

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Бојана С. Стојановић

**Утицај галектина-3 на развој експерименталног
аутоимунског енцефаломијелитиса код мишева
инфицираних *Cytomegalovirus*-ом**

Ментор: проф. др Марија Миловановић

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ 2019

1. УВОД

1.1. Цитомегаловирус

Цитомегаловирус (енгл. *Cytomegalovirus*, CMV) спада у фамилију *Herpetoviridae*, субфамилију *β -Herpesvirinae*. CMV изазива увећање ћелије, што је 1921. године означено као цитомегалија. Присуство CMV је уочено употребом електронске микроскопије у пљувачним и лимфним жлездама у облику вирусних честица које формирају инклузије у једру инфицираних ћелија са околним хало ефектом налик на „совино око“ (1). CMV изазива доживотну асимптоматску инфекцију код имунокомпетентних особа због ефикасне контроле овог вируса бројним механизмима урођене и стечене имуности, док код имунодефицијентних особа CMV изазива тешке облике болести чак и смртни исход (2). Овај вирус је један од најчешћих узрочника опортунистичких инфекција код болесника након трансплантације матичних ћелија и трансплантације органа. Иако су ефикасни антивирусни лекови, вирусни мониторинг и усклађивање донора и реципијента смањили вероватноћу обољевања након трансплантације матичних ћелија, стопа смртности пацијената који развијају пнеумонију удружену са CMV-ом остаје и даље висока, око 80% - 90% (3).

Хумани цитомегаловирус (енгл. *Human Cytomegalovirus*, HCMV) је убиквитаран и спада у групу најраспрострањенијих хуманих вируса. HCMV није високо контагиозан. Преноси се директним контактом са телесним течностима инфициране особе и то путем крви, мајчиног млека, пљувачке, вагиналног секрета и семене течности (4). Примарне инфекције HCMV-ом најчешће се догађају у детињству и тада је инфекција асимптоматска. Инфекција се преноси трансплацентарно за време интраутериног периода, перинатално проласком кроз порођајни канал HCMV-позитивне мајке или постнатално мајчиним млеком. У каснијем животном добу вирус се преноси путем пљувачке и полним путем. HCMV инфицира ограничени број ћелија, попут фибробласта, макрофага, ћелија глатке мускулатуре, епителних и ендотелних ћелија (1). Као и сви остали херпесвируси, након примарне инфекције и литичке репликације, CMV успоставља доживотну латенцију, са фазама реактивације и секреције вируса (5). HCMV је један од главних узрочника

поремећаја у развоју. Услед конгениталних инфекција овај вирус може изазвати озбиљно оштећење централног нервног система. Новорођенчад развијају трајне инвалидности као што су губитак слуха или тешки неуролошки поремећаји, попут микроцефалије, менталне ретардације и епилепсије (6).

1.1.1. Структура CMV вириона

Величина CMV вириона је око 200 nm. У основи вирион се састоји из четири компонентне које укључују језгро, капсид, тегумент и омотач. CMV има највећи геном од свих херпес вируса. Језгро вируса се састоји од јединственог линеарног ДНК генома, који је дужине 220 kbp, са капацитетом кодирања око 100 протеина. Протеински омотач означен као капсид окружује ову нуклеинску киселину и заједно граде нуклеокапсид (7). Капсид је окружен тегументом који садржи неколико протеина који помажу вирусу у склапању вириона и успостављању продуктивне инфекције у новој ћелији. Током инфекције ови протеини ремете функције домаћина како би савладали одбрамбене механизме и помажу у активацији експресије вирусних гена (8). Последња компонента вириона херпес вируса је омотач, чија двослојна липидна мембрана води порекло од мембране ендоплазматског ретикулума ћелије домаћина. Поред двослојне липидне мембране омотач садржи неколико вирусних гликопротеина попут gB и gH (9).

Схема 1.

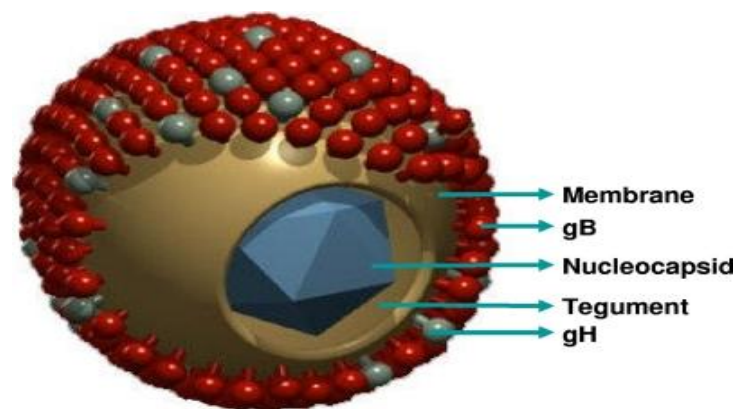


Схема 1. Структура CMV вириона. Преузето из *Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan; 22(1):76-98.*

Репликација CMV почиње причвршћивањем вируса за ћелијску површину и продором вируса у ћелију. Када се вирус припоји за ћелију, вирус интерагује са протеогликанским комплексима на ћелијској површини домаћина преко гликопротеинских комплекса gM:gN које кодира вирус. CMV се онда везује за специфичније рецепторе, као што је рецептор за епителни фактор раста преко гликопротеина gB који је кодиран вирусом (10). Гликопротеин gB у омотачу вируса олакшава фузију вируса са ћелијском мембраном, депонујући тегумент и нуклеокапсид у ћелијску цитоплазму. Фузија вируса за циљне ћелије се разликује у зависности од врсте ћелије, на пример фузија у ендотелним ћелијама захтева ендцитозу и ниску рН вредност (11). Гликопротеински gH-gL димер је неопходан за доспевање вируса у циљну ћелију, на тај начин што омогућава фузију ћелијске мембране и гликопротеина B (12). Након уласка у ћелију, вирусни нуклеокапсид мигрира у једро преко микротубула, и у једру настаје експресија гена, репликација генома CMV и стварање нових капсида (13). Циклус репликације HCMV је дуг, тако да након продукције неколико хиљада копија вирусног генома по инфицираној ћелији, ослобађају се нови вируси 24 до 48 сати после продора у ћелију. После репликације настаје дисеминација вируса и инфекција ткива и органа према којима CMV поседује специфични тропизам, а то су епителне ћелије бубрежних тубула, дуктуса пљувачних жлезди, жучне кесе и других органа и на овај начин се омогућава излучивање вируса путем телесних течности (14).

Схема 2.

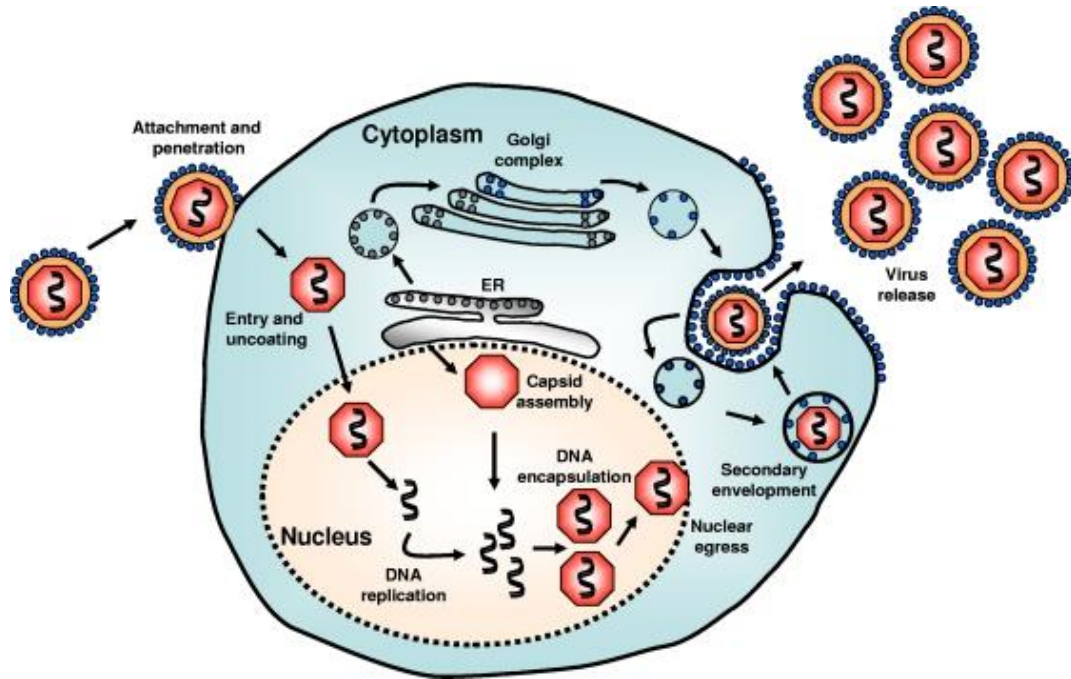


Схема 2. Животни циклус HCMV у хуманој ћелији. Преузето из *Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan; 22(1):76-98.*

Када херпес вируси инфицирају домаћина, ова инфекција може бити литичка у којој се вирус размножава и изазива ћелијску смрт или може бити латентна инфекција у којој вирус остаје у стању мировања у домаћину. Латенција је дефинисана као присуство вирусних ДНК, али без продукције вируса (15). CMV може бити у латентном стању у неколико ћелијских типова. Након примарне инфекције, вирус остаје у латентном стању у моноцитима крви и мијелоидним прекурсорским ћелијама костне сржи. Након диференцијације моноцита у ткивне макрофаге настаје реактивација латентне инфекције и дисеминација вируса (16). Латентни CMV геном је пронађен у плурипотентним CD34+ ћелијама. Ове ћелије имају способност да се диферентују у различите ћелије мијелоидне и лимфоидне линије чиме је омогућена дисеминација вируса (17).

1.1.2. Мишји цитомегаловирус (енгл. *Murine Cytomegalovirus*, MCMV)

С обзиром да је *CMV species* специфичан (специфичан за одређену врсту), анимални модели *CMV* се користе за проучавање имунобиологије и патогенезе хуманог *CMV*. Међу анималним *CMV*, мишји *CMV* (MCMV) је најраширеније коришћен модел инфекције хуманим цитомегаловирусом (18). MCMV и HCMV имају сличности у погледу патогенезе и организације генома. Могу изазивати болест реактивацијом латентне инфекције или примарном инфекцијом и могу успостављати доживотну латенцију. Геном ових вируса је линеаран, инфилтрирају сличне ћелије и изазивају идентичне патолошке промене (19).

1.1.3. Имуни одговор на инфекцију цитомегаловирусом

Механизми урођеног и стеченог имуноског одговора имају кључну улогу у имуном одговору на *CMV*. Стимулација TLR (енгл. *Toll-like receptor*) патогенима попут *CMV*, активира нисходне сигналне путеве, који индукују секрецију проинфламацијских цитокина који регрутују ћелије урођене имуности и усходно регулишу експресију костимулаторних молекула као што су CD80 и CD86, који су важни за активацију стечене имуности (20). Цитокински одговор у MCMV инфекцији се догађа веома рано током акутне инфекције, што указује да иницијално препознавање и репликација вируса су јаки покретачи овог одговора. Акутна инфекција MCMV-ом код C57BL/6 мишева изазива ослобађање бројних цитокина попут IFN, IL-12 и TNF- α . Ови одговори достижу пик 2-3 дана после инфекције и сви цитокински одговори изузев IFN- γ су независни од NK ћелија и Т лимфоцита (21). IFN тип I директно утиче на способност вирусне репликације иницијацијом механизма који инхибирају синтезу протеина или оштећују вирусну РНК. Мишеви који имају дефицијенцију IFN- α/β рецептора имају повишени титар вируса у MCMV инфекцији и другим вирусним инфекцијама (22). Поред поремећаја у вирусној репликацији, IFN тип I повећава примарни одговор антитела и сазревање ћелија које презентују антиген и које експримирају костимулаторне молекуле и МНС молекула I класе како би се подстакло одговор CD8⁺ Т лимфоцита (23). CD8⁺ Т лимфоцити експримирају IFN α/β рецептор, тако да IFN тип I директно утиче на стварање антиген-специфичних CD8⁺ Т лимфоцита. Овај цитокин такође може индуковати апоптозу ових ћелија на тај

начин деплетира посматрачке CD8⁺ Т лимфоците, што ствара довољно простора за пролиферацију и развој антиген-специфичних CD8⁺ Т лимфоцита (24).

NK ћелије су интегрални део урођене имуности на CMV и укључене су у клиренсу експерименталне MCMV инфекције (25). Један од најбољих доказа о улози урођеног имунског система у инфекцији MCMV-ом су успостављени експериментима коришћењем беж мишева који имају недостатак цитотоксичности која је посредована NK ћелијама, па су ови мишеви подложнији инфекцији MCMV-ом. Заштита од MCMV-а се може поново успоставити трансфером NK ћелија из нормалних мишева (26). У *in vitro* експериментима коришћењем NK ћелија које су активирани IL-2 је показано да NK ћелије могу инхибирати репликацију CMV у инфицираним фибробластима индукцијом ослобађања IFN- β из инфицираних фибробласта (27). Активирани NK ћелије такође ослобађају IFN- γ који може реметити вирусну репликацију (28). NK ћелије код C57BL/6 мишева експримирају Ly49H, активациони рецептор који препознаје m157 протеин MCMV-а. m157 протеин је експримиран на ћелијској површини инфицираних ћелија и везивање овог протеина за Ly49H узрокује цитотоксични одговор NK ћелија, чиме се снижава титар вируса (29). BALB/c мишеви не експримирају Ly49H рецептор на NK ћелијама, стога ови мишеви продукују висок титар вируса 3-4 дана после инфекције (30). Клиренс вируса код BALB/c мишева је посредован цитотоксичним Т лимфоцитима, а код C57BL/6 мишева NK ћелијама, чиме се објашњава осетљивост BALB/c, а отпорност C57BL/6 мишева према MCMV инфекцији (31).

Дендритске ћелије су следеће ћелије које учествују у урођеном имунском одговору на CMV. Дендритске ћелије преко TLR3 и TLR9 рецептора интерагују са молекулским обрасцима CMV-а што индукује активацију нисходних сигнала и продукцију проинфламацијских цитокина (32). Важна улога дендритских ћелија је активација CD8⁺ Т лимфоцита приликом акутне фазе инфекције. Ова функција је смањена у CMV инфекцији, јер вирус нисходно регулише експресију CD80 и CD86 молекула и MHC молекула I класе (33).

Ћелије које су инфициране CMV-ом продукују проинфламацијски цитокин CCL2/MCP-1, који делује као хемоатрактант за моноците и ово је битан механизам којим моноцити шире вирус током примарне инфекције, јер диференцијацијом моноцита у макрофаге настаје реактивација и дисеминација вируса и на овај начин се стимулише репликација вируса (34). MCMV кодира стварање MCK-2, проинфламацијског молекула који регрутује мијеломоноците чиме се повећава дисеминација вируса (35).

Хуморални имунски одговор је битан у ограничавању дисеминације CMV и у ограничавању тежине болести (36). Важност хуморалног имунског одговора на CMV је приказан у моделима гвинеа свиња, где антитела штите животиње од достизања леталне инфективне дозе, али не спречавају инфекцију, што указује на улогу хуморалног имунског одговора у ограничавању тежине болести контролисањем вирусног оптерећења (37). Након примарне инфекције код људи, антитела против одређеног броја протеина из HCMV се могу детектовати у серуму. Ова антитела препознају низ протеина из различитих делова вируса, укључујући pp65 и pp150 из тегумента, гликопротеина gB и gH из омотача, као и протеина укључених у транскрипцију као што је IE-1 (38). Гликопротеин B је један од многих протеина који као антиген покреће одговор антитела. Овај гликопротеин је експримиран на површини вириона и неутралишућа антитела против gB блокирају везивање вириона за нове ћелије и тиме ограничавају ширење вируса (39). Трансфер антитела из HCMV-серопозитивне мајке на новорођенче пружа заштиту против HCMV инфекције (40). Важност хуморалног имунског одговора је такође приказана код конгениталне CMV инфекције, у којој труднице које развијају примарну CMV инфекцију имају 40% шансе да пренесу HCMV на фетус (41).

Целуларни имунски одговор је неопходан за контролу латенције и ометање вирусне репликације код особа са латентном CMV инфекцијом (42). Значај CD4+ Т лимфоцита је уочен код мишева са деплецијом CD4+ Т лимфоцита и када се ови мишеви инфицирају MCMV-ом имају повећану инциденцу од реактивације MCMV (43). CD4+ Т лимфоцити имају улогу у сузбијању вирусне репликације у пљувачним жлездама током примарне инфекције. Титри MCMV су редуковани у слезини и плућима недељу дана после инфекције, док се пик титара вируса мери три недеље после инфекције у пљувачним

жлездама (44). Деплеција CD4+ Т лимфоцита код мишева који су инфицирани МСМV-ом изазива повећање вирусних титара у пљувачним жлездама, док титри вируса у слезини и плућима нису промењени (45). CMV инфекција се карактерише бројним CD8+ Т лимфоцитима који су специфични за антиген. Ове ћелије су доминантне у антивирусном одговору у латентној инфекцији (46). Главно обележје CMV инфекције је одржавање популације меморијских CD8+ Т лимфоцита специфичних за вирус, чиме настаје неодговарајући имунски одговор на остале стимулусе у старијем животном добу (47). Деплеција CD8+ Т лимфоцита код мишева који су инфицирани МСМV-ом не мења кинетику елиминације вируса (48).

Схема 3.

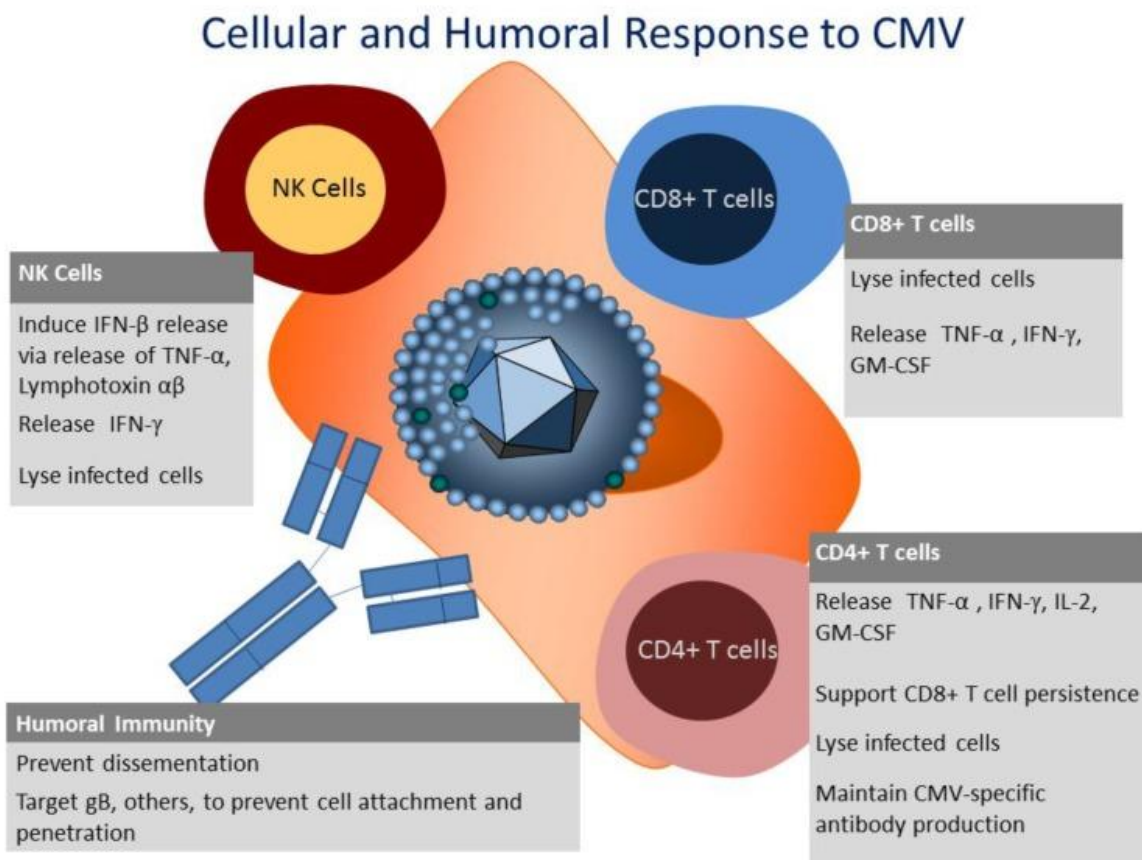


Схема 3. Целуларни и хуморални имунски одговор на CMV. Преузето из *Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead Viruses*. 2014 Jun; 6 (6):2242-2258.

1.1.4. Модулација имунског одговора цитомегаловирусом

Поједини вируси су пронашли начине да избегну имунски систем домаћина, који им омогућавају да се деле, шире и перзистирају током читавог живота, повремено се реактивирају, али углавном остају у латентном облику (49). CMV поседује бројне механизме којима избегава имунски систем који регулишу сваку компоненту имунског одговора и који се сматрају важним за перзистенцију вируса, као и за хоризонтално ширење вируса (50). Један од начина на који CMV може да перзистира у домаћину је коришћење многобројних гена који омогућавају овом вирусу да избегне имунски одговор. CMV ремети презентацију МНС молекула I класе CD8+ Т лимфоцитима. МНС молекули I класе су деградирани или задржани у ендоплазматском ретикулуму различитим вирусним протеинима. Укључено је најмање четири гена CMV у нисходну регулацију експресије МНС молекула I класе: US2, US3, US6, и US11 (51). МНС молекули II класе такође су деградирани и њихова усходна регулација је прекинута генима специфичним за CMV (52). Недостатак површинских МНС молекула I класе чини инфицирану ћелију склону лизи NK ћелијама. Међутим, CMV може да избегне лизу NK ћелијама експресијом хомолога МНС молекула I класе, или усходном регулацијом експресије HLA-E домаћина који се везује за инхибиторни рецептор на NK ћелијама. Тако, инфициране ћелије избегавају детекцију и накнадну лизу NK ћелијама (53).

CMV инфицира дендритске ћелије и зауставља њихово сазревање, водећи их у стање функционалне неактивности и на овај начин спречава презентацију CMV антигена Т лимфоцитима (54). Поред смањене експресије МНС молекула I класе и костимулаторних молекула, MCMV инфекција изазива дисфункцију дендритских ћелија у секрецији цитокина. Дендритске ћелије заражене MCMV нису само нереактивне на MCMV, већ ове ћелије не секретују IL-2 или IL-12 након третмана потенцијалним стимулусом, липополисахаридом (LPS) (33).

1.2. Класификација и структура галектинских молекула

Лектини спадају у фамилију еволуционо конзервираних протеина који имају могућност везивања угљених хидрата (55). Класификовани су у 4 групе: пентраксини, галектини, лектини С типа и Р типа (56). Галектини спадају у фамилију протеина од 15 чланова (означени бројевима од 1 до 15) (57). Чланови ове фамилије имају најмање један домен којим препознају угљене хидрате (енгл. *Carbohydrate recognition domain*, CRD) и способност везивања аминолактозне јединице унутар гликана. Домен за препознавање угљених хидрата има висок афинитет да везује β -галактозиде и дужине је око 135 аминокиселина (55). Чланови фамилије галектина су подељени у 3 групе (58):

- „*Proto*”- тип галектини су нековалентни хомодимери, који поседују два домена којим препознају угљене хидрате. Овој групи припадају галектин 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 и 15.
- „*Tandem repeat*”- тип галектини садрже два домена којим препознају угљене хидрате која су повезана кратким пептидом који је различите дужине. Овој групи припадају галектин 4, 6, 8, 9 и 12.
- „*Chimera*”- тип галектини имају 1 домен за препознавање угљених хидрата који је спојен са не-лектинским N-терминалним крајем. Члан ове групе галектина је галектин-3.

Схема 4.




Класификација	Структура
<p>„proto“ – тип</p> <p>Галектин- 1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15</p>	 <p>Димер, два идентична CRDs</p>
<p>„chimera“ – тип</p> <p>Галектин- 3</p>	 <p>Један CRD</p>
<p>„tandem-repeat“ – тип</p> <p>Галектин- 4, -6, -8, -9, -12</p>	 <p>Два различита CRDs</p>

Схема 4. Структура и класификација галектина. Адаптирино према *Lui FT и сар. Ann N Y Acad Sci 2010; 1183:158-82.*

Галектини могу бити експримирани у свим ћелијама и ткивима. Присутни су у многим ћелијама урођене и стечене имуности (59). Могу се наћи на површини ћелије, у цитоплазми, у једру, или у солубилном облику у телесним течностима (60). Галектин 1 и галектин 3 су експримирани у различитим ћелијама и ткивима, а галектин 2 само у дигестивном епителу (61).

Поред тога што имају афинитет да везују галактозу, поједини галектини поседују способност да прилагоде CRD регион како би везали различите олигосахариде који су повезани са галактозом (62, 63). Везивањем за гликокоњугате на површини ћелије галектини покрећу различите сигналне путеве (64). Функције интрацелуларних галектина зависе од везивања за различите интрацелуларне протеинске лиганде и галектини су укључени у различитим интраћелијским сигналним путевима (65).

Током ембриогенезе и диференцијације мења се експресија галектина (66). Галектини су укључени у процесе ембриогенезе, пролиферације, ћелијске диференцијације, апоптозе и у бројним другим процесима у ћелији (67-69). Галектини су такође укључени и у патогенезу различитих патолошких стања (59).

1.2.1. Структура галектин-3 молекула

Галектин-3 има полипептидни ланан који садржи N-терминални домен и C-терминални домен (CRD регион). CRD домен је битан за препознавање угљених хидрата (67, 70). На N-терминалном домену галектина-3 се налази место за фосфорилацију серина (71, 72). Овај домен такође има секвенце сличне колегену- α које су богате пролином, глицином и тирозином (70, 73, 74). Захваљујући N-терминалним доменима молекули галектина-3 се удружују у пентамере, унакрсно повезују гликокоњугате и покрећу интрацелуларне сигналне путеве (60, 75, 76). N-терминални домен је битан за секрецију галектина-3 (77), па услед делеције првих 11 аминокиселина у овом домену инхибира се секреција галектина-3 (75). N-терминални домен је такође битан у регулисању апоптозе. Мутација серина на позицији 6 делује неповољно на антиапоптотску функцију галектина-3 (74). C-терминални регион галектина-3 се састоји од 135 аминокиселинских остатака који формирају глобуларну структуру (78).

Схема 5.

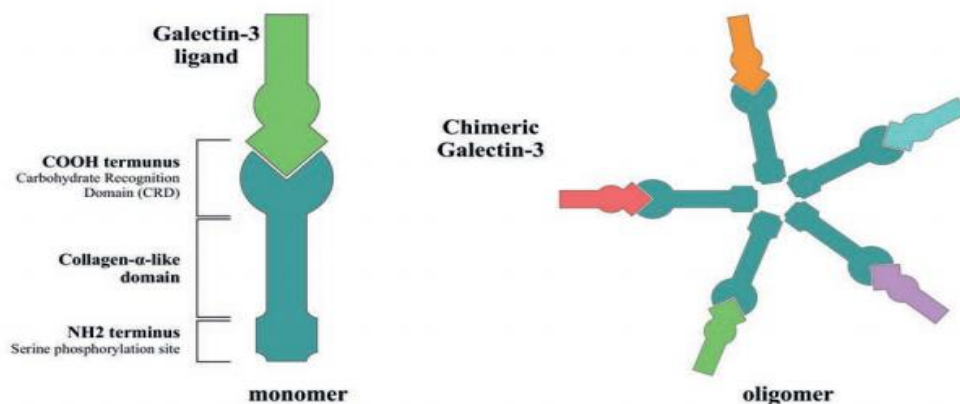


Схема 5. Структура галектина-3. Преузето из *Radosavljevic G u cap. Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (3): 187-198*

1.2.2. Биолошке функције галектина-3

Галектин-3 може бити локализован на површини ћелије, у цитоплазми, у једру и у екстраћелијском простору (79). Галектин-3 се везује и ступа у реакцију са бројним лигандима у екстрацелуларној и интрацелуларној средини и обавља бројне функције у ћелији. Унутар цитоплазме подстиче ћелијску пролиферацију (80). Галектин-3 такође регулише ћелијску диференцијацију В лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија (81-83). Везивањем за антиапоптоски Bcl-2 протеин у цитоплазми, галектин-3 инхибира апоптозу (84). Галектин-3 утиче и на пост-транслациону обраду информационе RNA (енгл. mRNA *splicing*) (85).

Екстрацелуларни галектин-3 поседује улогу у активацији ћелија, тако што унакрсно повезује лиганде на површини ћелије, што изазива активацију нисходних сигналних путева (79). Екстрацелуларни галектин-3 поседује улогу у адhezији ћелија, тако што се везује за угљене хидрате на ћелијама и екстрацелуларном матриксу (79). Везујући се за $\alpha\beta 1$ интегрин, галектин-3 делује на ћелијску адhezију (86). Галектин-3 може деловати и као хемоатрактант, тако што стимулише миграцију моноцита и макрофага (87).

Галектин-3 може бити експримиран у многим туморима, као што је карцином дојке. Постоји индиректна корелација између нивоа експресије галектина-3 и метастатског потенцијала карцинома (88).

1.2.3. Улога галектина-3 у регулисању одговора имунског система

Многобројне ћелије конститутивно експримирају галектин-3, попут моноцита, макрофага, еозинофила, дендритских ћелија, док га ћелије стеченог имунског система експримирају тек након активације (89).

Галектин-3 поседује важну улогу у регулисању инфламацијског одговора и делује на хемотаксу, адhezију и активацију ћелија, опсонизацију и фагоцитозу (90-92). Галектин-3 повећава стварање реактивних кисеоничних радикала и IL-1 у макрофагима (81).

Макрофаги из галектин-3 дефицијентних мишева су склонији апоптози од макрофага из галектин-3 позитивних мишева (93).

Макрофаги значајно експримирају и секретују галектин-3 (81). Галектин-3 делује на функцију моноцита и макрофага, тако што стимулише продукцију супероксидних анјона у хуманим моноцитима (81), али делује и као хемоатрактант за моноците и макрофаге (87). Галектин-3 стимулише фагоцитозу апоптотских тимоцита и еритроцита који су опсонизовани са IgG (94). Овај лектин утиче на алтернативну активацију макрофага. Макрофаги пореклом из галектин-3 дефицијентних мишева имају смањену алтернативну активацију под дејством IL-4 и IL-13, док није било промене у алтернативној активацији макрофага под утицајем липополисахарида и IFN- γ (95). Макрофаги пореклом из галектин-3 дефицијентних мишева стварају већу количину проинфламацијских цитокина под утицајем липополисахарида (96).

Галектин-3 функционише и као хемотактички молекул за неутрофиле и повећава фагоцитну активност неутрофила. Галектин-3 подстиче адхезију хуманих неутрофила за ламинин и ендотелне ћелије (97, 98). Галектин-3 стимулише супероксидну продукцију у неутрофилима и дегранулацију мастоцита због унакрсног повезивања мембранских гликопротеина (99, 100).

Активација, функција и миграција дендритских ћелија је зависна од галектина-3 (101, 102). Током инфекције дендритске ћелије повећавају експресију галектина-3 (103). Поларизација имунског одговора такође је зависна од експресије галектина-3 у дендритским ћелијама (103-105). Галектин-3 има улогу рецептора за препознавање молекулских образаца (енгл. *Pattern-recognition receptor*, PRR) на дендритским ћелијама и на тај начин утиче на продукцију проинфламацијских цитокина из дендритских ћелија. Инхибицијом галектина-3 смањује се експресија IL-6, IL-1 β и IL-23, док се повећава експресија IL-10 и IL-12 у хуманим дендритским ћелијама (106). Дендритске ћелије из галектин-3 дефицијентних мишева продукују већу количину IL-23 и изазивају снажније Th17 одговоре у поређењу са дендритским ћелијама пореклом из мишева дивљег соја (107).

Галектин-3 такође поспешује хемотаксу еозинофила у експерименталном моделу астме (108).

Галектин-3 игра битну улогу у апоптози и пролиферацији Т лимфоцита (109, 110). Апоптозу активираних Т лимфоцита подстиче експресија екстрацелуларног галектина-3, док експресија интрацелуларног галектина-3 спречава апоптозу активираних Т лимфоцита (111). Митохондријални пут апоптозе се активира отпуштањем цитохрома-с и активацијом каспазе-3, што се дешава везивањем галектина-3 за CD7 и CD29 молекуле (109).

Галектин-3 делује на преживљавање В лимфоцита, зауставља диференцијацију ових ћелија у плазмоците и изазива настанак меморијских В лимфоцита (82).

1.2.4. Улога галектина-3 у инфекцији и акутној инфламацији

Галектин-3 је укључен у многим процесима акутне инфламације, попут активације адхезије неутрофила (97), хемотаксе моноцита и макрофага, активације мастоцита (87). Чланови фамилије галектина могу деловати као рецептори за препознавање молекулских образаца патогена (112, 113). Галектин-3 може да се веже за гликане који су експримирани на микроорганизмима *Leishmania major*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trypanosoma cruzi* и *Shistosoma mansoni*. У овим инфекцијама галектин-3 има проинфламацијску улогу (114-117). Показано је да галектин-3 може да допринесе инфекцијама појединим микроорганизмима, јер омогућава адхезију микроорганизама за ћелије домаћина или на тај начин повећава деструктивни одговор инфламацијских ћелија које оштећују организам домаћина (118-120). Инфекција патогеном *Schistosoma mansoni* код мишева са дефицијенцијом галектина-3 је праћена смањењем броја В и Т лимфоцита (104). Галектин-3 дефицијентни мишеви су подложнији инфекцији *Paracoccidioides brasiliensis* и развијају Th2 поларизоване стечене имунске одговоре (121). Галектин-3 дефицијентни мишеви инфицирани *Streptococcus pneumoniae* развијају јачи Th1 имунски одговор и имају већи степен оштећења плућног ткива (90). Поларизација стеченог имунског одговора под утицајем галектина-3 вероватно је зависна од типа патогена који је узроковао болест (122).

Галектин-3 модулише инфламацијске одговоре током инфекције хелминтима и експресија овог молекула у дендритским ћелијама је кључна у контроли прајмовања Т лимфоцита (104). Галектин-3 такође има антимикуробне ефекте у инфекцијама изазваним *Candida-e albicans* (123).

Галектин-3 игра важну улогу у патогенези многобројних вирусних инфекција. Овај молекул је битан медијатор за улазак *Herpes simplex virusa tip 1* (HSV-1) у хумане корнеалне кератиноците (120). Удруживање галектина-3 са трансмембранским муцинима на површини корнеалних кератиноцита ограничава инфекцију *Herpes simplex virus*-ом (120). Галектин-3 је неопходан за ефикасну инфекцију и улазак *Parvovirusa* у ћелије фибробласта и тумора дојке (124). Такође, галектин-3 промовише излазак HIV-1 вируса (енгл. *Human immunodeficiency virus*, HIV) из инфицираних Т лимфоцита (125). Делација гена за галектин-3 игра протективну улогу у вирусном моделу мултипле склерозе смањујући инфилтрацију имунских ћелија у субвентрикуларној зони (126).

Галектин-3 има важну улогу у патогенези хепатитиса који је индукован конканавалином А (Con-A). Галектин-3 дефицијентни мишеви су имали значајно мању инфламацију јетре и значајно мањи број ефекторских ћелија (127). У овом мишјем моделу фулминантног хепатитиса који је индукован применом Con-A, галектин-3 има проинфламацијску улогу (127).

1.2.5. Улога галектина-3 у аутоимунским болестима

У многим моделима аутоимунских болести је испитана улога галектина-3. У моделу аутоимунског *Diabetes mellitus*-а је уочено да галектин-3 дефицијентни мишеви имају мању моноклеарну инфилтрацију у панкреасним острвцима (105). Галектин-3 смањује апоптозу ћелија у инфилтратима ЦНС-а и повећава синтезу IL-17 и IFN- γ у моделу експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса. Мишеви са дефицијенцијом галектина-3 имају значајно слабији ЕАЕ у поређењу са галектин-3 позитивним мишевима (103). У експерименталном моделу реуматоидног артритиса галектин-3 делује као проинфламацијски молекул. Галектин-3 дефицијентни мишеви имају мању продукцију проинфламацијских цитокина IL-6 и TNF- α (128). У експерименталном моделу

атеросклерозе галектин-3 има протективну улогу преко преузимања и ефикасног уклањања модификованих липопротеина (129).

1.2.6. Експресија галектина-3 у јетри

Здрави хепатоцити не експримирају галектин-3 (130). У многобројним малигним и инфламацијским болестима је повећана експресија галектина-3 (131-133). Галектин-3 је обилно експримиран унутар регенеративних нодулуса у цирози јетре (134). Галектин-3 је укључен у прогресију неалкохолног стеатохепатитиса тако што смањује стеатозу, али промовише инфламацију и фиброзу јетре (135). Експресија галектина-3 је такође укључена у прогресију тумора и повезана је са лошијом прогнозом хепатоцелуларног карцинома (131).

1.2.7. Експресија галектина-3 у централном нервном систему

Галектин-3 је експримиран у централном нервном систему укључујући мозак и кичмену мождину. Галектин-3 експримирају активирани микроглијалне ћелије, макрофаги, епендимске ћелије, астроцити субвентрикуларне зоне, неурони региона хипокампуса и Шванове ћелије након повреде нерава. Галектин-3 стимулише адхезију нервних ћелија и раст неурита (136). Галектин-3 је експримиран на епендимским ћелијама и астроцитима субвентрикуларне зоне и има улогу у регулацији миграције неуробласта током развоја мозга (137). Галектин-3 стимулише неурогенезу и ангиогенезу и има важну улогу у процесу ремоделовања можданог ткива након исхемијске повреде мозга (138). Галектин-3 такође стимулише диференцијацију олигодендроцита, доприносећи процесима мијелинизације што може ограничити процесе демиелинизације (139).

Експресија галектина-3 је повећана у микроглији и макрофагима у кичменој мождини и оптичким нервима код мишева са експерименталним аутоимунским енцефаломијелитисом (140). Као одговор на инфламацијске стимулусе, микроглија секретује галектин-3 који делује као ендогени лиганд за *Toll-like* рецептор 4 (TLR-4). Галектин-3 учествује у активацији проинфламацијског М1 фенотипа микроглијалних ћелија и на тај начин промовише неуроинфламацију (141). Са друге стране, галектин-3 секретован из

микроглијалних ћелија има протективне, антиинфламацијске ефекте у амиотрофичној латералној склерози (142). Експресија галектина-3 је повећана у прионским инфекцијама мозданог ткива (143) и у експерименталном пнеумококном менингитису (144). Експресија галектина-3 на активираним макрофагама и микроглијалним ћелијама је повезана са акумулацијом абнормалних протеина у патогенези прионских болести и са развојем неуродегенеративних обољења централног нервног система (145). Такође повећана је експресија галектина-3 на активираним микроглијалним ћелијама код експерименталног енцефалитиса изазваног *Junin* вирусом (146). Повећана експресија галектина-3 је уочена у дегенеративним лезијама мозга мишева са енцефалитисом узрокованог *Encefalomiokarditis* вирусом (енгл. *Encephalomyocarditis virus*, EMCV) (147).

1.3. Мултипла склероза

Мултипла склероза (МС) је инфламацијско демиелинизирајуће обољење ЦНС-а. МС је водећи узрок нетрауматске инвалидности код младих у најпродуктивнијим годинама живота (148). Активирани аутореактивни имунски ћелије инфилтришу мозак и кичмену мождину изазивајући дуготрајну инфламацију, прогресивну демиелинизацију и неуродегенерацију што изазива поремећај у спровођењу нервних импулса и на крају губитак аксона (149).

Тачан узрок МС је још увек непознат. Широко је прихваћено да је патологија болести посредована имунским системом код генетски осетљивих домаћина (150). Генски алели МНС молекула и многи алели МНС-независних гена доприносе настанку МС (151). Осим генетских фактора ризика који одређују осетљивост и који могу утицати на тежину болести, фактори околине такође могу допринети покретању болести (152). Инфекције, посебно вирусне етиологије, и недостатак витамина Д могу допринети развоју МС (153). Неколико вируса могу деловати као окидачи МС. Најчешће проучаван вирус који је повезан са МС је *Epstein-Barr* вирус (EBV), члан фамилије *Herpesviridae* (154). Други херпес вирус, хумани цитомегаловирус, такође је предложен као потенцијални окидач МС. Повишени титри IgG према HCMV су уочени у серуму болесника са МС (155). Према хигијенској хипотези смањен контакт или изостанак контакта са инфективним агенсима у

детињству изазива неадекватну регулацију имунског одговора и може допринети развоју аутоимунских болести, као што је МС (156).

Клиничке манифестације МС могу бити различите. Најчешћи облик МС је релапсно-ремитентна МС, која се карактерише фазама неуролошких испада и опоравком између релапса. Овај облик МС може да пређе у секундарно-прогресивну МС, која има прогресивни ток. Следећи облик МС је примарно-прогресивна МС, која напредује од самог почетка болести и има мања побољшања (157). Последњи облик МС је прогресивно-релапсна МС, која има прогресиван ток од почетка и карактерише се сталним напредовањем болести са фазама опоравка (158).

1.3.1. Патогенеза мултипле склерозе

Повезаност између HLA-II региона и осетљивости ка развоју МС је указала да CD4+ Т лимфоцити имају битну улогу у патогенези мултипле склерозе (159). CD4+ Т лимфоцити продукцијом цитокина привлаче макрофаге, неутрофиле, активирају микроглију, CD8+ цитотоксичне Т лимфоците и В лимфоците (160). CD4+ Т лимфоцити се активирају у периферним лимфним органима препознавањем пептида ЦНС-а и диференцирају се у правцу Th1 или Th17 субпопулације (161). Активирани лимфоцити секретују бројне проинфламацијске цитокине, хемокине, повећавају експресију интегрина VLA-4 и цитокинских рецептора, чиме се мења пропустљивост крвно-мождане баријере. На овај начин CD4+ Т лимфоцити доспевају у ЦНС и поново се реактивирају антигенима који су приказани у склопу МНС молекула на површини ћелија које презентују антиген. Ова реактивација изазива продукцију различитих цитокина, активацију бројних ћелија попут макрофага, неутрофила, NK ћелија, В лимфоцита и индукцију инфламацијског одговора који изазива оштећење мијелина и последичну демиелинизацију (162). Постоје истраживања која су указала на улогу Th17 лимфоцита у патогенези аутоимунских болести, као што је МС (163). Ниво Th17 лимфоцита је значајно висок у пику болести у ЦНС-у и смањује се током стадијума опоравка (164). Т лимфоцити који продукују IL-17 су пронађени у цереброспиналној течности оболелих од МС у релапсној фази болести (165).

Експресија IL-17 у цереброспиналној течности и у крви је у корелацији са тежином МС (166).

