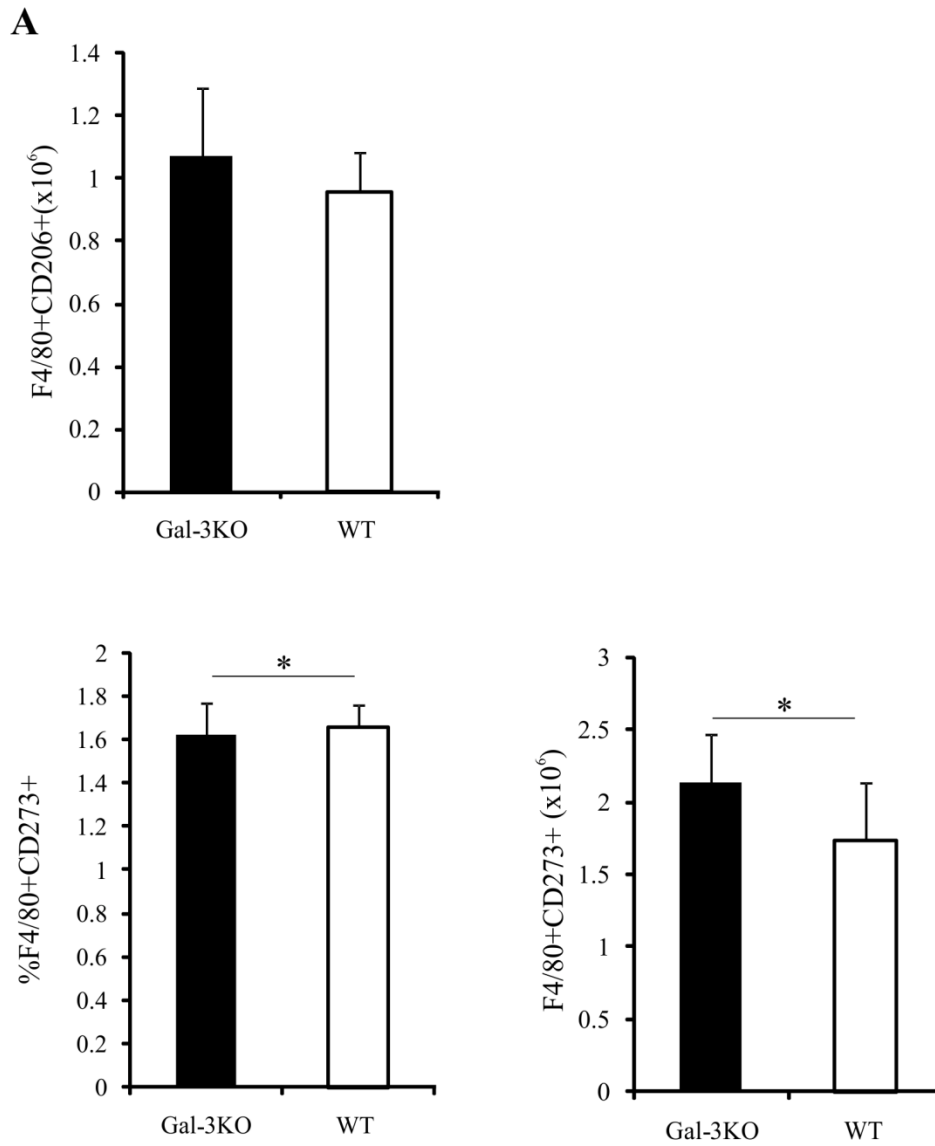
Из тог разлога је у слезини експерименталних животиња, проточном цитометријом одређивана заступљеност алтернативно активисаних макрофага као и њихов цитокински профил.

На **Фигури 7А** приказана је заступљеност F4/80+CD206+ макрофага у слезинама Gal-3КО и WT мишева. Резултати показују да разлика у нумеричкој и процентуалној 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**, $p < 0.05$).

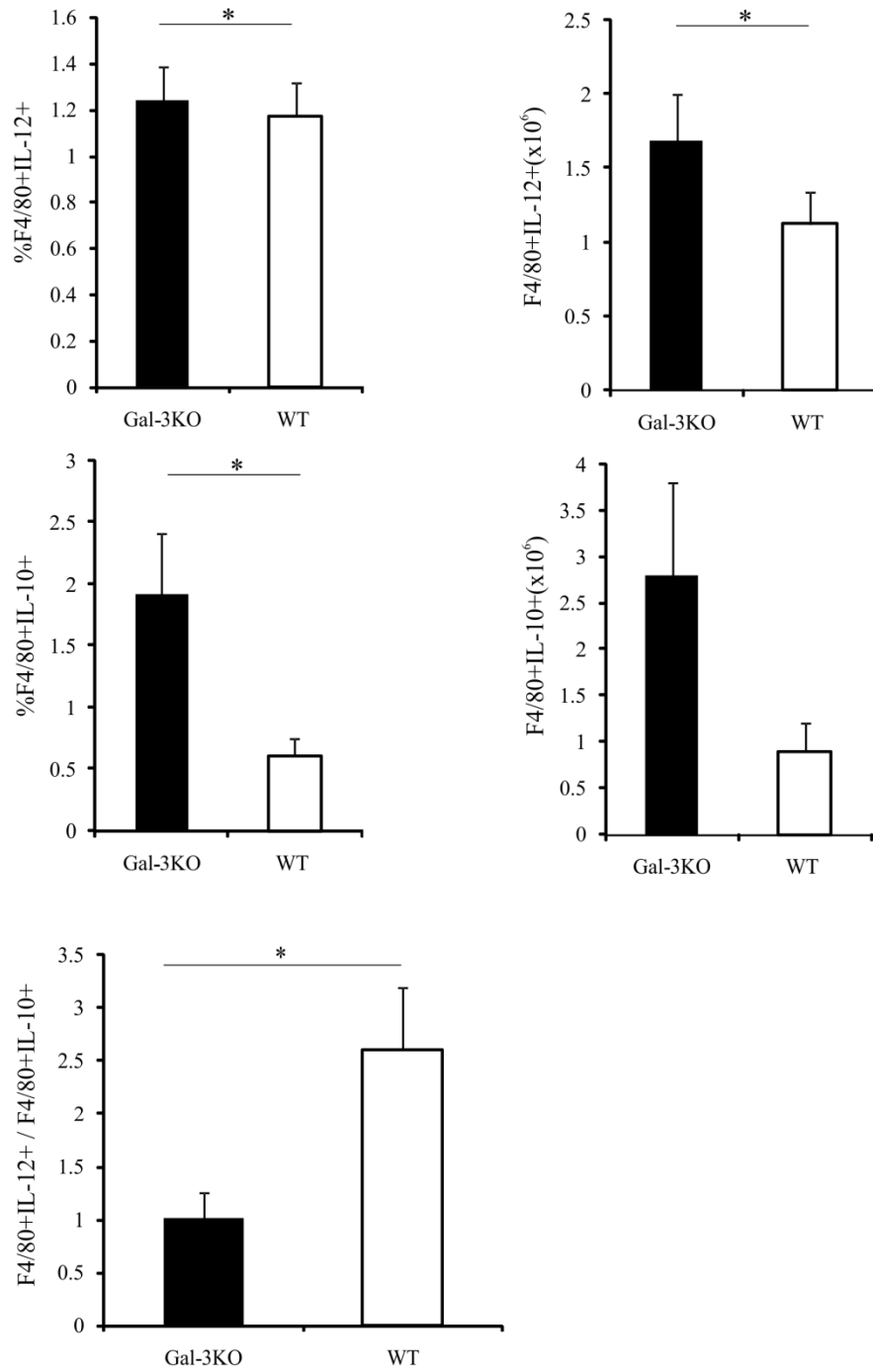
Након што је детектован значајан пораст серумских концентрација Th2 цитокина (**Фигура 1А**) и значајно већи број алтернативно активисаних макрофага у срцу и слезини (**Фигура 3Б** и **Фигура 7А**) Gal-3КО мишева, у наставку истраживања испитивано је да ли су детектоване разлике настале због промене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