Иако су CD4+ Т лимфоцити кључне ћелије у патогенези МС, број CD8+ Т лимфоцита је већи у активним лезијама на местима ткивне деструкције (167). Број CD8+Т лимфоцити је у корелацији са степеном оштећења аксона (168). CD8+ Т лимфоцити делују цитотоксично преко перфорина и гранзима, али успостављају и директан контакт са аксонима и олигодендроцитима (169). Показано је да CD8+ Т лимфоцити убијају изоловане олигодендроците или секретују проинфламацијске цитокине TNF- α и IFN- γ (170).

В лимфоцити се налазе у менингеама, паренхиму мозга и цереброспиналној течности (168). В лимфоцити кроз продукцију антитела према протеинима мијелинског омотача могу допринети патогенези МС (171). Ова антитела могу активирати класични пут комплемента и могу изазвати лизу мијелинског омотача (172). Олигоклоналне траке IgG у цереброспиналној течности су важна карактеристика МС које су битне у дијагнози болести (173). Примена анти-CD20 антитела смањује број лезија и релапса код пацијената са МС, што указује на значај В лимфоцита у патогенези МС (174).

1.3.2. Експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (ЕАЕ)

ЕАЕ је експериментални модел за испитивање патофизиологије мултипле склерозе (175). Овај експериментални модел има много имунских, хистолошких и клиничких сличности са орган-специфичним аутоимунским обољењима као што је МС (176).

ЕАЕ се може индуковати активном и пасивном имунизацијом. Активна индукција ЕАЕ-а представља имунизацију експерименталних животиња протеинима или пептидима ЦНС-а са адјувансима (177). Активна индукција се најчешће обавља имунизацијом осетљивих животиња хомогенатима кичмене мождине или применом протеинских компоненти мијелина. Поред антигена примењује се и адјуванс који садржи компоненте бактерија које активирају неспецифични имунски систем што је битно за презентацију антигена (178). Најчешће се користи комплентан *Frojndov* адјуванс са додатком бактерије *Mycobacterium tuberculosis* и оваква активна имунизација изазива бржи развој болести и тежи облик

болести код животиња (179). Са друге стране, пасивна индукција ЕАЕ-а представља адоптивни трансфер активираних Т лимфоцита који су изоловани из имунизованих животиња и који су специфични за антигене мијелина (177). Најчешће коришћени мишији модел за проучавање патогенезе болести је ЕАЕ, који је индукован имунизацијом са мијелин олигодендрцитним протеином, резудуа 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) код C57Bl/6 мишева (180).

Експериментални модел ЕАЕ-а се може поделити у неколико фаза. Прва фаза је преимунизациона фаза у којој се потенцијално аутореактивни Т лимфоцити налазе у циркулацији, али су у стању мировања (181). Затим следи индукциона фаза неколико дана након имунизације, где антигене мијелина преузимају и обрађују ћелије које презентују антиген и презентују их у склопу МНС молекула Т лимфоцитима у дренажућем лимфном чвору. Т лимфоцити се активирају, пролиферишу и диференцирају у правцу Th1 или Th17 субпопулације (181, 182). Активирани Т лимфоцити повећавају експресију интегрина, адхезивних молекула и хемокинских рецептора који им омогућавају да доспевају до ЦНС-а у периваскуларни простор тако што пролазе кроз крвно-мождану баријеру (183). Анализом хистолошки исечака се може уочити да се акутне лезије налазе периваскуларно и да се у њима налазе леукоцити (184). Затим следи последња ефекторска фаза где се аутореактивни Т лимфоцити специфични за антигене мијелина поново реактивирају у периваскуларном простору ЦНС-а, тако што ћелије које презентују антиген, презентују пептиде мијелина у склопу МНС молекула II класе. Активирани аутореактивни Т лимфоцити продукују проинфламацијске цитокине, хемокине, обављају ефекторске функције, индукују инфламацију и последично оштећење мијелина, односно демиелинизацију (185). Болест се развија између 9-12 дана после имунизације и одликује се различитим патолошким променама и клиничким током у зависности од имунизације и соја животиња (186). Болест се карактерише прогресивно асцендентном парализом која изазива најпре парализу репа, затим парезу или парализу задњих ногу, а временом настаје пареза и парализа предњих ногу и на крају смртни исход (184).

Кључну улогу у патогенези ЕАЕ-а имају енцефалитогени CD4⁺ Т лимфоцити Th1 субпопулације који секретују бројне проинфламацијске цитокине након стимулације,

попут $IFN-\gamma$ (187). $IFN-\gamma$ пореклом из Th1 лимфоцита активира макрофаге које су најзначајније ћелије које доприносе инфламацији продукцијом проинфламацијских цитокина и реактивних кисеоничних једињења (188). На значај ових ћелија су указали и експерименти са недостатком IL-12p40 субјединице која је битна за поларизацију T лимфоцита у правцу Th1 (189). Ови мишеви су били резистентни на ЕАЕ (189). Међутим, у другим експериментима мишеви су развили тежи ЕАЕ без $IFN-\gamma$ и STAT1 који је битан транскрипциони фактор за развој Th1 лимфоцита (190).

Поред Th1 лимфоцита улогу у имунопатогенези ЕАЕ-а имају и Th17 лимфоцити (191). IL-17 кога секретују Th17 лимфоцити привлачи и активира неутрофиле и нарушава пермеабилност крвно-мождане баријере (192). Ове ћелије синтетишу IL-21, IL-22, фактор стимулације гранулоцитних и макрофагних колонија (GM-CSF) који стимулише ћелије које презентују антиген да секретују IL-23 који је битан за развој Th17 лимфоцита (193). Показано је да примена анти-IL-17 антитела смањује тежину ЕАЕ-а (194).

Постоје студије које указују да CD8+ T лимфоцити могу имати патогену улогу у ЕАЕ-у (195). CD8+T лимфоцити који потичу из имунизованих животиња, могу узроковати демјелинизацију код примаоца (196). Показано је да регулаторни CD8+ T лимфоцити могу супримирати ток ЕАЕ секрецијом $IFN-\gamma$ и TGF- β . Стога, мишеви који имају дефицијенцију CD8+ T лимфоцита имају тежи ЕАЕ (197).

В лимфоцити доприносе патогенези ЕАЕ-а презентацијом антигена, обезбеђивањем костимулаторних сигнала T лимфоцитима или синтезом антитела. В лимфоцити продукују IL-6 који је битан цитокин за поларизацију T лимфоцита у Th17 субпопулацију (198). Поред тога, В лимфоцити могу да синтетишу и друге цитокине, попут IL-2, 4, 12, $IFN-\gamma$ (199). Мишеви који имају дефицијенцију В лимфоцита су отпорни на индукцију ЕАЕ-а MOG пептидом (200).

Следећа ћелијска популација која има битну улогу у патогенези ЕАЕ-а су регулаторни CD4+ T лимфоцити. Уочено је да трансфер CD4+ CD25+ T лимфоцита смањује тежину болести (201). Такође је показано да се регулаторни T лимфоцити акумулирају у ЦНС-у у фази опоравка (164).

1.3.3. Улога CMV у патогенези мултипле склерозе и ЕАЕ

Постоји неколико различитих механизма помоћу којих вируси као што је CMV могу изазивати активацију аутореактивних Т лимфоцита и настанка аутоимунских болести. Две хипотезе се ослањају на чињеницу да су потенцијално аутореактивни Т лимфоцити већ присутни у малом броју у сваком појединцу. Ове ћелије избегавају негативну селекцију у тимусу током нормалног развоја Т лимфоцита (202, 203). Једна хипотеза предлаже директну активацију аутореактивних Т лимфоцита инфективним патогенима који експримирају антигенске епитопе који су структурно слични епитопима сопствених антигена (204). Пример овакве молекулске мимикрије је унакрсна реакција Т лимфоцита између мијелинског базног протеина (МВР), аутоантигена повезаног са мултиплом склерозом и *Epstein-Barr* вируса (EBV) (205). Друга хипотеза, коју су предложили *Hart* и сарадници је варијација молекулске мимикрије, означена као „одложена молекулска мимикрија”, модел у којем латентне хроничне инфекције стварају репертоар дугоживећих меморијских Т лимфоцита специфичних за вирус. Ове ћелије могу бити реактивирани у било ком тренутку када наиђу на сопствене антигене који су ослобођени из повређених ткива (206). Следећа хипотеза обухвата активацију посматрача. Наиме, цитокини продуковани из имунских ћелија које су специфичне за вирус, могу изазивати активацију аутореактивних Т лимфоцита (207). Процес блиско повезан са молекулском мимикријом и активацијом посматрача је ширење епитопа. После иницијалне реакције на патоген, антигени ослобођени из примарне лезије у циљном ткиву ће проширити потенцијално аутореактивне Т лимфоците (208). Такође, оштећење ћелија домаћина вирусним инфекцијама изазива отпуштање скривених епитопа, укључујући сопствене антигене који нису доступни имунском систему. У TMEV мишјем моделу мултипле склерозе (енгл. *Theiler's murine encephalitis virus*) је показано ослобађање скривених антигена ЦНС-а (209). Затим, митогени или суперантигени, ослобођени из инфективних патогена, могу изазвати поликлонску активацију лимфоцита (202). Дакле, инфламацијска средина у вирусним инфекцијама може изазвати активацију и клонску експанзију аутореактивних Т лимфоцита, резултирајући аутоимунским болестима (210). Један од најупечатљивијих механизма преко којег CMV може имати улогу у мултиплој склерози је молекулска мимикрија. Пронађена је унакрсна реактивност између пептида хуманог CMV (hCMV₉₈₁₋

¹⁰⁰³) и мијелинског олигодендроцитног гликопротеина резидуе 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) у ЕАЕ-у код *Lewis* пацова (211). У другом анималном моделу, SJL/J мишеви који су инфицирани вирусом вакциније који кодира протеолипидни протеин, а касније су изложени мишјем CMV, развили су лезије беле масе. У овом моделу болести, примарна инфекција повећава број аутореактивних Т лимфоцита, а секундарна инфекција изазива болест преко активације посматрача или активације и пролиферације претходно насталих аутореактивних Т лимфоцита (212).

Постоје супротни подаци о удружености инфекције цитомегаловирусом и мултипле склерозе. Епидемиолошки подаци који указују да CMV има улогу у етиопатогенези мултипле склерозе су оскудни. Показано је да су титри IgG антитела специфичних за CMV и за DNК вируса повећани код пацијената са мултиплом склерозом, указујући на улогу CMV у мултиплој склерози (213). Серопозитивност на CMV је повезана са већим бројем релапса и са прогресијом до клинички дефинитивне мултипле склерозе (214). Присуство антитела на CMV је такође повезано са израженијом атрофијом сиве масе и целог мозга код пацијената са мултиплом склерозом (215).

Друге студије указују на заштитни ефекат CMV у аутоимунским болестима. CMV кодира више фактора који покрећу имуномодулаторне механизме и механизме избегавања имунског система, што може смањити имунски одговор код пацијената са мултиплом склерозом (213, 216). У моделу инфекције Тајлеровим вирусом мишјег енцефаломијелитиса, MCMV инфекција која две недеље предходи TMEV инфекцији изазива бољи исход болести. Ови мишеви су имали боље моторичке перформансе и мању инфилтрацију Т лимфоцитима у мозгу, што указује на имуномодулаторни ефекат MCMV инфекције у овом моделу болести (216). Веза између титара антитела специфичних за CMV и бољег клиничког исхода је примећен у групи пацијената са мултиплом склерозом. Наиме, пацијенти који су били позитивни на CMV су имали мању атрофију мозга и краће релапсе (217). Друге студије су указивале да серопозитивност на CMV смањује ризик од развоја мултипле склерозе (218).

1.4. Хепатитис изазван CMV-ом

Инфекција хуманим цитомегаловирусом код имунокомпромитованих особа, нарочито код примаоца трансплантата изазива пнеумонију, болести гастроинтестиналног система, ретинитис и тешки хепатитис који повећава морталитет (219). Многе вирусне инфекције изазивају болести јетре. Нарочито, херпесвируси групе CMV-а могу изазвати значајна обољења јетре. Иако је инфекција HCMV-ом код имунокомпетентних особа субклиничка, често је праћена повишеним серумским нивоима трансаминаза (220). Код новорођенчади и код имунокомпромитованих одраслих особа, HCMV може изазвати фулминантни или хронични хепатитис, што на крају изазива цирозу јетре или смртни исход (221). HCMV инфицира јетру и може изазвати дисфункцију јетре код примаоца трансплантата органа и пацијената са AIDS-ом (222, 223). Хепатоспленомегалија и жутица су два знака системске конгениталне инфекције HCMV-ом (224). Дуготрајне последице инфекције јетре, укључујући билијарну болест, фиброзу и цирозу јетре су објављене код конгенитално или перинатално инфицираних одојчади (225).

Примарне карактеристике акутне инфекције MCMV-ом код осетљивих мишева укључују високе нивое вирусне репликације у слезини и јетри који су удружени са губитком функције јетре (226). MCMV изазива обољење јетре код мишева са многим карактеристикама сличним оним које су примећене током инфекција код људи. Код имунокомпетентних мишева који су резистентни на вирус, инфекције умереним дозама вируса узрокују болест јетре која се карактерише индукцијом фокалног инфламацијског одговора и ензимским доказом о оштећењу јетре (227). MCMV изазива хроничну непродуктивну инфекцију са иницијалним хистолошким и серолошким доказима хепатичне инфламације и оштећења јетре (220).

Ћелије урођеног имунског система се активирају брзо након CMV инфекције (228). Главна карактеристика ћелија урођене имуности је секреција проинфламацијских и имунорегулаторних цитокина. Претходне студије су објавиле да цитокини урођене имуности IL-12 и IFN- α/β промовишу ефекторске функције NK ћелија и CD8+ Т лимфоцита повећавајући продукцију цитокина, као што је IFN- γ и цитолитичких гранула

укључујући перфорине и гранзиме (229, 230). Међу ћелијама урођеног имунског система, NK ћелије су главне ефекторске ћелије, које су укључене у контролу примарне CMV инфекције током времена које претходи индукцији специфичног имунског одговора (231). *Shellam* и сарадници су показали да сојеви мишева који су имали високу активност NK ћелија су били резистентнији на MCMV инфекцију од сојева који су имали малу активност NK ћелија (232). Контрола инфекције MCMV-ом NK ћелијама код C57BL/6 мишева је првенствено зависна од сигнализације преко активационог Ly49H рецептора, који специфично препознаје m157 протеин који кодира вирус (29, 233). Делеција m157 гена (Δ m157 MCMV) ремети вирусну контролу NK ћелијама и повећава репликацију вируса *in vivo* (234). Стога, NK ћелије WT мишева играју кључну улогу у раној контроли инфекције изазване MCMV-ом. NK ћелије контролишу вирусну инфекцију секрецијом цитолитичких гранула, индукцијом апоптозе у циљној ћелији и продукцијом проинфламацијских цитокина (233, 235). Ово је регулисано кроз фину равнотежу између инхибицијских и активацијских сигнала који долазе из великог репертоара NK рецептора експримираних на њиховој површини и разноврсним цитокинима продукованим другим ћелијама урођене имуности, попут дендритских ћелија или макрофага (236). Показано је да је ендогено произведен IFN- γ важан фактор у контроли вирусне репликације у јетри која је посредована NK ћелијама (237). Рано након MCMV инфекције, у одсуству цитолитичких механизма, NK ћелије продукују IL-10, што је важно за ограничавање укупног одговора CD8⁺ Т лимфоцита (238). Мишеви који имају деплецију NK ћелија су подложнији озбиљнијим и дисеминованим инфекцијама MCMV-ом које имају дуже трајање (44). Показано је да C57BL/6 мишеви којима су деплетирани NK ћелије *in vivo* су имали повећане титре MCMV у јетри, слезини, плућима и пљувачним жлездама, тешки хепатитис и повећану осетљивост на леталну MCMV инфекцију (25).

Инфламацијски моноцити су укључени у MCMV хепатитис и у патогенезу болести. Они су регрутовани хемокинским сигнаlima домаћина (MCP1/CCR2) и хемокинским сигнаlima вируса (MCK2) (239, 240). Инфламацијски моноцити штите од леталног хепатитиса регрутовањем NK ћелија које контролишу инфекцију (241). Код BALB/c мишева, инфламацијски моноцити ограничавају антивирусни одговор CD8⁺ Т лимфоцита, што изазива одлагање вирусног клиренса из периферних органа. У оваквом окружењу,

инфламацијски моноцити могу бити одговорни за имунопатологију (242). Током сублеталне MCMV инфекције код BALB/c мишева, CD8⁺ Т лимфоцити контролишу вирусну репликацију у јетри, као и у већини периферних органа (243). CD4⁺ Т лимфоцити контролишу вирусну репликацију у пљувачним жлездама (45). CD4⁺ Т лимфоцити не убијају директно хепатоците, већ производе широк спектар цитокина који утичу на имунски одговор. CD4⁺ Т лимфоцити продукују IL-17, цитокин који је повезан са акутним хепатитисом тако што олакшава регрутацију неутрофила (244). IFN- γ је битан цитокин у контроли репликације вируса у пљувачним жлездама која је посредована CD4⁺ Т лимфоцитима (245).

Истраживања цитокина домаћина и ендокриних одговора на CMV инфекцију наглашава значај хуморалних одговора у контроли репликације CMV-а, што модулира имунски одговор на инфекцију и доприноси развоју лезија. Фактор некрозе тумора алфа (TNF- α) продукован код особа који су инфицирани вирусом доприноси оштећењу ткива. TNF- α продукују углавном макрофаги, али и друге врсте ћелија укључујући лимфоидне ћелије, мастоците, ендотелне ћелије, фибробласте и неуроне (246). У јетри, TNF- α је укључен у патофизиологију вирусног хепатитиса, алкохолне болести јетре, неалкохолне масне болести јетре и исхемијско-реперфузионе повреде. TNF- α игра дихотомну улогу у јетри, где он не делује само као медијатор ћелијске смрти, већ може индуковати пролиферацију хепатоцита и регенерацију јетре (247). Целокупно оштећење јетре, рано након инфекције, код нормалних или имунодефицијентних особа је посредовано TNF- α (227). TNF- α такође доприноси дуготрајној болести јетре током континуиране вирусне репликације код имунодефицијентних особа. TNF- α има улогу у одбрани од MCMV инфекције и има критичну улогу у оштећењу ткива изазваном MCMV-ом (227). Заштитна дејства TNF- α током акутне инфекције MCMV-ом су објављена код BALB/c мишева (21). Међутим, код новорођених BALB/c мишевима, високи серумски нивои TNF- α су карактеристика вирулентне инфекције и у корелацији су са морталитетом (248). Антивирусна дејства TNF- α код мишева који су инфицирани MCMV-ом су индиректно посредована олакшавајући инфилтрацију инфламацијских ћелија на местима инфекције (249). Високи нивои TNF- α у серуму се детектују рано након инфекције (21), док је повећан ниво mRNA TNF- α детектован у јетри, слезини и плућима инфицираних мишева (250). Показано је да

TNF- α индукује патологију јетре код C57BL/6J Rag-/- мишева и E26 мишева који имају дефицијенцију NK ћелија и T лимфоцита. Сигнализација посредована преко TNF- α је потребна за развој раних некротичних жаришта у јетри и за повећане нивое ензима јетре (227). Једна студија указује да лечење анти-TNF- α антителом нема ефекта на репликацију MCMV-а и на исход болести (251).

2. ЦИЉ РАДА

Главни циљ истраживања је проучавање утицаја галектина-3 на развој имунског одговора на *Cytomegalovirus* и последични утицај на оштећење јетре изазвано вирусном инфекцијом и на развој експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса индукованог имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅ коришћењем Gal-3 позитивних C57BL/6 мишева (WT) и Gal-3 дефицијентних мишева (Gal-3 KO).

У складу са главним циљем постављени су експериментални задаци:

- Анализирати фенотипске карактеристике ћелија које играју кључну улогу у контроли инфекције *Cytomegalovirus*-ом C57BL/6 мишева, NK, NKT и дендритских ћелија, у слезини и јетри инфицираних WT и Gal-3 KO мишева.
- Проценом хистолошког скорa и биохемијских параметара утврдити утицај галектина-3 на развој оштећења јетре које изазива инфекција *Cytomegalovirus*-ом.
- Утврдити утицај инфекције *Cytomegalovirus*-ом на експресију галектина-3 у јетри.
- Хистолошком анализом, проценом присуства ћелија инфицираних вирусом у јетри и титра вируса у органима мишева инфицираних MCMVΔm157 вирусом утврдити утицај NK ћелија на степен оштећења јетре WT и Gal-3 KO мишева.
- Анализом хистолошког скорa и биохемијских параметара и проценом апоптозе хепатоцита утврдити утицај TNF- α на степен оштећења јетре WT и Gal-3 KO мишева.
- Испитати ефекат примене рекомбинатног Gal-3 и инхибитора Gal-3 на тежину оштећења јетре изазваног инфекцијом *Cytomegalovirus*-ом.
- Проценом клиничке слике и хистолошком анализом ткива мозга и кичмене мождине утврдити ефекат галектина-3 и инфекције *Cytomegalovirus*-ом на развој ЕАЕ код WT и Gal-3 KO мишева.
- Испитати ефекат галектина-3 и инфекције *Cytomegalovirus*-ом на целуларност инфилтратa у централном нервном систему и фенотип инфилтришућих ћелија мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

- Упоредити фенотип и функционалне карактеристике микроглије WT и Gal-3 KO мишева инфицираних *Cytomegalovirus*-ом.
- Испитати ефекат галектина-3 и инфекције *Cytomegalovirus*-ом на заступљеност ефекторско-меморијских лимфоцита у периферној крви мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Експерименталне животиње

У овој студији коришћени су C57BL/6 мишеви (енгл. *Wild Type*, WT) и мишеви истог соја са делецијом гена за галектин-3 молекул (*Gal-3 knock-out* [КО]) женског и мушког пола, старости од 6 до 8 недеља. Gal-3 КО мишеви су добијени из одгајалишта за мишеве универзитета Калифорније. Све експерименталне животиње су одгајане у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија. Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука је одобрила све планиране процедуре.

3.1.1. Начин добијања C57BL/6 мишева са циљаном делецијом гена за галектин-3

Метода хомологе рекомбинације се користи за добијање *knock-out* мишева (252). Током хомологе рекомбинације ген који је функционалан се мења неактивним геном, и на тај начин се елиминише функција гена који постоји (253).

Селекција ћелија гдесе десила хомолога рекомбинација је основа у процесу добијања “*knock-out*” мишева. Део ДНК са искљученим или мутираним геном је уграђен у циљни вектор који има ген за вирусну тимидин киназу (ТК ген) и ген за резистенцију на неомицин (*Neo* ген) (254, 255). ТК ген се губи у хомологој рекомбинацији, док се *Neo* ген уграђује у геном ћелије (254, 255).

Мишји ген за галектин-3 има шест егзона. Амино-терминални крај галектина-3 кодирају егзони 2 и 3, док карбокси-терминални крај кодирају егзони 4, 5 и 6 (256). Како би се добили Gal-3^{-/-} мишеви, у лабораторији проф. др Hsu-а (*University of California*) је учињен прекид гена за галектин-3 молекул на ембрионалним матичним ћелијама (93). Вектор је сачињен тако да има део клониране ДНК за молекул галектина-3, а начин за настајање Gal-3^{-/-} мишева се односио на прекиду региона гена који кодира домен којим препознавају угљене хидрате. Ген за резистенцију на неомицин је заменио кратак сегмент (од 0,5 кило база) кога сачињавају интрон-4 и егзон-5. Сегмент од егзона 4 -5 мишјег гена

за галектин-3 молекула је уграђен у *pMC1Neo Poly (A)* вектор. Следећи сегмент од егзона 5-6 је инсертован нисходно од *Neo* касете, док је у *Neo* геном прекинуо сегмент између интрона 4-5 (93).

У мишје матичне ћелије је уграђен циљни вектор (D3), а након тога су уз помоћ G418 селектоване трансфектоване ћелије, док је употребом PCR (енгл. *Polimerase Chain Reaction*) и *Southern*- блот хибридизацијом, детектована хомолога рекомбинација у G418-51 резистентним ћелијама (93). Клон ембрионалних матичних ћелија где се десила хомолога рекомбинација је првобитно пропагиран и потом су ћелије апликоване у бластоцисте C57BL/6 мишева старе 3.5 дана, које су онда имплантиране у сурогат мајке. Овако су првобитно настали химерични мишеви, а укрштањем ових мужјака са женкама C57BL/6 мишева су настали хетерозиготни *knock-out* мишеви (Gal-3-/+ мишеви). Инбредним укрштањем Gal-3-/+ мишева после 9 генерација су настали хомозиготни *knock-out* мишеви, који имају генски дефицит у експресији галектин-3 молекула (Gal-3-/- мишеви) (93).

Хистолошком анализом различитих органа (мозак, плућа, јетра, слезина, лимфни чворови, итд.) изолованих из Gal-3 -/- мишева који су добијени на овакав начин, нису запажене промене. Није била разлика у броју крвних ћелија између Gal-3+/+ и Gal-3-/- мишева (93).

3.2. Индукција хепатитиса изазваног WT MCMV-ом

WT мишеви и Gal-3 KO мишеви су инфицирани интраперитонеалном апликацијом 10^5 PFU мишјег соја CMV (MW97. 01). Мишеви су жртвовани 36 сати и 72 сата након интраперитонеалне апликације MCMV-а.

3.3. Инфекција вирусом и индукција ЕАЕ-а

Мишеви су инфицирани интраперитонеалном апликацијом 10^5 PFU мишјег соја CMV. Десет дана након инфекције, мишевима је индукован ЕАЕ коришћењем хуманог пептида MOG₃₅₋₅₅ као антигена. Пептид MOG₃₅₋₅₅ је растворен у PBS-у у концентрацији 5 mg/ml. За имунизацију је употребљена суспензија која садржи мешавину MOG₃₅₋₅₅ пептида и

комплетног Фројндовога адјуванса, CFA у односу 1:1. Мишевима је субкутано у пределу бокова апликовано 200µl суспензије, која садржи 300µg пептида MOG₃₅₋₅₅ раствореног у 100µl PBS-а и 100µl CFA са додатком 700µg *Mycobacterium tuberculosis* (сој H37 RA). Истог дана мишевима је апликовано 300ng токсина пертусиса интраперитонеално који је растворен у 100µl дестиловане воде. Токсин је чуван на температури од +4 °C у раствору 50 µg/ml у дестилованој води. После 48 сати од апликације једне дозе токсина пертусиса, мишевима је апликована још једна доза пертусис токсина.

3.4. Праћење клиничког тока ЕАЕ-а

Испољавање болести је оцењивано и праћено сваки дан. Клиничким почетком болести је означен дан када се уочила парцијална парализа репа. Испољавање болести је процењивано на основу следећих вредности клиничког скорa:

0 означава да нема испољавања болести

0.5 означава делимичну парализу репа

1 означава парализу репа

2 означава парезу задњих ногу

2,5 означава парализу једне задње ноге

3 означава парализу задњих ногу

3,5 означава парализу задњих ногу и парезу предњих ногу, или парализу 3 екстремитета

4 означава парализу 4 екстремитета

5 означава смрт

Процена клиничких знакова ЕАЕ-а је приказана у облику средњег клиничког скорa.

3.5. Апликација инхибитора Gal-3 (Gal-3 INH)

Коришћењем WT мишева је испитивано да ли интраперитонеална употреба инхибитора галектина-3 може да утиче на MCMV хепатитис. Gal-3INH је растворен у 40% ди-метил сулфоксиду (DMSO) и направљен је 4mM шток. DMSO је прво растворен у NaCl-у, а затим је шток дилутиран 4 пута NaCl-ом чиме је добијен 1mM шток. Доза која је коришћена у експериментима је била 300µg Gal-3INH. Прва група WT мишева је примала

300µg Gal-3INH интраперитонеално два сата пре MCMV инфекције, док је друга група мишева само инфицирана MCMV-ом.

3.6. Апликација рекомбинатног Gal-3

Како би се истражило да ли употреба рекомбинатног галектина-3 може да делује на MCMV хепатитис, коришћени су WT мишеви и Gal-3 KO мишеви. Мишевима је интраперитонеално апликован рекомбинантни Gal-3 у дози од 50µg/ml, два сата пре MCMV инфекције.

3.7. Третман инфликсимабом

С обзиром да TNF-α има значајан утицај у патогенези хепатитиса изазваног MCMV-ом, WT мишевима и Gal-3 KO мишевима је интраперитонеално апликован инфликсимаб у дози од 5mg/kg у 200µL физиолошког раствора, један сат пре MCMV инфекције. Инфликсимаб је химерично моноклонско антитело које делује против TNF-α и користи се за лечење аутоимунских болести.

3.8. Патохистолошка анализа ткива кичмене мождине, мозга и јетре

У току максималне клиничке манифестације ЕАЕ-а мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом. Ткиво мозга и кичмене мождине је коришћено за патохистолошку анализу од којих су направљени парафински исечци.

У моделу хепатитиса који је индукован MCMV инфекцијом, мишеви су жртвовани 36 и 72 сата након интраперитонеалне апликације MCMV, након чега је узета јетра за патохистолошку анализу.

3.8.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Парафински исечци су прво загрејани на +56°C 45 минута, и после тога су у ксилолу депарафинисани. Након тога је примењена процедура рехидратације ткива испирањем исечака у опадајућим концентрацијама етил алкохола. Препарати су бојени

хематоксилином 10 минута, након тога су испрани дестилованом, а потом и текућом водом 5 минута. Потом су препарати бојени еозином. После тога, дехидратисано је ткиво и просветљено је у ксилолу. У процесу дехидратације препарати су испирани у растућим концентрацијама етил алкохола. После дехидратације, препарати су просветљени мешавином ксилола и апсолутног алкохола један минут, а потом 2 пута по 1 минут у ксилолу. Канада балзам и покровна стакла су коришћена за прекривање ткивних исечака. Након сушења после 24 сата, препарати су евалуирани употребом светлосног микроскопа.

3.9. Процена хистолошког скорa

Дистрибуција инфламације и некрозе у јетри је одређивана микроскопирањем исечака ткива јетре која су обојена хематоксилином и еозином, коришћењем светлосног микроскопа. Степен инфламације и некрозе је подељен у 4 скорова и то:

скор 0= без патологије

скор 1= 1-3 абнормалних области

скор 2= 3-5 абнормалних области

скор 3= више од 5 абнормалних области

Анализа степена инфламације и некрозе урађена је према претходно описаном протоколу (220, 257).

Вредност хистолошког скорa у кичменој моздини и мозгу је анализиран према следећим критеријумима:

скор 0= нема инфилтришућих ћелија

скор 1= неколико инфилтришућих ћелија

скор 2= инфилтришуће ћелије су периваскуларно груписане

скор 3= периваскуларна инфилтрација која се шири у паренхим ЦНС-а или у субарахноидални простор

скор 4= интензивна инфилтрација периваскуларног простора са паренхимским или субарахноидалним инфилтратом

Анализа хистолошког скорa у кичменој моздини и мозгу урађена је према претходно описаном протоколу (258, 259).

3.10. Биохемијска анализа оштећења јетре

36 и 72 сата после интраперитонеалне апликације MCMV-а, у атмосфери zasiћеној диетилетром, мишеви су жртвовани. Пункцијом абдоминалне аорте је узета крв. Након коагулације крви, серум је издвојен центрифугирањем на 1200 rpm у трајању од 15 минута, како би се одредила концентрација трансминаза (AST и ALT). Трансминазе су анализирани у складу са препоруком произвођача (260, 261).

3.11. Одређивање концентрација цитокина у серуму

Нивои IL-10, IL-17, TNF- α и IFN- γ су мерени у серуму ELISA китовима који су специфични за мишје цитокине. Стандарди су растворени у PBS-у према упутству произвођача, првобитне концентрације треба да буду 2000 pg/ml за IL-10, TNF- α и IFN- γ и 1000 pg/ml за IL-17.

У бунарчиће микротитар плоча стављено је 100 μ l везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*). Плоче су залепљене фолијом и остављене су преко ноћи. Затим су бунарчићи микротитар плоча испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*). Онда је стављен блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) волумена 300 μ l. Након једног сата, пуфером за испирање су испране микротитар плоче. Узорци су пре тога разблажени десет пута у дејонизованој води.

Узорци и стандарди су стављени у микротитар плоче и прекривени су фолијом и 2 сата су остављени на собној температури. После завршене инкубације и испирања микротитар плоча, у бунарчиће је сипано 100 μ l антитела за детекцију (енгл. *Detection Antibody*). Плоче су прекривене фолијом и опет су у трајању од 2 сата остављене на собној температури. Плоче су затим испране и у бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације *Streptavidin-HRP* (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури у трајању од 20 минута без директног излагања светлости је прекинута испирањем микротитар плоча. У бунарчиће је затим додато 100 μ l раствора супстрата. После 20 минута, додато је 50 μ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution*: 2N H₂SO₄) и евалуирана је оптичка густина на таласној дужини 450nm.

3.12. Изолација мононуклеарних ћелија из јетре

Мононуклеарне ћелије су изоловане из јетре 36 и 72 сата након интраперитонеалне примене MCMV-а. Метода механичке разградње јетре је коришћена за изолацију мононуклеара из јетре. Након екстрипације јетре, спроведена је перфузија јетре. Јетра је уситњена и полако здробљена кроз челичну мрежу (200 μ m). Након тога се суспензија пропушта кроз ћелијско сито. Садржај који је добијен је растворен у 50ml медијума RPMI-1640 и на 60G је центрифугиран у трајању од један минут. Супернатант који садржи интрахепатичне ћелије (45ml), је пребачен у другу епрувету и на 480G је центрифугиран 8 минута. Талог добијен након центрифугирања је растворен у 10ml 37.5% *Percoll-a* у HBSS медијуму. Након тога је центрифугиран на 1907 г.р.м. (850G) у трајању од 30 минута. Талог који је добијен је затим ресуспендован у 5ml *lysing* пуфера и инкубиран 5 минута, на леду, на температури од +4°C. После инкубације је додато 5ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом. Онда су ћелије центрифугиране на 480G 8 минута на 8°C. Талог је ресуспендован у 1ml комплетног RPMI-1640 медијума.

3.13. Изолација мононуклеарних ћелија из слезине

Екстрипирана слезина је клипом шприца хомогенизована и пропуштена кроз ћелијско сито у епрувету уз додатак 5ml медијума са 10% FBS-а. Добијена суспензија је пребачена у епрувету од 15ml и центрифугирана је на 1500 грм у трајању од 5 минута. Талог ћелија је ресуспендован у 5ml *lysing* раствора како би се лизирали еритроцити и инкубиран је 5 минута на температури од +4°C. После инкубације, заустављено је даље лизирање додавањем 5ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а. Затим је суспензија опет центрифугирана, пелет ресуспендован у 8ml RPMI-1640 медијума са 10% FBS-а. Ћелије су још једанпут пропуштене кроз ћелијско сито. Овако добијена суспензија спленочита је коришћена у даљим истраживањима.

3.14. Изолација леукоцита из ЦНС-а

Иzolовано ткиво ЦНС-а је исецкано, дигестијом хомогенизовано и инкубирано је у трајању од 1 сат на 37°C у 5ml медијума са додатком 10% FBS-а, 1mg/ml колагеназе тип I

и 1mg/ml DNA-зе. Како би се ткиво мозга и кичмене мождине хомогенизовало, у току инкубације се провлачи кроз шприц и иглу дебљине 18G. После инкубације ткиво се пропушта кроз ћелијско сито (40 μ m), и сито се испира са 5ml медијума. Добијена ћелијска суспензија се центрифугира на 400G у трајању од 10 минута и талог се ресуспендује у 10ml 30% перкола, и пребацује се на 5ml 70% перкола и центрифугира на 390G у трајању од 20 минута. Након истека инкубацији са врха се уклоња слој мијелина који се издвојио и Пастеровом пипетом се сакупљају моноклеари који се налазе у интерфази. На крају се ћелије оперу 2 пута у PBS-у и ресуспендују у медијуму.

3.15. Анализа популација моноклеарних ћелија јетре, слезине, мозга и кичмене мождине методом проточне цитометрије

Иzolоване су моноклеарне ћелије из јетре, слезине, мозга и кичмене мождине. Након изолације, одређена је вијабилност ћелија приликом бројања ћелија помоћу *trypan-blue*-а употребом светлосног микроскопа. Ћелијске суспензије које су имале вијабилност већу од 90% су коришћене у експериментима. Функционалне и фенотипске карактеристике различитих популација моноклеарних ћелија и процентуална заступљеност ћелија је анализирана методом проточне цитометрије.

3.15.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера

Анти-мишија моноклонска антитела обележена флуоресцентним бојама и специфична за мембранске и интрацелуларне молекуле су коришћена за одређивање функционалних и фенотипских карактеристика субпопулација моноклеара који су изоловани из јетре и слезине. 5×10^5 ћелија је коришћено у анализи које су ресуспендоване у 50 μ l пуфера за бојење. Одређена количина моноклонских антитела је додата ћелијама.

Антитела за површинско бојење су употребљена у дози тако да коначна разблажења буду 1:100. Ћелијски талог је вортексован и инкубиран 20 минута на +4°C у мраку. Након тога, ћелијски талог је опран са 1,5ml хладног пуфера за бојење и ћелије су центрифугиране на 400G 5 минута. После тога талог је растворен у 350 μ l пуфера за бојење. После бојења, експресија површинских маркера је евалуирана на проточном цитометру.

3.15.2. Интрацелуларно бојење цитокина

BD *Cytofix/Cytoperm*TM методом је изведено интрацелуларно бојење цитокина. Ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом и јономицином, који индукују активност протеин киназе C и узрокују улазак калцијума, што изазива експресију цитокина у ћелији (262). Инкубација у трајању од четири до шест сати је довољна за индукцију великог броја цитокина. Дужа инкубација узрокује снажан цитопатогени ефекат форбол миристат ацетата и јономицина. У *in vitro* ћелијској стимулацији употребљени су супстанце које инхибишу интрацелуларни транспорт протеина, *BD GolgyStop*TM (садржи моненсин) и *BD GolgyPlug*TM (садржи брефелдин А). Блокада транспорта изазива акумулацију цитокина у Голџијевом комплексу или ендоплазматском ретикулуму. Трајање инкубације дуже од 12 сати је токсично по ћелије, зато излагање ћелија моненсину и брефелдину А мора бити ограничено.

3.15.3. Стимулација ћелија

Ћелијске суспензије мононуклеара изолованих из јетре (1×10^6 /ml) ресуспендованих у комплетном медијуму, су инкубирани у трајању од 4 сата на 37°C у присуству 5% CO₂. У ћелијску суспензију је затим додат РМА (50ng/ml) и јономицин (500ng/ml). У ћелијску суспензију је такође додат *BD GolgyStop*TM (0,7μl/ml) како би се блокирала секреција цитокина и повећала интрацелуларна акумулација цитокина. Након инкубације мононуклеари су испрани и ресуспендовани у комплетном медијуму. Потом су мононуклеарне ћелије пребачене у пластичне епрувете. Остале процедуре су спроведене на +4°C.

3.15.4. Бојење површинских антигена

Бојење површинских антигена треба спровести пре фиксације ћелија, зато што епитопи површинских маркера могу бити оштећени приликом поступка фиксације и пермеабилитације. 1×10^6 мононуклеарних ћелија је ресуспендовано у 50μl пуфера за бојење и додата је одређена количина примарно конјугованих моноклонских антитела.

Антитела за површинско бојење су употребљена тако да њихово коначно разблажење буде 1:100. Ћелије су потом инкубиране у мраку у трајању од 30 минута на +4°C.

3.15.5. Фиксација ћелија и пермеабилizација ћелијске мембране

Мононуклеарне ћелије су испране 2 пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети) после завршетка инкубације и затим су центрифугиране на 300G у трајању од 5 минута. Након тога је талог ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора. Након инкубације од 20 минута на +4°C талог је опран два пута у *Perm/Wash*™ пуферу (1ml/епрувети) и центрифугиран је на 300G 5 минута.

3.15.6. Бојење интрацелуларних цитокина

Након одливања супернатанта нанета су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана су 30 минута на +4°C. Затим је ћелијски талог растворен у 50µl *Perm/Wash*™ пуфера и потом су додата примарно коњугована моноклонска антитела. После инкубације ћелије су опране у *Perm/Wash*™ пуферу и центрифугиране су на 300G у трајању од 5 минута. Затим је талог ресуспендован у 350µl пуфера за бојење и евалуиран је методом проточне цитометрије.

3.16. Изолација мишијих хепатоцита

Изолована јетра је пребачена у HBSS на температури од 4°C. Јетра је механички уситњена на комадиће величине 1mm³ и опрана је у медијуму. Уситњено ткиво је центрифугирано на 800 грм 4 минута. Талог је ресуспендован у медијуму за дигестију (0.6% NaCl, 0.05% KCl, 1.2% HEPES, 0.07% CaCl₂, 3g/ml *collagenase Type I*, pH 7.4) и инкубиран 20 минута на 37°C. Након инкубације ћелије су центрифугиране на 800 грм 4 минута. Талог је два пута опран у комплетном DMEM-у, пропуштен кроз филтер промера 100µm и ћелије су центрифугиране на 600 грм 4 минута. У комплетном DMEM-у је ресуспендован талог који садржи хепатоците.

3.16.1. Annexin V бојење и детекција експресије калретикулина на површини хепатоцита

Изоловани хепатоцити су опрани у хладном PBS-у и ресуспендовани у 1X *binding buffer*-у у концентрацији од 1×10^6 ћелија по mL. *Annexin FITC* и *propidium iodide* (PI) су додати у 100 μ L ћелијске суспензије и инкубирани су 15 минута на собној температури у мраку. Након инкубације додато је 400 μ L 1X *binding buffer*-а у сваку епрувету, а обојене ћелије су анализирани у року од једног сата коришћењем *FACS Calibur* и *Flow Jo software*. За детекцију експресије калретикулина на површини ћелије, изоловани хепатоцити су обојени анти-калретикулинским антителом (*Abcam*) и анализирани су коришћењем *FACS Calibur* и *Flow Jo software*.

3.17. Имунохистохемија мишијих узорака јетре

Имунохистохемијско бојење исечака јетре спроведено је употребом специфичног зечијег конјугата и специфичног мишијег конјугата за бојење галектина-3. За имунохистохемијско бојење коришћени су исечци јетре дебљине 5 μ m на којима је спроведена депарафинизација и рехидратација ткива. После депарафинизације исечци ткива јетре су 21 минут кувани у 10mM Na-цитрату. После хлађења ткивни исечци су испрани 3 пута у PBS-у. Потом је на исечке нането 2-3 капи *Hydrogen Peroxide Block*-а како би дошло до инактивације ендогених пероксидаза. После инкубације од 10 минута, препарати су испрани 2 пута у PBS-у. Након тога је на препарате нането 2-3 капи *Protein Block*-а и остављени су да се 10 минута инкубирају на собној температури након чега су једанпут испрани у PBS-у. 150 μ l примарног антитела (зечији анти-мишији галектин-3 (*Abcam*) и зечији анти-мишији TNF- α (*Abcam*)) раствореног у PBS-у са 1% BSA је затим додато на ткивне исечке. После инкубације од 1h, препарати су испрани три пута по 5 минута у PBS-у, након чега је на исечке додато секундарно биотинизирано антитело. После инкубације од 30 минута препарати су испрани 3 пута по 5 минута. *Streptavidin Peroxidase*-а је након тога додато на ткивне исечке. Након инкубације од 10 минута препарати су испрани 3 пута по 5 минута и затим је додато 2-3 капи DAB реагенса (20 μ l DAB *Chromogen*-а у 1ml DAB *Substrate*-а). Препарати су затим испрани 3 пута у

дестилованој води након развијања боје и обојени су хематоксилином 2 минута, а након тога испрани текућом водом. Исечци су затим покривени воденим медијумом и покровном лъуспицом.

3.18. Бојење мишјих узорака јетре TUNEL методом

За бојење TUNEL методом (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) коришћени су парафински исечци ткива јетре дебљине 5 μ m. Након завршеног поступка депарафинизације ткивни исечци су потопљени у расхлађени ацетон 8 минута, а након тога двоструко испрани у PBS-у. На сваки ткивни исечак је затим нането по 50 μ L мешавине за TUNEL реакцију (450 μ L *Label solution*, 50 μ L *enzyme solution*), и након инкубације од 60 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку, препарати су троструко испирани у PBS-у. На ткивне исечке је затим нането по 50 μ L *Converter-a* POD, и ткивни исечци су на 37°C инкубирани у влажној атмосфери у мраку 30 минута. Након тога препарати су троструко испирани у PBS-у, и на сваки препарат је нането 50-100 μ L DAB супстрата и инкубирани су на собној температури 10 минута. Након троструког испирања у PBS-у, на обојене ткивне исечке је нанета по једна кап глицерола и прекривени су покровном лъуспицом.

3.19. Статистичка обрада података

Статистички програм SPSS верзија 20 је коришћен за анализу података. Правилност расподеле вредности које су добијене је испитана пре статистичке обраде података. *Kolmogorov-Smirnov* тест је коришћен за одређивање нормалности расподеле. *Student's t* тест је коришћен за вредности које имају правилну расподелу, док је *Mann-Whitney* тест коришћен за вредности које имају неправилну расподелу. Резултати су приказани као вредност \pm стандардна грешка (енгл. *Standard error*, SE). Статистичка значајност разлике између испитиваних група износи $p < 0,05$, док статистички веома значајна разлика између испитиваних група износи $p < 0,001$.

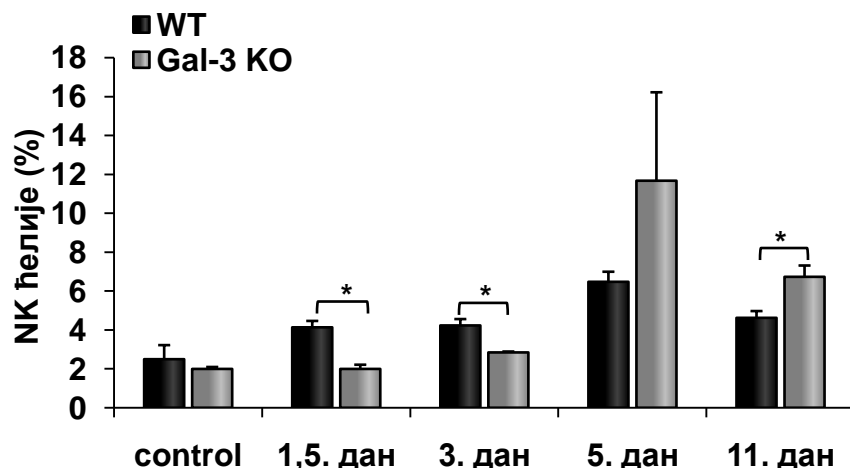
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. MCMV инфекција је праћена значајним повећањем процента NK ћелија код WT мишева рано након инфекције, док се проценат NK ћелија значајно повећава код Gal-3 KO мишева 11 дана након инфекције

Пошто MCMV инфекција изазива системску инфламацију, анализирани су ефекти MCMV инфекције на фенотипске карактеристике ћелија неспецифичне имуности у слезини. Анализирани су састав мононуклеарних ћелија добијених из слезине WT и Gal-3 KO мишева у више временских тачака након вирусне инфекције. Мишеви су жртвовани 1,5 дан, 3 дана, 5 дана и 11 дана након инфекције MCMV-ом, изолована је слезина и испитиван је фенотип мононуклеарних ћелија. Вирусна инфекција је изазвала значајно повећање процента NK ћелија у слезини WT мишева 1,5 и 3 дана након инфекције, у поређењу са процентом NK ћелија изолованих из слезине инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 1). Међутим, проценат NK ћелија у слезини Gal-3 KO мишева је статистички значајно већи 11 дана након инфекције MCMV-ом, у поређењу са процентом ових ћелија изолованих из слезине инфицираних WT мишева (Графикон 1).

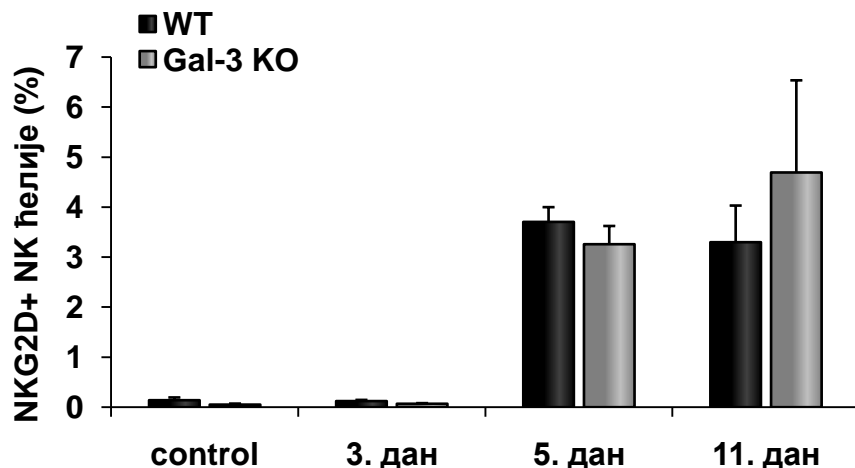
Инфекција вирусом може изазвати повећање експресије активационог маркера NKG2D, који је експримиран на различитим ћелијским популацијама, између осталих и на NK ћелијама. NKG2D појачава ефекторске функције ћелија које га експримирају. Анализирани су присуство NK ћелија које експримирају маркер активације NKG2D у слезини WT и Gal-3 KO мишева 3, 5 и 11 дана након инфекције вирусом. Инфекција MCMV-ом повећава проценат NK ћелија које експримирају NKG2D након инфекције вирусом (Графикон 2).

Графикон 1



Графикон 1. Инфекција MCMV-ом значајно повећава проценат NK ћелија у слезини WT мишева у првим данима инфекције. 6-8 недеља стари WT и Gal-3 KO мишеви су нултог дана експеримента инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 1,5, 3, 5 и 11 дана након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (Student- t тест * $p < 0.05$).

Графикон 2



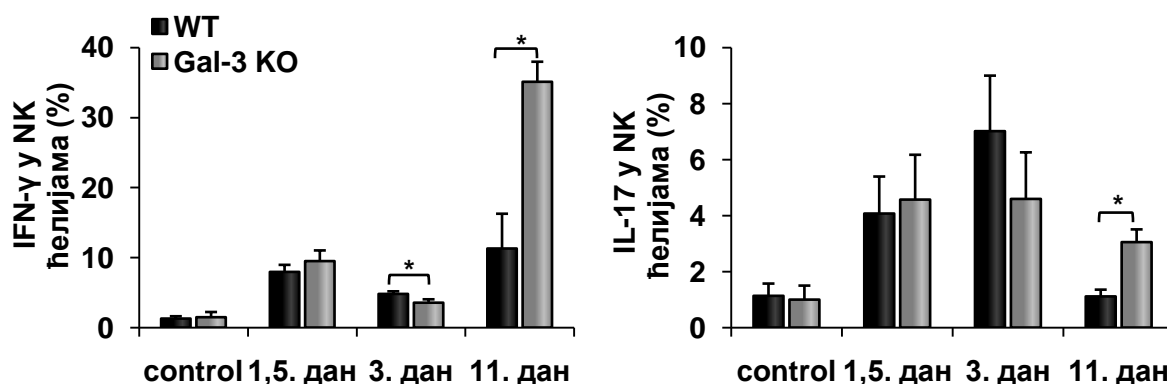
Графикон 2. Инфекција MCMV-ом повећава експресију активационих маркера на NK ћелијама код WT и Gal-3 KO мишева. 6-8 недеља стари WT и Gal-3 KO мишеви су нултог дана експеримента инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3, 5 и 11

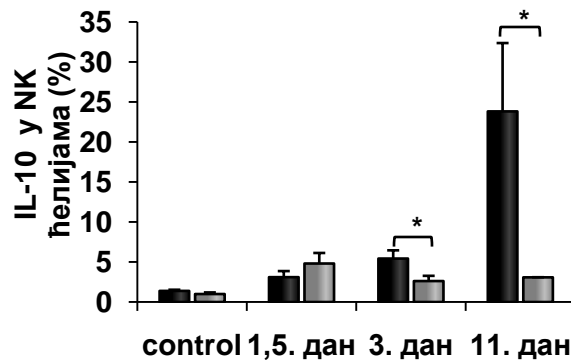
дана након инфекције МСМV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.2. Инфекција МСМV-ом је праћена индукцијом развоја проинфламацијских и смањењем развоја антиинфламацијских NK ћелија у слезини Gal-3 KO мишева, 11 дана након инфекције вирусом

Анализом фенотипских карактеристика NK ћелија је утврђено да је проценат проинфламацијских IFN- γ + NK ћелија значајно већи у слезини инфицираних WT мишева, 3 дана након инфекције, у поређењу са процентом ових ћелија изолованих из слезине Gal-3 KO мишева инфицираних МСМV-ом (Графикон 3). Међутим, 11 дана после инфекције вирусом, проценат проинфламацијских NK ћелија које експримирају IFN- γ је већи у слезини инфицираних Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија изолованих из слезине инфицираних WT мишева (Графикон 3). Процент проинфламацијских IL-17+ NK ћелија је већи код Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија изолованих из WT мишева, 11 дана након инфекције МСМV-ом (Графикон 3). Процентуална заступљеност антиинфламацијских IL-10+ NK ћелија је значајно већа у слезини WT мишева у односу на проценат ових ћелија изолованих из слезине Gal-3 KO мишева, 3 и 11 дана након инфекције МСМV-ом (Графикон 3).

Графикон 3



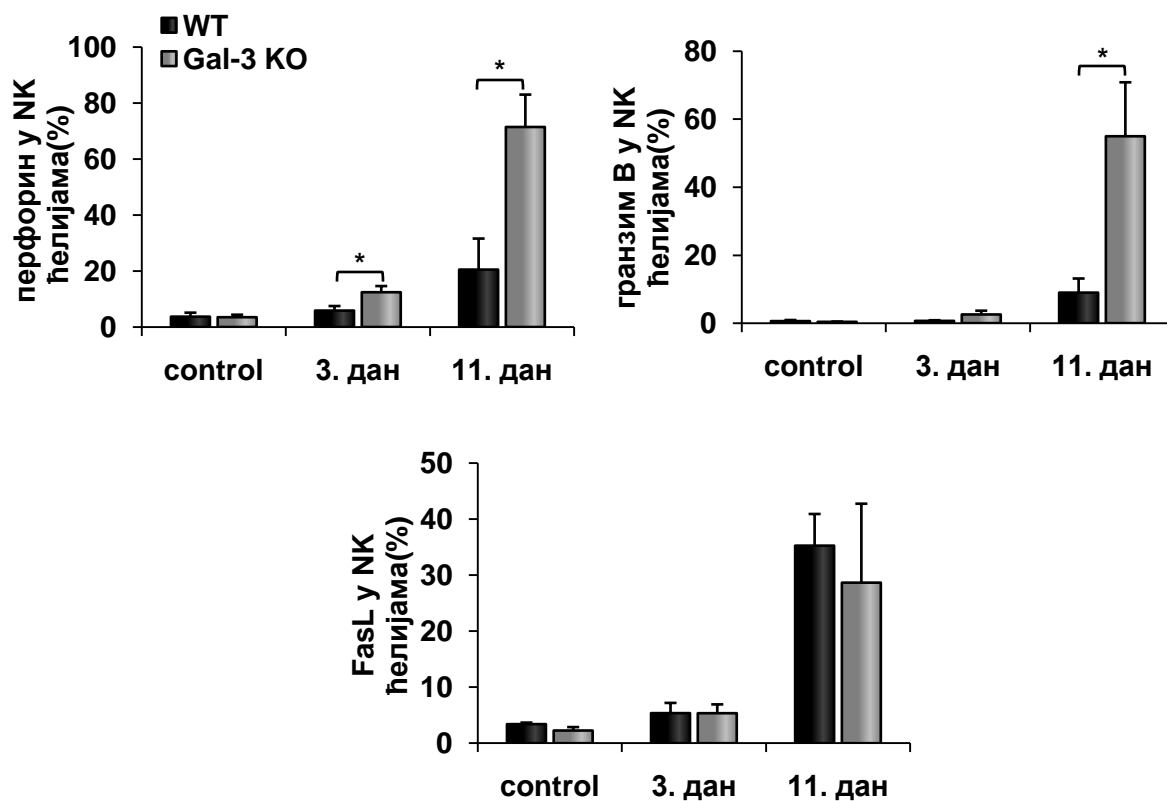


Графикон 3. Gal-3 KO мишеви инфицирани MCMV-ом имају већи проценат NK ћелија које експримирају IL-17 и IFN- γ , а мањи проценат NK ћелија које експримирају IL-10, 11 дана након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 1,5 дан, 3 и 11 дана након инфекције вирусом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (Student-t тест * $p < 0.05$).

4.3. Gal-3 дефицијенција је удружена са повећањем процента цитолитичких NK ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом

Даљом анализом фенотипа NK ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом је уочено да дефицијенција Gal-3 има утицаја на фенотип ових ћелија. Процент NK ћелија које испољавају маркер цитотоксичности перфорин је већи код Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија изолованих из WT мишева, 3 и 11 дана након инфекције вирусом (Графикон 4). Процент NK ћелија које испољавају маркер цитотоксичности гранзим B је већи код Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија изолованих из WT мишева, 11 дана након инфекције вирусом (Графикон 4). Није било значајне разлике у проценту NK ћелија које експримирају маркер цитотоксичности FASL између инфицираних WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 4).

Графикон 4



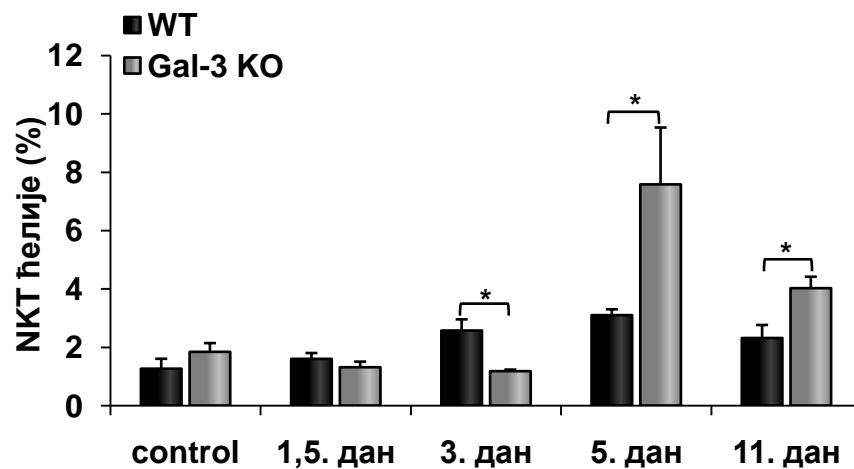
Графикон 4. Одсуство галектина-3 повећава проценат цитолитичких НК ћелија у слезини 11 дана након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након вирусне инфекције. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.4. Gal-3 дефицијентни мишеви инфицирани MCMV-ом имају већи проценат NKT ћелија у слезини 5 и 11 дана након инфекције

Даље смо испитивали ефекат инфекције MCMV-ом на фенотипске карактеристике NKT ћелија у слезини. Анализирани су састав мононуклеарних ћелија добијених из слезине 1,5 дан, 3 дана, 5 дана и 11 дана након инфекције MCMV-ом. Инфекција MCMV-ом је изазвала значајно повећање процента NKT ћелија у слезини WT мишева 3 дана након инфекције, у поређењу са процентом NKT ћелија изолованих из слезине инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 5). Међутим, инфекција MCMV-ом је изазвала значајно повећање процента NKT ћелија у слезини Gal-3 KO мишева 5 и 11 дана након инфекције,

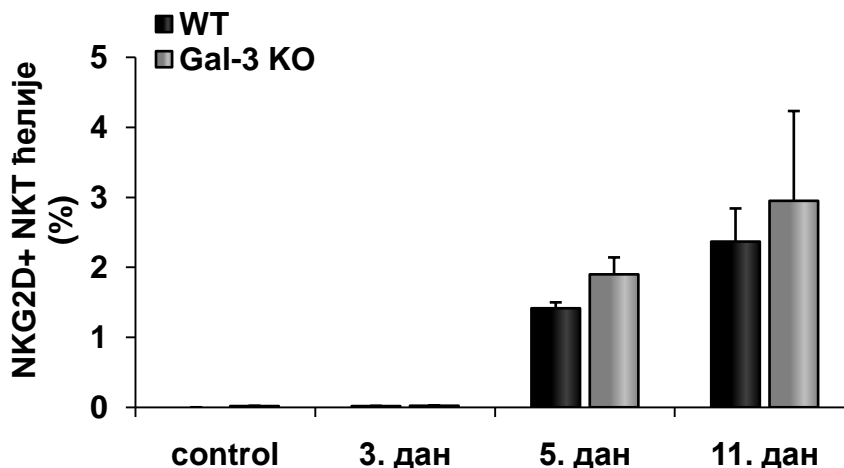
у односу на проценат ових ћелија код WT мишева који су инфицирани вирусом (Графикон 5). Даље је анализирано присуство NKT ћелија које експримирају маркер активације NKG2D у слезини WT и Gal-3 KO мишева 3, 5 и 11 дана након инфекције вирусом. Инфекција MCMV-ом повећава проценат NKT ћелија које експримирају NKG2D након инфекције код WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 6).

Графикон 5



Графикон 5. Одсуство галектина-3 значајно повећава проценат NKT ћелија 5 и 11 дана након инфекције MCMV-ом. 6-8 недеља стари WT и Gal-3 KO мишеви су нултог дана експеримента инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 1,5, 3, 5 и 11 дана након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (Student- t тест * $p < 0.05$).

Графикон 6



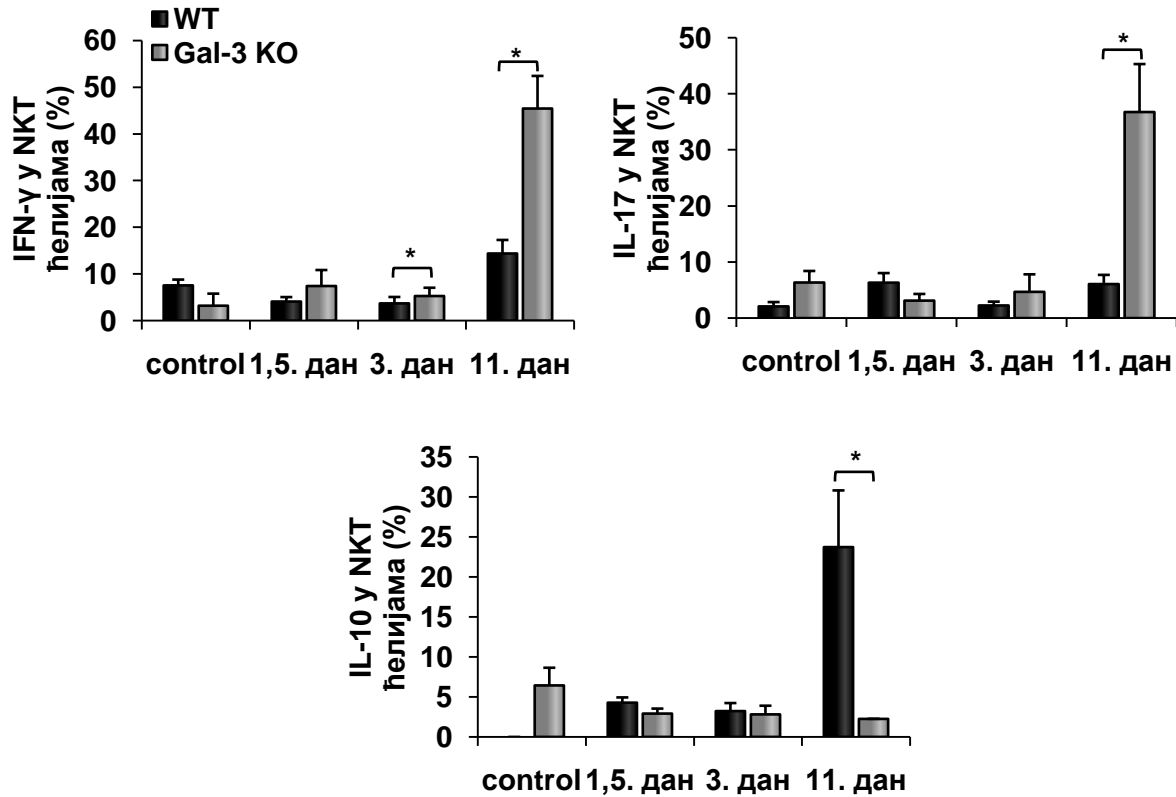
Графикон 6. Инфекција MCMV-ом повећава експресију активacionих маркера на NKT ћелијама код WT и Gal-3 KO мишева. 6-8 недеља стари WT и Gal-3 KO мишеви су нултог дана експеримента инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3, 5 и 11 дана након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест * $p < 0.05$).

4.5. Инфекција MCMV-ом је праћена повећањем процента проинфламацијских NKT ћелија и смањењем процента антиинфламацијских NKT ћелија у слезини Gal-3 KO мишева

Зато што NKT ћелије преко продукције различитих цитокина могу да модулишу имунски одговор, анализиран је ефекат галектина-3 на заступљеност проинфламацијских и антиинфламацијских NKT ћелија у слезини мишева инфицираних MCMV-ом. Анализа фенотипских карактеристика NKT ћелија је показала да је проценат проинфламацијских IFN- γ + NKT ћелија већи у слезини Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија код WT мишева, 3 и 11 дана после инфекције MCMV-ом (Графикон 7). Процент проинфламацијских IL-17+ NKT ћелија је већи у слезини Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија код WT мишева, 11 дана после инфекције MCMV-ом (Графикон 7). Процент антиинфламацијских IL-10+ NKT ћелија је већи у слезини WT мишева у односу

на проценат ових ћелија изолованих из слезине Gal-3 KO мишева, 11 дана након инфекције МСМV-ом (Графикон 7).

Графикон 7



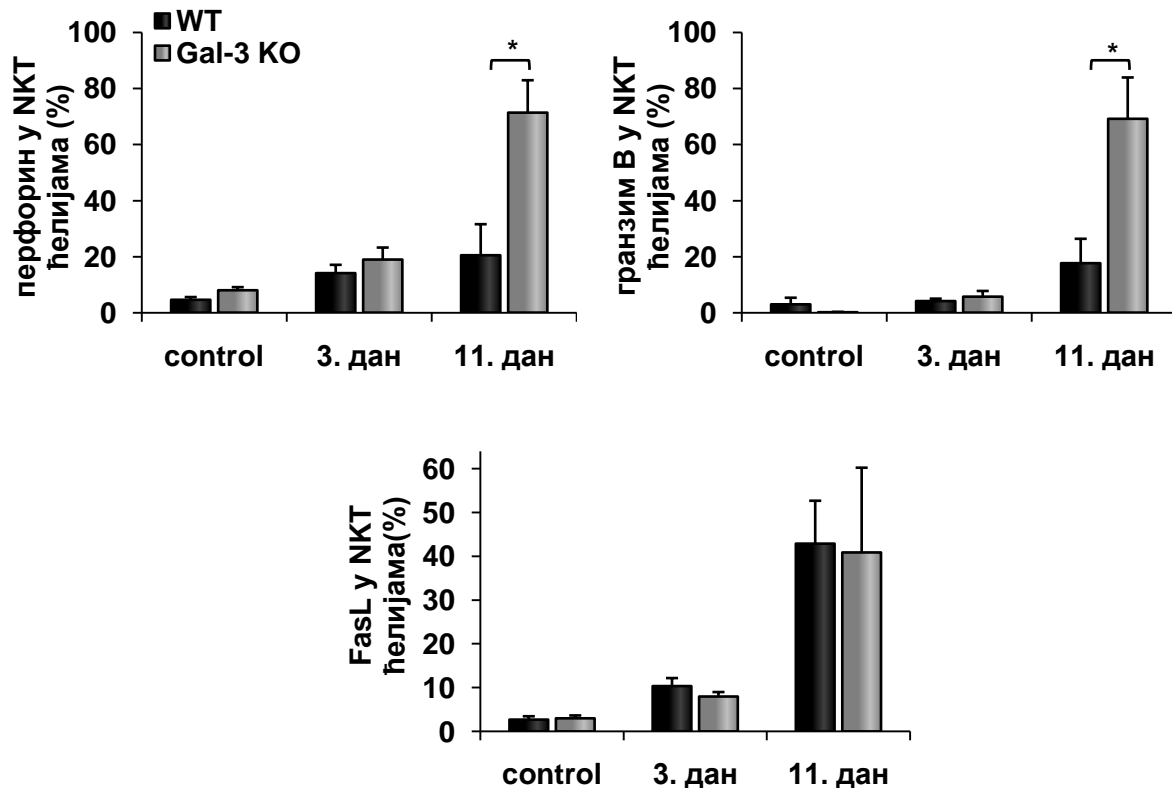
Графикон 7. Gal-3 KO мишеви инфицирани МСМV-ом имају већи проценат NKT ћелија које експримирају IL-17 и IFN-γ, а мањи проценат NKT ћелија које експримирају IL-10, 11 дана након инфекције МСМV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 1.5 дан, 3 и 11 дана након инфекције вирусом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (Student-t тест * $p < 0.05$).

4.6. Gal-3 дефицијенција је удружена са повећањем процента цитолитичких NKT ћелија у слезини мишева инфицираних МСМV-ом

Испитивање фенотипа NKT ћелија у слезини код мишева инфицираних МСМV-ом је указало да дефицијенција Gal-3 делује на фенотип NKT ћелија. Процент NKT ћелија које

испољавају маркере цитотоксичности, перфорин и гранзим В је већи у слезини Gal-3 KO мишева у односу на проценат ових ћелија код WT мишева, 11 дана после вирусне инфекције (Графикон 8). Нема значајне разлике у проценту NKT ћелија које експримирају маркер цитотоксичности FASL између инфицираних WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 8).

Графикон 8



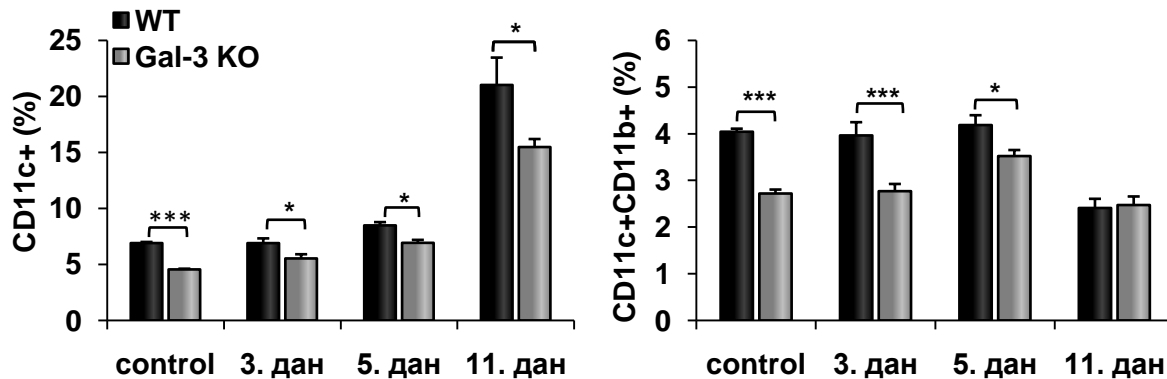
Графикон 8. Одсуство галектина-3 значајно повећава проценат цитолитичких NKT ћелија у слезини, 11 дана након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након инфекције вирусом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.7. MCMV инфекција индукује инфламацијски фенотип ћелија које презентују антиген у слезини WT мишева

Испитиване су CD11c⁺ дендритских ћелија, као и CD11c⁺CD11b⁺ инфламацијских дендритских ћелија. У овом истраживању је уочено да су дендритске ћелије заступљеније у слезини WT мишева у односу на Gal-3 KO мишеве након инфекције MCMV-ом. Процент CD11c⁺ дендритских ћелија је статистички значајно већи у слезини инфицираних WT мишева нултог, трећег, петог и једанаестог дана експеримента у односу на инфициране Gal-3 KO мишеве (Графикон 9). Процент CD11c⁺CD11b⁺ инфламацијских дендритских ћелија је статистички значајно већи у слезини инфицираних WT мишева нултог, трећег и петог дана експеримента у односу на проценат ових ћелија изолованих из слезине инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 9).

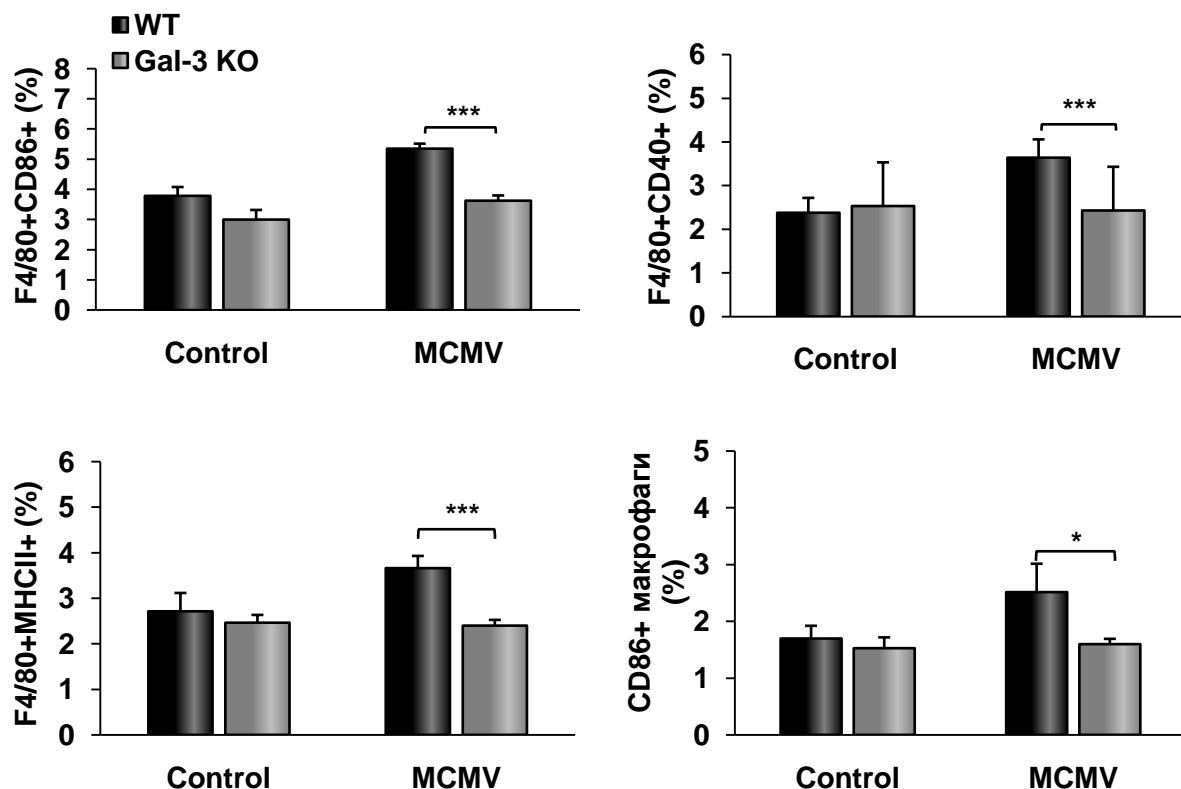
У слезини WT мишева, 3 дана након инфекције MCMV-ом је уочен већи проценат активираних F4/80⁺ макрофага који експримирају CD86, CD40 и МНС молекуле II класе (Графикон 10). У слезини WT мишева, 3 дана након инфекције MCMV-ом је уочен већи проценат класично активираних CD86⁺ макрофага (Графикон 10).

Графикон 9



Графикон 9. Слезине инфицираних WT мишева садрже већи проценат CD11c⁺ и CD11c⁺CD11b⁺ дендритских ћелија. WT и Gal-3 KO мишеви су нултог дана експеримента инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирание методом проточне цитометрије 1.5, 3, 5 и 11 дана после инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, укупно 5 мишева по групи. (Student- t тест *p < 0.05, ***p < 0.001).

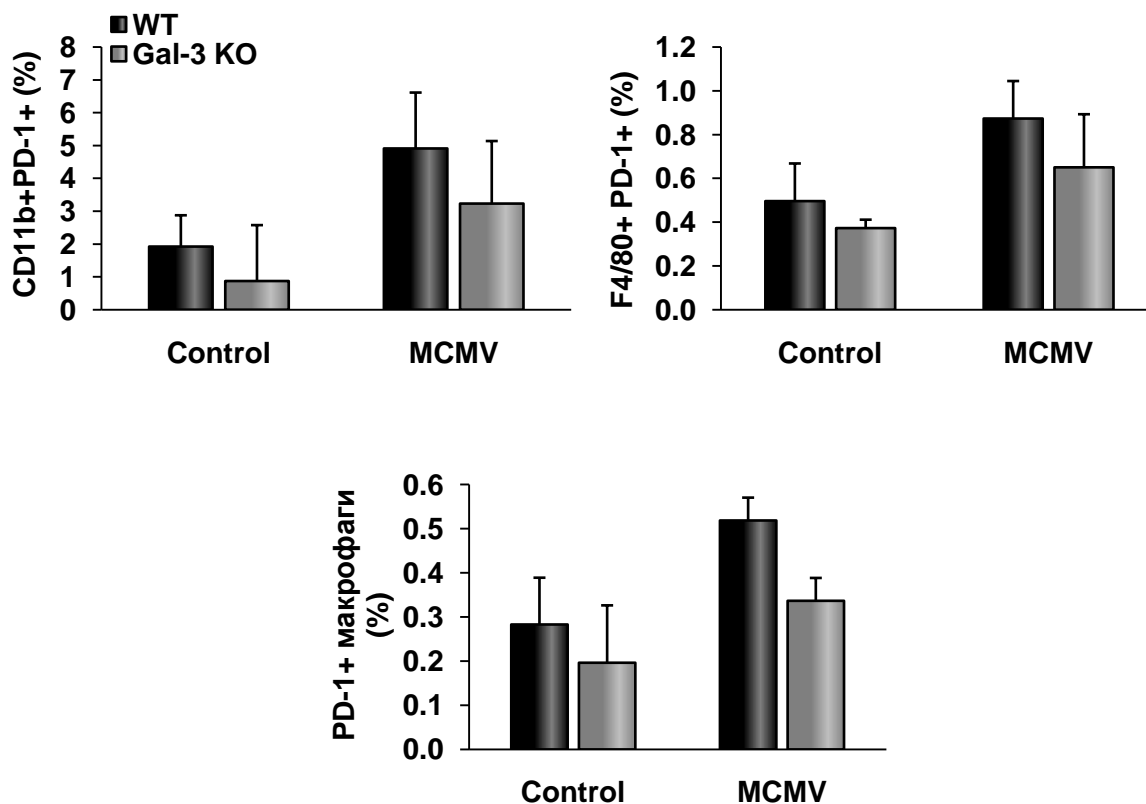
Графикон 10



Графикон 10. Макрофаги у слезини инфицираних WT мишева испољавају већу експресију маркера активације. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 дана након инфекције вирусом. Приказане су средње вредности + SE, 5 мишева по свакој групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

PD-1 молекула (енгл. *programmed cell death protein-1*) је инхибиторни рецептор на T лимфоцитима, који ограничава имунски одговор и индукује апоптозу. Већа експресија PD-1 молекула на моноцитима, T и B лимфоцитима у новијим студијама га означава маркером активације ових ћелија (263). Анализа експресије PD-1 маркера је показала већу заступљеност CD11b+PD-1+ дендритских ћелија, F4/80+ PD-1+ и PD-1+ макрофага у слезини WT мишева (Графикон 11).

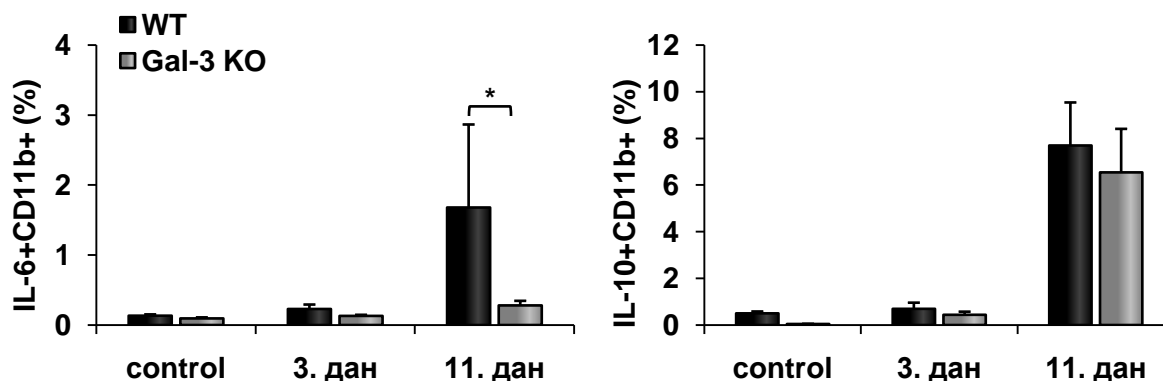
Графикон 11



Графикон 11. Повећана процентуална заступљеност CD11b+PD-1+ дендритских ћелија, F4/80+ PD-1+ и PD-1+ макрофага у слезини WT мишева након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 дана након инфекције вирусом. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Такође су анализирани фенотипске карактеристике мијелоидних ћелија у слезини WT и Gal-3 KO мишева након инфекције MCMV-ом. Процент CD11b+ мијелоидних ћелија које експримирају IL-6 је већи код инфицираних WT мишева у односу на инфициране Gal-3 KO мишеве, 11 дана након инфекције вирусом (Графикон 12). Није било значајне разлике у проценту мијелоидних CD11b+ ћелија које експримирају IL-10 између WT и Gal-3 KO мишева након инфекције MCMV-ом (Графикон 12).

Графикон 12



Графикон 12. Инфекција MCMV-ом значајно повећава проценат мијелоидних ћелија које експримирају IL-6 у слезини WT мишева. Мононуклеарне ћелије из слезине су анализирани методом проточне цитометрије 3 и 11 дана након инфекције. Представљене су средње вредности + SE, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест * $p < 0.05$).

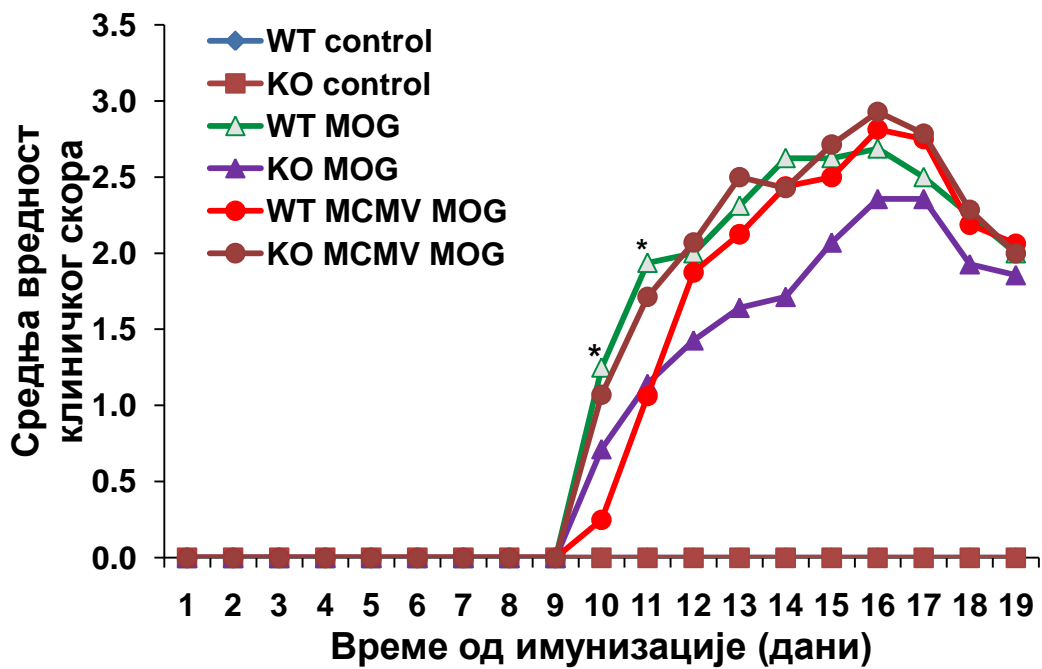
4.8. MCMV инфекција прекида атенуацију EAE-a код Gal-3 KO мишева

Пошто је показано да Gal-3 KO мишеви који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају атенуирани EAE (103), желели смо да испитамо какав утицај има инфекција MCMV-ом на индукцију ове болести код Gal-3 KO мишева. Да бисмо испитали улогу MCMV инфекције у патогенези EAE-a, 10 дана након инфекције вирусом Gal-3 KO мишеве смо имунизовали пептидом MOG₃₅₋₅₅. Неинфицирани WT мишеви, који су осетљиви на развој EAE-a (264) су коришћени као контролне животиње, као и неинфицирани Gal-3 KO мишеви. Развој болести је испитиван праћењем знакова болести свакодневно. Процентом клиничког скорa је уочено да Gal-3 KO мишеви имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом развијају атенуирани EAE, док инфицирани Gal-3 KO мишеви MCMV-ом па након тога имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ развијају типичне клиничке знаке EAE-a, који су у корелацији са клиничким знацима EAE-a код осетљивих WT мишева (Графикон 13A). MCMV инфекција је одложила почетак болести код WT мишева са EAE-ом, али након 15 дана вредност клиничког скорa се повећава код инфицираних WT имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на WT мишеве који су имунизовани само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 13A). На Графикону 13B приказан је укупан број мононуклеарних ћелија из ЦНС-a. Код

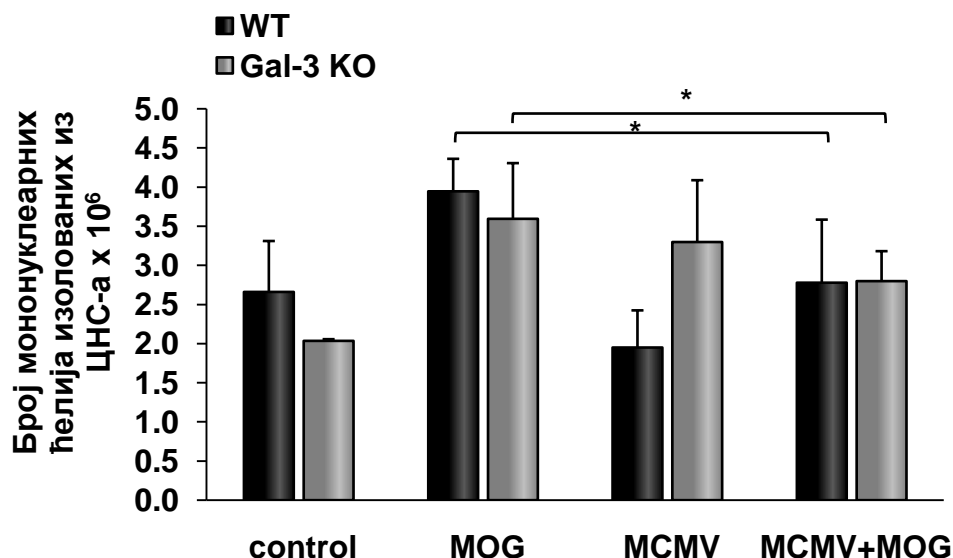
имунизованих WT мишева MOG₃₅₋₅₅ пептидом (WT+MOG) укупан број мононуклеарних ћелија изолованих из ЦНС-а је већи у односу на инфициране WT мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (WT MCMV +MOG). Код Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Gal-3 KO+MOG) укупан број мононуклеарних ћелија из ЦНС-а је већи у односу на инфицирани Gal-3 KO мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Gal-3 KO MCMV +MOG).