Апсолутн 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, $p < 0.05$).



B



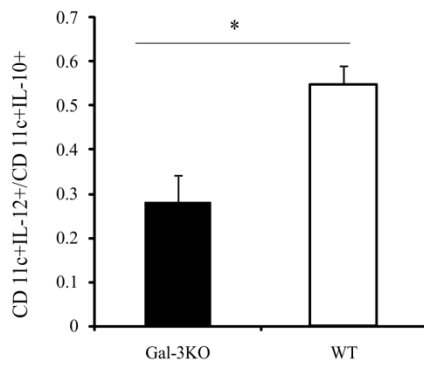
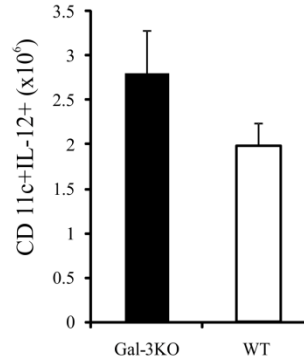
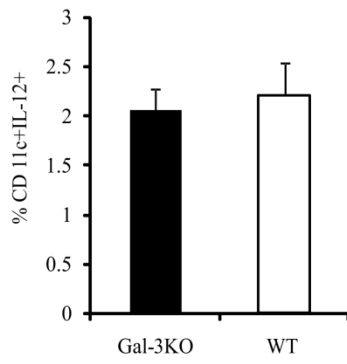
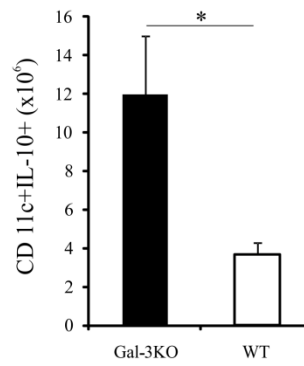
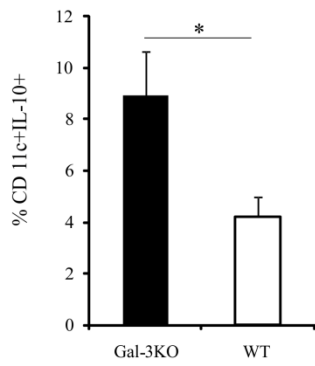
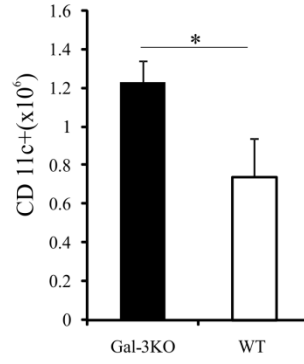
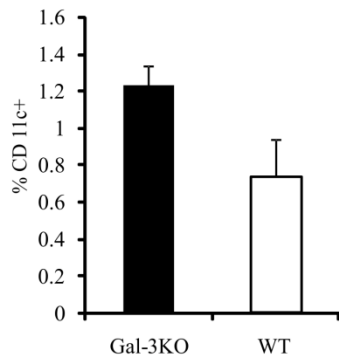
Фигура 7. Процентуална и бројчана заступљеност макрофага различитих функционалних фенотипа у слезини Gal-3КО и WT мишева. А. Није детектована разлика у нумеричкој и процентуалној заступљености F4/80+CD206+ макрофага између Gal-3КО и WT мишева, $p>0.05$. Број F4/80+CD273+ макрофага ($1,73\pm 0,4\times 10^4$ 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**, $p>0.05$).

Апсолутн 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⁺ 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⁺IL-10⁺ 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⁺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⁺/IL-10⁺ 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 Mуhс α ₃₃₄₋₃₅₂.