Графикон 13

A



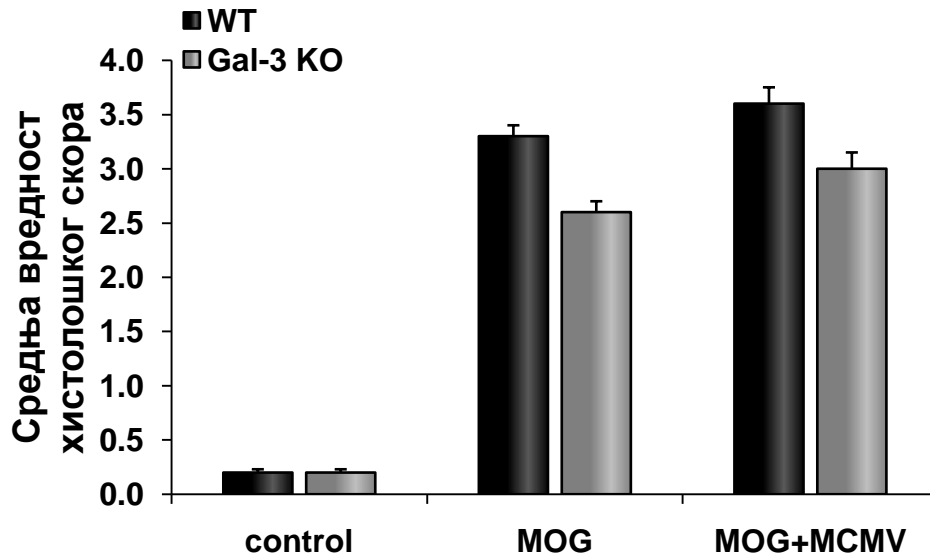
Б



Графикон 13. Инфицирани Gal-3 KO мишеви који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом развијају клиничке знаке ЕАЕ-а као и осетљиви WT мишеви. 6-8 недеља стари WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.p. MCMV-ом и 10 дана након тога су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅). Друга група WT и Gal-3 KO мишева је имунизована MOG₃₅₋₅₅ пептидом без инфекције вирусом (WT MOG₃₅₋₅₅ и Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅). Трећа група WT и Gal-3 KO мишева је само инфицирана MCMV-ом (WT MCMV, Gal-3 KO MCMV). Четврту групу су чинили неинфицирани WT и Gal-3 KO мишеви (WT control, Gal-3 KO control). (А) Вредност клиничког скорa ЕАЕ-а је представљена као средња вредност + SE. (Б) Средња вредност броја мононуклеарних ћелија из ЦНС-а WT control, Gal-3 KO control, WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅, WT MCMV, Gal-3 KO MCMV, WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅ мишева, 2 независна експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p* < 0.05).

Хистолошка анализа. У исечцима ткива мозга инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом, уочени су већи мононуклеарни инфилтрати. MCMV инфекција повећава средњу вредност хистолошког скорa у мозгу код WT и Gal-3 KO мишева са ЕАЕ-ом, у поређењу са вредностима хистолошког скорa у групи WT и Gal-3 KO мишева имунизованих само MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 14).

Графикон 14



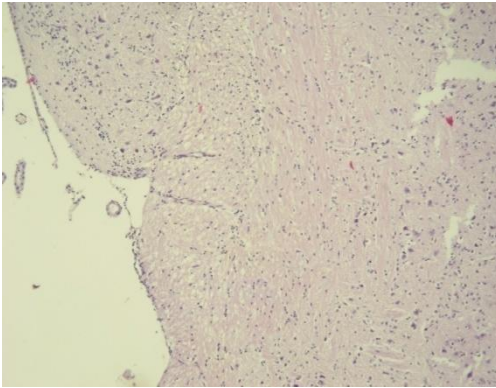
Графикон 14. У ЦНС-у инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом се уочава већи инфламацијски инфилтрат. Ткиво мозга WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅, WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅ и контролних група мишева је екстирпирано 15 дана након имунизације MOG₃₅₋₅₅, исечци су бојени хематоксилин-еозином. Представљен је хистолошки скор (средња вредност + SE), 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p*<0.05).

MCMV инфекција пре имунизације MOG₃₅₋₅₅ пептидом код WT и Gal-3 KO мишева је изазвала развој већих субарахноидних и периваскуларних инфилтрата у мозгу у односу на WT и Gal-3 KO мишеве имунизованих само MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Слика 1).

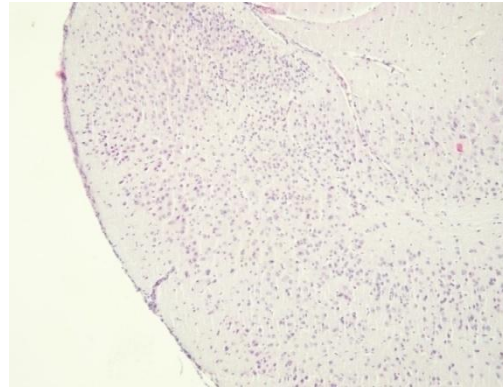
Слика 1

А

WT MOG₃₅₋₅₅

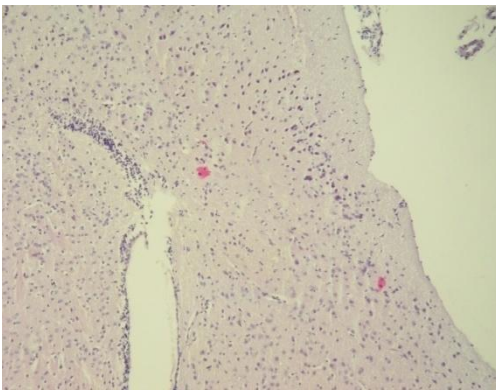


Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅

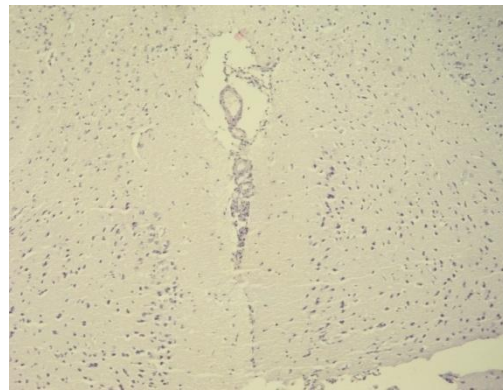


Б

WT MCMV+ MOG₃₅₋₅₅



Gal-3 KO MCMV+ MOG₃₅₋₅₅

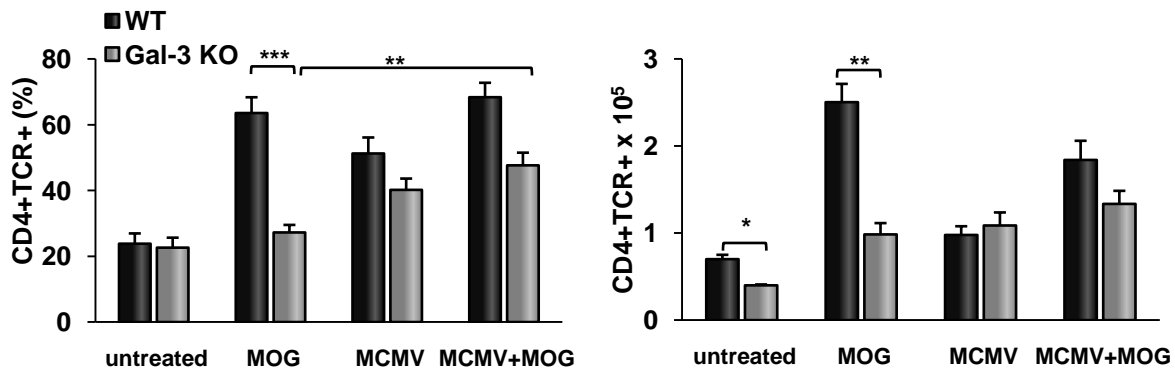


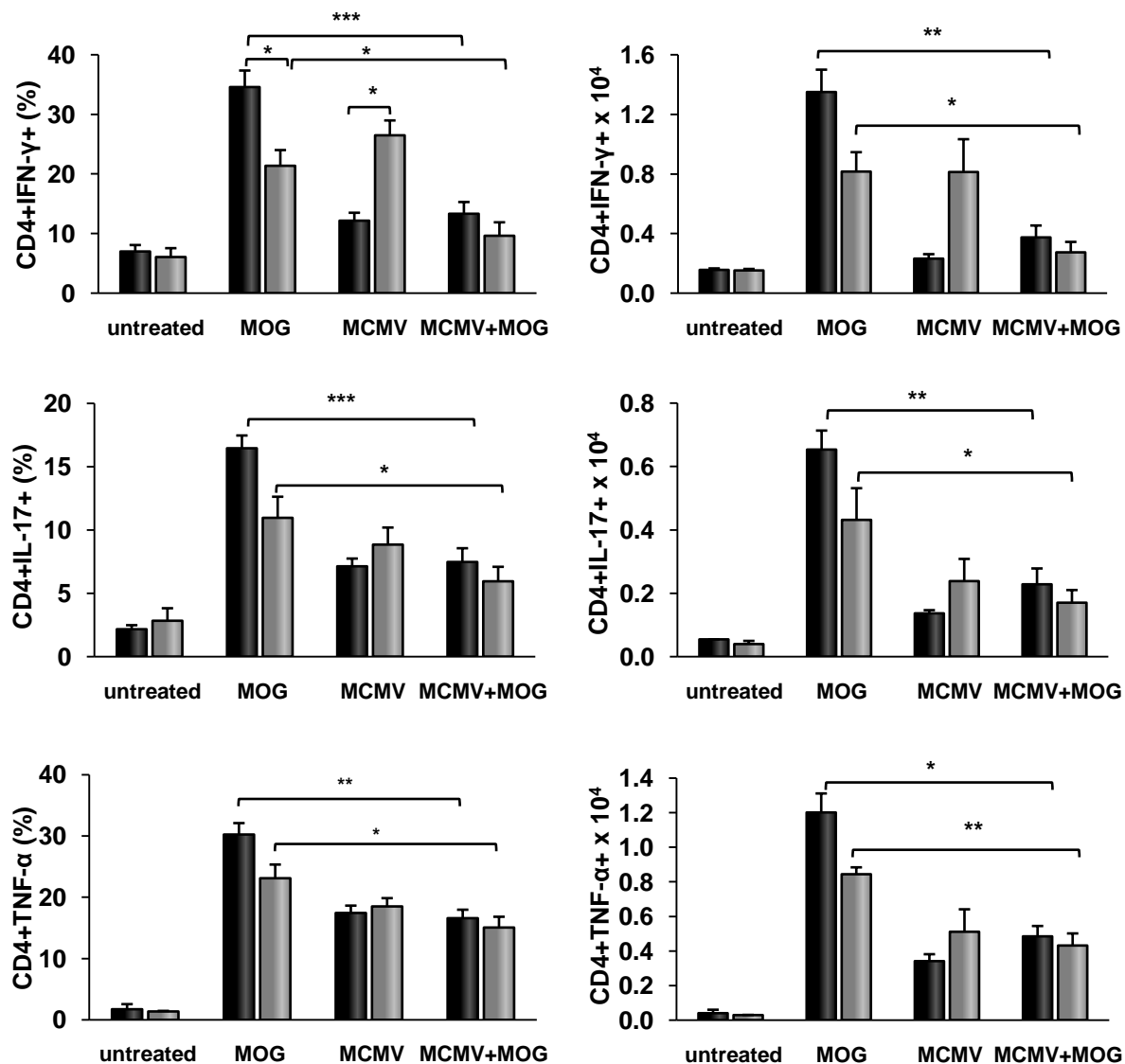
Слика 1: Хистологија мозга инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅) и WT и Gal-3 KO мишева само имунизованих енцефалитогеном (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅). Ткиво мозга је узето 15 дана након имунизације MOG₃₅₋₅₅, исечци су бојени хематоксилин-еозином. Представљени су исечци ткива мозга (А) WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ и (Б) инфицираних WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.

4.9. MCMV инфекција смањује проценат и број проинфламацијских CD4+ T лимфоцита у мозгу WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Анализирано је да ли у ЦНС-у инфицираних WT мишева и Gal-3 KO мишева који су имунизовани енцефалотигеном постоје разлике у проценту и укупном броју одређених ћелија које играју битну улогу у патогенези болести, у односу на групу WT мишева и Gal-3 KO мишева који су само имунизовани енцефалотигеном у време максималног испољавања болести. Процент и укупан број CD4+ T лимфоцита је већи код WT мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на Gal-3 KO мишеве који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 15). Процент CD4+ T лимфоцита је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 15). Процент и укупан број CD4+ T лимфоцита који експримирају IFN- γ је значајно мањи код инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са WT и Gal-3 KO мишевима који су имунизовани само пептидом MOG₃₅₋₅₅. MCMV инфекција смањује проценат и укупан број IL-17+ CD4+ T лимфоцита и TNF- α + CD4+ T лимфоцита код WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са WT и Gal-3 KO мишевима који су имунизовани пептидом (Графикон 15).

Графикон 15





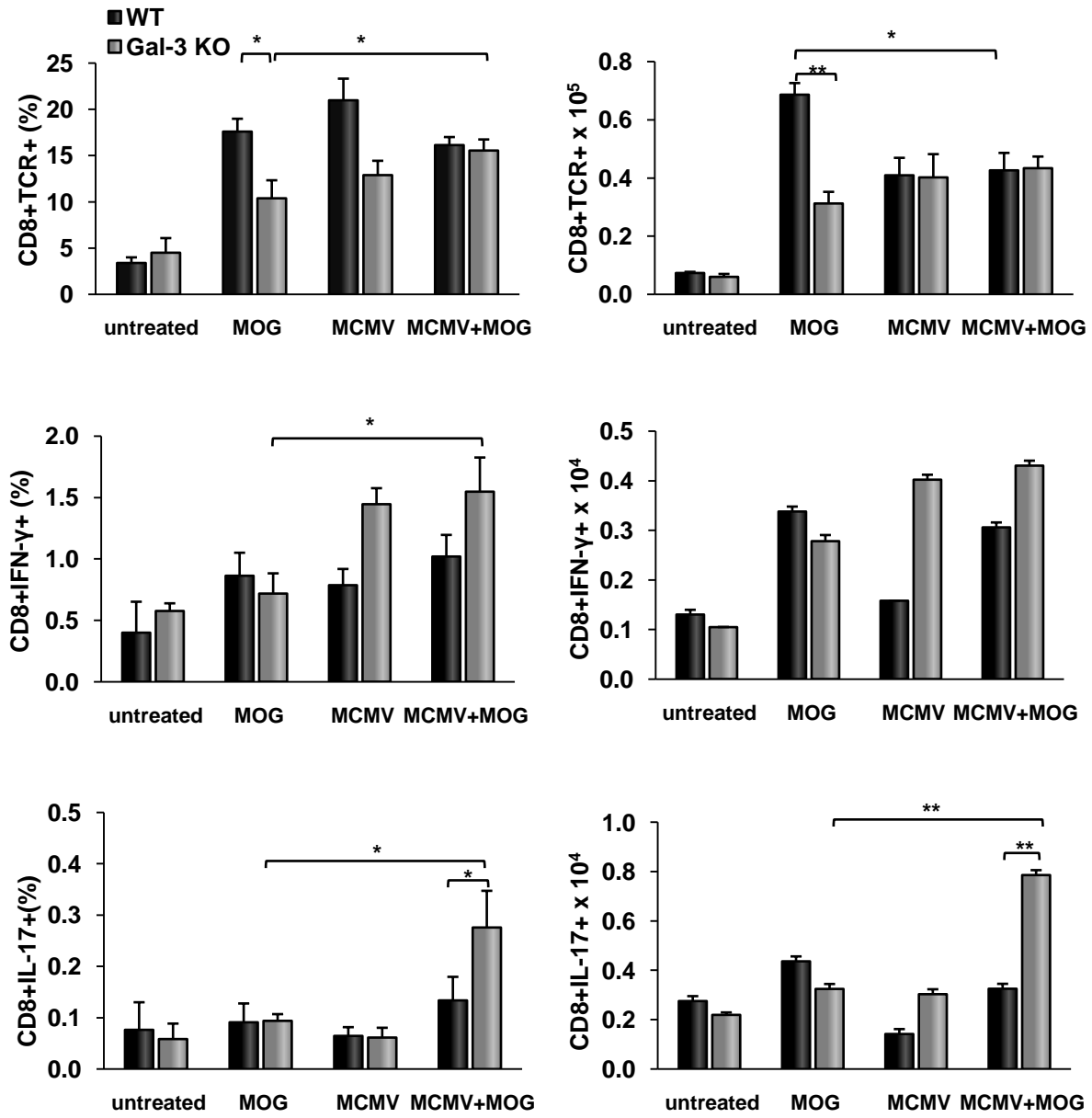
Графикон 15. Инфилтрати у ЦНС-у инфицираних WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ садрже мање проинфламацијских CD4+ Т лимфоцита. Мишеви су жртвовани 15 дана после индукције EAE-а, изоловане су мононуклеарне ћелије из мозга и евалуиране су методом проточне цитометрије. Представљен је проценат и број CD4+ Т лимфоцита, CD4+ IFN-γ+ Т лимфоцита, CD4+ IL-17+ Т лимфоцита и CD4+ TNF-α+ Т лимфоцита. Подаци су представљени као средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student-t* тест; **p* < 0.05).

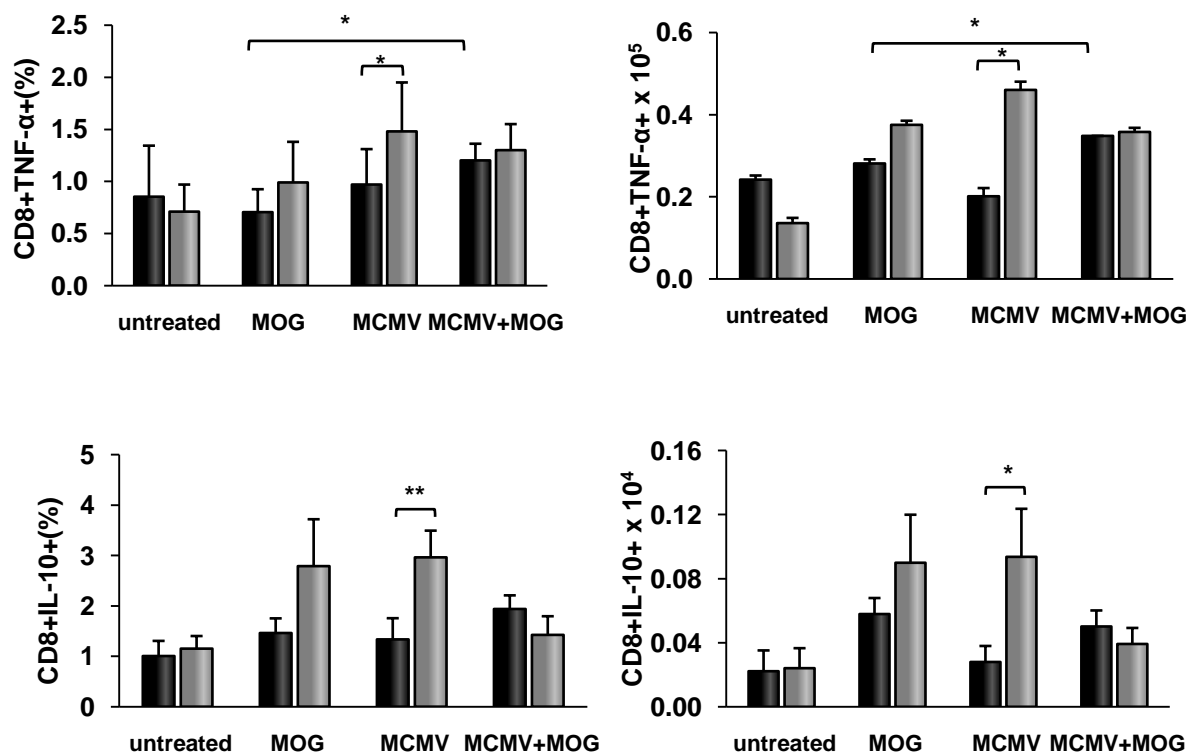
4.10. Делација гена за галектин-3 повећава проценат и број проинфламацијских CD8+ Т лимфоцита, а смањује проценат и број антиинфламацијских CD8+ Т лимфоцита у мозгу инфицираних мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом

Такође смо анализирали присуство и фенотип CD8+ Т лимфоцита у моноклеарним инфилтратима ЦНС-а, 15 дана након индукције ЕАЕ-а. Процент и укупан број CD8+ Т лимфоцита је значајно већи код имунизованих WT мишева MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на Gal-3 KO мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 16). Процент CD8+ Т лимфоцита је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на имунизоване Gal-3 KO мишеве (Графикон 16). Укупан број CD8+ Т лимфоцита је статистици значајно већи код WT мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на инфициране WT мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 16). Процент CD8+ Т лимфоцита који експримирају IFN- γ је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на Gal-3 KO мишеве имунизованим само MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Процент и укупан број CD8+ Т лимфоцита који експримирају IL-17 је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Процент и укупан број CD8+ Т лимфоцита који експримирају TNF- α је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 16). Процент и укупан број CD8+ Т лимфоцита који експримирају TNF- α је већи код инфицираних WT мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на WT мишеве имунизоване MOG₃₅₋₅₅ пептидом. Процент и укупан број CD8+ Т лимфоцита који експримирају IL-10 је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 16).

Анализом експресије гранзима В и перфорина, маркера цитолитичке активности CD8+ Т лимфоцита, показано је постојање већег процента и броја цитотоксичких CD8+ Т лимфоцита код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 17).

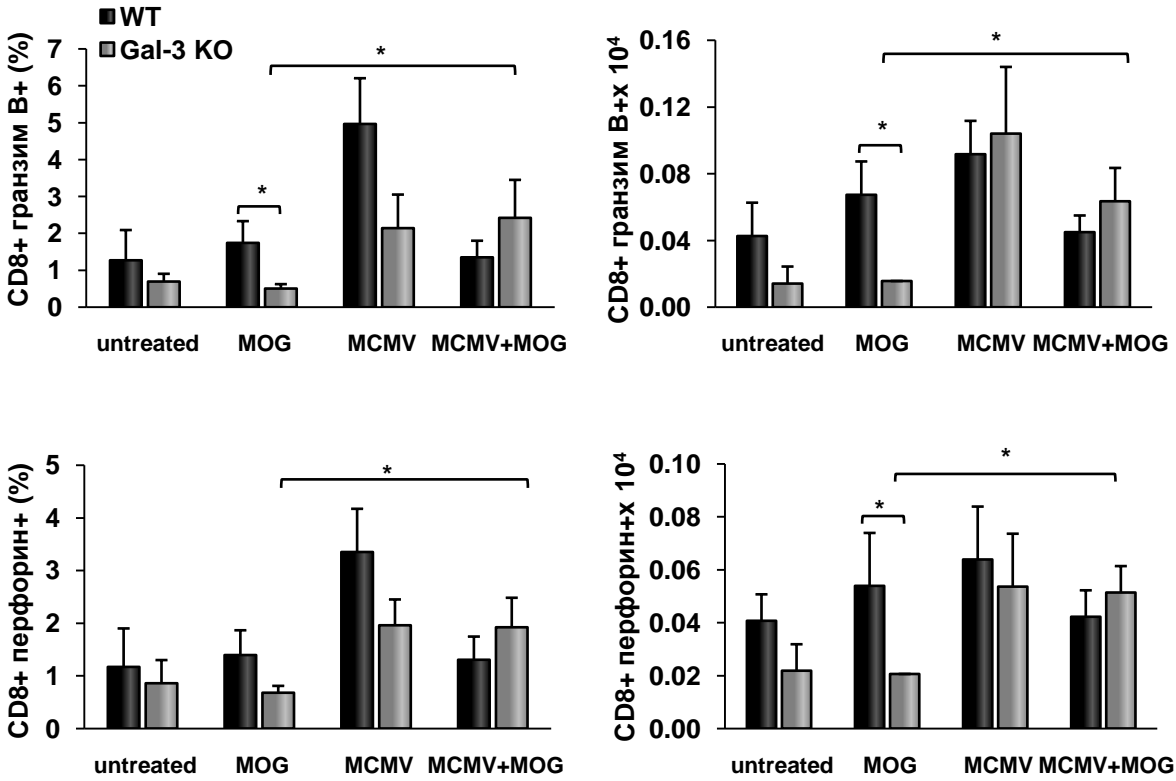
Графикон 16





Графикон 16. У ЦНС-у инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом је уочен већи проценат и број проинфламацијских CD8⁺ Т лимфоцита и мањи проценат и број антиинфламацијских CD8⁺ Т лимфоцита. Мононуклеарне ћелије из ЦНС-а су анализирание методом проточне цитометрије 15 дана након индукције ЕАЕ-а. Приказани су проценти и апсолутни бројеви CD8⁺ Т лимфоцита, CD8⁺ IFN- γ ⁺ Т лимфоцита, CD8⁺ IL-17⁺ Т лимфоцита, CD8⁺ TNF- α ⁺ лимфоцита и CD8⁺ IL-10⁺ Т лимфоцита. Подаци су представљени као средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student*- t тест; **p* < 0.05).

Графикон 17



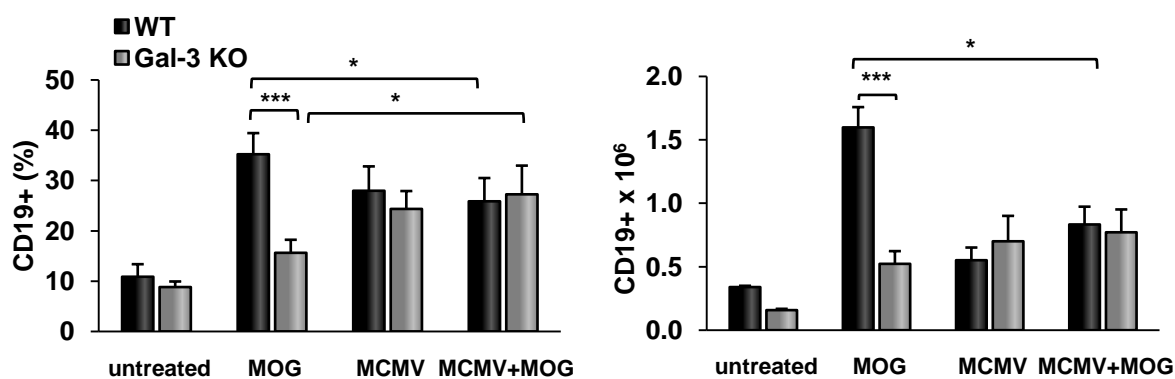
Графикон 17. У ЦНС-у инфицираних Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ је уочен већи проценат и број CD8+Т лимфоцита који испољавају маркере цитотоксичности. Представљени су проценат и укупан број CD8+ гранзим В+ Т лимфоцита и CD8+перфорин+ Т лимфоцита који су изоловани из ЦНС-а инфицираних WT и Gal-3 КО мишева који су након тога имунизовани енцефалотигеном (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 КО MCMV+MOG₃₅₋₅₅), групе само имунизованих WT и Gal-3 КО мишева MOG₃₅₋₅₅ пептидом (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 КО MOG₃₅₋₅₅) и групе инфицираних WT и Gal-3 КО мишева MCMV-ом (WT MCMV, Gal-3 КО MCMV). Подаци су представљени као средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p* < 0.05).

4.11. MCMV инфекција смањује проценат и број CD19+ В лимфоцита у мозгу WT мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Даљом анализом је испитана процентуална заступљеност и апсолутни број CD19+ В лимфоцита у ЦНС-у инфицираних WT и Gal-3 КО мишева имунизованих пептидом

MOG₃₅₋₅₅. Процент и апсолутни број CD19⁺ В лимфоцита је значајно већи код WT мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на Gal-3 KO мишевима који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 18). Процент и апсолутни број CD19⁺ В лимфоцита је значајно већи код WT мишева имунизованих само MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на инфицирани WT мишеве и у поређењу са инфицирани WT мишевима који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 18). Процент CD19⁺ В лимфоцита је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованих само MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 18).

Графикон 18



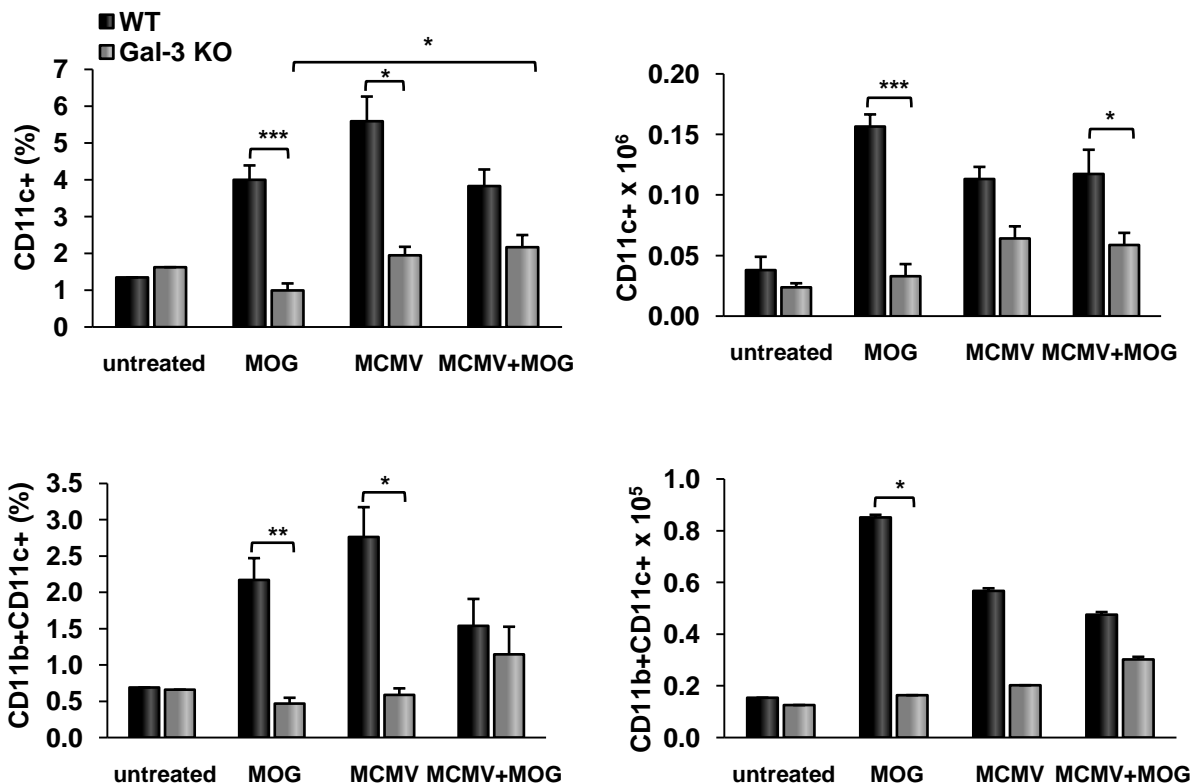
Графикон 18. MCMV инфекција смањује проценат и број CD19⁺ В лимфоцита у мозгу WT мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Приказани су проценат и број CD19⁺ В лимфоцита у ЦНС-у из групе инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅), групе само имунизованих WT и Gal-3 KO мишева пептидом MOG₃₅₋₅₅ (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅) и групе инфицираних WT и Gal-3 KO мишева MCMV-ом (WT MCMV, Gal-3 KO MCMV). Подаци су представљени као средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p*<0.05).

4.12. MCMV инфекција повећава проценат CD11c⁺ и CD11b⁺ CD11c⁺ дендритских ћелија у мозгу Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Затим смо испитивали ефекте MCMV инфекције на фенотип ћелија које презентују антигене у ЦНС-у. Процент и апсолутни број CD11c⁺ дендритских ћелија је значајно

већи код WT мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на Gal-3 KO мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 19). Процент CD11c+ дендритских ћелија је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 19). Процент и апсолутни број CD11b+ CD11c+ дендритских ћелија је значајно већи код WT мишева који су имунизовани пептидом MOG₃₅₋₅₅ у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 19).

Графикон 19



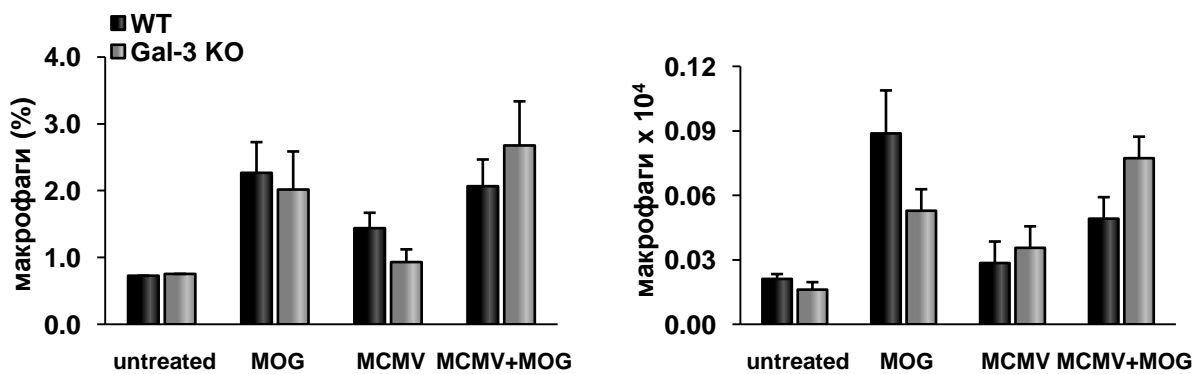
Графикон 19. MCMV инфекција повећава процентуалну заступљеност и број CD11c+ и CD11b+ CD11c+ дендритских ћелија у мозгу Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Приказани су процент и број CD11c+ и CD11b+ CD11c+ из групе инфицираних WT и Gal-3 KO мишева који су имунизовани енцефалитогеном (WT MCMV+MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MCMV+MOG₃₅₋₅₅), групе само имунизованих WT и Gal-3 KO мишева пептидом MOG₃₅₋₅₅ (WT MOG₃₅₋₅₅, Gal-3 KO MOG₃₅₋₅₅) и групе инфицираних WT и Gal-3 KO мишева MCMV-ом (WT MCMV, Gal-3 KO MCMV). Подаци су представљени као

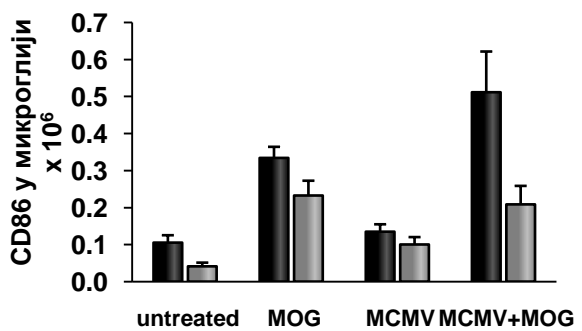
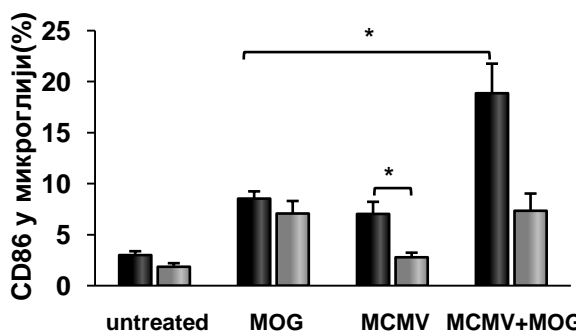
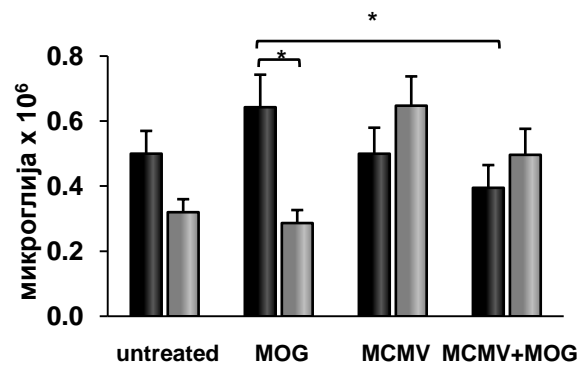
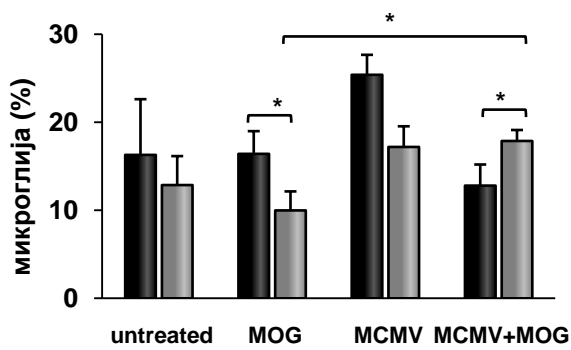
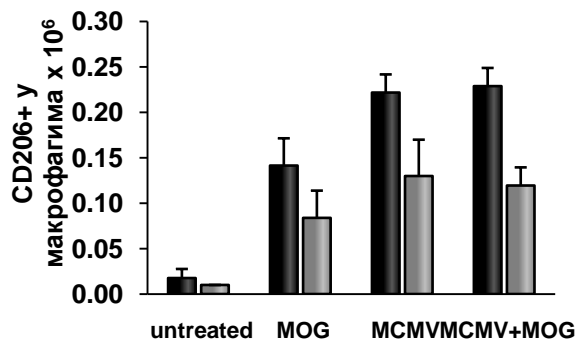
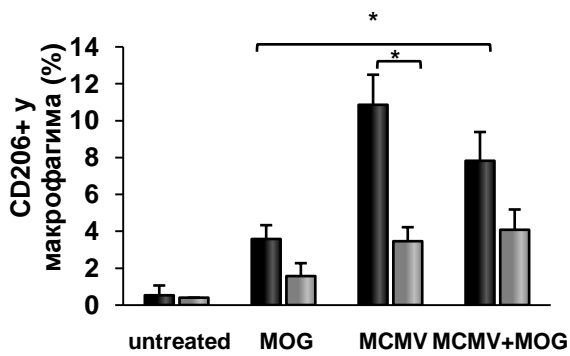
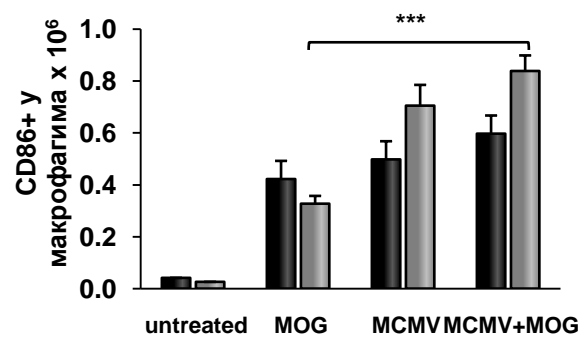
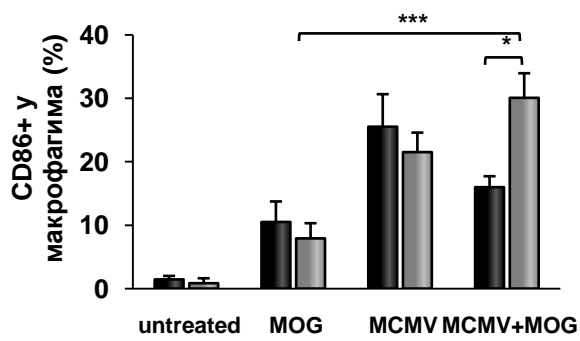
средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

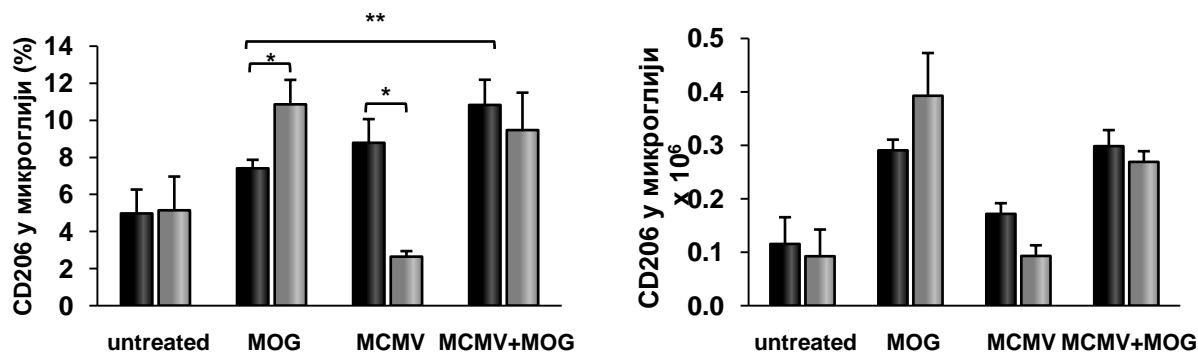
4.13. Инфекција MCMV-ом повећава проценат макрофага, микроглије и повећава класичну активацију макрофага у мозгу Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅

Даље смо анализирали могући утицај вирусне инфекције на промене у фенотипу макрофага и микроглије у ЦНС-у. Инфекција MCMV-ом повећава проценат и укупан број макрофага код инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅, али није постојала статистички значајна разлика (Графикон 20). Процент и укупан број класично активираних CD86+ макрофага је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованих само пептидом MOG₃₅₋₅₅ (Графикон 20). Процент алтернативно активираних CD206+ макрофага је значајно већи код инфицираних WT мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ у односу на WT мишове који су имунизовани само MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 20). Процент микроглије је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Процент CD86+ микроглије и CD206+ микроглије је значајно већи код инфицираних WT мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ у односу на имунизоване WT мишове (Графикон 20).