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 миокарда 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 α 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 Gal3-KO 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 Mуh α ₃₃₄₋₃₅₂ пептида: 21-ог дана након апликације Mуh α ₃₃₄₋₃₅₂ пептида, хипертрофија срца Gal3-KO мишева била је значајно већа (**Графикон 1**, $p < 0.05$). Анализирајући хистолошке препарате срца животиња третираних Mуh α ₃₃₄₋₃₅₂ пептидом уочена је дифузна инфилтрација инфламацијским ћелијама, значајна дегенерација и некроза кардиомиоцита у ткиву срца Gal3-KO 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. Делација 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- γ (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 делација 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-3KO мишева уочено је да делација 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 Gal3-КО 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 Gal3-КО 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- γ и IL-4 [294], проверено је да ли делеција гена за Gal-3 утиче на заступљеност CD4+IFN- γ + 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- γ + 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- γ + ћелија у изолатима Gal-3КО мишева, су сагласни са претходно наведеним резултатима студије у којој је показано да CD4+ Gal-3^{-/-} ћелије повећано продукују IL-4 и IFN- γ [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- γ), 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- γ 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- $\gamma^{-/-}$ и *Tbx21* $^{-/-}$ мишеви, развијају још тежи облик болести у поређењу са WT мишевима [118, 119, 121]. Поред тога, тежина ЕАМ код мишева IL-12a $^{-/-}$ 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- γ у патогенези аутоимунских болести. Поједини аутори указују на патогену улогу IFN- γ [297], док друга група аутора сугерише, да упркос његовој проинфламаторној улози, IFN- γ има могућност да умањи тежину аутоимунских обољења [120]. У ЕАМ индукованим срчаним миозином у A/J мишевима, показана је протективна улога IFN- γ [78]. Могућа објашњења протективне улоге IFN- γ 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- γ повећава апоптозу CD4 $^{+}$ Т лимфоцита у ЕАМ индукованим пептидом миозина. Међутим, испитивањем ЕАМ у мишевима са делецијом гена за IFN- γ 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- γ 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 повећава тежину 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 $\alpha_{334-352}$

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 молекул 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^{hi} или Ly6C^{lo} фенотип. Субпопулација

Ly6C^{lo} диференцира искључиво у M2 макрофаге, док Ly6C^{hi} могу диференцирати у M1 или M2 макрофаге [90, 91]. Поларизацију Ly6C^{hi} ћелија у M2 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⁺ макрофага и њихових субпопулација (CD11b⁺/Ly6C^{hi} и CD11b⁺/Ly6C^{lo}) у инфламираном ткиву [305]. Резултати ове студије показују да Gal-3КО мишеви имају значајно већу заступљеност CD11b⁺/Ly6C^{hi} макрофага (**Фигура 4В**) али и CD11b⁺ 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⁺/Ly6C^{lo} 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 M2 макрофага у срцу (**Фигура 3Б**) и виши ниво Th2 цитокина у серуму (**Фигура 1А**). анализирана је заступљеност и функционални фенотип M2 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⁺ (M2) макрофага (**Фигура 7А**) и смањује процентуални однос F4/80+IL-12⁺/IL-10⁺, тако што повећава процентуалну заступљеност F4/80+IL-10⁺ макрофага у слезини (**Фигура 7Б**). Слично нашим резултатима *Volarevic* и сарадници [253] су показали већу заступљеност F4/80+CD273⁺ 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^{+/+} 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⁺ 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⁺ Т лимфоцита.

Резултати овде приказане студије показују да недостатак експресије гена за Gal-3 повећава број CD11c⁺CD11b⁻, CD11c⁺F4/80⁻ и CD11c⁺IL-13⁺ ћелија у срцу (**Фигура 6**). Такође, у овој студији је анализом површинских и интрацелуларних маркера дендритских ћелија показано да у слезини Gal-3^{КО} мишева има значајно више CD11c⁺ и регулаторних CD11c⁺IL-10⁺ 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. Делација 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- β , 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- β , главног профибротског фактора, фиброза је одсутна или јако смањена у Gal-3 дефицијентним мишевима. Исти аутори су показали да TGF- β 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 KO 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⁺ 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⁺ ћелија у срцима Gal-3КО мишева значајно већи од броја IL-10⁺ ћелија у срцима WT мишева (**Слика 6**). Резултати добијени у овој студији могу се објаснити значајно израженијим бројем IL-10⁺ 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 γ -RIII на НК 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 миокарда 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- α	енг. <i>tumor necrosis factor-α</i>
TAC	трансверзална аортна констрикција
Th	помагачки Т лимфоцити (енг. <i>T helper</i>)
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (енг. <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TGF- β	трансформишући фактор раста- β (енг. <i>transforming growth factor-β</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, ME Billingham, WD Edwards, SM Factor, JT Fallon, JJ Fenoglio, JrEG Olsen, and FJ Schoen. 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, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I, Nordet P. 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, Fu M, Heliö T, Heymans S, Jahns R, Klingel K, Linhart A, Maisch B, McKenna W, Mogensen J, Pinto YM, Ristic A, Schultheiss HP, Seggewiss H, Tavazzi L, Thiene G, Yilmaz A, Charron P, Elliott PM. 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. *Eur Heart J* 2013; 34:2636-48.
5. Elliott P, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29:270–276.
6. Maron BJ, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. 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, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, and Seidman CE. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 343:1688–1696.

8. Karkkainen S, and Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 2007; 39:91–107.
9. Kindermann I, Christine B, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59:779–792.
10. Badorff C, GH Lee, BJ Lamphear, ME Martone, KP Campbell, RE Rhoads, and KU Knowlton. 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, F Calabrese, A Angelini, F Tona, A Vinci, S Bottaro, A Ramondo, E Carturan, S Iliceto, G Thiene, and L Daliento. 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 SL Hill. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clinical immunology and immunopathology* 1996; 80:92-99.
14. Ian Mackay, Noel Rose. Myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Rose NR, Mackay IR, eds. *The Autoimmune Diseases*. Boston, Massachusetts, USA: Academic Press 2006; 875–888.
15. Cihakova D, Rose RN. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Immunol* 2008; 99:95–114.
16. S Busted, P Sparrow, C Molloy, M G Molloy³. Myocarditis as a prognostic indicator in systemic lupus erythematosus. *Postgrad Med J* 2004; 80:366–7.
17. Levin MD, Zoet-Nugteren SK, Markusse HM. Myocarditis and primary Sjogren’s syndrome. *Lancet* 1999; 354:128–9.
18. Frustaci A, C Chimenti, F Calabrese, M Pieroni, G Thiene, and A Maseri. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107:857-863.
19. Frustaci A, M Pieroni, and C Chimenti. Immunosuppressive treatment of chronic non-viral myocarditis. *Ernst Schering Research Foundation workshop* 2006; 343-351.
20. Eriksson U, and JM Penninger. Autoimmune heart failure: new understandings of pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005; 37:27-32.

21. Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Álvarez-León E, Martínez-Rodríguez N, Gallardo GJ, Inés-Real S, Granados J, Reyes PA, and Vargas-Alarcón G. MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* 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. *J Immunol* 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. *J Immunol* 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, Anderson HR. A systematic analysis for the global burden of disease study. *Lancet*. 2015; 386: 743–800.
26. Kyto V, et al. Gender differences in myocarditis: A nationwide study in Finland. *Eur Heart J* 2013; 34:644.
27. Lyden DC, OJ Feran M, et al. Coxsackievirus B-3- induced myocarditis. Effect of sex steroids on viremia and infectivity of cardiocytes. *Am J Pathol* 1987; 126:432-438.
28. Schwartz J, Sartini D, 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, 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; 23:649-657.
30. Cooper LT, Berry GJ, and Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *N Engl J Med* 1997; 336:1860–1866.
31. Fenoglio Jr JJ, Ursell PC, Kellogg CF, et al. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *N Engl J Med* 1983; 308:12-18.
32. Kyto V, Saukko P, Lignitz E, et al. Diagnosis and presentation of fatal myocarditis. *Hum Pathol* 2005; 36:1003-1007.

33. Saji T, Hiroyuki M, Hasegawa K, Nishikawa T, Yamamoto E, Ohki H, Yasukochi S, Arakaki Y, Joo K, Nakazawa M. Comparison of the clinical presentation, treatment, and outcome of fulminant and acute myocarditis in children. *Circ J* 2012; 76:1222–1228.
34. Towbin JA, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *JAMA* 2006; 296:1867–76.
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, Sheppard M. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006; 92:316–20.
37. Basso C, et al. Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings. *Cardiovasc Res* 2001; 50:290–300.
38. Gore I, Saphir O. Myocarditis; a classification of 1402 cases. *Am Heart J* 1947; 34:827–30.
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. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:11–18.
40. Cooper LT, et al. Giant cell myocarditis. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14:394–401.
41. Ekstrom K, et al. Long-term outcome and its predictors in giant cell myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2016; 18:1452–8.
42. Cooper LT Jr1. Myocarditis. *N Engl J Med* 2009; 360:1526-38.
43. Daubeney PE, Nugent AW, Chondros, P, Carlin JB, Colan SD, Cheung M, Davis AM, Chow CW, and Weintraub RG. Clinical features and outcomes of childhood dilated cardiomyopathy: Results from a national population-based study. *Circulation* 2006; 114:2671–2678.
44. Pérez-Serra A, TR Sarquella-Brugada, de Gonzalo-Calvo D, Cesar S, Carro E, Llorente-Cortes V, Iglesias A, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Genetic basis of dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2016; 224:461-472.
45. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, and Virmani R. 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. *J Am Coll Cardiol* 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. *Arch Intern Med* 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, Burnet FM. *Autoimmune Diseases, Pathogenesis, Chemistry and Therapy*. Thomas, Springfield III 1963.

49. Fairweather D, and NR Rose. Women and autoimmune diseases. *Emerging infectious diseases* 2004; 10:2005-2011.

50. Mosca, M , L Carli, A d'Ascanio, C Tani, R Talarico, C Baldini, L Bazzichi, A Tavoni, P Migliorini, and S Bombardieri. 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 SL Hill. Mechanisms of autoimmunity. *Seminars in liver disease* 2002; 22:387-394.

52. Fairweather D, and NR Rose. 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, N Neu, LM de la Maza, S Pal, A Hessel, and JM Penninger. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999; 283:1335-1339.

55. Horwitz MS, LM Bradley, J Harbertson, T Krahl, J Lee, and N Sarvetnick. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature medicine* 1998; 4:781-785.

56. Feldman AM, and D McNamara. Myocarditis. *N Engl J Med* 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. *J Am Coll Cardiol* 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. *J Clin Lab Immunol* 1993; 40:61–67.
59. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, and Schiaffino S. 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. *Am Heart J* 1990; 119:1322–1328.
61. Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M, Yeh WC, Akira S, and Liu PP. 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. *Adv Virus Res* 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, Gatewood SJ, and Rose NR. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *J Immunol* 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. *Rev Med Virol* 2005; 15:17–27.
67. Pummerer CL, Luze K, Grassl G, Bachmaier K, Offner F, Burrell SK, Lenz DM, Zamborelli TJ, Penninger JM, and Neu N. Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *J Clin Invest* 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 Mol Med* 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, Zittrich S, Blaudeck N, Hardt SE, Pfitzer G, Rose NR, Katus HA, 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, L Davinna, Rose NR. Genetic complexity of autoimmune myocarditis. *Autoimmun Rev* 2008; 7:168–73.
72. Taneja V, Behrens M, Cooper LT, Yamada S, Kita H, Redfield MM, Terzic A, and David C. Spontaneous myocarditis mimicking human disease occurs in the presence of an appropriate MHC and non-MHC background in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:1054–1064.
73. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell mediated disease. *J Immunol* 1991; 147:2141–2147.
74. Mackay IR, Leskovsek N, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun* 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. *Nat Immunol* 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, D Georgakopoulos, DF Belardi, AC Ramsundar, JG Barin, DA Kass, and NR Rose. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *The American journal of pathology* 2004; 164:807-15.
78. Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, Hill SL, Rose NR. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *Am J Pathol* 2001; 159:193–203.
79. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 2003; 9:1484–90.

80. Lodge PA, et al. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol* 1987; 128:455–63.
81. Ong S, et al. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. *Am J Pathol* 2015; 185:847–61.
82. Barin JG, Cihakova D. Control of inflammatory heart disease by CD4⁺ T cells. *Acad Sci* 2013; 1285:80–96.
83. Baldeviano GC, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2010; 106:1646–55.
84. Barin JG, et al. Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN-gamma and IL-17A. *J Immunol* 2013; 191:4038–47.
85. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, and Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1629–1638.
86. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, and Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204:3037–3047.
87. Schulz C, Gomez PE, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. 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, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 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, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656–661.
90. Fujiu K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:3425–3441.
91. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupper ML, Duffield JS. Bone marrow Ly6c^{high} monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol* 2009; 183:6733–6743.

92. Barin JG, Rose NR, Cihakova D. Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review. *Immunobiology* 2012; 217:468–75.
93. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, 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, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204:3037–3047.
95. Hu Y, Zhang H, Lu Y, Bai H, Xu Y, Zhu X, Zhou R, Ben J, Chen Q. Class a scavenger receptor attenuates myocardial infarction-induced cardiomyocyte necrosis through suppressing M1 macrophage subset polarization. *Basic Res Cardiol* 2011; 106:1311–1328.
96. Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, Elsasser A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2009; 13:3485–3496.
97. Zandbergen HR, Sharma UC, Gupta S, Verjans JW, van den Borne S, Pokharel S, van Brakel T, Duijvestijn A, van Rooijen N, Maessen JG, Reutelingsperger C, Pinto YM, Narula J, Hofstra L. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2009; 14:68-75.
98. van Amerongen MJ, Martin C, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ., Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* 2007; 170:818-829.
99. RenW ZR, Markel DC, Wu B, Peng X, Hawkins M, Wooley PH. Blockade of vascular endothelial growth factor activity suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis. *J Rheumatol* 2007; 34:27-35.
100. Nacu N, Luzina IG, Highsmith K, Lockett IV, Pochetuhen K, Cooper ZA, Gillmeister MP, Todd NW, Atamas SP. Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-Ig-H3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts. *J Immunol* 2008; 180:5036–5044.
101. Yan D, Li D, Liu W, Li M, Qu Z, Ruan Q. Macrophages overexpressing VEGF target to infarcted myocardium and improve neovascularization and cardiac function. *Int J Cardiol* 2013; 164:334-338.

102. Cihakova D, et al. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *Am J Pathol* 2008; 172:1195–208.
103. Bangert A, et al. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113:E155–64.
104. Hulsmans M, Hendric B, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, Iwamoto Y, Sun Y, Wilson RM, Wojtkiewicz G, Tricot B, Osborne MT, Hung J, Vinegoni C, Naxerova K, Sosnovik DE, Zile MR, Bradshaw AD, Liao R, Tawakol A, Weissleder R, Rosenzweig A, Swirski FK, Sam F, Nahrendorf M. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J Exp Med* 2018; 215:423-440.
105. Barin JG, et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol* 2012; 42:726–36.
106. Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, Dirnhofer S, Leimenstoll B, Blyszczuk P, Dong C, Mueller C, Hunziker L, and Eriksson U. CD11b⁺ monocytes abrogate Th17 CD4⁺ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2008; 180:2686–2695.
107. Artis D, Hergen S. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015; 517:293–301.
108. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348–2357.
109. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 2013; 25:305–12.
110. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183:211–21.
111. A Billau. Interferon-gamma: biology and role in the pathogenesis. *Adv Immunol* 1996; 62:61–130.
112. Schmidtke M, et al. Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol* 2000; 61:518–526.
113. Luppi P, 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. *Hum Immunol* 2003; 64:194-210.

114. Taneja V, David CS. Spontaneous autoimmune myocarditis and cardiomyopathy in HLA-DQ8.NOD.Abo transgenic mice. *J Autoimmun* 2009; 33:260-269.
115. Taneja, V, et al. Spontaneous myocarditis mimicking human disease occurs in the presence of an appropriate MHC and non-MHC background in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:1054-1064.
116. Reifenberg K, et al. Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol* 2007; 171:463-472.
117. Torzewski M, et al. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon gamma-overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 2012; 180:73-81.
118. Afanasyeva M, 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; 104:3145–51.
119. Eriksson U, et al. Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN-gamma. *J Immunol* 2001; 167:5464–9.
120. Caspi RR, CC Chan, Grubbs BG, Silver PB, Wiggert B, Parsa CF, Bahmanyar S, Billiau A, Heremans H. Endogenous systemic IFN-g has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *J Immunol* 1994; 152:890–899.
121. Rangachari M, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 2006; 203:2009–19.
122. Eriksson U, 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, 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. *Am J Pathol* 2004; 165:1883–94.
124. Afanasyeva M, et al. Impaired up-regulation of CD25 on CD4+ Tcells in IFN-gamma knockout mice is associated with progression of myocarditis to heart failure. 2005; 102:180-185.
125. Barin JG, et al. Mechanisms of IFN gamma regulation of autoimmune myocarditis. *Exp Mol Pathol* 2010; 89:83-91.

126. Dalton DK, et al. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000; 192:117-122.
127. Pope RM, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9:252–6.
128. Sonderegger I, et al. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* 2006; 36:2849–56.
129. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, 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, et al. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol* 1997; 183:105-108.
131. Han RO, et al. Detection of interleukin and interleukin-receptormRNA in human heart by polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:520-523.
132. Li J, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol* 2007; 554:60-68.
133. Satoskar AR, et al. Interleukin-4-deficient BALB/c mice develop an enhanced Th1-like response but control cardiac inflammation following *Borrelia burgdorferi* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183:319-325.
134. Soares MB, et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol* 2001; 159:703-709.
135. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21:467–476.
136. Harrington LE, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6:1123-1132.
137. Park H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6:1133–1141.
138. Veldhoen M, et al. 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, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17- producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 2009; 10:314-324.