Графикон 20







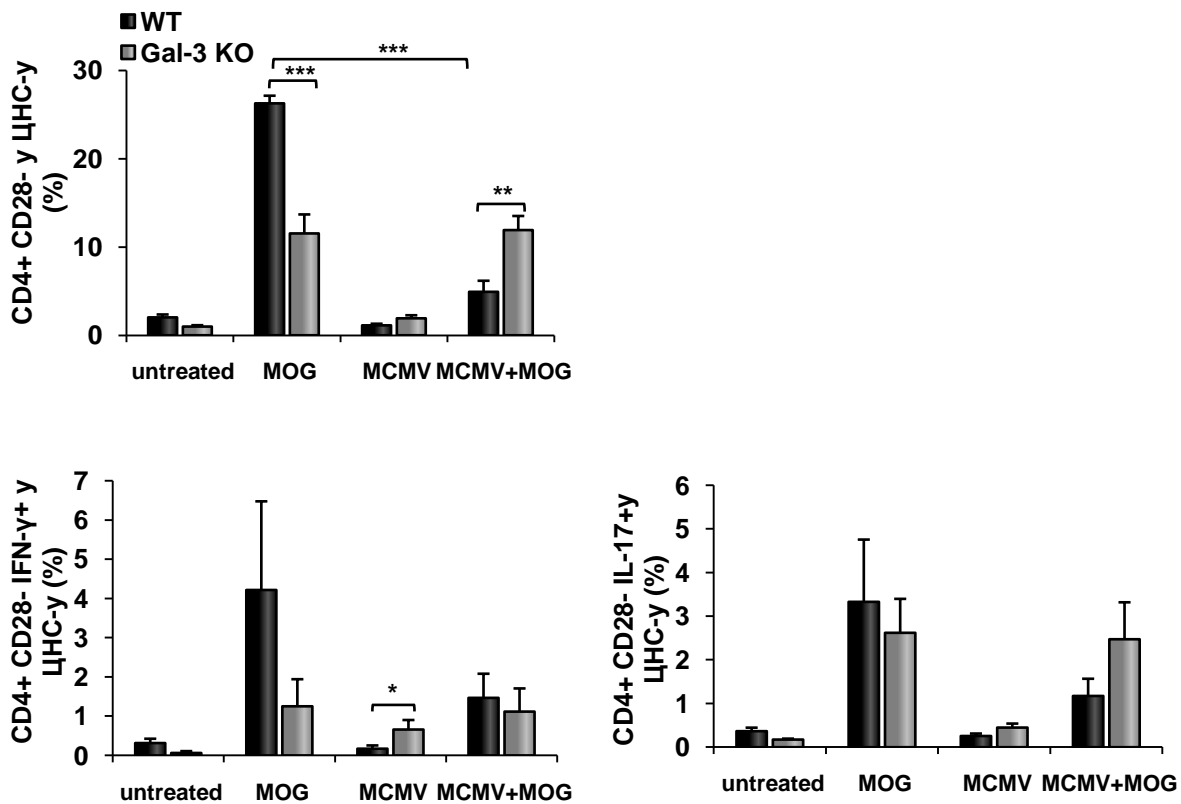
Графикон 20. Инфекција MCMV-ом повећава проценат макрофага, микроглије и повећава класичну активацију макрофага у мозгу Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅. Приказани су проценти и апсолутни бројеви макрофага, CD86+ макрофага, CD206+ макрофага, микроглије, CD86+ микроглије и CD206+ микроглије у ЦНС-у WT и Gal-3 KO мишева. Подаци су представљени као средња вредност + SE, 2 одвојена експеримента, 10 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p*<0.05).

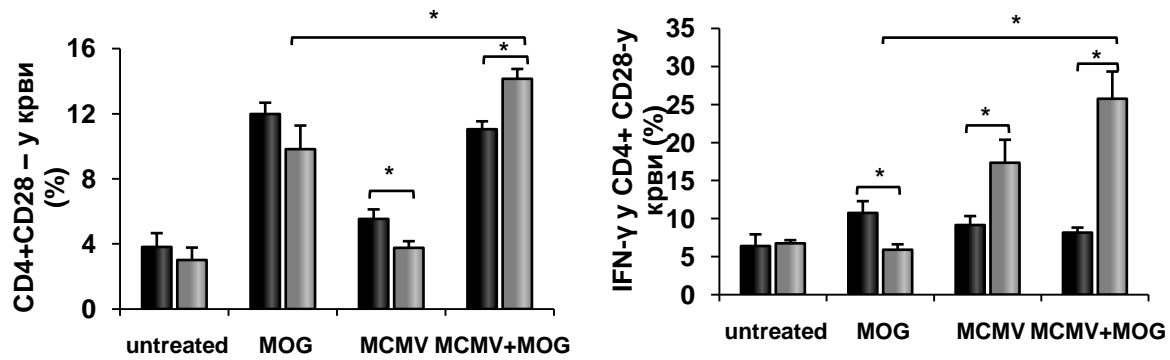
4.14. Инфекција MCMV-ом изазива експанзију CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у и у периферној крви код Gal-3 KO мишева

Показано је да CD4+CD28- Т лимфоцити који имају ефекторско-меморијски и цитотоксични фенотип су повећани код животиња са ЕАЕ-ом и да проценат ових ћелија корелира са количином демиелинизације и са тежином болести (265). Да бисмо испитали да ли је MCMV инфекција повезана са експанзијом CD4+CD28- Т лимфоцита, анализирали смо присуство и фенотип CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у и у периферној крви. Процент CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у је значајно већи код имунизованих WT мишева у односу на Gal-3 KO мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 21). Процент CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у је значајно већи код имунизованих WT мишева у односу на инфициране WT мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 21). Процент CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на инфициране WT мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом (Графикон 21). Процент CD4+CD28- Т лимфоцита који експримирају IFN- γ је већи у ЦНС-у инфицираних Gal-3 KO мишева у односу на неинфициране Gal-3 KO мишеве. Процент

CD4+CD28- Т лимфоцита који експримирају IL-17 је већи у ЦНС-у инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у односу на инфициране WT мишеве који су имунизовани MOG₃₅₋₅₅ пептидом, али није постојала статистички значајна разлика (Графикон 21). Процент CD4+CD28- Т лимфоцита и проценат IFN- γ + CD4+CD28- Т лимфоцита је значајно већи у периферној крви инфицираних Gal-3 KO мишева имунизованих MOG₃₅₋₅₅ пептидом у поређењу са Gal-3 KO мишевима имунизованим MOG₃₅₋₅₅ пептидом, 25 дана након MCMV инфекције (Графикон 21).

Графикон 21





Графикон 21. Инфекција MCMV-ом изазива експанзију CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у и периферној крви код Gal-3 KO мишева. Мононуклеарне из ЦНС-а су анализирани методом проточне цитометрије. Приказани су проценти CD4+CD28- Т лимфоцита, IFN-γ+ CD4+CD28- Т лимфоцита и IL-17+ CD4+CD28- Т лимфоцита у ЦНС-у. Такође је приказан проценат CD4+CD28- Т лимфоцита и IFN-γ+ CD4+CD28- Т лимфоцита у периферној крви 25 дана након инфекције MCMV-ом. Подаци су представљени као средња вредност + SE, један експеримент, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; **p* < 0.05).

4.15. Инфекција МСМV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима

Галектин-3 има различиту улогу у патогенези тумора и у патогенези бројних хроничних инфламацијских болести (127, 135, 266, 267). Познато је да билијарне епителне ћелије и хепатоцити порекла из нетретираних C57BL/6 животиња имају веома слабу експресију галектина-3 (130). Показано је да појачана експресија галектина-3 постоји код пацијената са хепатитисом који је индукован вирусом (268). Да би се испитао утицај инфекције МСМV-ом на експресију галектина-3 *in vivo* и да би се одредила ћелијска локализација галектина-3, урађено је имунохистохемијско бојење исечака јетре WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције МСМV-ом. Имунохистохемијска бојења исечака јетре су указала на значајно временски зависно повећање експресије галектина-3 у хепатоцитима WT мишева 36 и 72 сата након МСМV инфекције (слика 2А). Експресија галектина-3 није уочена у хепатоцитима неинфицираних мишева и Gal-3 KO мишева инфицираних МСМV-ом (слика 2Б). Да бисмо одредили колики број хепатоцита експримира галектин-3, галектин-3 позитивне хепатоците смо бројали у десет различитих поља и приказали смо као средњи број галектин-3+ хепатоцита + SD. Значајно већи број галектин-3+ хепатоцита по пољу је уочен код WT мишева 72 сата након инфекције МСМV-ом у поређењу са бројем галектин-3+ хепатоцита код WT мишева 36 сати након МСМV инфекције (Графикон 22).

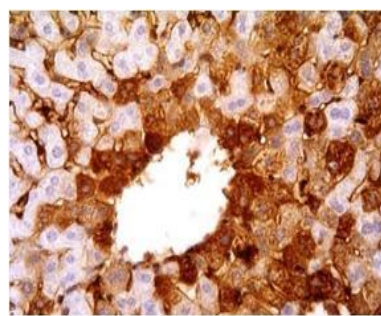
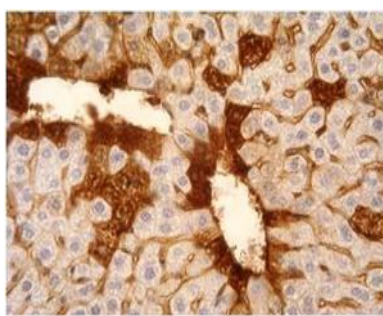
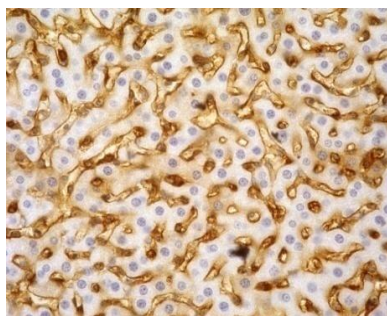
Слика 2

А

WT нетретирани

WT МСМV 36 сати

WT МСМV 72 сата

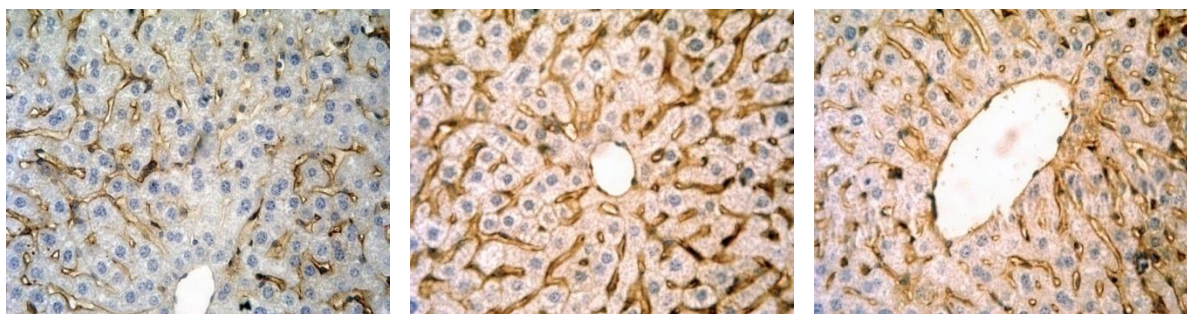


Б

Gal-3 KO нетретирани

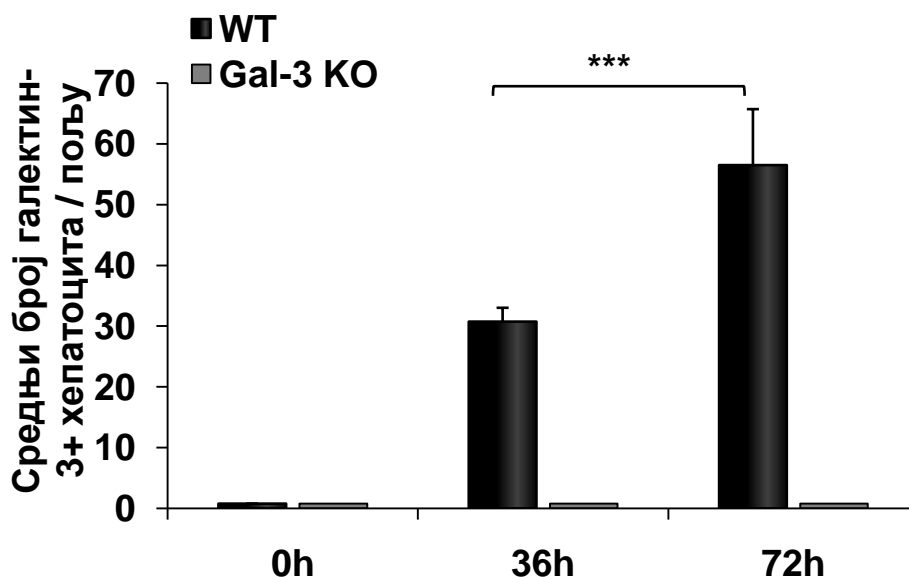
Gal-3 KO MCMV 36 сати

Gal-3 KO MCMV 72 сата



Слика 2. Имунохистохемијско бојење препарата јетре. Репрезентативни исечци експресије галектина-3 у јетрама WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом и у контролним неинфицираним јетрама WT и Gal-3 KO мишева. Галектин-3+ хепатоцити су присутни код WT мишева 36 сати, а нарочито 72 сата након инфекције MCMV-ом.

Графикон 22



Графикон 22. Инфекција MCMV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима. Број галектин-3 позитивних хепатоцита је пребројаван у десет различитих поља и приказан је као средњи број галектин-3 позитивних хепатоцита по пољу + SD. Један репрезентативни експеримент, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; *** $p < 0.001$).

4.16. Дефицијенција галектина-3 је удружена са тежом формом хепатитиса који је изазван WT MCMV вирусом

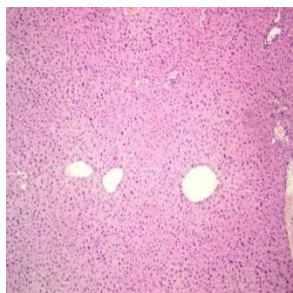
Због повећане експресије галектина-3 у хепатоцитима мишева инфицираних MCMV-ом, испитивана је улога галектина-3 у хепатитису који је индукован MCMV-ом. Хистолошки и серолошки параметри оштећења јетре су анализирани код WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције. Није било разлике у архитектури ткива јетре између нетретираних WT и Gal-3 KO мишева (слика 3). Хистолошки параметри повезани са хепатитисом који је индукован MCMV-ом, а односе се на инфламацију и некрозу јетре су израженији код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом (Слика 3, Графикон 23). Већа некротична поља и већи инфламацијски фокуси су уочени у јетрама Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције (Слика 3). Сличне разлике у величини некротичних поља између Gal-3 KO и WT мишева су уочене 72 сата након MCMV инфекције (Слика 3). У исто време Gal-3 KO мишеви су имали већи број мањих инфламацијских фокуса у поређењу са WT мишевима, док није било разлике у величини инфламацијских фокуса између ове две групе мишева (Слика 3).

Иако је инфекција HCMV-ом субклиничка код имунокомпетентних особа, често је праћена повишеним серумским нивоима трансаминаза. Испитиван је ниво аланин трансаминазе (ALT) у серуму инфицираних мишева. У складу са хистолошким налазима, нађени су значајно виши нивои ALT-а у серуму Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом, у поређењу са WT мишевима (Графикон 24).

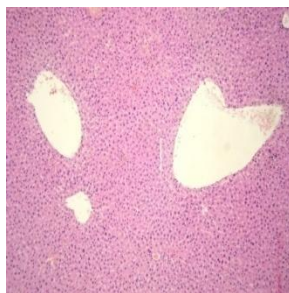
Узимајући у обзир да је велики број некротичних поља присутан у исечцима јетре Gal-3 KO мишева (Слика 3, Графикон 23) и да MCMV има способност да индукује некроптозу (269), испитивани су маркери некроптоичне смрти, HMGB1 (енгл. *High mobility group box 1*) у хомогенатима ткива јетре и мембранска експресија калретинулина на хепатоцитима, 36 сати након инфекције. Пронађена је значајно већа концентрација HMGB1 у хомогенатима ткива јетре (графикон 25) и већи проценат хепатоцита који експримирају калретинулин на површини мембране (графикон 26) код Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом.

Слика 3

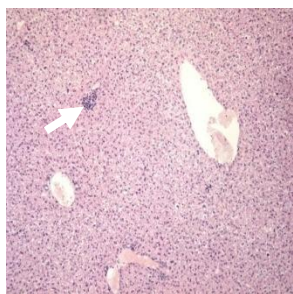
WT контрола



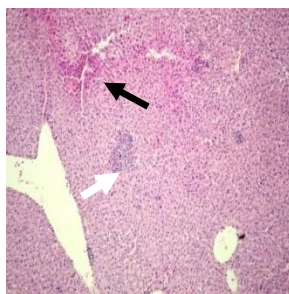
Gal-3 KO контрола



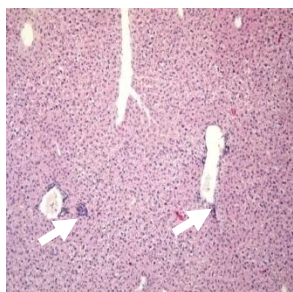
WT MCMV 36h



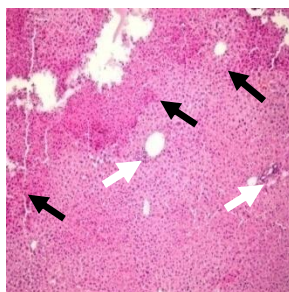
Gal-3 MCMV 36h



WT MCMV 72h

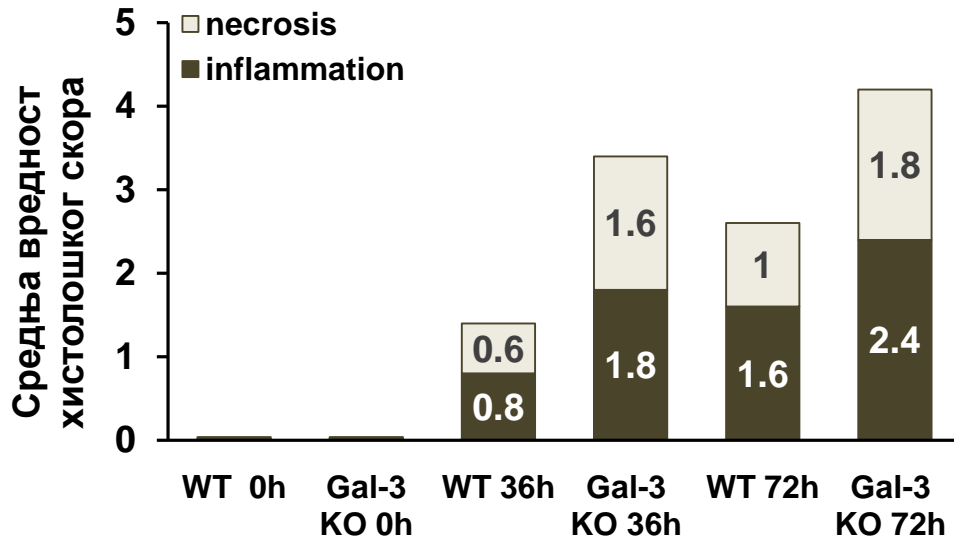


Gal-3 MCMV 72h



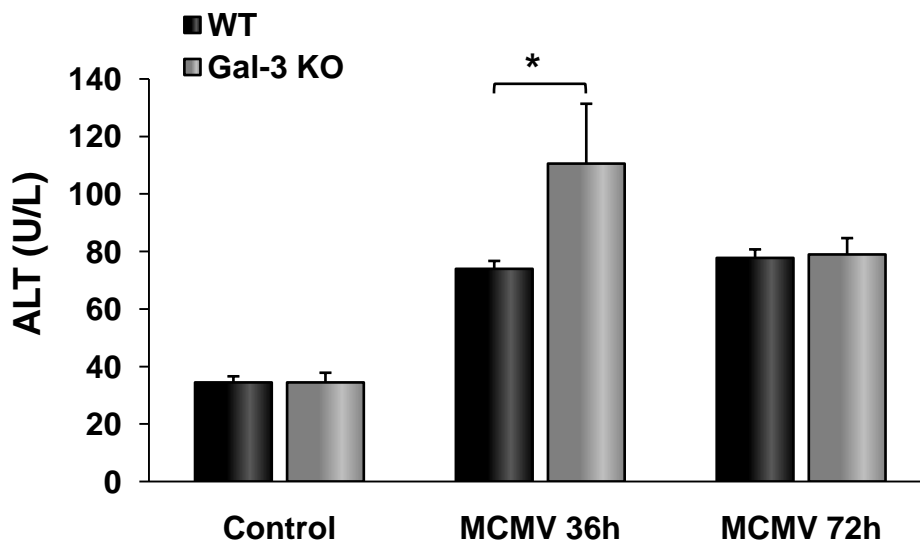
Слика 3. Патолошко-истолошки исечци ткива јетре WT и Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Приказани су примери патолошко-истолошких исечака ткива јетре групе WT MCMV и Gal-3 KO MCMV мишева. Ткиво јетре је екстирпирано 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом и ткивни исечци су обојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице показују некротична поља, а беле стрелице показују инфламацијске фокусе.

Графикон 23



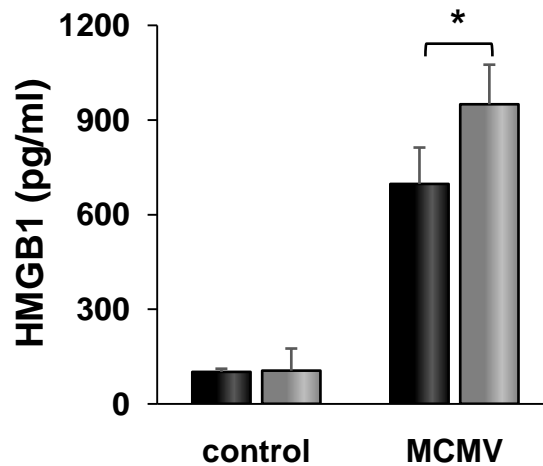
Графикон 23. Инфламација и некроза јетре су израженије код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Ткиво јетре WT и Gal-3 KO мишева је екстирпирано 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом, ткивни исечци су бојени хематоксилин-еозином. Представљена је средња вредност хистолошког скова + SE), 2 одвојена експеримента, 6 мишева по групи.

Графикон 24



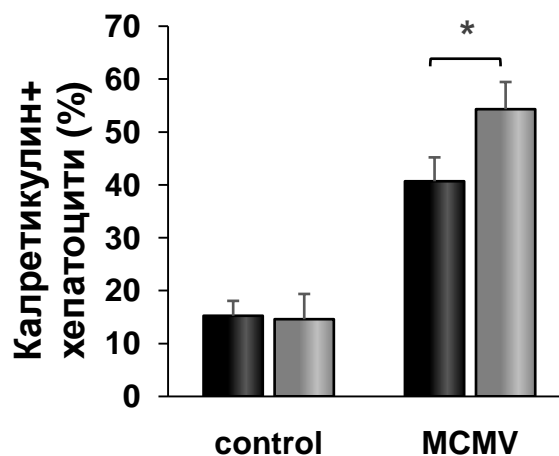
Графикон 24. Концентрација ALT је већа у серуму Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом. Концентрације ензима јетре у серуму су одређиване колориметријском методом 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом. Представљена је средња вредност + SE серумске концентрације ALT-а, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

Графикон 25



Графикон 25. Концентрација HMGB1 је већа у хомогенату ткива јетре Gal-3 KO мишева 36 сати након инфекције MCMV-ом. Концентрације HMGB1 у хомогенатима ткива јетре су одређене ELISA методом 36 сати после инфекције MCMV-ом. Представљена је средња вредност + SE HMGB1 концентрације, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

Графикон 26

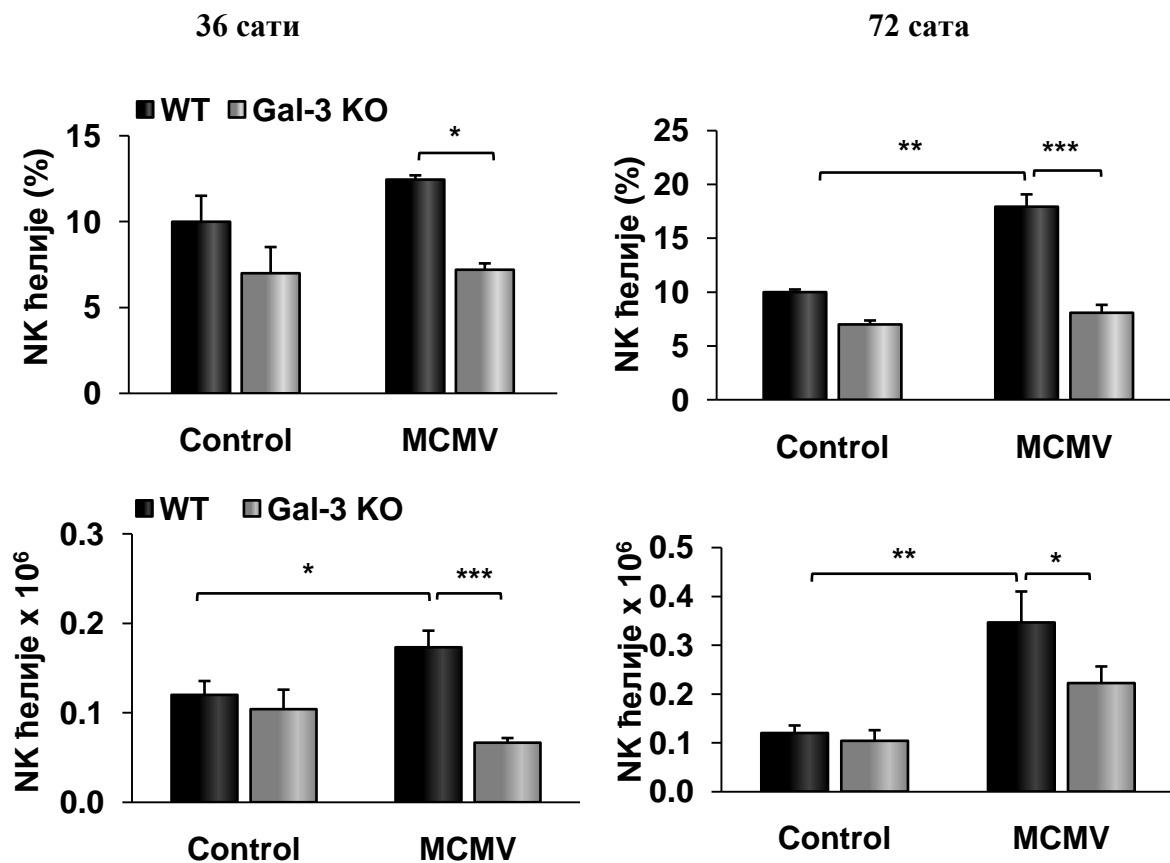


Графикон 26. Gal-3 KO мишеви имају статистички значајно већи проценат калретикулин+ хепатоцита 36 сати након инфекције MCMV-ом. Процент калретикулин+ хепатоцита је одређен проточном цитометријом 36 сати након инфекције MCMV-ом. Подаци су представљени као средња вредност калретикулин+ хепатоцита + SE, 5 мишева по групи. (*Student- t* тест *** $p < 0.001$).

4.17. Тежа болест код Gal-3 KO мишева је независна од активације NK ћелија

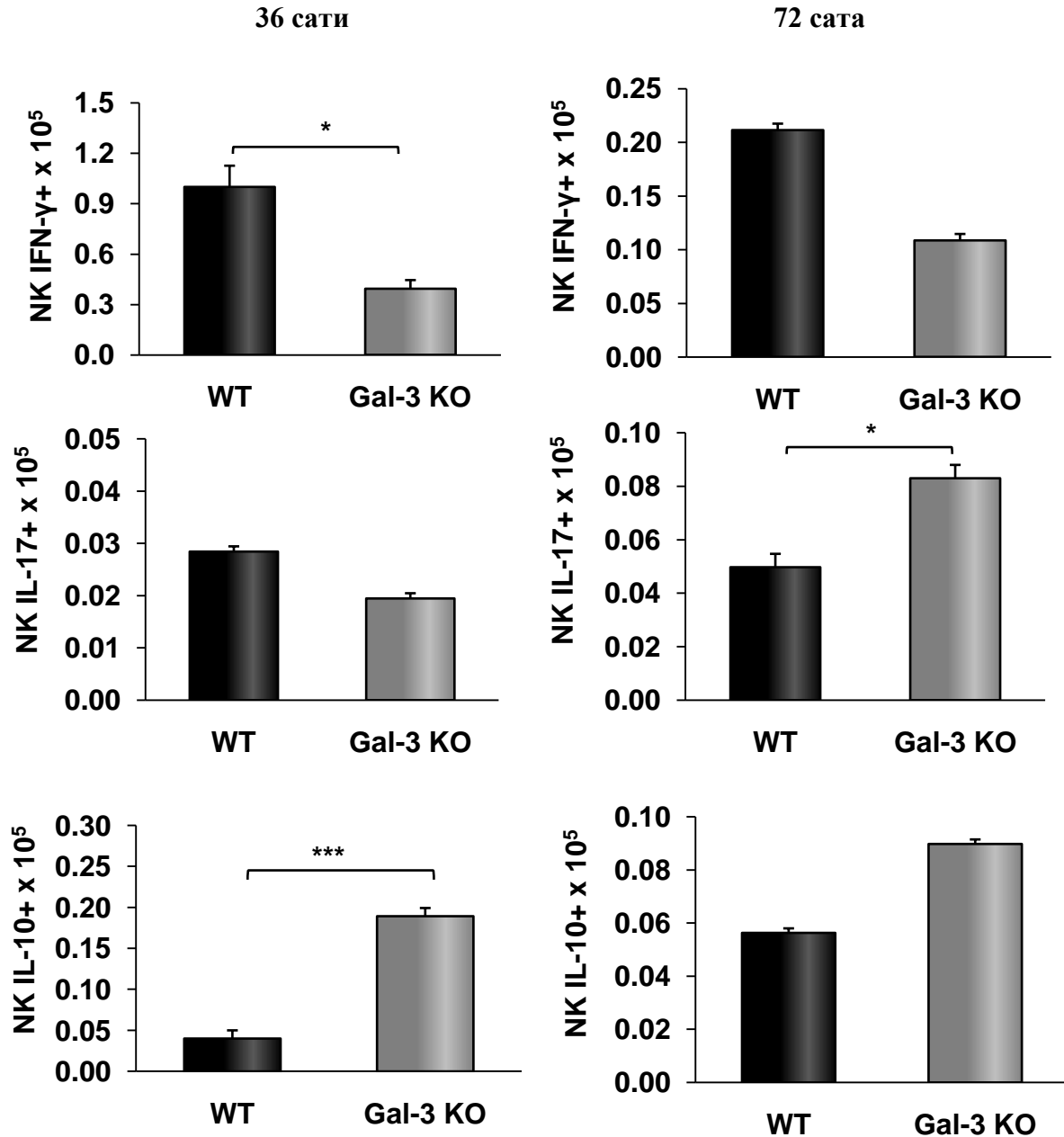
Узимајући у обзир чињенице да NK ћелије играју кључну улогу у раном имунском одговору против MCMV-а код C57BL/6 мишева (235) и да NK ћелије доприносе оштећењу јетре код вирусних инфекција (270), испитивана је могућност да је веће оштећење јетре код инфицираних Gal-3 KO мишева последица повећане активности NK ћелија. Анализирано је присуство и фенотип NK ћелија у мононуклеарним инфилтратима јетре, 36 и 72 сата након MCMV инфекције. Није било статистички значајног повећања процента и укупног броја NK ћелија у јетри инфицираних Gal-3 KO мишева у односу на неинфициране Gal-3 KO мишеве (Графикон 27). Са друге стране, MCMV инфекција је индуковала значајно повећање укупног броја и процента NK ћелија у јетри WT мишева (Графикон 27). Такође, укупан број и проценат NK ћелија је значајно већи у јетри WT мишева, 36 и 72 сата након MCMV инфекције (Графикон 27). Укупан број IFN- γ + NK ћелија је већи у јетри WT мишева 36 сати након MCMV инфекције у односу на Gal-3 KO мишеве, док ова разлика није имала статистичку значајност 72 сата након инфекције (Графикон 28). Укупан број IL-17+ NK ћелија је већи код Gal-3 KO мишева, 72 сати након инфекције MCMV-ом. Такође, укупан број NK ћелија које експримирају IL-10 је већи у код Gal-3 KO мишева, 36 сати након инфекције MCMV-ом у односу на WT мишеве (Графикон 28).

Графикон 27



Графикон 27. Код инфицираних Gal-3 KO мишева је присутан мањи проценат и укупан број NK ћелија у јетри. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Графикон 28

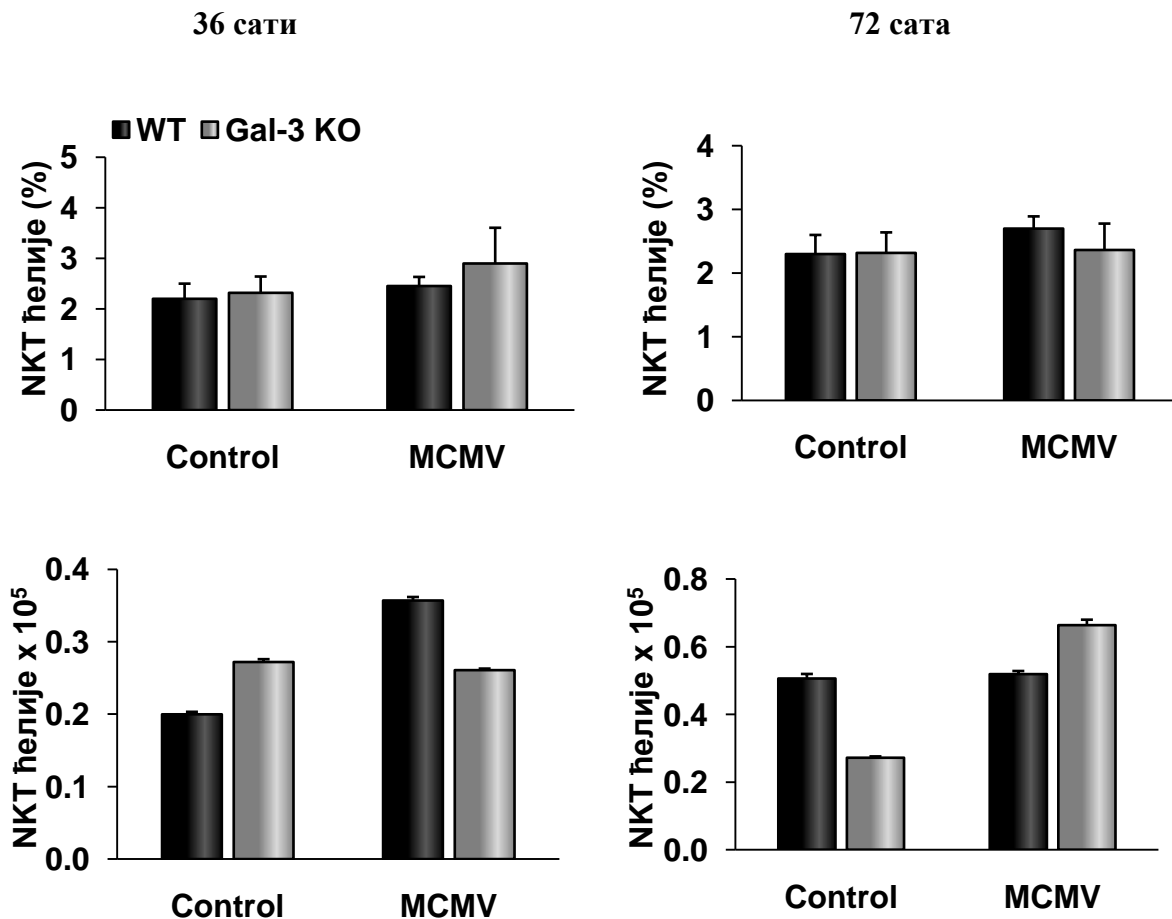


Графикон 28. У јетрама инфицираних WT мишева су бројније инфламацијске NK ћелије упркос чињеници да је оштећење јетре израженије код Gal-3 KO мишева. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата после инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест * $p < 0.05$).

4.18. Антиинфламацијске NKT ћелије су бројније у јетри Gal-3 KO мишева након инфекције MCMV-ом

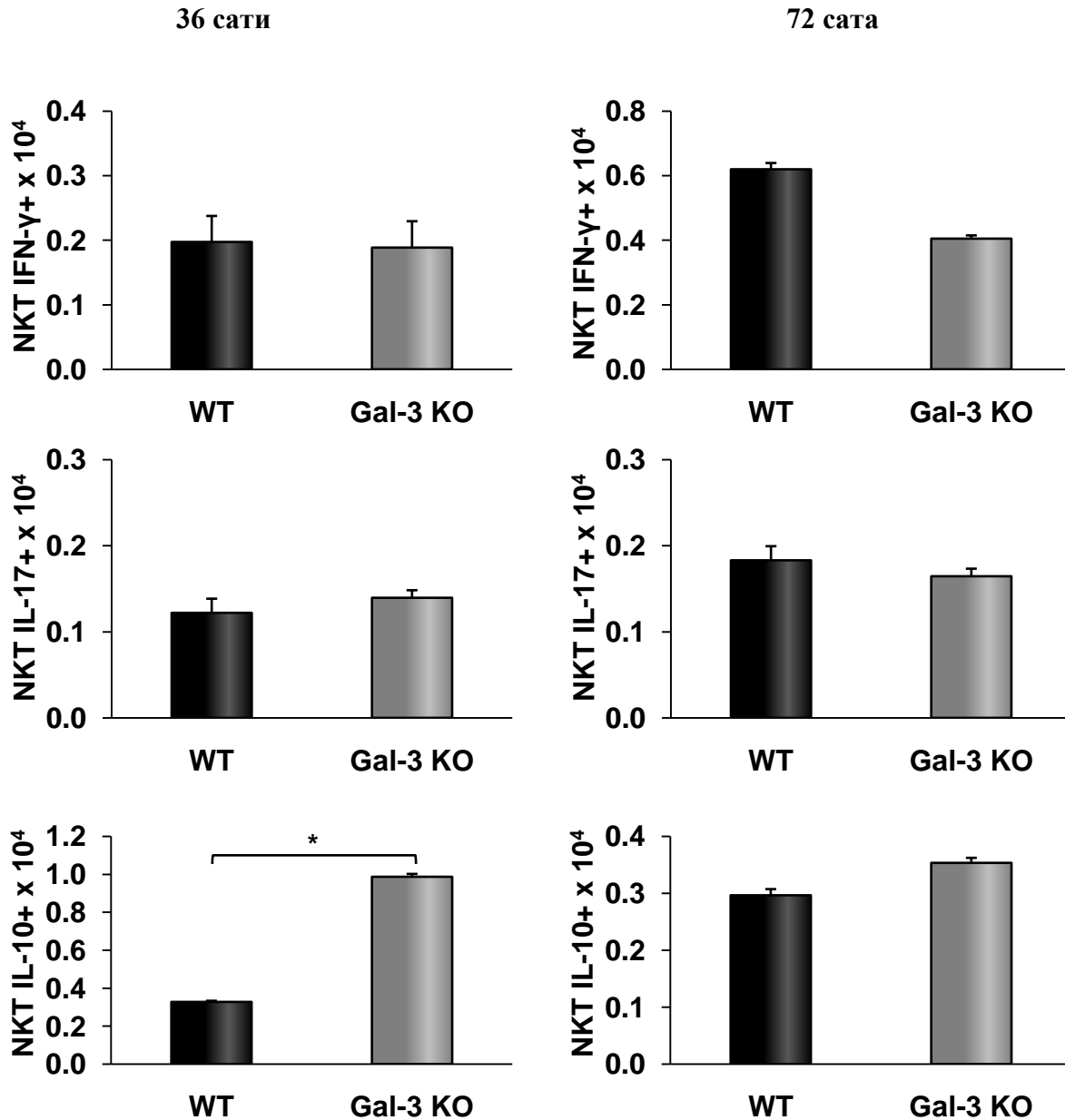
У наставку истраживања смо анализирали присуство и фенотип NKT ћелија у мононуклеарним инфилтратима јетре, 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Није уочена значајне разлике у укупном броју и проценту NKT ћелија у јетри између инфицираних Gal-3 KO мишева и инфицираних WT мишева (Графикон 29). Укупан број NKT ћелија које експримирају IFN- γ је већи у јетри Gal-3 KO мишева 72 сата након MCMV инфекције (Графикон 30). Није уочена разлика у проценту и укупном броју NKT ћелија које експримирају IL-17 између група. Укупан број NKT ћелија које експримирају IL-10 је већи у јетри Gal-3 KO мишева, 36 сати након инфекције MCMV-ом (Графикон 30).

Графикон 29



Графикон 29. Процент и укупан број NKT ћелија у јетри инфицираних WT и Gal-3 KO мишева. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Графикон 30



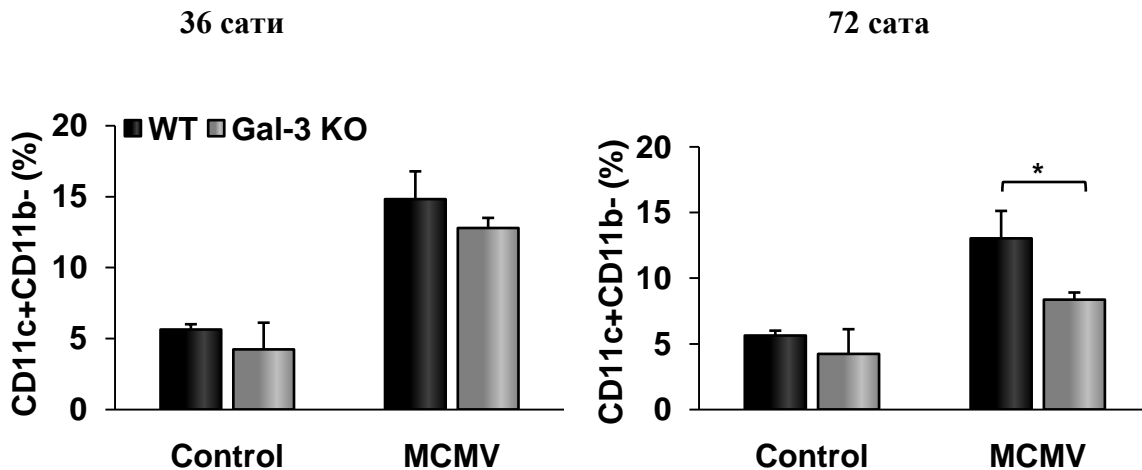
Графикон 30. У јетрама инфицираних Gal-3 KO мишева су бројније антиинфламацијске NKT ћелије. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом

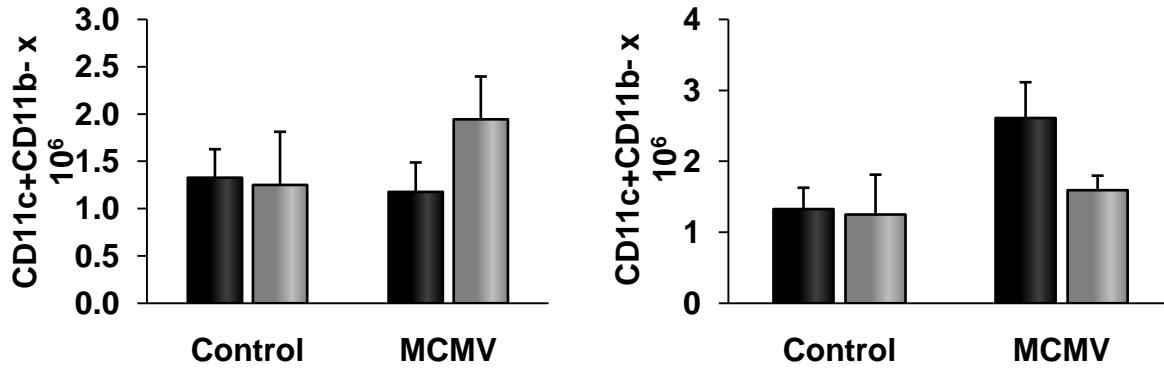
проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције МСМV-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.19. У јетрама инфицираних WT мишева доминирају дендритске ћелије, инфламацијски моноцити и резидентне ћелије

Процент CD11c+CD11b- дендритских ћелија је већи код WT мишева у односу на проценат ових ћелија код Gal-3 KO мишева, 72 сата након инфекције МСМV-ом (Графикон 31). Процент CD11b+CD11c-Ly6ChighLy6G- инфламацијских моноцита је значајно већи код WT мишева, 72 сата након инфекције МСМV-ом (Графикон 32). Процент и апсолутни број CD11b+CD11c-Ly6c-Ly6G- резидентних ћелија је такође већи код WT мишева у односу на Gal-3 KO мишове, 72 сата након инфекције МСМV-ом (Графикон 33).

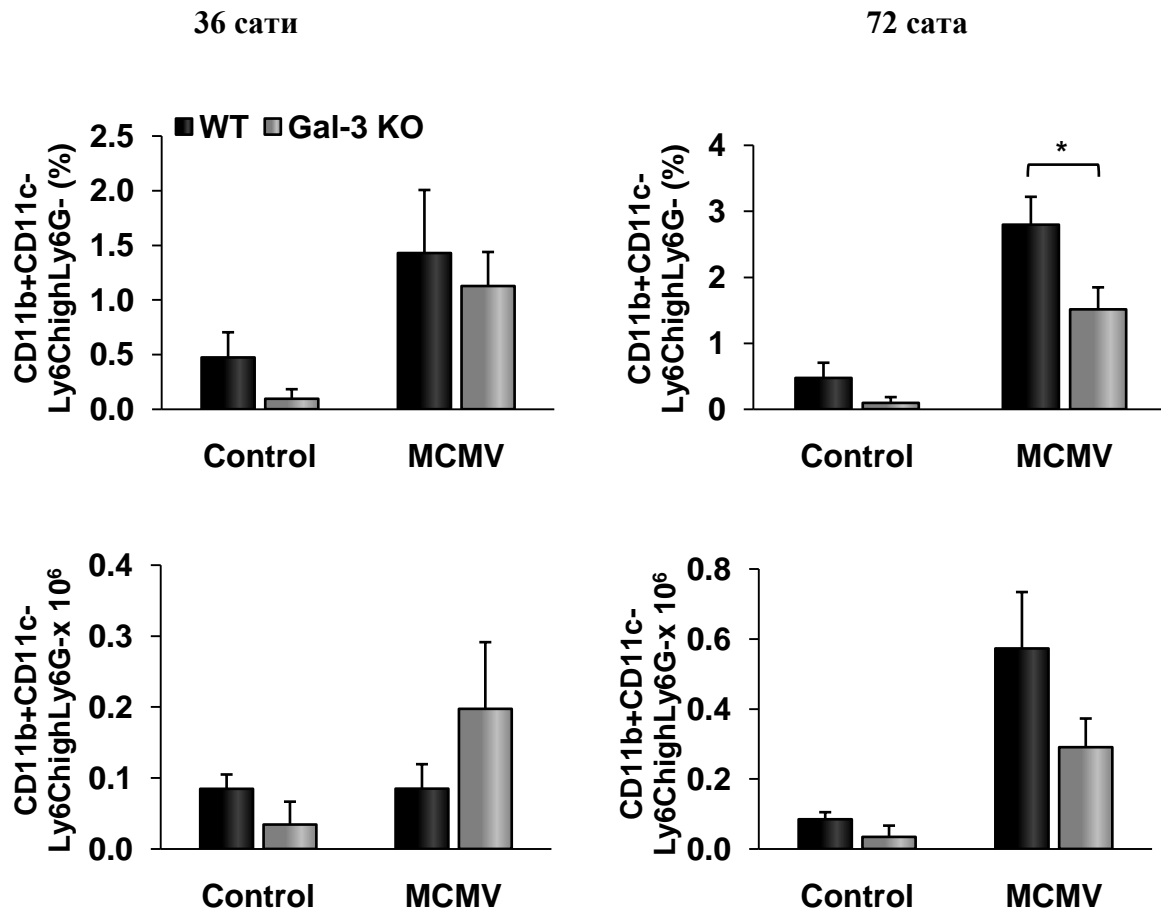
Графикон 31





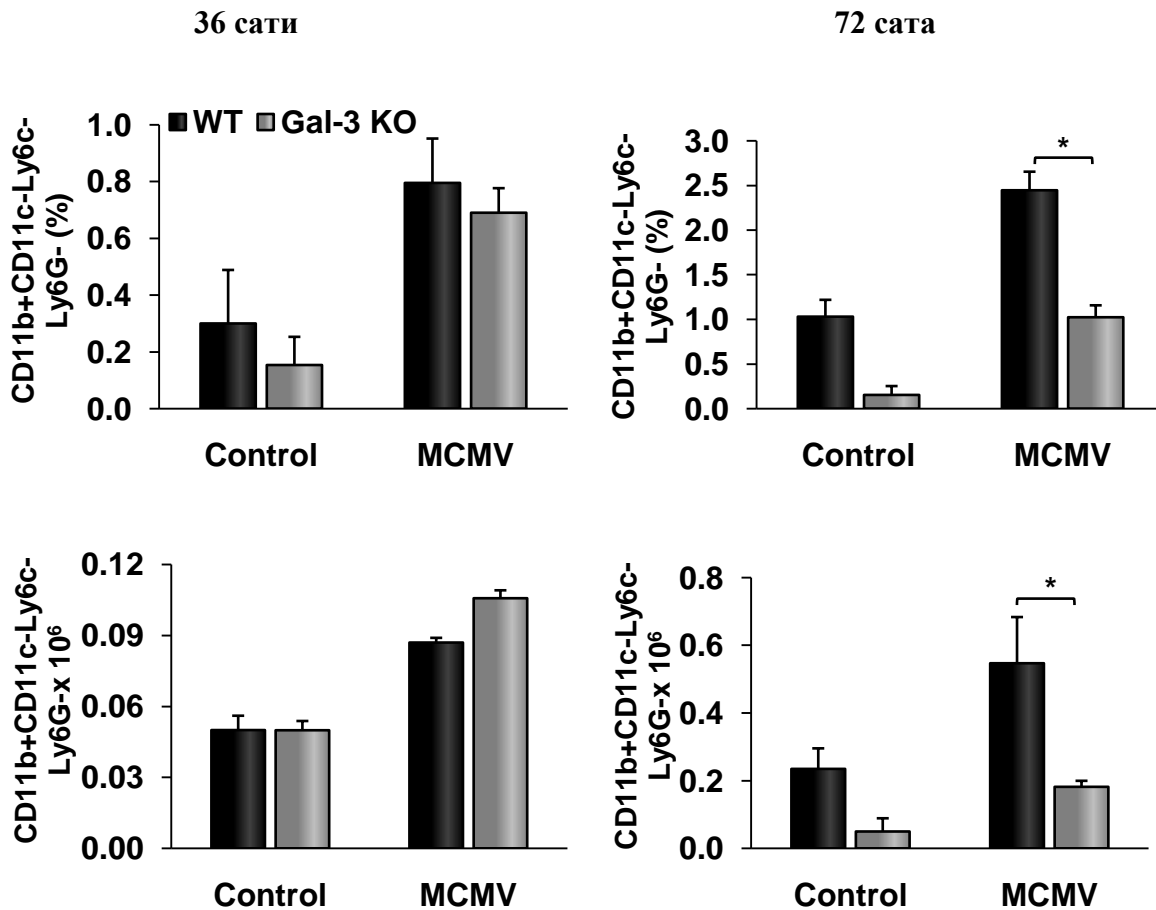
Графикон 31. У јетрама WT мишева је присутан већи проценат дендритских ћелија, 72 сата након инфекције МСМВ-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције МСМВ-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Графикон 32



Графикон 32. У јетрама WT мишева је присутан већи проценат инфламацијских моноцита, 72 сата након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE укупног броја и процента CD11b+CD11c-Ly6ChighLy6G- инфламацијских моноцита по групи, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

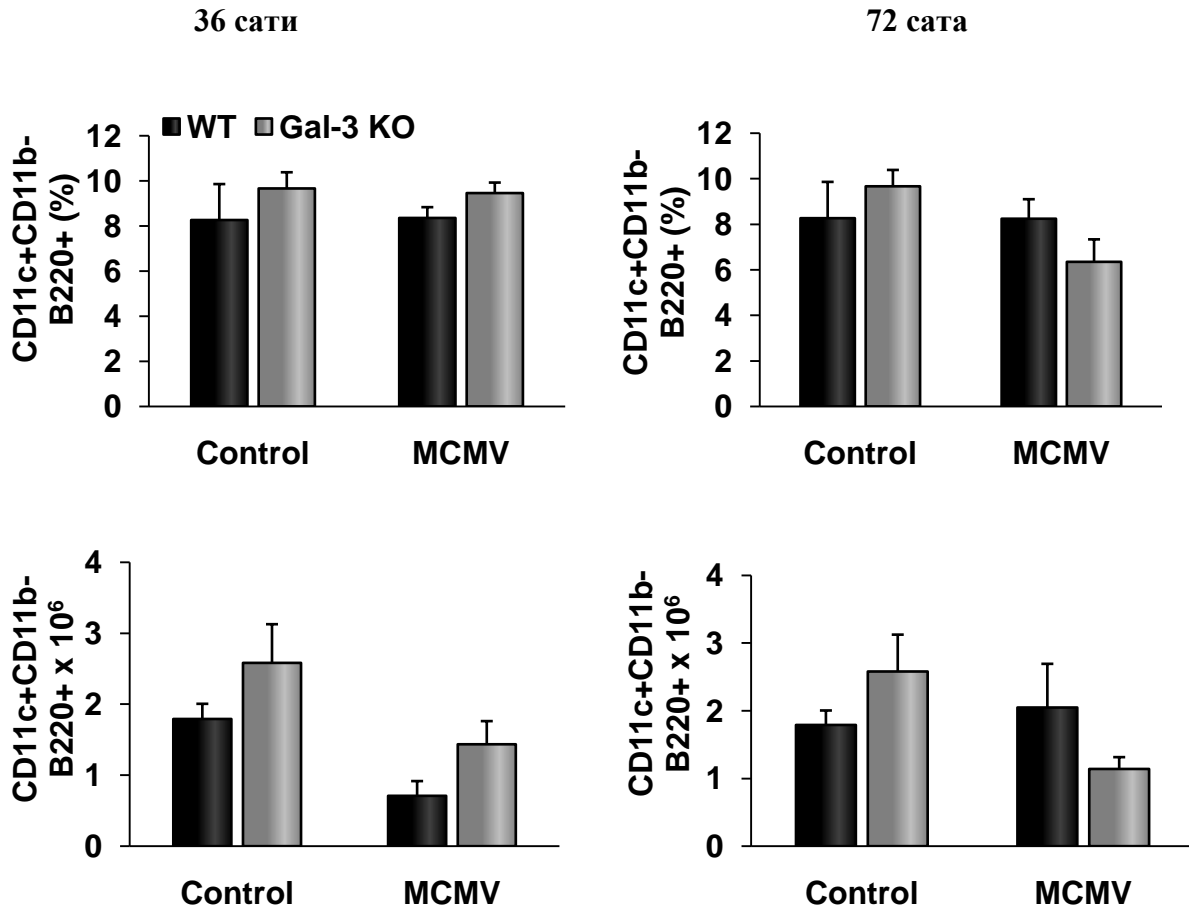
Графикон 33



Графикон 33. У јетрама WT мишева је присутан већи проценат и апсолутни број резидентних ћелија, 72 сата након инфекције MCMV-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE укупног броја и процента CD11b+CD11c-Ly6c- Ly6G- резидентних ћелија по групи, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

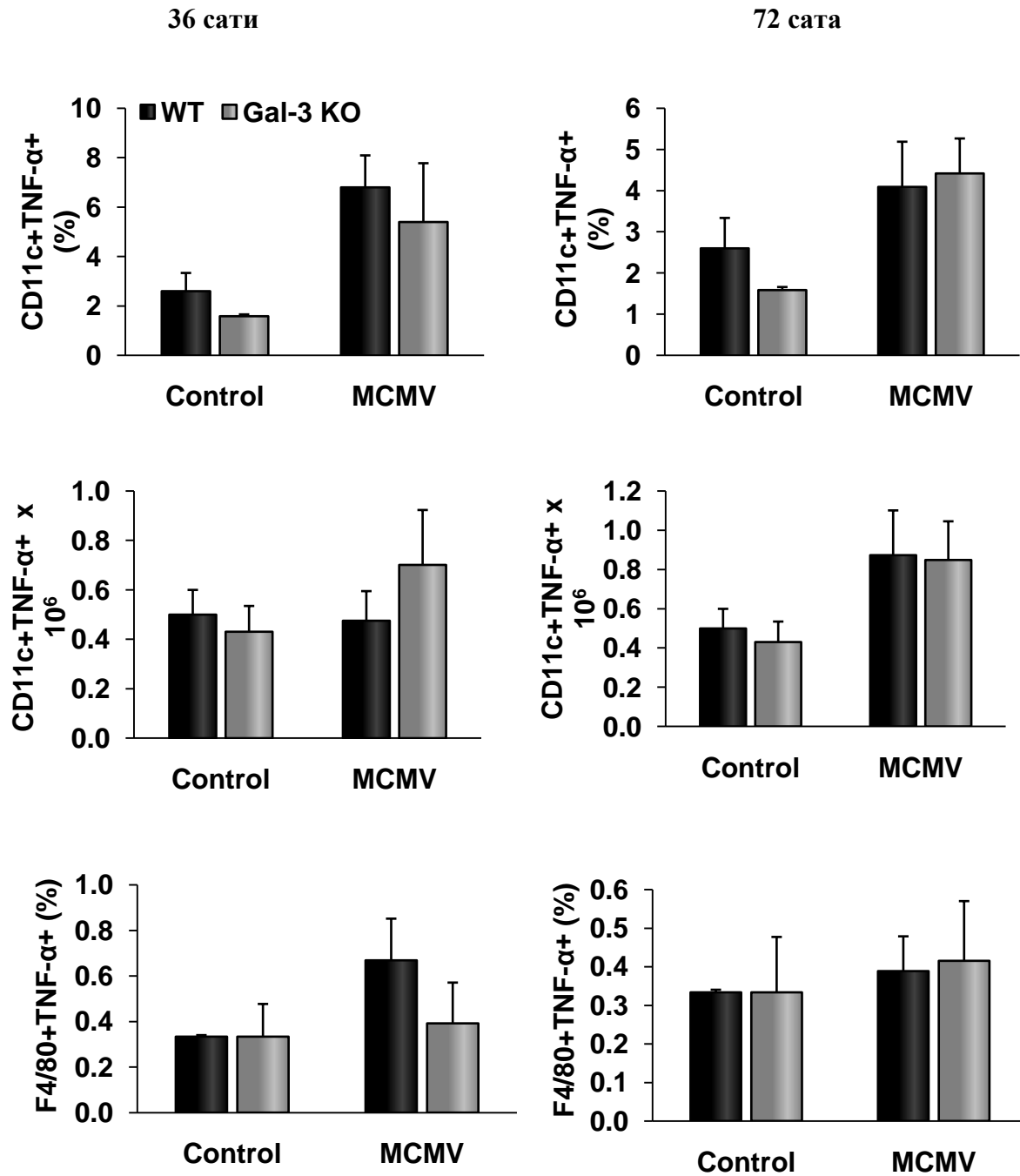
Није било значајне разлике у заступљености CD11c+CD11b-B220+ плазмоцитоидних дендритских ћелија (Графикон 34), CD11c+ дендритских ћелија који експримирају TNF- α и F4/80+ макрофага који експримирају TNF- α у јетри између инфицираних WT и Gal-3 KO мишева (Графикон 35).

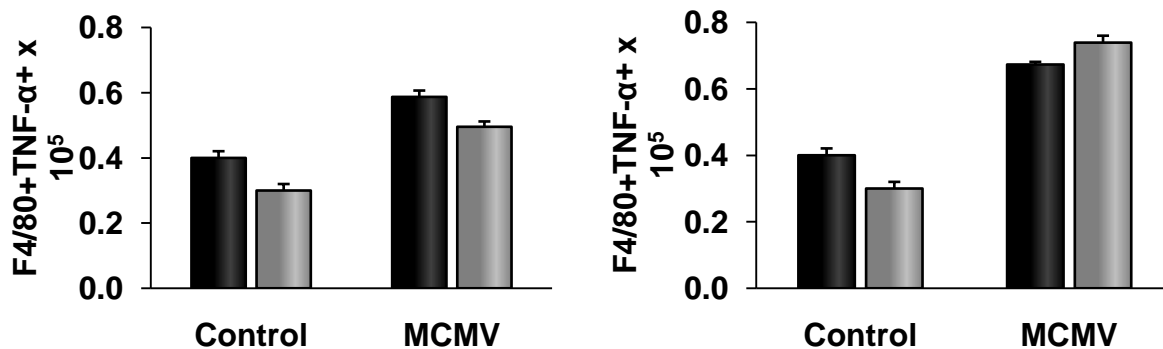
Графикон 34



Графикон 34. Нема разлике у проценту и апсолутном броју плазмоцитоидних дендритских ћелија код WT и Gal-3 KO мишева након MCMV инфекције. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE процента и укупног броја CD11c+CD11b-B220+ плазмоцитоидних дендритских ћелија по групи, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Графикон 35



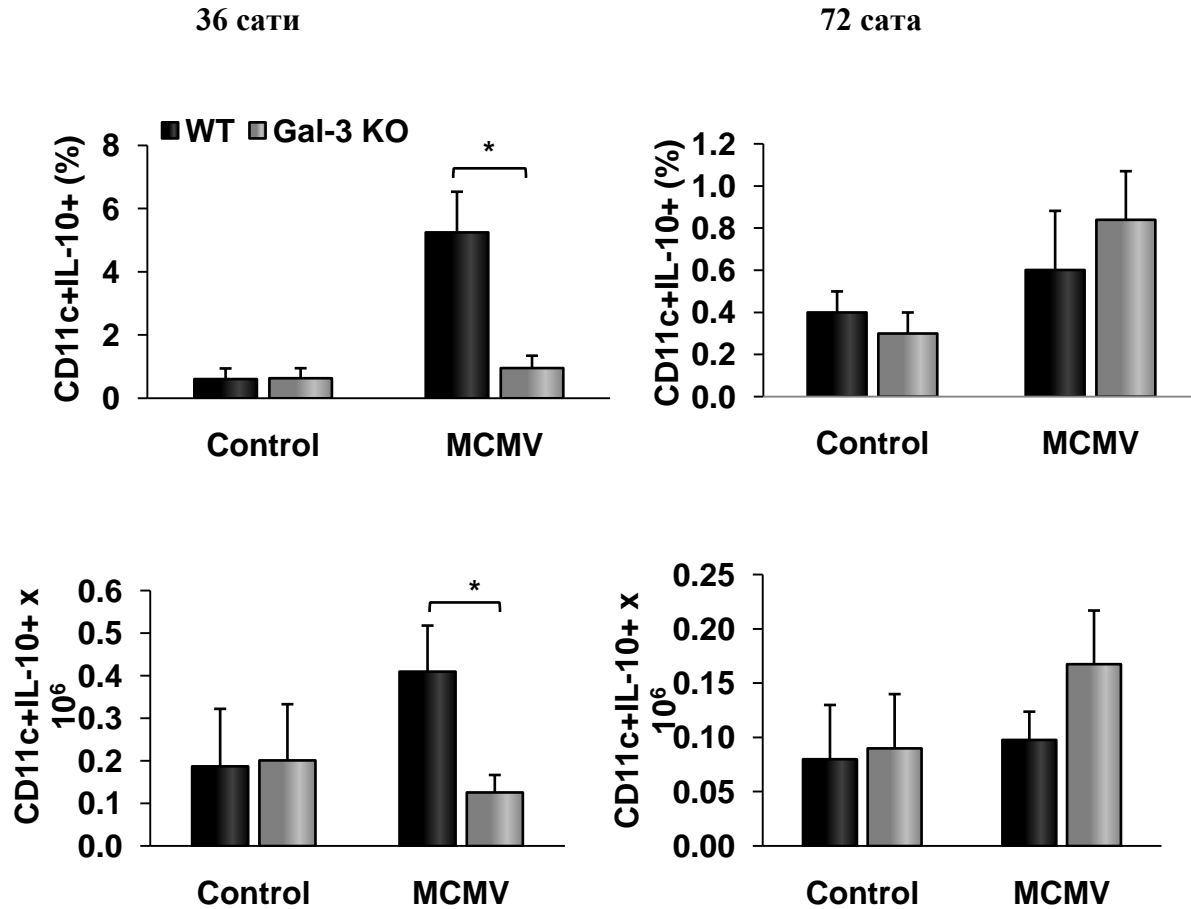


Графикон 35. Нема разлике у проценту и апсолутном броју дендритских ћелија и макрофага који експримирају TNF- α у јетрама инфицираних WT и Gal-3 KO мишева. Методом проточне цитометрије су анализирани мононуклеарне ћелије 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Представљене су средње вредности + SE процента и укупног броја CD11c+ дендритских ћелија који експримирају TNF- α и F4/80+ макрофага који експримирају TNF- α , 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.20. Дефицијенција гена за галектин-3 смањује проценат и број регулаторних дендритских ћелија и макрофага код мишева инфицираних MCMV-ом

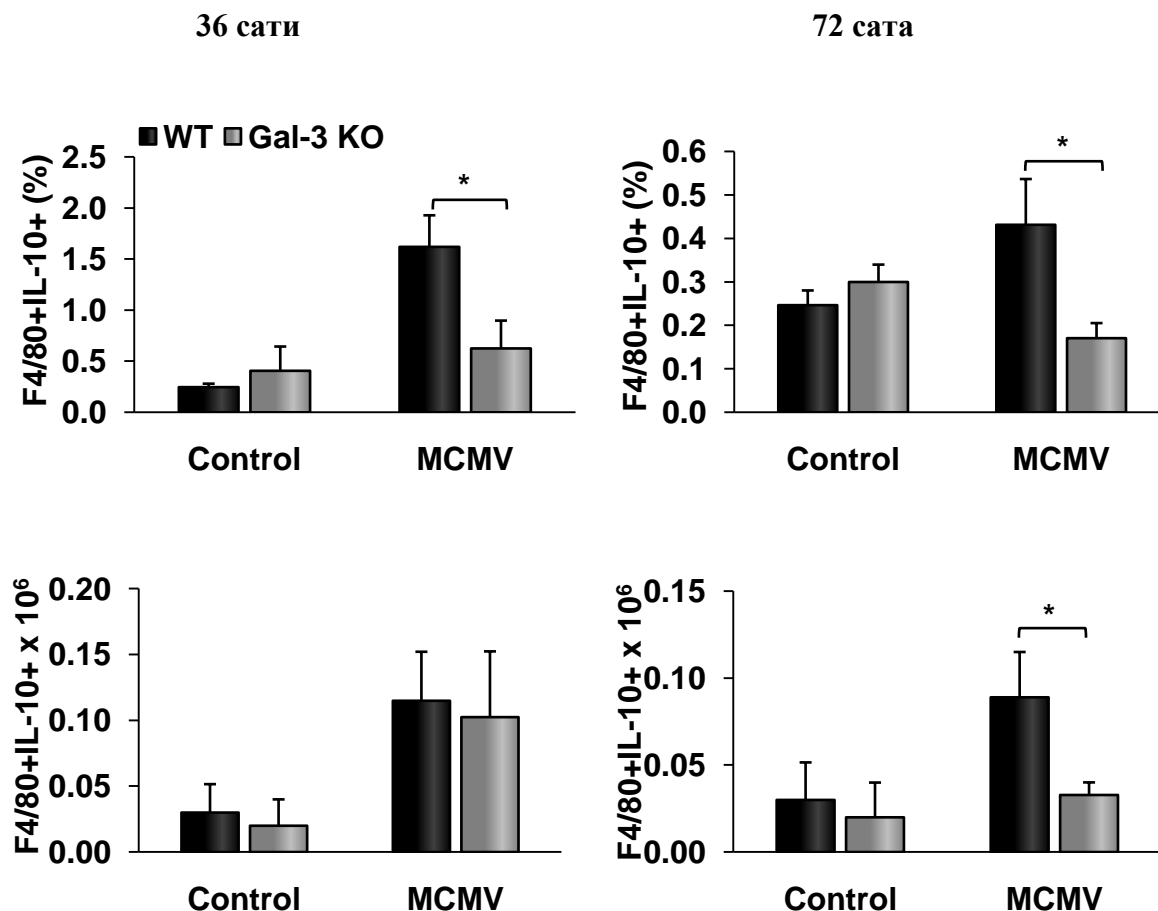
Даљом анализом је испитан проценат и број регулаторних дендритских ћелија и макрофага након инфекције MCMV-ом. Процент и апсолутни број IL-10+ CD11c+ регулаторних дендритских ћелија је већи у јетри WT мишева у односу са процентом и бројем ових ћелија у групи Gal-3 KO мишева, 36 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 36). Процент и апсолутни број IL-10+ F4/80+ регулаторних макрофага је већи у јетри WT мишева у односу са процентом и бројем ових ћелија у групи Gal-3 KO мишева, 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 37). Већи проценат регулаторних дендритских ћелија и макрофага у јетрама инфицираних WT мишева доприноси мањој инфламаци и мањем оштећењу јетре.

Графикон 36



Графикон 36. Дефицијенција галектина-3 смањује проценат регулаторних дендритских ћелија код мишева инфицираних МСМВ-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирани методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције МСМВ-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

Графикон 37



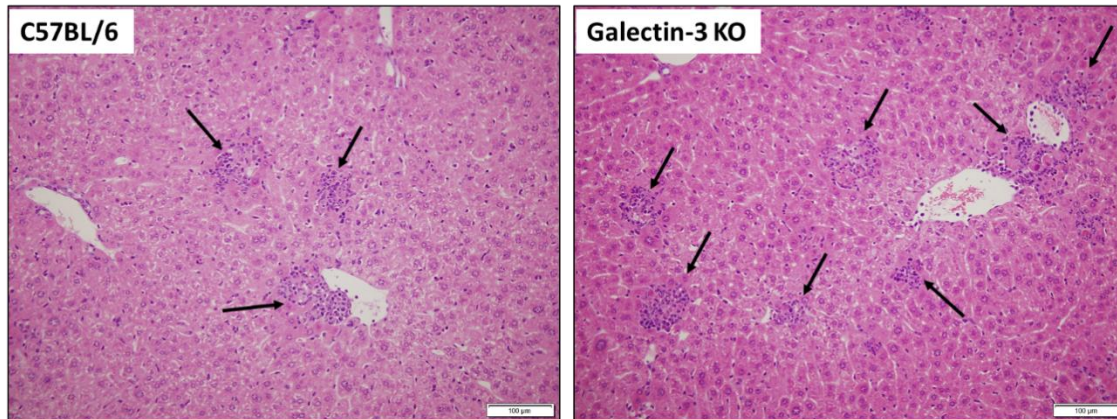
Графикон 37. Дефицијенција галектина-3 значајно смањује проценат и број регулаторних макрофага у јетри мишева инфицираних МСМВ-ом. Мононуклеарне ћелије су анализирание методом проточне цитометрије 36 и 72 сата након инфекције МСМВ-ом. Представљене су средње вредности + SE, 6 мишева по групи. (*Student- t* тест * $p < 0.05$).

4.21. Повећана инфламација и слабија контрола вирусне инфекције у јетри Gal-3 КО мишева није ефекат измењене активности галектин-3 дефицијентних NK ћелија

Да би се искључила улога NK ћелија у већем оштећењу јетре код Gal-3 КО мишева, анализирали смо оштећење јетре код WT и Gal-3 КО мишева након инфекције мутантним сојем MCMV вируса (MCMV Δ m157), којем недостаје m157 протеин који активира NK ћелије. Инфламацијски ћелијски инфилтрати се уочавају у ткиву јетре инфицираних WT и Gal-3 КО мишева (Слика 4). Није било разлике у величини инфилтрата између ове две групе мишева, али број инфилтрата је значајно већи код инфицираних Gal-3 КО мишева (Графикон 38). Да би се потврдило присуство ћелија које су инфициране вирусом, исечци јетре су имунохистохемијски обојени антителом против IE1, протеина MCMV-а. Као што је приказано на Слици 5, у ткиву јетре Gal-3 КО мишева је уочен велики број ћелија које су инфициране вирусом.

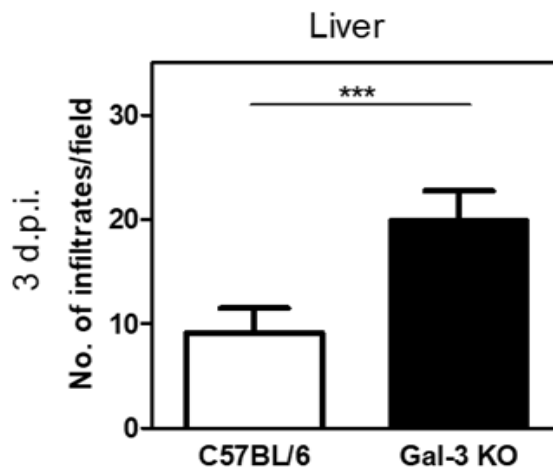
С обзиром на предходни налаз да Gal-3 КО мишеви имају већи број вирусом инфицираних ћелија, желели смо да испитамо титар вируса у различитим органима рано након инфекције. Као што је приказано на Графикону 39А, очекиван вирусни титар је присутан у слезини WT мишева 3 дана након инфекције. Код Gal-3 КО мишева нису уочене битне разлике у вирусном титру у слезини у односу на WT мишеве, 3 дана након инфекције вирусом. Постоји повишени титар вируса у плућима Gal-3 КО мишева, али разлике нису биле статистички значајне. Међутим, у јетри Gal-3 КО мишева постоји статистички значајно повећање вирусног титра у поређењу са WT мишевима 3 дана након инфекције. Вирусни титри у слезини нису детектовани 8 дана после инфекције, изузев ниског вирусног титра код једног Gal-3 КО миша (Графикон 39Б). У плућима, јетри и пљувачним жлездама, детектовани су вирусни титри, али нису забележене статистички значајне разлике између ове две групе мишева (Графикон 39Б).

Слика 4



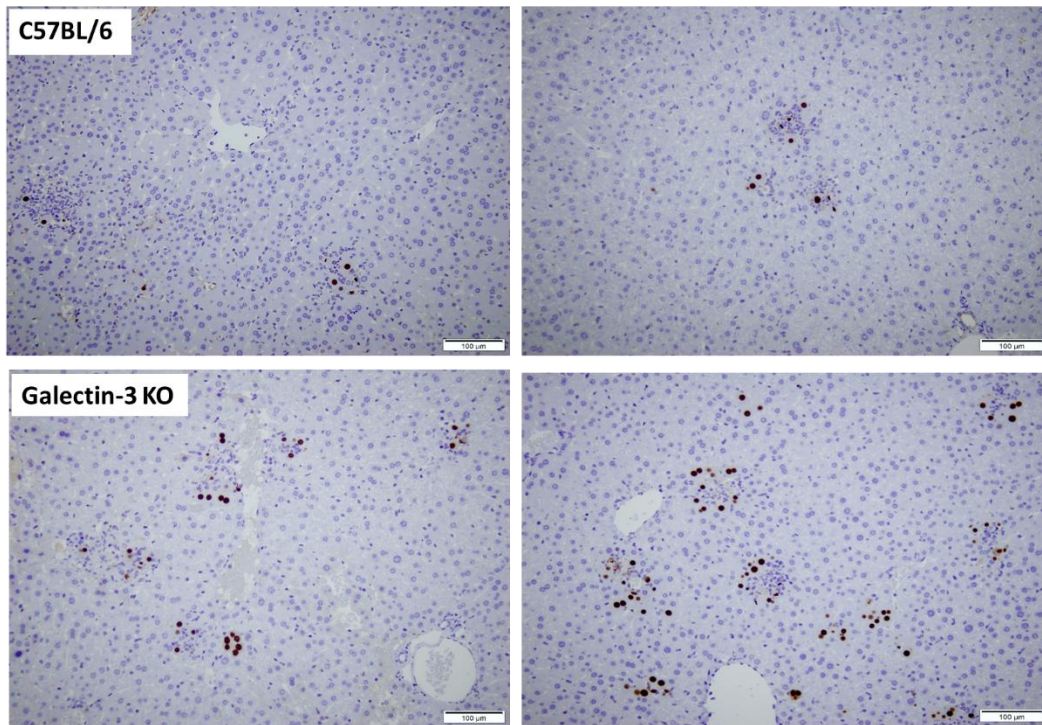
Слика 4. Хистолошки исечци ткива јетре WT и Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције MCMV Δ m157 вирусом. WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.v. MCMV Δ m157 вирусом 2×10^5 PFU/животињи. Ткиво јетре је екстирпирано 72 сата после инфекције MCMV Δ m157 вирусом и исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице означавају инфламацијске ћелијске инфилtrate.

Графикон 38



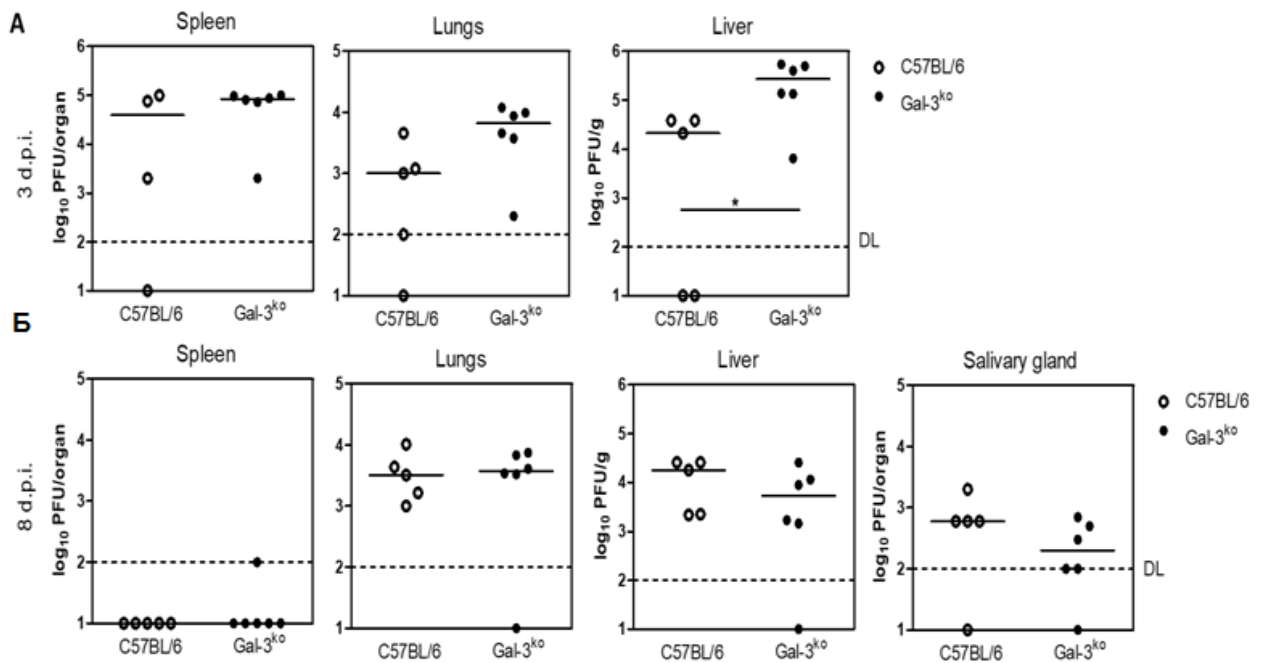
Графикон 36. Инфламацијски ћелијски инфилtrate су бројнији у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV Δ m157 вирусом. Број инфламацијских ћелијских инфилtrate је пребројаван и приказан је као број инфилtrate по пољу + SE. Један репрезентативни експеримент, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест; *** $p < 0.001$).

Слика 5



Слика 5. Имунохистохемијско бојење исечака ткива јетре. Ћелије инфициране вирусом су детектоване анти-IE1 бојењем (приказане браон) и инфициране ћелије су бројније код Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције MCMV Δ m157 вирусом.

Графикон 39



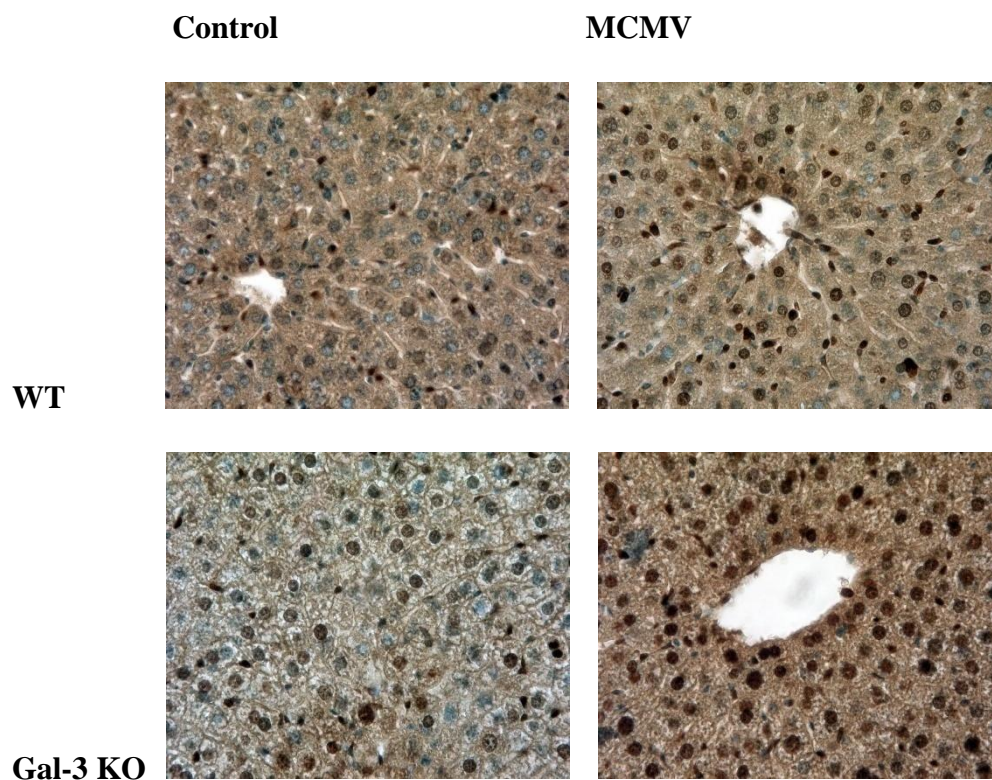
Графикон 39. Gal-3 KO мишеви имају повишене титре вируса рано након инфекције. WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.v. MCMV Δ m157 вирусом 2×10^5 PFU/животињи. Вирусни титри у појединачним органима су одређени стандардним тестом плака 3 дана (А) и 8 дана (Б) након инфекције. Свака тачка представља појединачну животињу, а црта представља средишњи титар вируса.

4.22. Gal-3 KO мишеви инфицирани MCMV-ом имају више апоптотских хепатоцита

Да бисмо даље анализирали оштећење јетре код WT и Gal-3 KO мишева након инфекције MCMV-ом, користили смо TUNEL тест (означавање посредовано терминалом деоксинуклеотидил трансферазом, dUTP) за *in situ* детекцију фрагментације дезоксирибонуклеинске киселине. Као што је приказано на Слици 6 и на Графикону 40, јетре Gal-3 KO мишева садрже значајно већи број апоптотских, TUNEL позитивних хепатоцита 72 сата након инфекције MCMV-ом, у поређењу са јетрама WT мишева. Да бисмо потврдили повећану апоптозу хепатоцита код Gal-3 KO мишева, изоловали смо

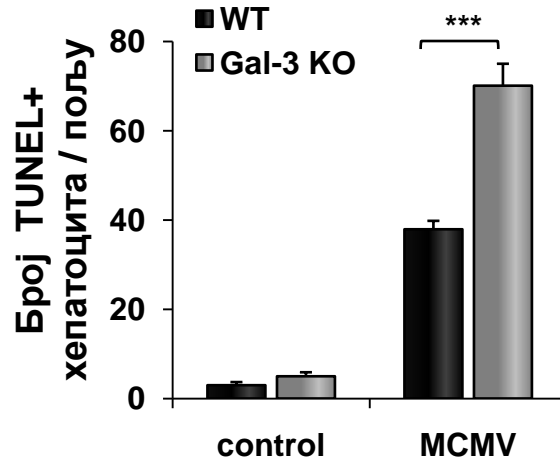
хепатоците из WT и Gal-3 KO мишева 72 сата након MCMV инфекције и одредили смо проценат апоптотских ћелија проточном цитометријом. Детектовали смо статистички значајно већи проценат апоптотских, *Annexin V* позитивних хепатоцита изолованих из инфицираних Gal-3 KO мишева (Графикон 41). Да бисмо још једном потврдили повећану апоптозу хепатоцита код Gal-3 KO мишева, исечци јетре су имунохистохемијски обојени антителом против каспазе 3. Као што је приказано на Слици 7, у ткиву јетре Gal-3 KO мишева је уочен већи број апоптотских, каспаза 3 позитивних ћелија по инфламацијском инфилтрату у поређењу са инфицираним WT мишевима.