140. Yuan J, et al. Th17 cells contribute to viral replication in coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis. *J Immunol* 2010; 185:4004-4010.
141. da Matta Guedes PM, 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, et al. Susceptibility to autoimmune myocarditis is associated with intrinsic differences in CD4(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 2012; 169:79–88.
143. Hori S, N.T., Sakaguchi S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y., 2003. 299: p. 1057–1061. .*
144. Shi Y, et al. Regulatory T cells protect mice against coxsackievirus-induced myocarditis through the transforming growth factor beta-coxsackie-adenovirus receptor pathway. *Circulation* 2010; 121:2624–34.
145. Dardalhon V, 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. *Nat Immunol* 2008; 9:1347–1355.
146. Veldhoen M, et al. Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 2008; 9:1341–1346.
147. Elyaman W, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:12885–12890.
148. Vistnes M, et al. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *J Appl Physiol* 2010; 108:1357–1364.
149. Cappuzzello C. et al. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN-gamma in patients with chronic heart failure. *J Transl Med* 2011; 9:28.
150. Moudgil KD, Sercarz EE. Crypticity of self antigenic determinants is the cornerstone of a theory of autoimmunity. *Discov Med* 2005; 5:378–82.
151. Cheng HM, Chamley L. Cryptic natural autoantibodies and co-potentiators. *Autoimmun Rev* 2008; 7:431–4.
152. Caforio AL, et al. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4:411–7.
153. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:237–264.
154. SH Barondes, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76:597–598.

155. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:209–231.
156. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269:20807–20810.
157. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, et al. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19:433–440.
158. Loris L. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:198–208.
159. J Hirabayashi, 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, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982; 128:1221–8.
161. CF Roff, 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. FT Liu, Norman O. Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1984; 259:10649–10652.
163. RF Cerra, MA Gitt, SH Barondes. Three soluble rat beta-galactosidebinding lectins. *J Biol Chem* 1985; 260:10474–10477.
164. CP Sparrow, H Leffler, SH Barondes. Multiple soluble b-galactosidebinding lectins from human lung. *J Biol Chem* 1987; 262:7383–7390.
165. A Raz, L Meromsky, I Zvibel, R Lotan. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer* 1987; 39:353–360.
166. HJ Woo, Leslie MS, JM Messier, AM Mercurio. The major nonintegrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem* 1990; 265:7097–7099.
167. K Albrandt, Norman K, FT Liu. An IgE-binding protein with a distinctive repetitive sequence and homology with an IgG receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6859–6863.
168. S Jia, Robert P, G Morford, N Agrwal, PG Voss, IK Moutsatsos, JL Wang. Carbohydrate-binding protein 35: molecular cloning and expression of a recombinant polypeptide with lectin activity in *Escherichia coli*. *Gene* 1987; 60:197–204.

169. BJ Cherayil, Weiner SJ, S Pillai. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med* 1989; 170:1959–1972.
170. JG Laing, CA Gritzmacher, JL Wang, FT Liu. Biochemical and immunological comparisons of carbohydrate-binding protein 35 and an IgE-binding protein. *J Biol Chem* 1989; 264:1097–1100.
171. H Leffler, Frank RM, SH Barondes. Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 1989; 28:9222–9229.
172. A Raz, Pnina C, T Raz, V Hogan, A Mohamed, SR Wolman. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. *Cancer Res* 1991; 51:2173–2178.
173. J Herrmann, CW Turck, RE Atchison, ME Huflejt, L Poulter, MA Gitt, AL Burlingame, SH Barondes, H Leffler. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem* 1993; 268:26704–26711.
174. JC Gaudin, BMehul, RC Hughes. Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. *Biol Cell* 2000; 92:49–58.
175. D Houzelstein, Isabelle RG, AJ Fadden, SS Sidhu, DN Cooper, K Drickamer, H Leffler, F Poirier. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol* 2004; 21:1177–1187.
176. Liu FT, Rabinovich G. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29-41.
177. Liu FT, Rabinovich G. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:29-41.
178. Ochieng J, Furtak V, LukyanovP. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004; 19:527-535.
179. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* 2004; 19:575-581.
180. JL Wang, JG Laing, RL Anderson. Lectins in the cell nucleus. *Glycobiology* 1991; 1:243-252.
181. A Raz, G Pazerini, P Carmi. Identification of the metastasis-associated galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res* 1989; 49:3489–3493.

182. J Seetharaman, A Kanigsberg, R Slaaby, H Leffler, SH Barondes, JM Rini. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate 30. recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 1998; 273:13047–13052.
183. EA Barboni, S Bawumia, K Henrick, RC Hughes. 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. RP Menon, RC Hughes. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum–Golgi complex. *Eur J Biochem* 1999; 264:569–576.
185. T Yoshii, Y Honjo, H Inohara, HR Kim, A Raz. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2002; 277:6852–6857.
186. DK Hsu, RI Zuberi, FT Liu. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 1992; 267:14167–14174.
187. B Birdsall, J Feeney, ID Burdett, S Bawumia, EA Barboni, RC Hughes. 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. RY Yang, DK Hsu, FT Liu. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6737–6742.
189. RY Yang, PN Hill, DK Hsu, FT Liu. Role of the carboxylterminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* 1998; 37:4086–4092.
190. S. Kuklinski, R Probstmeier. Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain. *J Neurochem* 1998; 70:814–823.
191. HJ Woo, JU Jung, AM Mercurio. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *J Biol Chem* 1991; 266:18419–18422.
192. H Vlassara, YM Li, F Imani, D Wojciechowicz, Z Yang, FT Liu, A Cerami. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE–receptor complex. *Mol Med* 1995; 1:634–646.
193. F Poirier, Elizabeth JR. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 1993; 119:1229–1236.

194. Fowlis D, Colnot C, Ripoche MA, and Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn* 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. *Mol Biol Evol* 1999; 45:1191-1202.
196. FA van den Brule, C Buicu, FT Liu, P. Jackers, R. Lambotte, V Castronovo. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. *Dev Dyn* 1997; 209:399–405.
197. Nio J, Kon Y, Iwanaga T. Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem* 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 Biol Int* 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. *J Immunol* 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. *Histochem Cell Biol* 2006; 126:45-56.
201. Villa-Verde DM, Silva ME, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, and Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 2002; 32:1434-1444.
202. Silva-Monteiro E, et al. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2007; 170:546-556.
203. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate- binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:172–185.
204. J Garin, Roberto D, S Kieffer, JF Dermine, S Duclos, C Rondeau, R Sadoul, M. Desjardins. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 2001; 152:165–180.