Слика 6



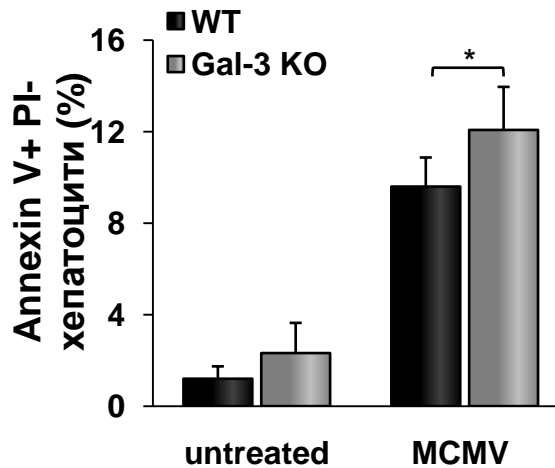
Слика 6. Репрезентативни примери TUNEL позитивних хепатоцита у јетри инфицираних WT и Gal-3 KO мишева 72 сата након MCMV инфекције. TUNEL позитивни хепатоцити имају браон пребојена једра.

Графикон 40



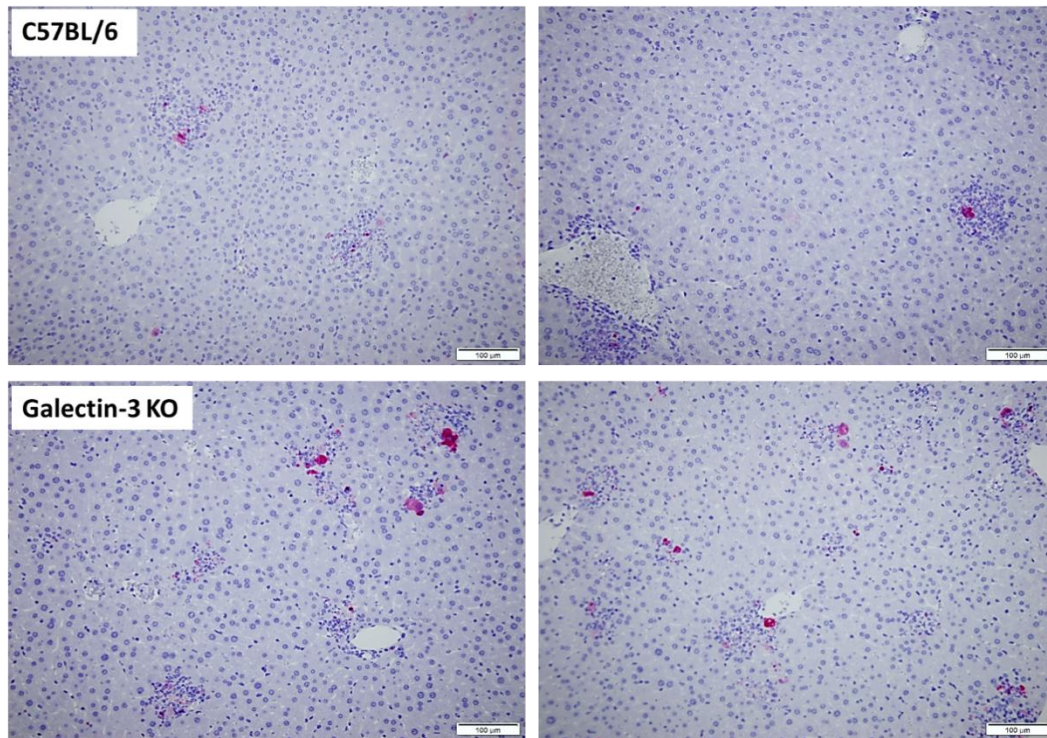
Графикон 40. Број апоптотских, TUNEL позитивних хепатоцита је значајно већи код инфицираних Gal-3 KO мишева. Исечци јетре су обојени TUNEL методом 72 сата после инфекције. TUNEL позитивни хепатоцити (браон једра) су пребројани у пет различитих поља, а подаци су приказани као средњи број TUNEL позитивних хепатоцита + SE, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест *** $p < 0.001$).

Графикон 41



Графикон 41. Процент апоптотских, Annexin V+PI- хепатоцита је значајно већи код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Апоптоза хепатоцита је анализирана методом проточне цитометрије помоћу Annexin V (FITC) и пропидијум јодид двоструког бојења. Подаци су представљени као средња вредност Annexin V+PI- хепатоцита + SE, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест * $p < 0.05$).

Слика 7



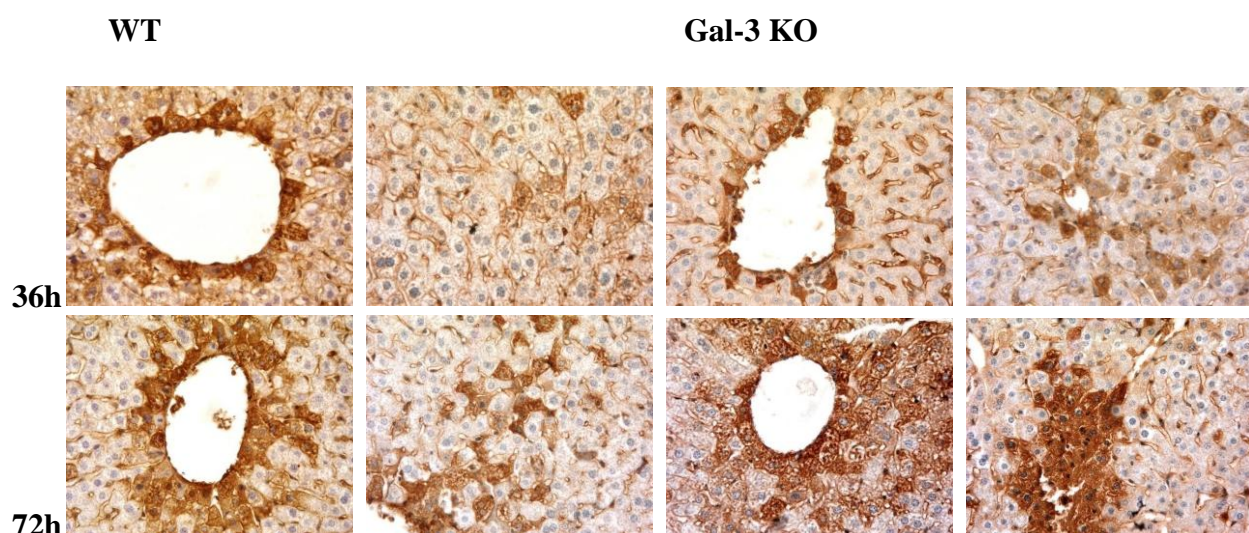
Слика 7. Имунохистохемијско бојење препарата јетре. Апоптотски хепатоцити су детектовани анти-каспаза-3 бојењем (приказани црвеном бојом). Апоптотски хепатоцити су бројнији код Gal-3 KO мишева 72 сата након инфекције MCMV Δ m157 вирусом.

4.23. Експресија TNF- α у хепатоцитима је повећана код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом

Пошто смо утврдили да повећана инфламација и оштећење јетре код Gal-3 KO мишева није последица промењене активности НК ћелија, у наставку истраживања смо анализирали улогу фактора некрозе тумора алфа (TNF- α). Познато је да TNF- α има улогу у одбрани од инфекције MCMV-ом и такође може имати улогу у оштећењу ткива јетре код MCMV инфекције (227). Такође је познато да сигнализација са TNF- α покреће некроптозу (271). У циљу даљег разјашњавања улоге TNF- α код оштећења ткива, урадили смо имунохистохемијско бојење исечака јетре 36 и 72 сата након MCMV инфекције. Експресија TNF- α у хепатоцитима је анализирана након MCMV инфекције код WT и Gal-3 KO мишева. Хепатоцити Gal-3 KO мишева више експримирају TNF- α 36 и 72 сата након

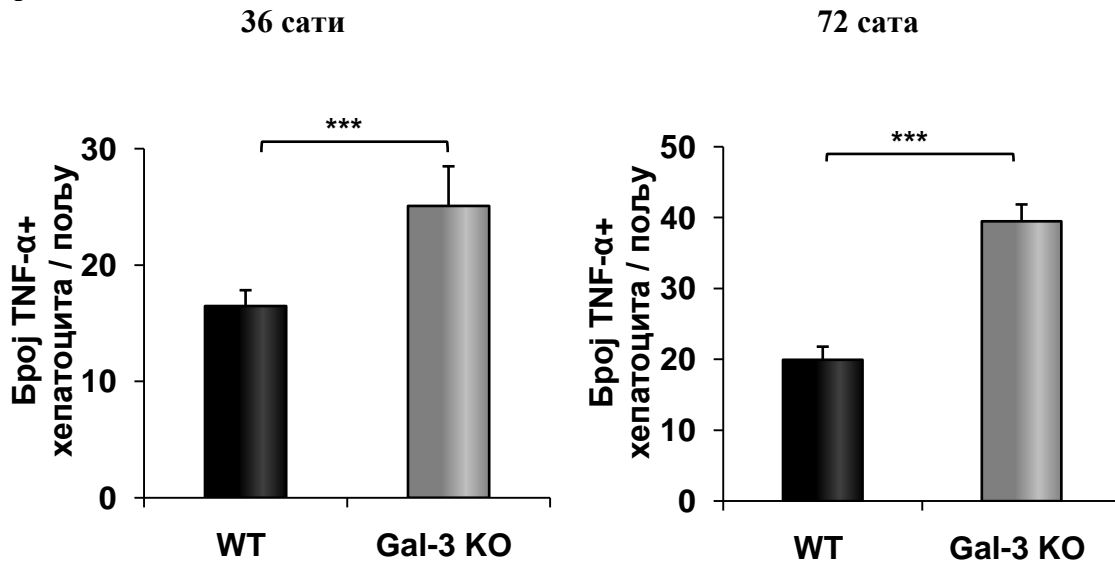
MCMV инфекције, у поређењу са хепатоцитима WT мишева (Слика 8). Број TNF- α позитивних хепатоцита је већи код инфицираних Gal-3 KO мишева у односу на инфициране WT мишове, 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 42). Такође, концентрација TNF- α у хомогенату ткива јетре је већа у групи Gal-3 KO мишева, 72 сата након MCMV инфекције (Графикон 43). Даље, значајно већи проценат TNF- α + хепатоцита анализиран проточном цитометријом је пронађен у групи Gal-3 KO мишева који су инфицирани MCMV-ом 72 сата након инфекције, у поређењу са инфицираним WT мишевима (Графикон 44). У складу са улогом NF- κ B у промовисању експресије TNF- α и његове улоге у функцијама које су посредоване TNF- α , статистички значајно већи проценат NF- κ B+ хепатоцита је уочен код Gal-3 KO мишева, 72 сата након инфекције (Графикон 44). Ови резултати сугеришу да већа експресија TNF- α у хепатоцитима може бити узрок повећане смрти хепатоцита која је индукована MCMV-ом у групи Gal-3 KO мишева.

Слика 8



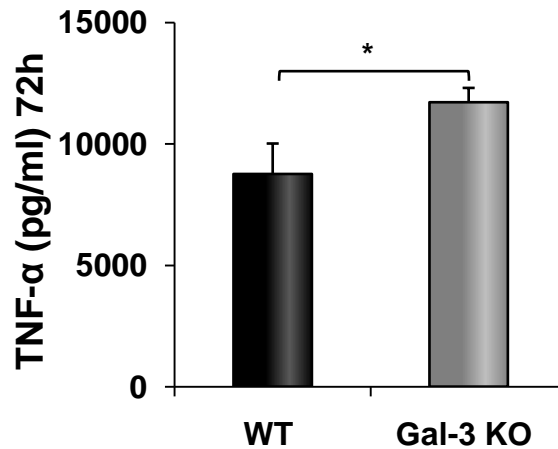
Слика 8. Имунохистохемијско бојење препарата јетре. TNF- α + хепатоцити су бројнији код Gal-3 KO мишева 36 сати и 72 сата након инфекције MCMV-ом.

Графикон 42



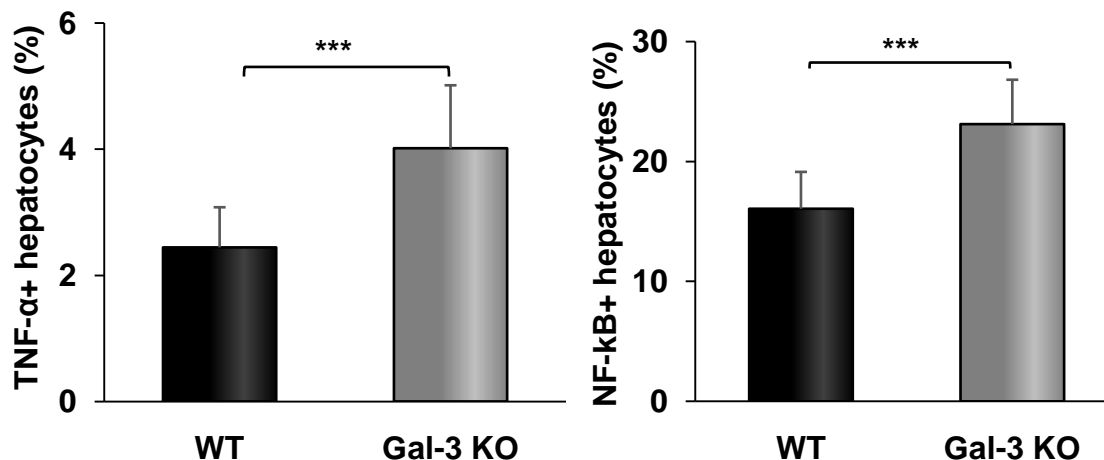
Графикон 42. Број TNF- α позитивних хепатоцита је значајно већи код Gal-3 KO мишева 36 и 72 сата након инфекције MCMV-ом. Исечци јетре инфицираних мишева обе групе су 36 и 72 сата после инфекције имунохистохемијски обојени. TNF- α позитивни хепатоцити су пребројани у пет различитих поља, а подаци су приказани као средњи број TNF- α позитивних хепатоцита + SE, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест *** p <0.001).

Графикон 43



Графикон 43. У хомогенату ткива јетре инфицираних Gal-3 KO мишева статистички је значајно већа концентрација TNF- α . Концентрација TNF- α у хомогенату ткива јетре је одређена ELISA методом 72 сата после инфекције MCMV-ом. Подаци су представљени као средња вредност TNF- α + SD, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест * p <0.05).

Графикон 44

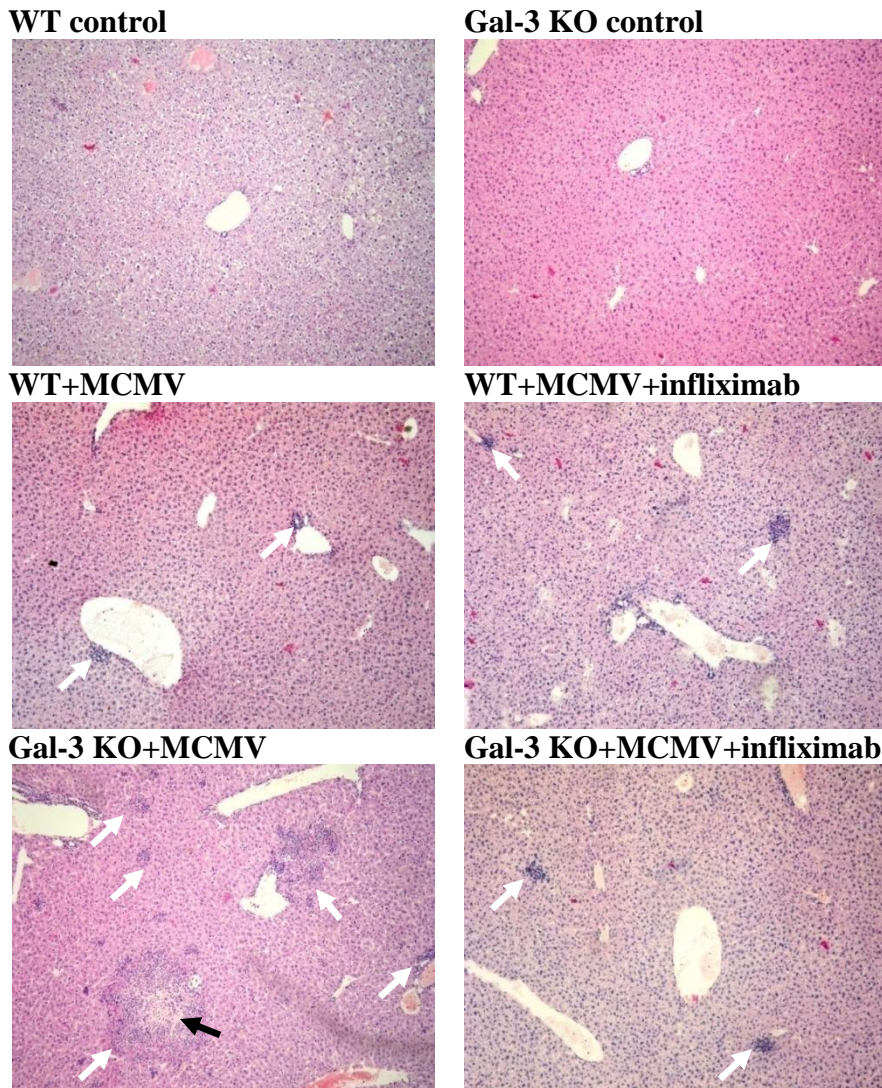


Графикон 44. Gal-3 KO мишеви имају статистички значајно већи проценат TNF- α + хепатоцита и NF- κ B+ хепатоцита 72 сата након инфекције MCMV-ом. Процент TNF- α + и NF- κ B+ хепатоцита је одређен проточном цитометријом 72 сата након инфекције MCMV-ом. Подаци су представљени као средња вредност TNF- α + и NF- κ B+ хепатоцита + SE, 6 мишева по групи. (*Student-t* тест *** $p < 0.001$).

4.24. Инхибиција везивања TNF- α ублажава хепатитис индукован MCMV-ом

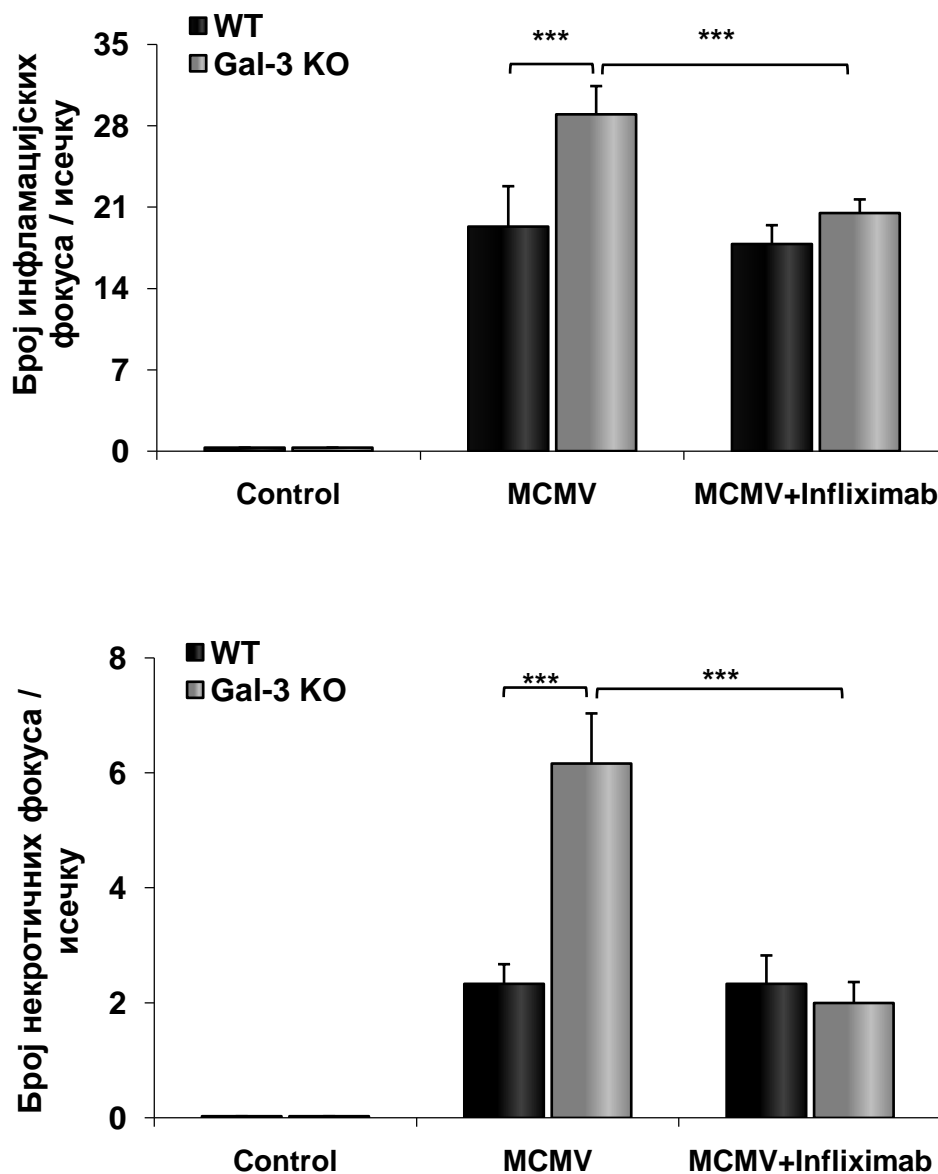
Да би се истражила улога TNF- α у оштећењу ткива јетре након инфекције MCMV-ом, обављена је фармаколошка инхибиција TNF- α инфликсимабом један сат пре инфекције MCMV-ом. Претретман инфликсимабом код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом значајно је смањило инфламацију и некрозу јетре (Слика 9 и Графикон 45). Јетре Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом садрже веће инфламацијске и некротичне фокусе у поређењу са јетрама мишева код којих је примењен инфликсимаб пре инфекције MCMV-ом (Слика 9). Такође, блокада TNF- α пре инфекције MCMV-ом статистички је значајно смањила серумске нивое ALT-а код Gal-3 KO мишева (Графикон 46). Блокада TNF- α пре MCMV инфекције није променила инфламацију и некрозу јетре код WT мишева (Графикон 45). Блажи хепатитис изазван MCMV-ом код Gal-3 KO мишева третираних инфликсимабом подржава улогу TNF- α у тежем обољењу код Gal-3 дефицијентних животиња.

Слика 9



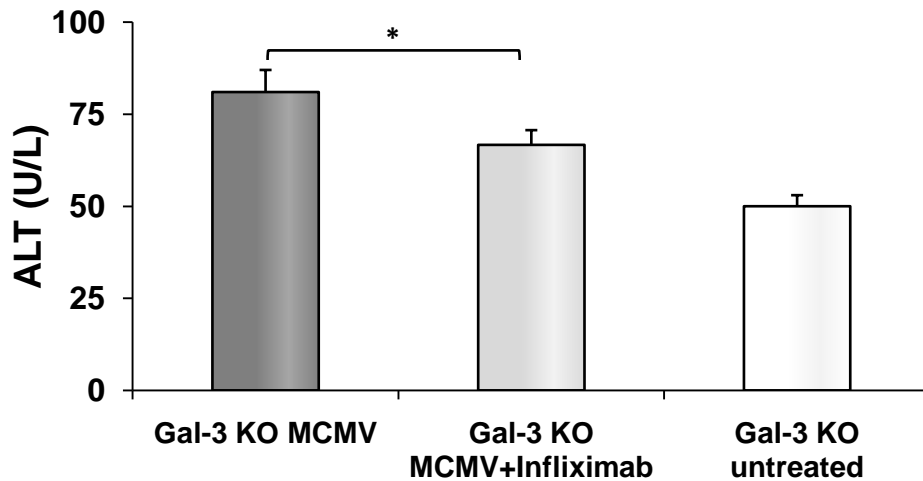
Слика 9. Блокада $\text{TNF-}\alpha$ смањује инфламацију и некрозу јетре код Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. WT и Gal-3 KO мишеви су инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Химерично моноклонско антитело, инфликсимаб је примењено у дози од 5 mg/kg i.p. један сат пре инфекције MCMV-ом. Мишеви су жртвовани 48 сати након инфекције, екстирпирано је ткиво јетре и исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице наглашавају некротична поља, а беле стрелице указују на инфламацијске фокусе.

Графикон 45



Графикон 45. Блокада TNF- α смањује број инфламацијских и некротичних фокуса у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројаван и приказан је као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест; *** $p < 0.001$).

Графикон 46



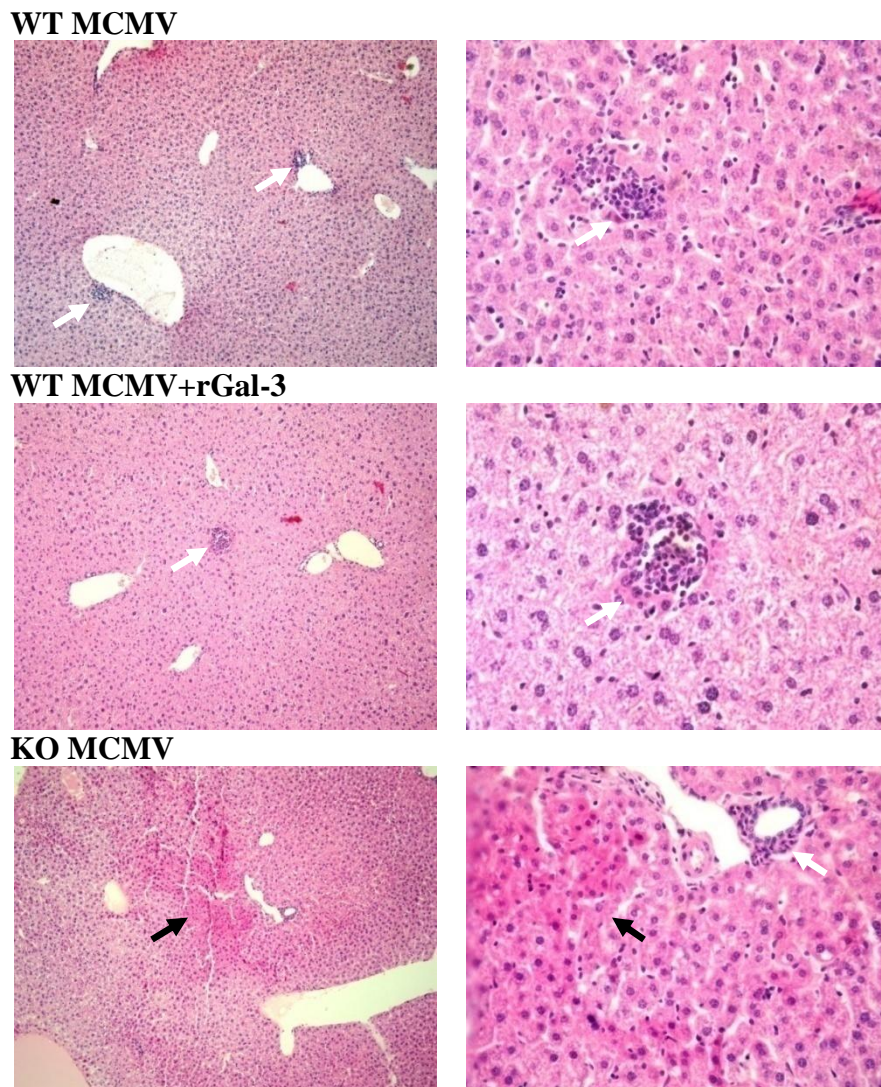
Графикон 46. Серумска концентрација ALT је значајно мања код инфицираних Gal-3 KO мишева третираних инфликсимабом. Концентрације ензима јетре у серуму су одређиване колориметријском методом 48 сати након инфекције MCMV-ом. Представљена је средња вредност ALT + SE, 5 мишева по групи. (*Student-t* тест; *** $p < 0.001$).

4.25. Егзогени галектин-3 ублажава оштећење јетре које је изазвано MCMV-ом

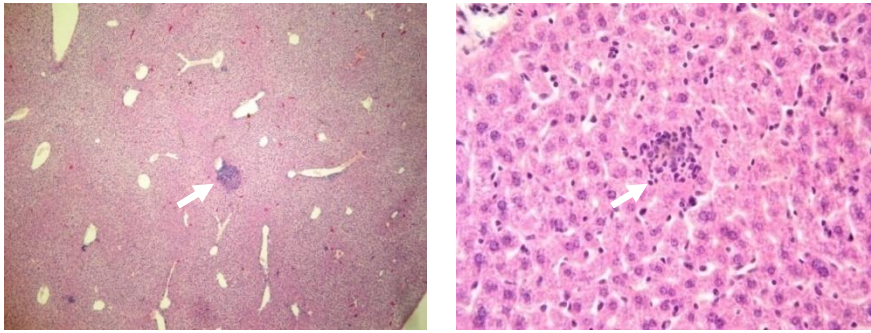
Да бисмо потврдили заштитну улогу галектина-3 на тежину болести у хепатитису који је индукован MCMV-ом код WT и Gal-3 KO мишева и да бисмо видели какав би ефекат имала примена рекомбинантног галектина-3 на патогенезу ове болести, мишевима смо интраперитонеално апликовали рекомбинантни галектин-3 у дози од 50 μ g/ml два сата пре инфекције. Примена рекомбинантног галектина-3 није променила инфламацију и некрозу јетре код WT мишева (Слика 10). Gal-3 KO мишеви третирани рекомбинантним галектином-3 су имали ниже хистолошке скорове некрозе и инфламације, 72 сата након MCMV инфекције (Графикон 47). Такође, Gal-3 KO мишеви који су пре инфекције третирани рекомбинантним галектином-3, имали су мањи број инфламацијских и некротичних фокуса по исечку (Графикон 48). Третман рекомбинантним галектином-3 није променио број инфламацијских фокуса у јетри код WT мишева, већ је индуковао

повећање њихове величине (Слика 10, беле стрелице). Мањи број некротичних поља је уочен у јетрама Gal-3 КО мишева третираних рекомбинантним галектином-3 пре инфекције, у поређењу са Gal-3 КО мишевима који су само инфицирани МСМV-ом (Слика 10, црне стрелице). Блажа болест код Gal-3 КО мишева третираних рекомбинантним галектином-3 потврђује заштитну улогу галектина-3 у хепатитису индукованом МСМV-ом.

Слика 10

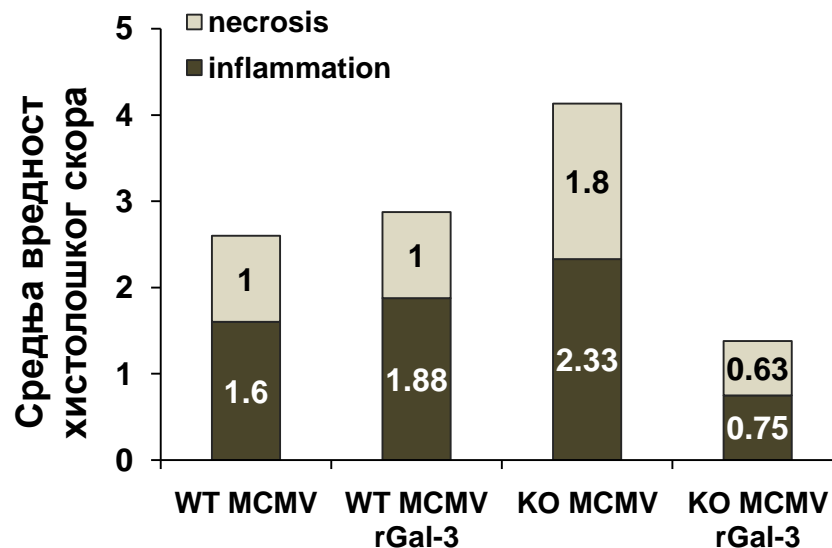


КО MCMV+rGal-3



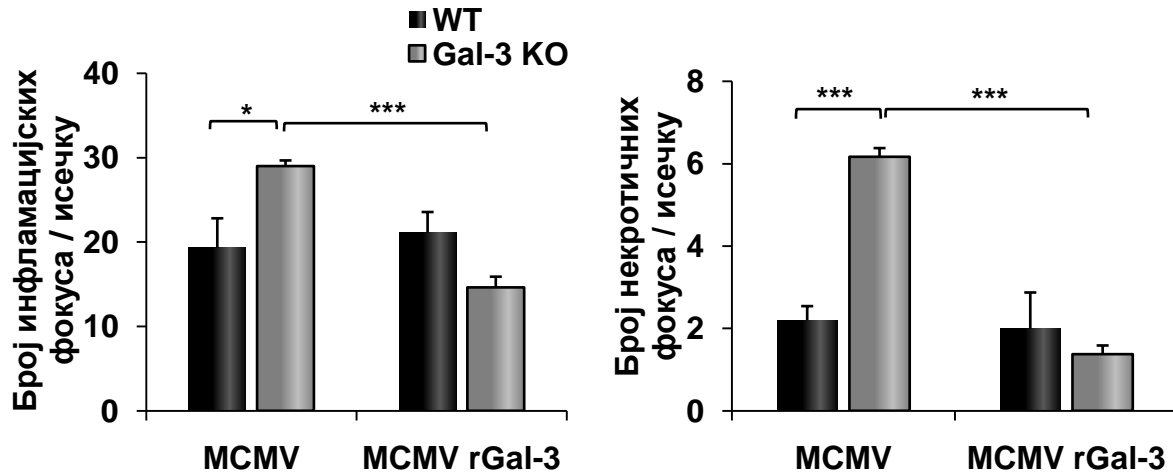
Слика 10. Егзогени галектин-3 ублажава хепатитис изазван МСМV-ом. WT и Gal-3 КО мишеви су инфицирани i.p. МСМV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Рекombинантни галектин-3 је примењен у дози од $50 \mu\text{g/ml}$ i.p два сата пре инфекције МСМV-ом. Мишеви су жртвовани 72 сата након инфекције, екстирпирано је ткиво јетре и исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице наглашавају некротична поља, а беле стрелице указују на инфламацијске фокусе.

Графикон 47



Графикон 47. Примена рекомбинантног галектина-3 пре инфекције МСМV-ом је смањила инфламацију и некрозу у јетри Gal-3 КО мишева. Јетра је екстирпирана 72 сата након инфекције МСМV-ом, исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Представљен је хистолошки скор (средња вредност + SE), 2 одвојена експеримента, 8 мишева по групи.

Графикон 48



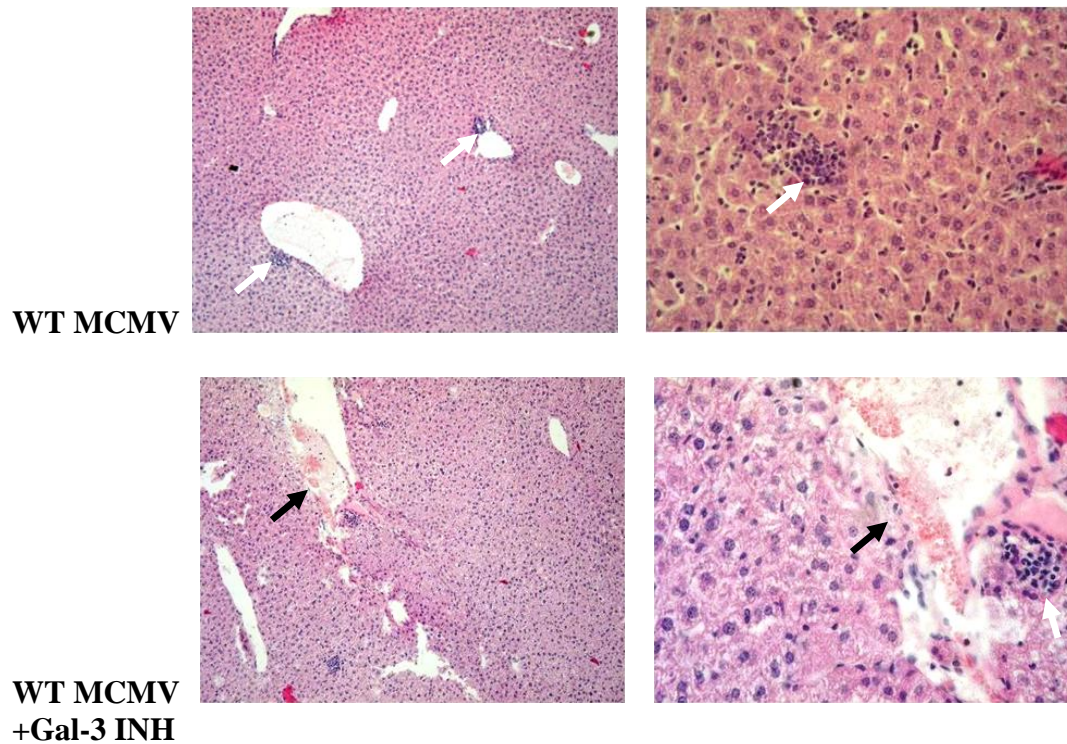
Графикон 48. Примена рекомбинантног галектина-3 смањује број инфламацијских и некротичних фокуса у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројаван и приказан је као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 8 мишева по групи. (*Student- t* тест; * $p < 0.05$).

4.26. Инхибитор галектина-3 (Gal-3INH) значајно повећава некрозу јетре код WT мишева након инфекције MCMV-ом

Након што је показано да галектин-3 може деловати протективно у моделу хепатитиса изазваног MCMV-ом, у даљем истраживању је анализирано да ли употреба инхибитора галектина-3 може повећати оштећење јетре. Како би се истражио ефекат инхибитора галектина-3 на ток хепатитиса после инфекције MCMV-ом, WT мишевима је апликован Gal-3INH интраперитонеално у дози од 300 μ g, два сата пре MCMV инфекције. Хистолошки параметри болести праћени су у групи инфицираних WT мишева који су примили инхибитор галектина-3 и упоређивани су са групом WT мишева који су само инфицирани MCMV-ом. У јетрама WT мишева инфицираних MCMV-ом и третираних инхибитором галектина 3 је детектовано значајно веће оштећење јетре (Слика 11). WT мишеви третирани Gal-3INH су имали веће средње вредности хистолошких скорова некрозе, 72 сата након инфекције MCMV-ом (Графикон 49). Такође, WT мишеви који су

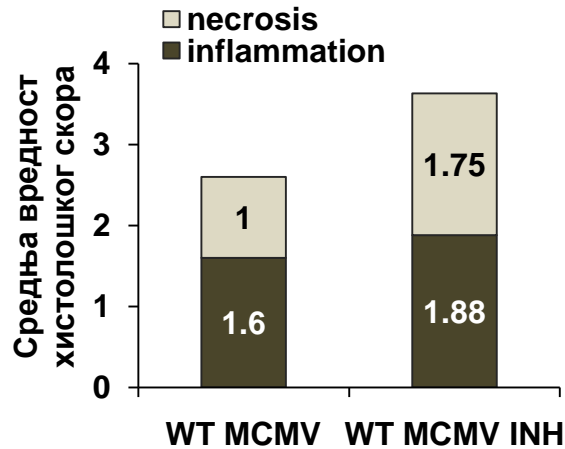
пре инфекције третирани Gal-3INH, су имали значајно већи број некротичних фокуса по исечку (Графикон 50).

Слика 11



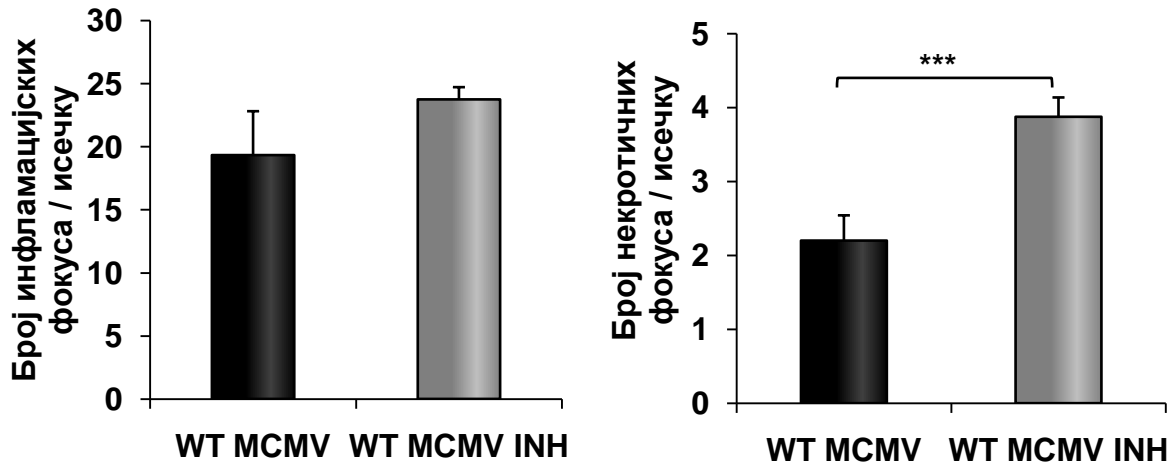
Слика 11. Инхибитор галектина-3 значајно повећава некрозу јетре код WT мишева након инфекције MCMV-ом. WT мишеви су инфицирани i.p. MCMV-ом са 1×10^5 PFU/животињи. Gal-3INH је примењен у дози од $300 \mu\text{g}$ i.p два сата пре инфекције MCMV-ом. Мишеви су жртвовани 72 сата након инфекције, екстирпирано је ткиво јетре и исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Црне стрелице наглашавају некротична поља, а беле стрелице указују на инфламацијске фокусе.

Графикон 49



Графикон 49. Примена Gal-3INH пре инфекције MCMV-ом повећава некрозу јетре код WT мишева. Ткиво јетре WT мишева је екстирпирано 72 сата после инфекције MCMV-ом, исечци су бојени техником хематоксилин-еозин. Представљен је хистолошки скор (средња вредност + SE), један независни експеримент, 8 мишева по групи.

Графикон 50



Графикон 50. Примена Gal-3INH је значајно повећала број некротичних фокуса у јетри WT мишева инфицираних MCMV-ом. Број инфламацијских и некротичних фокуса је пребројаван и приказан је као број фокуса по исечку + SE. Један репрезентативни експеримент, 8 мишева по групи. (*Student-t* тест; *** $p < 0.001$).

5. ДИСКУСИЈА

Дефицијенција галектина-3 је удружена са тежом формом хепатитиса који је изазван WT MCMV вирусом и са повећаним титром вируса у јетри

Неколико клиничких студија указују на повишене серумске нивое галектина-3 код вирусних инфекција (272, 273), и указују на то да је галектин-3 потенцијални маркер вирусних инфекција (147). Налази добијени у анималном моделу повреде срца која је индукована коксаки вирусом В3 код C57BL/6 мишева указују на заштитну улогу галектина-3 у болестима које су индуковане вирусима (274). У овом истраживању је показано да делеција гена за галектин-3 молекул изазива убрзано оштећење јетре које је изазвано инфекцијом MCMV-ом. Код C57BL/6 мишева, делеција гена за галектин-3 повећава обољење јетре које се одликује већим инфилтратима у јетри и већом некрозом јетре (Слика 3, Графикон 23), повишеним серумским нивоима ALT-а (Графикон 24), повећаном апоптозом и некроптозом хепатоцита (Слика 6, 7, Графикон 40, 41), већим вирусним титрима (Графикон 39) и већим бројем ћелија инфицираних MCMV-ом у јетри (Слика 5). Претретман Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом са рекомбинантним Gal-3 смањује инфламацију и оштећење јетре у хепатитису који је индукован MCMV-ом (Слика 10). Различити ефекти галектина-3 у различитим инфламацијским стањима зависе од доминантних патогенетских механизма који су укључени. Код кардитиса који је посредован макрофагима и срчане фиброзе која је изазвана коксаки вирусом В3 делеција гена за галектин-3 или фармаколошка инхибиција галектина-3, има протективну улогу (274). Раније је објављено да делеција гена за галектин-3 атенуира хепатитис који посредован Т лимфоцитима и NKT ћелијама (127, 268). У складу са налазом ове студије је и следећи рад где делеција гена за галектин-3 погоршава примарну билијарну цирозу која је изазвана ксенобиотиком услед повећане апоптозе хепатоцита и ослобађања аутоантигена (130).

Повећана инфламација и слабија контрола вирусне инфекције у јетри Gal-3 КО мишева је независна од активације NK ћелија

NK ћелије играју битну улогу у раном имунском одговору на инфекцију мишијим цитомегаловирусом и утичу на клиренс МСМV-а код C57BL/6 мишева (235). NK ћелије такође доприносе оштећењу јетре у вирусним инфекцијама (270). Галектин-3 експримиран на NK ћелијама углавном нисходно регулише њихове инфламацијске и цитотоксичне активности (267). У супротности са овим радом су резултати из ове студије где веће оштећење јетре код Gal-3 КО мишева није било праћено већом активношћу NK ћелија (Графикон 27 и 28). Показано је да WT мишеви имају већи инфлукс NK ћелија у јетру (Графикон 27). У јетрама WT мишева је примећен већи укупни број NK ћелија које експримирају IFN- γ и нижи укупни број NK ћелија које експримирају IL-10 (Графикон 28), што указује да нижи вирусни титри у јетрама WT мишева могу бити резултат повећане активности NK ћелија.

Одсуство учешћа NK ћелија у већем оштећењу јетре код Gal-3 КО мишева је потврђено у експериментима са инфекцијом мутантним сојем вируса МСМV Δ m157. Стимулација активационог Ly49H рецептора на NK ћелијама са m157 протеином кодираним МСМV-ом, има кључну улогу у раној контроли МСМV-а и резистенцији на инфекцију МСМV-ом (233). Делеција гена за m157 протеин или блокада Ly49H активационог рецептора на NK ћелијама укида контролу МСМV инфекције у већини органа (234, 243, 275, 276). У овом истраживању је показано да је већи број инфилтрата присутан у јетрама Gal-3 КО мишева инфицираних са МСМV Δ m157 у односу на јетре инфицираних WT мишева (Слика 4, Графикон 38) сугерише да већа активност NK ћелија нема важну улогу у већем оштећењу јетре код Gal-3 КО мишева.

Експресија TNF- α у хепатоцитима је повећана код Gal-3 КО мишева инфицираних МСМV-ом

Акутна МСМV инфекција генерише рани системски инфламацијски одговор који карактеришу високи нивои TNF- α , IL-12, IFN- γ и интерферона тип I (21, 277). TNF- α посредује у оштећењу јетре које је индуковано МСМV-ом независно од Т лимфоцита и

NK ћелија. TNF- α је неопходан за развој раних хепатичних некротичних жаришта и повишених нивоа ензима јетре (227). Резултати из ове студије показују да су хепатоцити значајан извор TNF- α у MCMV инфекцији (Слика 8). Иако је TNF- α традиционално описан као цитокин којег секретују ћелије урођеног имунског система (246), ткивно-специфичне ћелије такође продукују TNF- α (278-280). Продукција TNF- α у јетрама мишева инфицираних MCMV-ом зависи од сигнализације са TLR3, TLR7 и TLR9 (281, 282), као и од активности MAPK-активираних протеинске киназе 2 (283). У овој студији су уочени хепатоцити инфицирани MCMV-ом (Слика 5) и претпостављено је да MCMV директно стимулише производњу TNF- α у хепатоцитима. Детектована је већа експресија TNF- α и већи број хепатоцита који експримирају TNF- α у јетри Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом (Слика 8, Графикон 42). Поред тога, блокада TNF- α моноклонским антителом *Infliximabom*, значајно је редуковала смрт хепатоцита код мишева инфицираних MCMV-ом, посебно код Gal-3 KO мишева (Слика 9). TNF- α сензибилише хепатоците на апоптозу која је зависна од каспазе и на апоптозу која је независна од каспазе (284) и покреће некроптозу (271). Према томе, може се претпоставити да TNF- α порекла из хепатоцита игра значајну улогу у оштећењу јетре које је индуковано MCMV-ом. Узимајући у обзир ова запажања, изгледа да већа производња TNF- α у хепатоцитима Gal-3 KO мишева инфицираних MCMV-ом доприноси већем оштећењу јетре.

Инфекција MCMV-ом повећава експресију галектина-3 у хепатоцитима

Нормални хепатоцити не експримирају галектин-3 код људи (130), али експресија галектина-3 је повећана код различитих обољења јетре (285). У овој студији је утврђено да нема експресије галектина-3 у хепатоцитима нетретираних мишева и показано је постојање временски зависног повећања експресије галектина-3 у хепатоцитима WT мишева инфицираних MCMV-ом (Слика 2). Овај налаз је у складу са претходно објављеним радовима који показују повећану експресију галектина-3 у ткиву ЦНС-а код мишева након енцефаломиокардитиса који је изазван вирусном инфекцијом (147) и у микроглији и астроцитима мишева инфицираних са *Junin* вирусом (146). Недавно је показано да TNF- α повећава експресију галектина-3 (286), што указује да експресија

галектина-3 која је индукована MCMV-ом у хепатоцитима може бити резултат продукције TNF- α која је узрокована вирусом.

Gal-3 КО мишеви инфицирани MCMV-ом имају више апоптотских хепатоцита

Делеција гена који кодира галектин-3 сензибилише хумане кератиноците, ћелије колоректалног карцинома, леукемијске ћелије, ћелије хуманог карцинома бубрега и ћелије холангиокарцинома на апоптозу (132, 287-289), док прекомерна експресија галектина-3 штити ћелије од апотозе (290). Галектин-3 инхибира лиганд који изазива апоптозу који је повезан са TNF- α , TRAIL лиганд (енгл. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL), индукујући апоптозу активацијом PI3K/Akt пута који блокира губитак митохондријалног мембранског потенцијала, што резултира у инхибицији активације каспазе-9 и каспазе-3 (291). У складу са тим, пронађен је већи проценат TNF- α позитивних хепатоцита (Графикон 44) и већи проценат апоптотичних хепатоцита код Gal-3 КО мишева који су инфицирани MCMV-ом (Слика 6, Графикон 40, 41). Такође, у овој студији је пронађено значајно веће ослобађање HMGB1 (Графикон 25) и значајно већи проценат калретикулин позитивних хепатоцита (Графикон 26), маркера некроптотичне смрти (292), у јетрама инфицираних Gal-3 КО мишева. HMGB1 се везује за неколико рецептора на површини ћелија имунског система (TLR2, TLR4, RAGE) и посредује јакој инфламацији (293), док се изложени калретикулин везује за рецепторе на ћелијама које презентују антиген и стимулише фагоцитозу (294). Претпоставља се да је већа некроптоза хепатоцита код Gal-3 дефицијентних мишева, рано након инфекције MCMV-ом, праћена већим отпуштањем HMGB1, повећаном инфламацијом јетре и продукцијом TNF- α у ћелијама урођеног имунског система, која затим активира NF- κ B у хепатоцитима и накнадно повећава експресију цитокина урођене имуности (TNF- α) у хепатоцитима (295) изазивајући повећано оштећење јетре.

Коначно, подаци из ове студије указују да повећана експресија галектина-3 у јетрама које су инфициране MCMV-ом је удружена са смањеним титром вируса, штити хепатоците од апоптозе и некроптозе које су зависне од TNF- α , и накнадно атенуира оштећење јетре у хепатитису који је индукован MCMV-ом. Ови налази у комбинацији са смањеним оштећењем јетре изазваним MCMV-ом након третмана рекомбинантним галектином-3

указују на заштитну улогу галектина-3 у оштећењу јетре које је индуковано MCMV-ом, што може бити терапијски битно.

Схема 6

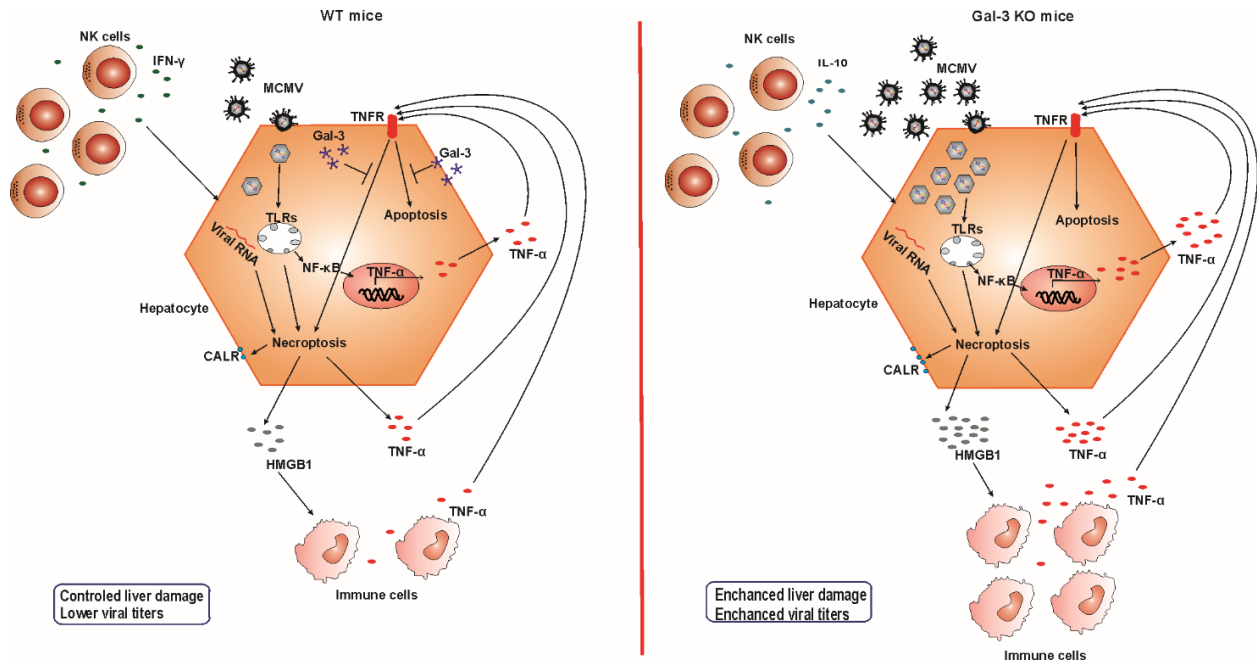


Схема 6. Улога галектина-3 у хепатитису који је индукован MCMV-ом. У присуству галектина-3 (леви панел) NK ћелије које инфилтришу јетру садрже IFN- γ и имају улогу у клиренсу вируса. MCMV у хепатоцитима индукује апоптозу и некроптозу, мембранску експресију калретикulina (CALR), ослобађање про-инфламацијског молекула HMGB-1 и продукцију TNF- α . TNF- α се везује за TNFR и додатно стимулише апоптозу, али интрацелуларни галектин-3 штити хепатоците од ћелијске смрти. Резултат је контролисано оштећење јетре и нижи вирусни титри. Код Gal-3 KO мишева (десни панел) NK ћелије које садрже више IL-10 су слабије у контроли вируса, што изазива повећану апоптозу и некроптозу које су индуковане вирусом. Повећана смрт хепатоцита Gal-3 KO мишева је удружена са већом експресијом CALR и ослобађањем HMGB1 који стимулише продукцију TNF- α у CD11c+ ћелијама. Више MCMV у хепатоцитима Gal-3 KO мишева индукује већу продукцију TNF- α која је посредована NF- κ B која затим повећава апоптозу хепатоцита, а у одсуству заштитног ефекта галектина-3 индукује теже оштећење јетре код Gal-3 KO мишева.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Галектин-3 утиче на развој имунског одговора на МСМV, па тако слезине инфицираних C57BL/6 мишева са делецијом гена за Gal-3 садрже мањи проценат инфламацијских мијелоидних ћелија, а након елиминације вируса, 11 дана после инфекције, садрже већи проценат инфламацијских NK ћелија што је удружено са прекидом атенуације ЕАЕ изазваног имунизацијом пептидом MOG₃₅₋₅₅. Галектин-3 штити хепатоците од апоптозе и некроптозе које изазива МСМV посредством TNF- α и тако смањује оштећење јетре изазвано инфекцијом цитомегаловирусом.

Закључци су изведени на основу следећих резултата:

1. Слезине Gal-3 KO мишева садрже мањи проценат дендритских ћелија (CD11c+ и CD11c+CD11b+) и активираних макрофага (F4/80+CD86+, F4/80+MHCII+, F4/80+CD40+), а након елиминације вируса, 11 дана после инфекције садрже већи проценат инфламацијских (IFN- γ + и IL-17+) NK и NKT ћелија.
2. МСМV инфекција повећава проценат инфламацијских ефекторско-меморијских (IFN- γ +CD4+CD28-) лимфоцита у периферној крви Gal-3 KO мишева инфицираних цитомегаловирусом и имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.
3. Инфекција цитомегаловирусом укида атенуацију ЕАЕ код Gal-3 KO мишева па они након имунизације пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције цитомегаловирусом развијају болест сличну оној коју развијају неинфицирани имунизовани C57BL/6 WT мишеви.
4. МСМV инфекција смањује проценат и број проинфламацијских CD4+ Т лимфоцита у мозгу WT и Gal-3 KO мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.
5. Дефицијенција галектина-3 је удружена са повећањем процента и броја проинфламацијских CD8+ Т лимфоцита и смањењем процента и броја антиинфламацијских CD8+ Т лимфоцита у мозгу инфицираних мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅.
6. Дефицијенција галектина-3 је удружена са повећањем процента дендритских ћелија, макрофага, микроглије и повећањем класичне активације макрофага у мозгу мишева имунизованих пептидом MOG₃₅₋₅₅ након инфекције МСМV-ом.

7. Дефицијенција галектина-3 је удружена са већим оштећењем јетре изазваним МСМV инфекцијом, судећи према вредностима хистолошког скорa и биохемијских параметара и већим титром вируса.
8. Веће оштећење јетре инфицираних Gal-3 КО мишева није последица веће активности NK ћелија. Јетре инфицираних C57BL/6 WT мишева садрже већи проценат и број NK ћелија и инфламацијских IFN- γ + NK ћелија и мањи титар вируса. Већа инфламација у јетри Gal-3 КО мишева је присутна и у случају инфекције МСМV Δ m157 вирусом који не активира NK ћелије.
9. У јетрама Gal-3 КО мишеви инфицираних МСМV-ом је већа експресија TNF- α , присутно је више апоптотских и некроптотских хепатоцита, а блокада TNF- α значајно смањује оштећење јетре Gal-3 КО мишева изазвано МСМV-ом.
10. Примена егзогеног галектина-3 ублажава оштећење јетре Gal-3 КО мишева изазвано МСМV инфекцијом, а примена инхибитора галектина-3 значајно повећава некрозу јетре WT мишева након инфекције МСМV-ом.

7. Референце:

1. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics*. 2003;98(3):269-97.
2. Cinque P, Marenzi R, Ceresa D. Cytomegalovirus infections of the nervous system. *Intervirology*. 1997;40(2-3):85-97.
3. Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. *International journal of hematology*. 2010;91(4):588-95.
4. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;46 Suppl 4:S6-10.
5. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):76-98, Table of Contents.
6. Bale JF, Jr., Blackman JA, Sato Y. Outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Journal of child neurology*. 1990;5(2):131-6.
7. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus research*. 2006;117(1):90-104.
8. Boyle KA, Pietropaolo RL, Compton T. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(5):3607-13.
9. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. 1996;39(5-6):401-12.
10. Wille PT, Wisner TW, Ryckman B, Johnson DC. Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *mBio*. 2013;4(3):e00332-13.
11. Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of virology*. 2006;80(2):710-22.
12. Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *Journal of virology*. 2009;83(8):3891-903.
13. Boehmer PE, Nimonkar AV. Herpes virus replication. *IUBMB life*. 2003;55(1):13-22.

14. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(5):1673-80.
15. Steiner I, Kennedy PG. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. *Journal of neurovirology*. 1995;1(1):19-29.
16. Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *Journal of internal medicine*. 2006;259(3):219-46.
17. Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *The Journal of general virology*. 1996;77 (Pt 12):3099-102.
18. Brune W. Molecular Basis of Cytomegalovirus Host Species Specificity, in: M.J. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*, Caister Academic Press, Germany, 2013, pp. 322-329.
19. Smith LM, McWhorter AR, Masters LL, Shellam GR, Redwood AJ. Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus. *Journal of virology*. 2008;82(13):6689-96.
20. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology*. 2004;78(15):7867-73.
21. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(12):4746-56.
22. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *Journal of virology*. 1995;69(8):4792-6.
23. Lin Q, Dong C, Cooper MD. Impairment of T and B cell development by treatment with a type I interferon. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(1):79-87.
24. McNally JM, Zarozinski CC, Lin MY, Brehm MA, Chen HD, Welsh RM. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *Journal of virology*. 2001;75(13):5965-76.
25. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1983;131(3):1531-8.

26. Shellam GR, Allan JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(8):5104-8.
27. Iversen AC, Norris PS, Ware CF, Benedict CA. Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(11):7568-74.
28. Loewendorf A, Benedict CA. Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *Journal of internal medicine*. 2010;267(5):483-501.
29. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 2002;296(5571):1323-6.
30. Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, Zucchini N, Rupp B, Ruzsics Z, et al. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS pathogens*. 2007;3(8):e123.
31. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, Wikstrom ME, Khong A, Voigt V, et al. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(6):1333-43.
32. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*. 2006;7(2):131-7.
33. Andrews DM, Andoniou CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nature immunology*. 2001;2(11):1077-84.
34. Hamilton ST, Scott GM, Naing Z, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus directly modulates expression of chemokine CCL2 (MCP-1) during viral replication. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 11):2495-503.
35. Noda S, Aguirre SA, Bitmansour A, Brown JM, Sparer TE, Huang J, et al. Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood*. 2006;107(1):30-8.
36. Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(5):1713-7.
37. Bratcher DF, Bourne N, Bravo FJ, Schleiss MR, Slaoui M, Myers MG, et al. Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *The Journal of infectious diseases*. 1995;172(4):944-50.

38. Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *Journal of virology*. 1990;64(3):1079-85.
39. Potzsch S, Spindler N, Wieggers AK, Fisch T, Rucker P, Sticht H, et al. B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS pathogens*. 2011;7(8):e1002172.
40. Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, Prober CG. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *The Journal of pediatrics*. 1981;98(2):281-7.
41. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama*. 1986;256(14):1904-8.
42. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(1):9-20.
43. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, Luccaronin P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(6):1047-54.
44. Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of virology*. 1984;52(1):119-28.
45. Jonjic S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(4):1199-212.
46. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, van Dommelen S, Shellam GR, Hill AB. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity*. 2008;29(4):650-9.
47. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature*. 1994;369(6482):652-4.
48. Jonjic S, Pavic I, Lucin P, Rukavina D, Koszinowski UH. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *Journal of virology*. 1990;64(11):5457-64.
49. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunologic research*. 2012;54(1-3):140-51.

50. S. Vidal AK, M. Pyzik, S. Jonjić. Innate Immunity to Cytomegalovirus in the Murine Model, in: M.J. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention* Caister Academic Press, Germany, 2013, pp. 192-214.
51. Park B, Oh H, Lee S, Song Y, Shin J, Sung YC, et al. The MHC class I homolog of human cytomegalovirus is resistant to down-regulation mediated by the unique short region protein (US)2, US3, US6, and US11 gene products. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(7):3464-9.
52. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus research*. 2011;157(2):151-60.
53. Mocarski ES, Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends in microbiology*. 2002;10(7):332-9.
54. Lehner PJ, Wilkinson GW. Cytomegalovirus: from evasion to suppression? *Nature immunology*. 2001;2(11):993-4.
55. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(33):20807-10.
56. Drickamer K, Taylor ME. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology*. 1993;9:237-64.
57. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):209-31.
58. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):433-40.
59. Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian journal of immunology*. 2007;66(2-3):143-58.
60. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(1):29-41.
61. Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai K, Wada Y, et al. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;361(2):195-201.
62. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1572(2-3):232-54.

63. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, et al. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(15):10109-23.
64. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:158-82.
65. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1673(1-2):75-93.
66. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):441-9.
67. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001;83(7):667-76.
68. Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1999;32(4):383-93.
69. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in immunology*. 2002;23(6):313-20.
70. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
71. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(35):26712-8.
72. Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(46):36311-5.
73. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, et al. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(35):26704-11.
74. Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS, et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer research*. 1999;59(24):6239-45.

75. Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *European journal of biochemistry*. 1999;264(2):569-76.
76. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):527-35.
77. Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1379(1):97-106.
78. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(21):13047-52.
79. Dunic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1760(4):616-35.
80. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2005;65(16):7292-300.
81. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *The American journal of pathology*. 1995;147(4):1016-28.
82. Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(1):493-502.
83. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(3):731-8.
84. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(13):6737-42.
85. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(4):1213-7.

86. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(3):788-91.
87. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(4):2156-64.
88. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *The Journal of pathology*. 1996;179(1):43-8.
89. Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug news & perspectives*. 2007;20(7):455-60.
90. Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *The American journal of pathology*. 2008;172(2):395-405.
91. Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood*. 1998;91(9):3430-8.
92. Fernandez GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gomez SA, Beigier Bompadre M, et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology*. 2005;15(5):519-27.
93. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):1073-83.
94. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(3):389-97.
95. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(4):2650-8.
96. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, et al. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(4):2781-9.
97. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(10):3939-44.

98. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(4):1813-22.
99. Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;154(7):3479-87.
100. Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry*. 1993;32(30):7644-9.
101. Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(3):573-83.
102. Vray B, Camby I, Vercruyse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology*. 2004;14(7):647-57.
103. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(2):1167-73.
104. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infection and immunity*. 2007;75(11):5148-57.
105. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2009;130(1):83-8.
106. Chen SS, Sun LW, Brickner H, Sun PQ. Downregulating galectin-3 inhibits proinflammatory cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells via RNA interference. *Cellular immunology*. 2015;294(1):44-53.
107. Fermin Lee A, Chen HY, Wan L, Wu SY, Yu JS, Huang AC, et al. Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines. *The American journal of pathology*. 2013;183(4):1209-22.
108. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, et al. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The American journal of pathology*. 2004;165(6):2045-53.

109. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer research*. 2003;63(23):8302-11.
110. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(4):555-64.
111. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunological reviews*. 2009;230(1):114-27.
112. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD, Rabinovich GA. Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: galectins and glycans in innate immunity. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(1):10-21.
113. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(7-9):583-91.
114. van den Berg TK, Honing H, Franke N, van Remoortere A, Schiphorst WE, Liu FT, et al. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(3):1902-7.
115. John CM, Jarvis GA, Swanson KV, Leffler H, Cooper MD, Huflejt ME, et al. Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected. *Cellular microbiology*. 2002;4(10):649-62.
116. Pelletier I, Sato S. Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(20):17663-70.
117. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, et al. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology*. 2007;170(2):546-56.
118. Quattroni P, Li Y, Lucchesi D, Lucas S, Hood DW, Herrmann M, et al. Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. *Cellular microbiology*. 2012;14(11):1657-75.
119. Kleshchenko YY, Moody TN, Furtak VA, Ochieng J, Lima MF, Villalta F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infection and immunity*. 2004;72(11):6717-21.

120. Woodward AM, Mauris J, Argueso P. Binding of transmembrane mucins to galectin-3 limits herpesvirus 1 infection of human corneal keratinocytes. *Journal of virology*. 2013;87(10):5841-7.
121. Ruas LP, Bernardes ES, Fermino ML, de Oliveira LL, Hsu DK, Liu FT, et al. Lack of galectin-3 drives response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-biased immunity. *PLoS one*. 2009;4(2):e4519.
122. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunologic research*. 2012;52(1-2):100-10.
123. Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(7):4718-26.
124. Garcin PO, Nabi IR, Pante N. Galectin-3 plays a role in minute virus of mice infection. *Virology*. 2015;481:63-72.
125. Wang SF, Tsao CH, Lin YT, Hsu DK, Chiang ML, Lo CH, et al. Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. *Glycobiology*. 2014;24(11):1022-35.
126. James RE, Hillis J, Adorjan I, Gratton B, Mundim MV, Iqbal AJ, et al. Loss of galectin-3 decreases the number of immune cells in the subventricular zone and restores proliferation in a viral model of multiple sclerosis. *Glia*. 2016;64(1):105-21.
127. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(6):1954-64.
128. Forsman H, Islander U, Andreasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlstrom A, et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(2):445-54.
129. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Scipioni A, Sansoni V, Cordone S, et al. Accelerated lipid-induced atherogenesis in galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(6):831-6.
130. Arsenijevic A, Milovanovic M, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, et al. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Scientific reports*. 2016;6:23348.
131. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2008;38(11):1098-111.

132. Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripa B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer science*. 2009;100(11):2077-84.
133. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(13):5060-5.
134. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*. 1999;81(4):519-26.
135. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2015;21:453-65.
136. Pesheva P, Kuklinski S, Schmitz B, Probstmeier R. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *Journal of neuroscience research*. 1998;54(5):639-54.
137. Comte I, Kim Y, Young CC, van der Harg JM, Hockberger P, Bolam PJ, et al. Galectin-3 maintains cell motility from the subventricular zone to the olfactory bulb. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 14):2438-47.
138. Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, Dempsey RJ. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain research*. 2009;1288:116-24.
139. Pasquini LA, Millet V, Hoyos HC, Giannoni JP, Croci DO, Marder M, et al. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. *Cell death and differentiation*. 2011;18(11):1746-56.
140. Reichert F, Rotshenker S. Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. *Experimental neurology*. 1999;160(2):508-14.
141. Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, Garcia-Quintanilla A, Kavanagh E, et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell reports*. 2015.
142. Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu FT, et al. Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior*. 2012;2(5):563-75.

143. Mok SW, Riemer C, Madela K, Hsu DK, Liu FT, Gultner S, et al. Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;359(3):672-8.
144. Bellac CL, Coimbra RS, Simon F, Imboden H, Leib SL. Gene and protein expression of galectin-3 and galectin-9 in experimental pneumococcal meningitis. *Neurobiology of disease*. 2007;28(2):175-83.
145. Jin JK, Na YJ, Song JH, Joo HG, Kim S, Kim JI, et al. Galectin-3 expression is correlated with abnormal prion protein accumulation in murine scrapie. *Neuroscience letters*. 2007;420(2):138-43.
146. Jaquenod De Giusti C, Alberdi L, Frik J, Ferrer MF, Scharrig E, Schattner M, et al. Galectin-3 is upregulated in activated glia during Junin virus-induced murine encephalitis. *Neuroscience letters*. 2011;501(3):163-6.
147. Kobayashi K, Niwa M, Hoshi M, Saito K, Hisamatsu K, Hatano Y, et al. Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation. *Neuroscience letters*. 2015;592:107-12.
148. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.
149. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(3):115-21.
150. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Seminars in immunology*. 2009;21(6):328-33.
151. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological reviews*. 2012;248(1):87-103.
152. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2010;6(3):156-66.
153. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2010;9(6):599-612.
154. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Jama*. 2001;286(24):3083-8.
155. Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, Shoenfeld Y. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1108:567-77.

156. Fleming JO, Isaak A, Lee JE, Luzzio CC, Carrithers MD, Cook TD, et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2011;17(6):743-54.
157. Aharoni R. New findings and old controversies in the research of multiple sclerosis and its model experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(5):423-40.
158. Hawker K. Progressive multiple sclerosis: characteristics and management. *Neurologic clinics*. 2011;29(2):423-34.
159. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* (London, England). 1972;1(7762):1240-1.
160. Miljkovic D, Spasojevic I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(18):2286-334.
161. Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS letters*. 2011;585(23):3747-57.
162. Hoglund RA, Maghazachi AA. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World journal of experimental medicine*. 2014;4(3):27-37.
163. Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology*. 2008;38(10):2636-49.
164. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine*. 2007;13(4):423-31.
165. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 12):3329-41.
166. Matusевич D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 1999;5(2):101-4.
167. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(3):393-404.

168. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 5):1175-89.
169. Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hunig T, et al. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss. *The American journal of pathology*. 2009;175(3):1160-6.
170. Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(6):3056-9.
171. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature reviews Neurology*. 2012;8(11):613-23.
172. Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American journal of pathology*. 1988;130(3):443-54.
173. Link H, Laurenzi MA. Immunoglobulin class and light chain type of oligoclonal bands in CSF in multiple sclerosis determined by agarose gel electrophoresis and immunofixation. *Annals of neurology*. 1979;6(2):107-10.
174. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2008;358(7):676-88.
175. Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS letters*. 2011;585(23):3715-23.
176. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1079-106.
177. Krishnamoorthy G, Wekerle H. EAE: an immunologist's magic eye. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2031-5.
178. Libbey JE, Fujinami RS. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine*. 2011;29(17):3356-62.
179. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 8):1953-71.

180. Bettelli E, Baeten D, Jager A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(9):2393-402.
181. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2011;31(12):907-16.
182. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(4):641-51.
183. Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 2001;14(5):547-60.
184. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67 Suppl 3:iii56-60.
185. Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006;84(7):532-43.
186. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols*. 2006;1(4):1810-9.
187. Adelman M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, et al. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of neuroimmunology*. 1995;63(1):17-27.
188. Shin T, Ahn M, Matsumoto Y. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anatomy & cell biology*. 2012;45(3):141-8.
189. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet (London, England)*. 1987;1(8538):893-5.
190. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(1):5-7.

191. Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, et al. The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine*. 2007;40(1):35-43.
192. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(4):1023-34.
193. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology*. 2011;12(6):568-75.
194. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
195. Weiss HA, Millward JM, Owens T. CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology*. 2007;191(1-2):79-85.
196. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(12):7579-87.
197. Chen ML, Yan BS, Kozoriz D, Weiner HL. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *European journal of immunology*. 2009;39(12):3423-35.
198. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(13):2921-37.
199. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):332-8.
200. Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *European journal of immunology*. 1999;29(11):3432-9.
201. Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, et al. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15434-9.

202. Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nature immunology*. 2001;2(9):797-801.
203. Enouz S, Carrie L, Merkler D, Bevan MJ, Zehn D. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(10):1769-79.
204. Fujinami RS, Oldstone MB, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(8):2346-50.
205. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology*. 2002;3(10):940-3.
206. Hart BA, Hintzen RQ, Laman JD. Multiple sclerosis - a response-to-damage model. *Trends in molecular medicine*. 2009;15(6):235-44.
207. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *BioMed research international*. 2014;2014:472978.
208. Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Kinkel PR. Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease. *Journal of autoimmunity*. 1999;13(1):11-20.
209. Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature medicine*. 1997;3(10):1133-6.
210. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *Journal of infection in developing countries*. 2011;5(10):679-87.
211. Zheng MM, Zhang XH. Cross-reactivity between human cytomegalovirus peptide 981-1003 and myelin oligodendroglia glycoprotein peptide 35-55 in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;443(3):1118-23.
212. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(1):80-94.
213. Sanadgol N, Ramroodi N, Ahmadi GA, Komijani M, Moghtaderi A, Bouzari M, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian

patients with different subtypes of multiple sclerosis. *The new microbiologica*. 2011;34(3):263-74.

214. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamano-Blanco M, et al. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One*. 2013;8(1):e53996.

215. Zivadinov R, Chin J, Horakova D, Bergsland N, Weinstock-Guttman B, Tamano-Blanco M, et al. Humoral responses to herpesviruses are associated with neurodegeneration after a demyelinating event: results from the multi-center set study. *Journal of neuroimmunology*. 2014;273(1-2):58-64.

216. Pirko I, Cardin R, Chen Y, Lohrey AK, Lindquist DM, Dunn RS, et al. CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(2):e32767.

217. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, et al. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurological research*. 2006;28(3):262-9.

218. Sundqvist E, Bergstrom T, Daialhosein H, Nystrom M, Sundstrom P, Hillert J, et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2014;20(2):165-73.

219. Mocarski J, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. *Fields Virology*. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. Cytomegaloviruses; pp. 1960–2014. 2013.

220. Livingston-Rosanoff D, Daley-Bauer LP, Garcia A, McCormick AL, Huang J, Mocarski ES. Antiviral T cell response triggers cytomegalovirus hepatitis in mice. *Journal of virology*. 2012;86(23):12879-90.

221. Lai MW, Chang MH, Lee CY, Hsu HC, Kau CL. Cytomegalovirus-associated neonatal hepatitis. *Zhonghua Minguo xiao er ke yi xue hui za zhi [Journal] Zhonghua Minguo xiao er ke yi xue hui*. 1992;33(4):264-72.

222. Bronsther O, Makowka L, Jaffe R, Demetris AJ, Breinig MK, Ho M, et al. Occurrence of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients. *Journal of medical virology*. 1988;24(4):423-34.

223. Bonacini M. Hepatobiliary complications in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American journal of medicine*. 1992;92(4):404-11.

224. Jones CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2003;33(3):70-93.

225. Hart MH, Kaufman SS, Vanderhoof JA, Erdman S, Linder J, Markin RS, et al. Neonatal hepatitis and extrahepatic biliary atresia associated with cytomegalovirus infection in twins. *American journal of diseases of children* (1960). 1991;145(3):302-5.
226. Shanley JD, Biczak L, Forman SJ. Acute murine cytomegalovirus infection induces lethal hepatitis. *The Journal of infectious diseases*. 1993;167(2):264-9.
227. Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Biron CA. Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection. *Journal of virology*. 1997;71(12):9248-58.
228. Jonjic S BI, Krmpotic A. Innate immunity to cytomegaloviruses. In: Reddehase MJ (ed) *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, 2006, pp 285–319.
229. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(2):133-46.
230. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2005;174(8):4465-9.
231. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Current opinion in immunology*. 2003;15(1):45-51.
232. Bancroft GJ, Shellam GR, Chalmer JE. Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1981;126(3):988-94.
233. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8826-31.
234. Bubic I, Wagner M, Krmpotic A, Saulig T, Kim S, Yokoyama WM, et al. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *Journal of virology*. 2004;78(14):7536-44.
235. Scalzo AA, Yokoyama WM. Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;321:101-22.
236. Kadri N, Wagner AK, Ganesan S, Karre K, Wickstrom S, Johansson MH, et al. Dynamic Regulation of NK Cell Responsiveness. *Current topics in microbiology and immunology*. 2016;395:95-114.

237. Tay CH, Welsh RM. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *Journal of virology*. 1997;71(1):267-75.
238. Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(10):2235-51.
239. Crane MJ, Hokeness-Antonelli KL, Salazar-Mather TP. Regulation of inflammatory monocyte/macrophage recruitment from the bone marrow during murine cytomegalovirus infection: role for type I interferons in localized induction of CCR2 ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(4):2810-7.
240. Saederup N, Lin YC, Dairaghi DJ, Schall TJ, Mocarski ES. Cytomegalovirus-encoded beta chemokine promotes monocyte-associated viremia in the host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10881-6.
241. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(3):1549-56.
242. Daley-Bauer LP, Wynn GM, Mocarski ES. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity*. 2012;37(1):122-33.
243. Sumaria N, van Dommelen SL, Andoniou CE, Smyth MJ, Scalzo AA, Degli-Esposti MA. The roles of interferon-gamma and perforin in antiviral immunity in mice that differ in genetically determined NK-cell-mediated antiviral activity. *Immunology and cell biology*. 2009;87(7):559-66.
244. Yang W, Ding X, Deng J, Lu Y, Matsuda Z, Thiel A, et al. Interferon-gamma negatively regulates Th17-mediated immunopathology during mouse hepatitis virus infection. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2011;89(4):399-409.
245. Lucin P, Pavic I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *Journal of virology*. 1992;66(4):1977-84.
246. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):45-65.
247. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2006;290(4):G583-9.

248. Trgovcich J P-PE, Tomac J, Koszinowski UH, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus in neonatal mice. In: Scholz M, Rabenau F, Doerr W, Cinatl J Jr (eds) *Monographs in Virology*, vol. 21: CMV-related immunopathology. Karger, Basel, 1998, pp 42–53.
249. Seleme MC, Kosmac K, Jonjic S, Britt WJ. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. *Journal of virology*. 2017;91(8).
250. Tang-Feldman YJ, Wojtowicz A, Lochhead GR, Hale MA, Li Y, Pomeroy C. Use of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to measure cytokine transcription and viral load in murine cytomegalovirus infection. *Journal of virological methods*. 2006;131(2):122-9.
251. Shanley JD, Goff E, Debs RJ, Forman SJ. The role of tumor necrosis factor-alpha in acute murine cytomegalovirus infection in BALB/c mice. *The Journal of infectious diseases*. 1994;169(5):1088-91.
252. Alberts B JA, 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; pp263-328.
253. Alberts B JA, 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; pp501-578.
254. CM. S. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14:32.
255. A. R. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510.
256. Gritzmacher CA, Mehl VS, Liu FT. Genomic cloning of the gene for an IgE-binding lectin reveals unusual utilization of 5' untranslated regions. *Biochemistry*. 1992;31(40):9533-8.
257. Chiossone L, Audonnet S, Chetaille B, Chasson L, Farnarier C, Berda-Haddad Y, et al. Protection from inflammatory organ damage in a murine model of hemophagocytic lymphohistiocytosis using treatment with IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*. 2012;3:239.
258. Wraith DC, Pope R, Butzkueven H, Holder H, Vanderplank P, Lowrey P, et al. A role for galanin in human and experimental inflammatory demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(36):15466-71.

259. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, Kvestak D, Arsenijevic A, Stojanovic B, et al. Murine Cytomegalovirus Infection Induces Susceptibility to EAE in Resistant BALB/c Mice. *Frontiers in immunology*. 2017;8:192.
260. Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(4):2764-71.
261. Apte RS, Niederkorn JY, Mayhew E, Alizadeh H. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2001;119(12):1805-9.
262. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):107-24.
263. Hofmeyer KA, Jeon H, Zang X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:451694.
264. Maron R, Hancock WW, Slavin A, Hattori M, Kuchroo V, Weiner HL. Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *International immunology*. 1999;11(9):1573-80.
265. Vanheusden M, Broux B, Welten SPM, Peeters LM, Panagioti E, Van Wijmeersch B, et al. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Scientific reports*. 2017;7(1):663.
266. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes*. 2013;62(6):1932-44.
267. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, et al. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clinical & experimental metastasis*. 2011;28(5):451-62.
268. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *European journal of immunology*. 2015;45(2):531-43.
269. Upton JW, Kaiser WJ. DAI Another Way: Necroptotic Control of Viral Infection. *Cell host & microbe*. 2017;21(3):290-3.

270. Zheng Q, Zhu YY, Chen J, Ye YB, Li JY, Liu YR, et al. Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clinical and experimental immunology*. 2015;180(3):499-508.
271. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(10):700-14.
272. ten Oever J, Giamarellos-Bourboulis EJ, van de Veerdonk FL, Stelma FF, Simon A, Janssen M, et al. Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2013;32(12):1605-10.
273. Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, Jurisevic M, Mijailovic Z, Maric V, et al. Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Disease markers*. 2017;2017:6275987.
274. 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. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;85:58-70.
275. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science*. 2001;292(5518):934-7.
276. Lee SH, Girard S, Macina D, Busa M, Zafer A, Belouchi A, et al. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics*. 2001;28(1):42-5.
277. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(8):4279-87.
278. Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, et al. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(3):841-8.
279. Bluml S, Scheinecker C, Smolen JS, Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *International immunology*. 2012;24(5):275-81.
280. Yoshigai E, Hara T, Inaba H, Hashimoto I, Tanaka Y, Kaibori M, et al. Interleukin-1beta induces tumor necrosis factor-alpha secretion from rat hepatocytes. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2014;44(5):571-83.

281. Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, et al. Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;180(9):5799-803.
282. Crane MJ, Gaddi PJ, Salazar-Mather TP. UNC93B1 mediates innate inflammation and antiviral defense in the liver during acute murine cytomegalovirus infection. *PLoS One*. 2012;7(6):e39161.
283. Ehling C, Trilling M, Tiedje C, Le-Trilling VTK, Albrecht U, Kluge S, et al. MAPKAP kinase 2 regulates IL-10 expression and prevents formation of intrahepatic myeloid cell aggregates during cytomegalovirus infections. *Journal of hepatology*. 2016;64(2):380-9.
284. Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, et al. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(1):705-12.
285. Shimonishi T, Miyazaki K, Kono N, Sabit H, Tuneyama K, Harada K, et al. Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human pathology*. 2001;32(3):302-10.
286. Okamoto M, Hidaka A, Toyama M, Baba M. Galectin-3 is involved in HIV-1 expression through NF-kappaB activation and associated with Tat in latently infected cells. *Virus research*. 2019;260:86-93.
287. Shi Y, He B, Kuchenbecker KM, You L, Xu Z, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *International journal of cancer*. 2007;121(6):1175-81.
288. Cheng YL, Huang WC, Chen CL, Tsai CC, Wang CY, Chiu WH, et al. Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;412(2):334-40.
289. Xu Y, Gu X, Gong M, Guo G, Han K, An R. Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. *Cancer biology & therapy*. 2013;14(10):897-906.
290. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(10):4395-406.
291. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, et al. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer research*. 2005;65(17):7546-53.

292. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014;3(9):e955691.
293. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.
294. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science translational medicine*. 2010;2(63):63ra94.
295. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(3):301-15.