205. C Thery, M Boussac, P Veron, P Ricciardi-Castagnoli, G Raposo, J Garin, S Amigorena. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001; 166:7309–7318.
206. FA van den Brule, C Buicu, ME Sobel, FT Liu, V Castronovo. Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. *Neoplasma* 1995; 42:215–219.
207. S Sato, RC Hughes. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylysosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *Biol Chem* 1992; 267:6983–6990.
208. J Ochieng, Maria LL-B, P. Warfield Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 246:788 -791.
209. S Dong, RC Huges. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J* 1997; 14:267–274.
210. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 2001; 83:667–676.
211. I Kuwabara, FT Liu. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 1996; 156:3939–3944.
212. DW Ohannesian, Dafna L, P Thomas, JM Jessup, M Fukuda, HJ Gabius, R Lotan. Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1995; 55:2191–2199.
213. VV Swarte, RE Mebius, DH Joziase, DH Van den Eijnden, G Kraal. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3- mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:2864–2871.
214. S Dong, RC Haughes, Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J* 1997; 14:267–274.
215. C Paret, A Beer, K Miyazaki, M Schnolzer, S Fiedler, M Zoller. Ly6 family member C4.4A binds laminins 1 and 5, associates with galectin-3 and supports cell migration. *Int J Cancer* 2005; 115:724–733.
216. H Inohara, S Akahani, K Koths, A Raz. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell–cell adhesion. *Cancer Res* 1996 56:4530–4534.
217. KC Jeng, LG Frigeri, FT Liu. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett* 1994; 42:113–116.

218. A Yamaoka, I Kuwabara, LG Frigeri, FT Liu. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol* 1995; 154:3479–3487.
219. J Almkvist, Jenny F, C Dahlgren, H Leffler, A Karlsson. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. *Infect Immun* 2001; 69:832–837.
220. E Feuk-Lagerstedt, Elizabeth TJ, H Leffler, C Dahlgren, A Karlsson. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol* 1999; 163:5592–5598.
221. GC Fernandez, Juan MI, CJ Rubel, MA Toscano, SA Gomez, M Beigier Bompadre, MA Isturiz, GA Rabinovich, MS Palermo. 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. I Cortegano, V del Pozo, B Cardaba, B de Andres, S Gallardo, A del Amo, I Arrieta, A Jurado, P Palomino, FT Liu, C Lahoz. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol* 1998; 161:385–389.
223. P. Nangia-Makker, Y.H., R. Sarvis, S. Akahani, V. Hogan, K.J. Pienta, A. Raz, , Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol*, 2000. 156: p. 899–909.
224. UC Sharma, S Pokharel, TJ van Brakel, JH van Berlo, JP Cleutjens, B Schroen, S Andre, HJ Crijns, HJ Gabius, J Maessen, YM Pinto. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3121–3128.
225. M Neidhart, F Zaucke, R von Knoch, A Jungel, BA Michel, RE Gay, S Gay. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann. Rheum. Dis* 2005; 64:419–424.
226. N Maeda, N Kawada, S Seki, T Arakawa, K Ikeda, H Iwao, H Okuyama, J Hirabayashi, K Kasai, K Yoshizato. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; 278:18938–18944.

227. H Sano, DK Hsu , L Yu, JR Apgar, I Kuwabara, T Yamanaka, M Hirashima, FT Liu. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165:2156–2164.
228. JL Wang, RM Gray, KC Haudek, RJ Patterson. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673:75–93.
229. R Shalom-Feuerstein, T Cooks, A Raz, Y Kloog. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:7292–7300.
230. YJ Lee, YK Song, JJ Song, RR Siervo-Sassi, HR Kim, L Li, DR Spitz, A Lokshin, JH Kim, Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp Cell Res* 2003; 288:21–34.
231. F Yu, RL Finley Jr, A Raz, HR Kim. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002 277; 15819–15827.
232. Park JW, Voss P, Grabski S, et al. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucl Acids Res* 2001; 29:3595-3602.
233. JL, L.J.a.W., Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex. *Biochemistry* 1988. 27: p. 5329-5334.
234. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 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. DK Hsu, RY Yang, Z Pan, L Yu, DR Salomon, WP Fung-Leung, FT Liu. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073–1083.
237. C Colnot, MA Ripoche, G Milon, X Montagutelli, PR Crocker, F Poirier. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* 1998; 94:290–296.
238. H Sano, DK Hsu, JR Apgar, L Yu, BB Sharma, I Kuwabara, S Izui, FT Liu. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* 2003; 112:389–397.

239. A Mey, H Leffler, Z Hmama, G Normier, JP Revillard. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol* 1996; 156:1572–1577.
240. MacKinnon AC, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 2008 180:2650–2658.
241. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181:2781–2789.
242. Jeon SB, Yoon H, Chang CY, et al. Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J Immunol* 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. *J Invest Dermatol* 2009; 129:573-583.
244. Mensah-Brown E, 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.
245. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Grosset P, Trottein F. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun* 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. *J Leukoc Biol* 2001; 69:555-564.
247. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA and Gruppi A. Galectin-3 mediates IL-4- induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2004; 172:493-502.
248. Oliveira FL, Brand C, Paula AA, Arcanjo KD, Hsu DK, Liu F-T, Takiya CM, Borojevic R, Chammas R, El-Cheikh MC. 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, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2004; 164:893–902.

250. 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; 23:893–903.
251. de Oliveira FL, Gatto M, Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Punzi L, Doria A. Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; 240:1019-28.
252. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Gosset P and Trottein F. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun* 2007; 75:5148-5157.
253. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012; 55:1954–64.
254. RC Hughes Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:172-185.
255. RC Hughes. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Trans* 1997; 25:1194-1198.
256. Henderson NC, Mackinnon A, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* 2008; 172:288-298.
257. Henderson NC, Mackinnon A, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. 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, O'Connor C. Novel biomarkers in chronic heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2012; 9:347-359.
259. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3121-3128.
260. Kasper M, Hughes R. Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis. *J Pathol* 1996; 179:309-316.

261. Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol* 1999 187:481-489.
262. Liu YH, D Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, Andre S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:404-12.
263. Kolatsi-Joannou M, Price K, Winyard PJ, 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, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1217-1224.
265. Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010; 99:323-328.
266. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, Pina IL, O'Connor CM. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circ Heart Fail* 2012; 5:72-78.
267. Heechul Kim, Lee J, Jin Won Hyun, Jae Woo Park, Hong-gu Joo, Taekyun Shin. 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, 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.
269. Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, Larson MG, and Levy D. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60:1249-1256.
270. Yu L, Ruifrok W, et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail* 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, et al. 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, et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *Am J Pathol* 2000; 156:1073–1083.
279. Pala P, Hussell T, et al. Openshaw PJM, Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243:107-124.
280. Lv H, Evis H, Pinto S, et al. Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J Clin Invest* 2011; 121:1561-73.
281. 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; 89:382-8.
282. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 239:1883–1891.
283. Abston ED, Barin JG, Cihakova D, Bucek A, Coronado MJ, Brandt JE, Bedja D, Kim JB, Georgakopoulos D, Gabrielson KL, Mitzner W, Fairweather D. IL-33 independently induces eosinophilic pericarditis and cardiac dilation: ST2 improves cardiac function. *Circ Heart Fail* 2012; 5:366-75.

284. Zimmermann O, Homann J, Bangert A, Muller A, Hristov G, Goeser S, Wiehe J, Zittrich S, Rottbauer W, Torzewski J, Pfitzer G, Katus H, Kaya Z. 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. *J Am Heart Assoc* 2012; 1:e003293.
285. Gordana D Radosavljevic, Jelena Pantic, Ivan Jovanovic, Miodrag L. Lukic, Nebojsa Arsenijevic. The Two Faces Of Galectin 3: Roles In Various Pathological Conditions. *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17:187-198.
286. A Arsenijevic, M Milovanovic, J Milovanovic, B Stojanovic, N Zdravkovic, PSC Leung, Fu-Tong Liu, M Eric Gershwin, ML Lukic. 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, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009; 182:1167-1173.
288. Pejnovic N, 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, Rose NR. Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3:476–486.
290. 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; 41:490-9.
291. Wang Y, Afanasyeva M, Hill SL, Rose NR. Characterization of murine autoimmune myocarditis induced by self and foreign cardiac myosin. *Autoimmunity* 1999; 31:151–162.
292. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *Immunol* 1991; 147:2141-2147.
293. Rose NR. Critical Cytokine Pathways to Cardiac Inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31:705- 10.
294. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:14496-501.

295. Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, 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, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172:146-155.
297. Barret SP, et al. Interferon-gamma is required during the initiation of an organ-specific autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1996; 26:1652–1655.
298. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1999; 15:749–795.
299. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD41 T cells. *J Exp Med* 1993; 177:573–576.
300. Gajewski TF, 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. *J Immunol* 1988; 140:4245–4252.
301. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, Delucchi F, Serino M, Federici M, Pricci F, Pugliese G. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: A major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol* 2011; 54:975-983.
302. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; 230:160–171.
303. T Heidt, Courties G, P Dutta, HB Sager, M Sebas, Y Iwamoto, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res* 2014; 115:284–295.
304. Egawa M, 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. Ana-Cristina Docan Dragomir, Richard Sun, Hyejeong Choi, Jeffrey D. Laskin, and Debra L Laskin. Role of Galectin-3 in Classical and Alternative Macrophage Activation in the Liver following Acetaminophen Intoxication. *J Immunol* 2012; 189:5934–5941.

306. Fermin Lee A, Chen HY, Wan L, Wu SY, Yu JS, Huang AC, Miaw SC, Hsu DK, Wu-Hsieh BA, Liu FT. Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines. *Am J Pathol* 2013; 183:1209-1222.
307. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, Apgar JR, Kawakami T, Lilly CM, Liu FT. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol* 2004; 165:2045–2053.
308. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006; 168:1910–1920.
309. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, Liu FT. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol*. 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. *J Pathol* 2006; 210:469–477.
311. 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; 108:167-76.
312. Breuilh L, 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, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45:531-543.
314. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351:336-43.
315. Ilija Jetic, Nemanja Jovicic, Jelena Pantic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L Lukic and Nada Pejnovic. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mol Med* 2015; 21:453–465.

316. RA de Boer, DJ Lok, T Jaarsma, P van der Meer, AA Voors, HL Hillege, et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 2011; 43:60-68.
317. Olga Frunza, I Russo, Amit Saxena, Arti V. Shinde, Claudio Humeres, Waqas Hanif, Vikrant Rai, Ya Su, and Nikolaos G. Frangogiannis. 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, 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.
319. Germán E. González, NE Rhaleb, Martin A D'Ambrosio, Pablo Nakagawa, Tang-Dong Liao, Edward L Peterson, Pablo Leung, Xiangguo Dai, Branislava Janic, Yun-He Liu, Xiao-Ping Yang, and Oscar A Carretero. Cardiac-deleterious role of galectin-3 in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 311:1287–1296.
320. Louis H, Van Laethem J, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Devière J. 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, Kida H, Nishino K, Osaki T, Tachibana I, Kaneda Y, Hayashi S. 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, Deviere J. 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, Lee RT. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circulation Heart Failure* 2009; 2:684–691.

324. Oliveira FL, Roger C, Ricon L, et al. Galectin-3 regulates peritoneal B1-cell differentiation into plasma cells. *Glycobiology* 2009; 19:1248–58.
325. 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; 23:893–903.
326. 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; 172:493-502.
327. Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, Hofhuis FM, Renardel de Lavalette CR, Schmidt RE, Capel PJ, van de Winkel JG, Gessner JE, van den Berg TK, Verbeek JS. 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, Gleich GJ. Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. *J Leukoc Biol* 1996.; 60:493– 501.